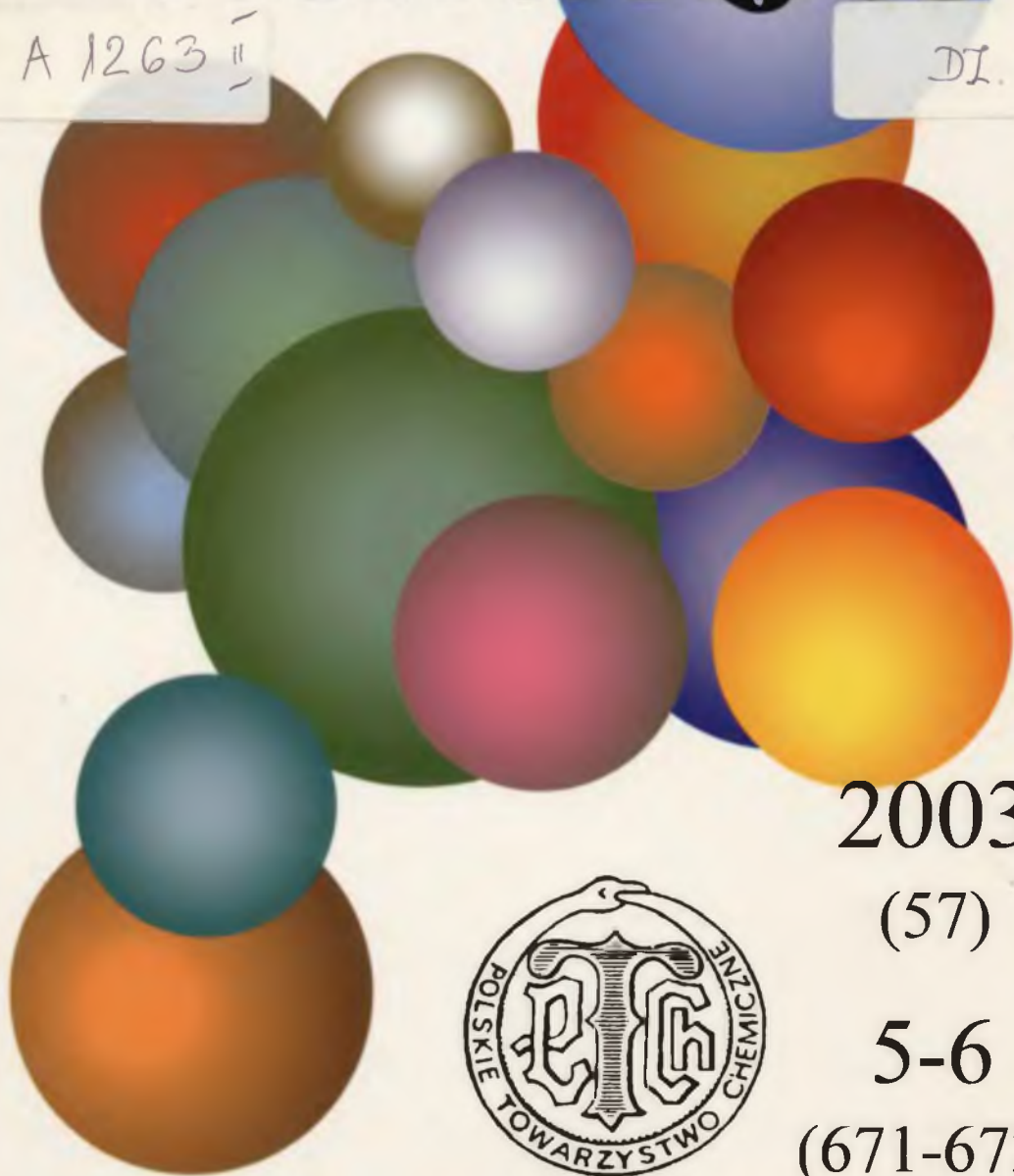


WIADOMOŚCI *chemiczne*

A 1263 II

DI. 3



2003

(57)

5-6

(671-672)

CZASOPISMO POLSKIEGO TOWARZYSTWA CHEMICZNEGO

Publikacja dotowana przez KBN

RADA REDAKCYJNA

RYSZARD ADAMIAK, JERZY BŁAŻEJOWSKI, RYSZARD BODALSKI,
JACEK GAWROŃSKI, ZBIGNIEW HUBICKI, JERZY KONARSKI,
TADEUSZ M. KRYGOWSKI, JANUSZ LIPKOWSKI, JACEK MŁOCHOWSKI,
PIOTR PANIETTI, STANISŁAW SŁOMKOWSKI, ZOFIA STASICKA

Z REDAKCJĄ STAŁE WSPÓŁPRACUJĄ

HENRYK GALINA (Rzeszów), MAREK K. KALINOWSKI (Warszawa),
BENIAMIN LENARCIK (Bydgoszcz), ZOFIA LIBUŚ (Gdańsk), JAN MALYSZKO (Kielce),
BOGDAN MARCINIĘC (Poznań), ZOFIA MICHAŁSKA (Łódź),
ROMAN MIERZECKI (Warszawa), WŁADYSŁAW RUDZIŃSKI (Lublin),
ZOFIA STASICKA (Kraków), JAN SZYMANOWSKI (Poznań), JÓZEF ŚLIWIOK (Katowice)

KOMITET REDAKCYJNY

BOGDAN BURCZYK, JERZY P. HAWRANEK, ADAM JEZIEŃSKI, ADOLF KISZA,
LUDWIK KOMOROWSKI, ZDZISŁAW LATAJKA, PRZEMYSŁAW MASTALERZ,
IGNACY Z. SIEMION, MIROSLAW SOROKA, MARIA SUSZYŃSKA

REDAKTOR NACZELNY

JÓZEF J. ZIÓŁKOWSKI

SEKRETARZ REDAKCJI

KRYSTYNA MARKSOWA

Korespondencję należy kierować pod adresem:

Redakcja „Wiadomości Chemicznych”
ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław
tel. 375 73 89, tel./fax 322 14 06

INTERNET (English abstracts) <http://www.chem.uni.wroc.pl/wiadchem.htm>

© Copyright by Redakcja „Wiadomości Chemicznych”, Wrocław 2002

ISSN 0043-5104

Maszynopis niniejszego numeru przekazano Wydawcy w maju 2003

Przygotowanie do druku i druk: Firma Wydawnicza K-2, ul. Konopnickiej 6, 00-491 Warszawa, tel./fax: (22) 628-97-66

**ZASTOSOWANIA SPEKTROSKOPII
MAGNETYCZNEGO REZONANSU JĄDROWEGO
W BADANIACH STRUKTURALNYCH
WEGLOWODANÓW I ICH POCHODNYCH**

**NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE SPECTROSCOPY
APPLICATIONS IN STRUCTURE DETERMINATION
OF CARBOHYDRATES AND THEIR DERIVATIVES**

Sławomir Kaźmierski

*Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk
ul. Sienkiewicza 112, 90-363 Łódź
e-mail: kaslawek@bilbo.cbmm.lodz.pl*

Abstract

Wprowadzenie

1. Wyznaczanie struktury pierwszorzędowej

1.1. Reguły empiryczne

1.2. Metody

1.2.1. Wyznaczanie rodzaju oraz liczby reszt cukrowych

1.2.2. Ustalanie konfiguracji anomerycznej

1.2.3. Wyznaczanie skwencji reszt cukrowych

3. Badanie struktury trójwymiarowej

Podsumowanie

Przykładowe dane eksperymentalne

Piśmiennictwo cytowane



Dr Sławomir Kaźmierski jest absolwentem Politechniki Łódzkiej. W roku 1990 ukończył studia na Wydziale Chemicznym (specjalizacja: analiza śladowa) i podjął pracę w Pracowni NMR Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN w Łodzi. W latach 1996–2001 wykonywał pracę doktorską pt.: „Struktura i dynamika analogów cukrowych na podstawie spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego”. Po uzyskaniu stopnia doktora odbył roczny staż pracując w grupie prof. Daniela Cenneta w Laboratorium Metodologii NMR przy uniwersytecie H. Poincaré w Nancy (*Laboratoire de Metodologie RMN, Université H. Poincaré, Nancy, France*).

gie RMN, Université H. Poincaré, Nancy, France).

ABSTRACT

Carbohydrates play a very important role in biological systems. Both carbohydrates and their derivatives are involved in many biological processes, such as cell-cell recognition, cell growth and energy transfer. In spite of very high importance in living processes, carbohydrates remain one of the less exploited class of biologically active molecules.

There is a lot of different methods which can be used in carbohydrates analysis [1]. The Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy is one of the most attractive, important and powerful tool for analyzing the conformation and molecular architecture of carbohydrate molecules. This method serves the possibility of solving the majority of problems in this area, without any different methods – particularly in the liquid phase. The biggest advantage of NMR spectroscopy is that it is a nondestructive method. Both one- and two-dimensional NMR methods have provided valuable information about small and large molecules, ranging from the anomeric configuration of a monosaccharide to the sequence of monosaccharide residues in a bigger oligo- or polysaccharide compounds. After first years of applications mainly in primary carbohydrate structures, NMR spectroscopy has recently reached a level of sophistication, which allows structural and conformational analysis of carbohydrates in solution. This article reviews the applications and possibilities of current NMR techniques to the structural and conformational characterization of carbohydrates and their derivatives. Both 1D and 2D (COSY, HSQC, HSQC-TOCSY, HMBC) NMR spectra of the GOTCAB saponin **1** are presented as examples of application of NMR in the structure elucidation of the carbohydrate derivatives.

WPROWADZENIE

Monosacharydy są typowym reprezentantem niskocząsteczkowych związków organicznych a ich struktura może być łatwo określona przy użyciu standardowych, jednowymiarowych (1D) technik NMR. Odmienną sytuację i skalę trudności napotyka spektroskopia NMR w przypadku badań oligo- i polisacharydów. Ogromna liczba parametrów definiujących pierwszorzędową strukturę oligosacharydów – typ pierścienia cukrowego, występowanie anomerów, różnice w konformacji pierścienia, miejsce wiązania glikozydowego – prowadzi do niemal nieskończonej ilości kombinacji, nawet w przypadkach cząsteczek średniej wielkości. Ponadto, rozwiązanie drugorzędowej, trójwymiarowej struktury złożonych połączeń cukrowych, wciąż stanowi duże wyzwanie dla badań strukturalnych.

Kompletna charakterystyka strukturalna złożonych cząsteczek cukrowych, wymaga dokładnego określenia:

1. rodzaju, liczby i sekwencji pierścieni cukrowych obecnych w badanej cząsteczce, włączając w to określenie ewentualnych miejsc rozgałęzienia łańcucha (poli-) sacharydowego i miejsca przyłączenia innych, niewęglowodanowych podstawników,
2. struktury trójwymiarowej, charakteryzowanej przez:
 - konformację pierścienia (pierścieni) cukrowego,
 - położenie i konformację wiązania (wiązań) glikozydowego,
 - konformację każdego z podstawników – określoną względem pierścienia cukrowego,
 - możliwość występowania wiązań wodorowych.

Zwykle cel ten osiągnąć jest dzięki zastosowaniu wielu metod badawczych – chemicznych, enzymatycznych i spektroskopowych [1]. Szczególną pozycję wśród metod analitycznych zajmuje spektroskopia NMR, która pozwala zdefiniować wiele parametrów strukturalnych bez wsparcia innymi metodami badawczymi, głównie w przypadku prac prowadzonych w fazie ciekłej. Istotną zaletą spektroskopii NMR jest jej niedestrukcyjny charakter. Badana próbka, otrzymana często ogromnym nakładem pracy, może być odzyskana w stanie niezniszczonym i wykorzystana w innych projektach badawczych.

W badaniach strukturalnych węglowodanów wykorzystuje się rezonans magnetyczny jąder ^1H i ^{13}C . Rozwiązanie pierwszorzędowej struktury oligosacharydów wymaga znajomości parametrów spektralnych: wartości izotropowej przesunięcia chemicznego δ oraz stałej sprzężenia spinowo-spinowego J . Standardowe widma protonowe (^1H) natywnych oligosacharydów pozwalają zazwyczaj tylko na scharakteryzowanie sygnałów pochodzących od protonów anomerycznych; linie rezonansowe pozostałych protonów nakładają się wzajemnie. Zatem pierwszym krokiem w drodze do pełnej charakterystyki budowy cząsteczki jest przypisanie możliwie największej liczby linii rezonansowych.

Pełne przypisanie sygnałów protonowych można osiągnąć wykorzystując techniki dwuwymiarowe (2D NMR). Rutynowo stosowaną sekwencją dwuwymiarową

jest eksperyment COSY [2] wykorzystujący zjawisko korelacji spinów (*spin correlation*). Eksperyment ten najczęściej stosowany jest w wersji fazoczułej (*phase sensitive*) oraz z zastosowaniem tzw. filtra podwójnie kwantowanego (*DQF – Double Quantum Filter*) [3] w celu wyeliminowania z widma 2D sygnałów pochodzących od niesprzężonych spinów (np.: grup metylowych) [4]. Sekwencja COSY nie pozwala na identyfikację sygnałów nieznacznie tylko różniących się przesunięciem chemicznym. Sygnały takie pojawiają się w widmie 2D bardzo blisko przekątnej, co powoduje duże komplikacje w ich interpretacji. W takich przypadkach bardzo pomocny jest eksperyment COSY-45, będący niewielką modyfikacją omawianej sekwencji.

Poza przesunięciem chemicznym drugim, bardzo istotnym w badaniach strukturalnych parametrem spektralnym, który można wyznaczyć w oparciu o eksperymenty COSY i TOCSY [5, 6] jest stała sprzężenia J . Wartość wicynalnej stałej sprzężenia (3J) dwóch protonów zależy, zgodnie z zależnością Karplusa [7], od wartości kąta torsyjnego jaki tworzą wiązania H–C w układzie H–C–C–H. Jeśli oba rozpatrywane protony są w położeniach aksjalnych, to kąt torsyjny wynosi ok. 180° i wartość obserwowanej stałej sprzężenia jest duża (7–11 Hz). Natomiast dla protonów zajmujących położenia ekwatorialne wartość stałej sprzężenia jest bardzo mała (0,5–3 Hz). Widać więc, że wielkość stałej sprzężenia określona jest poprzez stereochemię pierścienia piranozowego i na podstawie wartości wicynalnej stałej sprzężenia można określić położenie atomów wodoru w stosunku do pierścienia cukrowego (aksjalny, ekwatorialny), konfigurację anomeryczną pierścienia cukrowego oraz wiązania glikozydowego. Powyższy, prosty schemat rozwiązania struktury, oparty na przypisaniach dokonanych w oparciu o eksperymenty ^1H oraz COSY i TOCSY, nie zawsze pozwala na jednoznaczne rozwiązanie problemu. Spowodowane jest to dwiema trudnościami. Pierwszą z nich stanowi duże stłoczenie sygnałów w zakresie 3,5–4,5 ppm połączone z dużymi i bardzo zbliżonymi wartościami $^3J(\text{HH})$. Fakt ten jest szczególnie istotny, gdy różnica przesunięć chemicznych sygnałów dwóch sprzężonych protonów jest porównywalna z wartością stałej sprzężenia. Jeśli różnica przesunięć chemicznych jest mniejsza niż dwukrotna wartość stałej sprzężenia, to wyznaczenie wartości J staje się niemożliwe, przez co nie można również określić stereochemii pierścienia cukrowego na podstawie homojądrowej stałej sprzężenia. W takich wypadkach niezbędne jest wykorzystanie heterojądrowych technik NMR jądra ^{13}C .

Drugą trudnością jest bardzo mała wartość stałej sprzężenia $^3J(\text{HH})$ związana z protonami położonymi w pozycji *gauche* względem siebie. W tym przypadku, ze względu na ich bliskie sąsiedztwo w przestrzeni, często pomocny jest eksperyment NOESY, który wykorzystuje homojądrowy efekt Overhausera i pozwala obserwować oddziaływania spinów sprzężonych dipolarnie, tzn. „przez przestrzeń”.

Korelacja NOESY jest również często wykorzystywana do ustalania położenia wiązania glikozydowego poprzez obserwację oddziaływań dipolarnych pomiędzy protonem anomerycznym jednej reszty cukrowej a protonem aglikonowym znajdującym się przy atomie węgla sąsiedniej reszty cukrowej. Mała odległość tych protonów

powoduje, że efekt Overhausera jest dość silny i daje się łatwo obserwować [6a, 8]. Jednak ze względu na możliwość silnego oddziaływania protonu anomerycznego z protonem połączonym z węglem sąsiadującym z miejscem glikozydacji, położenie wiązania glikozydowego powinno być potwierdzone innymi technikami, np.: przy pomocy heterojądrowej korelacji ^{13}C - ^1H dalekiego zasięgu. Opisane powyżej oddziaływanie dipolame jest szczególnie silne gdy proton sąsiadujący z miejscem glikozydacji zajmuje położenie ekwatorialne [6, 4].

Wielkość efektu Overhausera uzależniona jest od dynamiki badanej cząsteczki. NOE jest dodatni dla małych cząsteczek a ujemny dla dużych. W przypadkach pośrednich, kiedy czas korelacji cząsteczki (τ_c), definiujący dynamikę układu, równy jest w przybliżeniu odwrotności częstości rezonansowej protonu ($1/\omega_H$), wartość efektu Overhausera jest bliska zera [9]. Zanik NOE ma miejsce np. w przypadku tetrasacharydu badanego w roztworze wodnym, w polu 11,4 T (500 MHz). Problem ten można ominąć poprzez zmianę lepkości roztworu. W tym celu można zmienić temperaturę pomiaru [10] lub dodać dodatkowy, lepki rozpuszczalnik – najczęściej DMSO [11, 12]. Jeśli powyższe zmiany warunków pomiarowych są niepożądane lub niemożliwe do zastosowania, wykorzystuje się pomiar NOE w rotującym układzie współrzędnych. W takich warunkach pomiarowych efekt Overhausera jest dodatni dla każdej wartości τ_c i ω_H . Eksperyment ten znany jest pod nazwą ROESY [13] (*Rotating Frame NOESY*) lub CAMELSPIN [14]. W przypadku większych polisacharydów i oligosacharydów obserwacja NOE jest o wiele łatwiejsza, gdyż dla tych dużych cząsteczek efekt Overhausera jest silny i przeważnie ujemny. Również ze względu na większą czułość eksperymentu NOESY, w porównaniu z ROESY, jest on częściej wykorzystywany do badań większych cząsteczek [4b].

W badaniach strukturalnych sacharydów często wykorzystywany jest również rezonans jądra ^{13}C . Sygnały w widmach węglowych sacharydów, ze względu na szerszy zakres spektralny, są lepiej rozseparowane niż sygnały w widmach protonowych. Sygnał pochodzący od węgla anomerycznego obserwowany jest w zakresie 100–90 ppm [15]. Natomiast sygnały odpowiadające metinowym atomom węgla pierścienia cukrowego, położone są w dość szerokim zakresie 85–55 ppm. Z tego względu, w porównaniu z widmami ^1H , tylko niewielka liczba linii rezonansowych pokrywa się, przez co widmo ^{13}C jest bardziej czytelne – nawet przy pomiarach w niższych polach.

Heterojądrowe techniki korelacyjne 2D ^{13}C - ^1H dostarczają ogromną ilość danych potrzebnych do wyznaczenia pierwszorzędowej struktury węglowodanów [4b]. Ze względu na małą czułość detekcji jądra ^{13}C – co wymaga dużej ilości materiału do badań – techniki te były w początkowym okresie wykorzystywane sporadycznie. To poważne ograniczenie zostało rozwiązane poprzez wprowadzenie modyfikacji eksperymentów heterojądrowych opartych na detekcji odwrotnej (*inverse detection*). Eksperyment HMQC [16] (*Heteronuclear Multiple Quantum Coherence*) pokazujący sprzężenia ^1H - ^{13}C poprzez jedno lub dwa wiązania, pozwala na jednoznaczne i całkowite przypisanie wszystkich linii rezonansowych w widmach ^{13}C – wykorzystując

oczywiście wcześniej dokonane przypisania ^1H – nawet w układzie silnie sprzężonych, protonów wicynalnych [17].

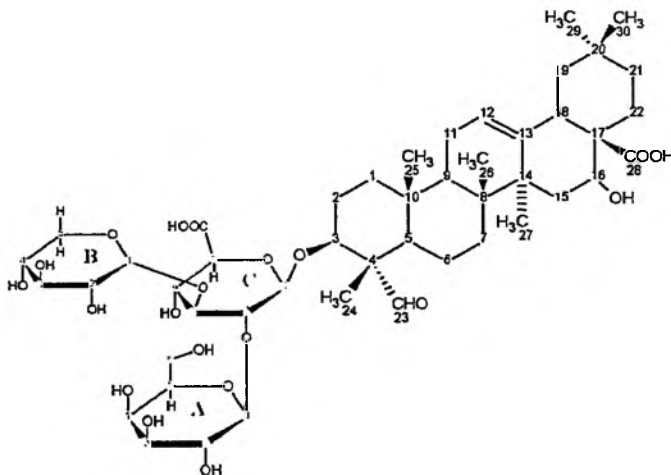
Modyfikacja HMQC, pozwalająca na badanie sprzężeń ^1H – ^{13}C dalekiego zasięgu, znana pod nazwą HMBC [18] (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*) jest obecnie standardowo wykorzystywaną techniką do ustalania położenia i konfiguracji wiązania glikozydowego oraz przypisań węgli czwartorzędowych [17a]. Dostarcza również informacji pozwalających potwierdzić i uzupełnić wcześniej dokonane przypisania oraz ustalić sekwencję reszt cukrowych. Na podstawie korelacji heterojądrowych możliwe jest również zlokalizowanie położenia przyłączonych podstawników niewęglowodanowych [19].

1. WYZNACZANIE STRUKTURY PIERWSZORZĘDOWEJ

Analiza pierwszorzędowej struktury oligosacharydów powinna odpowiedzieć na 3 następujące pytania:

- ile, możliwych do zidentyfikowania, reszt cukrowych – różnych bądź identycznych – obecnych jest w badanej cząsteczce,
- jaki jest współczynnik multiplikacji reszt cukrowych, oraz
- jakiego rodzaju są to reszty i jaka jest konfiguracja anomeryczna każdej z nich.

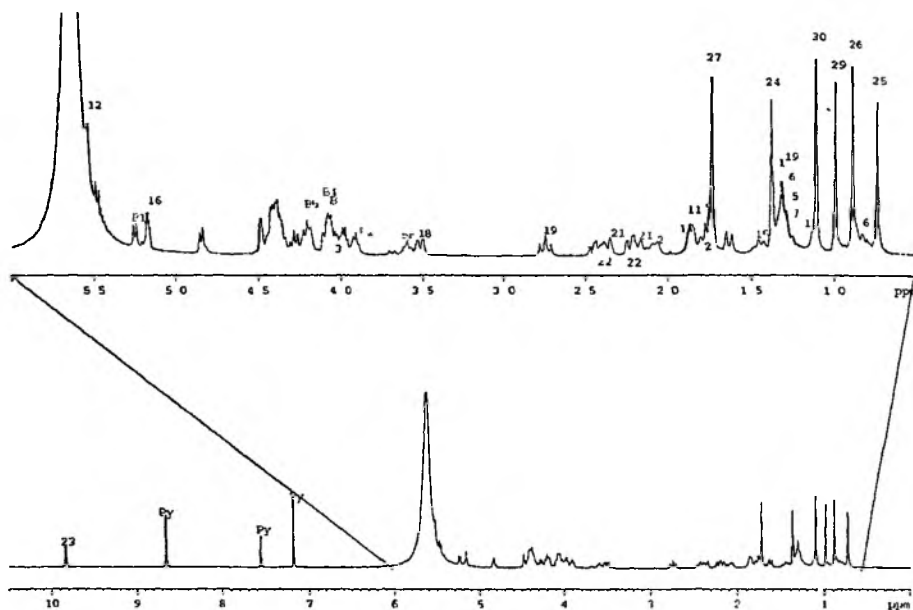
Do scharakteryzowania struktury pierwszorzędowej di- i trisacharydów często wystarcza analiza jednowymiarowych (1D) widm protonowych.



1

Schemat 1. Schemat struktury

[(1→2)-β-D-galaktopiranozo-(1→3)-β-D-ksylopiranozo]-3-O-β-D-glukaranu kwasu quillowego 1



Rysunek 1. Widmo ^1H związku 1. Na rozciągu przedstawiono zakres 6–0,7 ppm. Naniesione zostały również przypisanie sygnałów wg klucza: oznaczenia liczbowe odnoszą się do atomów części aglikonowej cząsteczki. Oznaczenia literowo-liczbowe odnoszą się do części cukrowej i tak, symbol A1 – oznacza proton H1 pierścienia cukrowego A. Oznaczenia te są zgodne z numeracją zastosowaną na Schemacie 1

Ze względu na to, że protony pochodzące od grup hydroksylowych mogą niepotrzebnie komplikować analizę widma ^1H , analizowaną próbkę rozpuszcza się najczęściej w D_2O a w wyniku wymiany labilnych protonów na atomy deuteru następuje „usunięcie” z widma ^1H wszystkich sygnałów pochodzących od grup hydroksylowych. Jeśli do przygotowania roztworu użyty zostanie inny rozpuszczalnik, wtedy wszystkie protony hydroksylowe tworzą najczęściej jeden, bardzo silny i dość szeroki sygnał, którego przesunięcie nie jest stałe i zależy od kilku czynników (stężenie, temperatura, rodzaj rozpuszczalnika). Z tego względu, często utrudnia on analizę widm NMR, choć sam nie ma praktycznie żadnej wartości analitycznej (Rys. 1).

W przypadku złożonych układów oligosacharydowych przydatna jest wiedza wynikająca z wieloletnich prac eksperymentalnych, które w wyniku analizy i uogólnienia bazy danych umożliwiły sformułowanie reguł empirycznych.

1.1. REGUŁY EMPIRYCZNE

Widmo ^1H NMR oligosacharydu jest efektem nałożenia widm poszczególnych jednostek oligomeru, nieznacznie tylko zmienionych wiązaniami glikozydowymi. W związku z tym do analizy widm można wykorzystać następujące zasady empiryczne [20]:

1. Sygnały nieanomerycznych protonów cukrowych poszczególnych pierścieni, ze względu na bardzo podobne otoczenie, występują w zakresie 4,5–3,0 ppm. Im bardziej złożona jest badana cząsteczka oligosacharydu, tym bardziej sygnały protonów nieanomerycznych nakładają się. Obserwowana grupa sygnałów nie ma wyraźnej struktury subtelnej i dlatego prawie nie dostarcza jednoznacznych informacji strukturalnych. Protony anomeryczne, z uwagi na sąsiedztwo dwóch atomów tlenu, znajdują się w innym otoczeniu chemicznym, co w efekcie powoduje, że w widmach są one dobrze rozseparowane od pozostałych sygnałów i występują w zakresie 5,5–4,5 ppm.

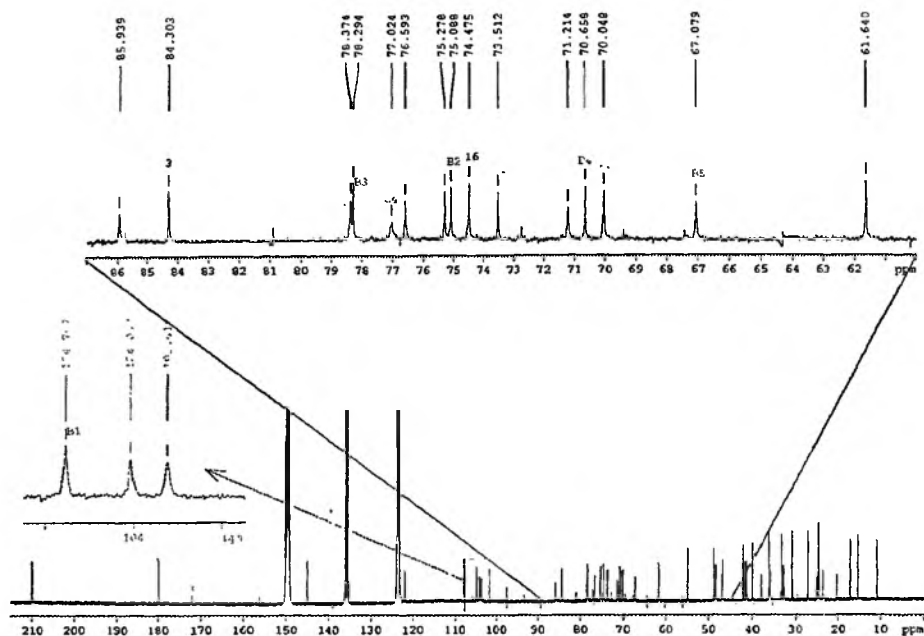
2. Proton zajmujący pozycję ekwatorialną przy danym atomie węgla w pierścieniu piranozowym wykazuje o ok. 0,5 ppm wyższe przesunięcie niż proton w pozycji aksjalnej. Z tej przyczyny, dla D-piranoz uczestniczących w wiązaniu α -glikozydowym (proton anomeryczny H1 w pozycji ekwatorialnej), przesunięcie chemiczne protonu anomerycznego wynosi 5,6–4,9 ppm. Natomiast gdy mamy do czynienia z wiązaniem β -glikozydowym (H1 aksjalny), sygnał protonu anomerycznego znajduje się w zakresie 4,7–4,3 ppm.

3. Każdy z protonów anomerycznych, ze względu na sprzężenie J z protonem H2 obserwowany jest w postaci dubletu. Wielkość stałej sprzężenia 3J odzwierciedla wzajemne położenie protonów przy dwóch sąsiednich atomach węgla w pierścieniu. Gdy oba protony są w pozycjach aksjalnych stała sprzężenia $^3J(H1-H2)$ ma wartość 7–8 Hz. Kiedy natomiast jeden proton zajmuje pozycję aksjalną a drugi ekwatorialną, bądź oba są w położeniach ekwatorialnych, wartość $^3J(H1-H2)$ znacznie maleje do wartości 3–4 Hz. Zatem, konfigurację anomeryczną poszczególnych jednostek glikozydowych można określić na podstawie przesunięcia chemicznego protonu anomerycznego oraz stałej sprzężenia $^3J(H1-H2)$.

4. Jeśli do reszty glikozylowej przyłączona jest inna reszta glikozylowa bądź inny podstawnik, to sygnał protonu połączonego z atomem węgla, przy którym następuje podstawienie, ulega przesunięciu w dół pola o ok. 0,2–0,5 ppm. Więc, sygnały protonów nieanomerycznych znajdujących się przy podstawionych atomach węgla, pojawiają się poza zakresem 4,4–3,9 ppm i mogą być wykorzystane do wstępnego oszacowania miejsca podstawienia w pierścieniu cukrowym.

Zasady powyższe są wynikiem analizy bardzo dużej ilości widm 1H NMR mono- i disacharydów o znanej strukturze pierwszorzędowej. Ich zastosowanie zostało szeroko opisane w literaturze [21, 22, 23]. Dostępne są również rozbudowane bazy danych zawierające przesunięcia chemiczne 1H – opracowane dla monosacharydów i małych oligosacharydów [24].

W ustalaniu struktury pierwszorzędowej sacharydów wykorzystywany jest również rezonans jądra ^{13}C . Na podstawie analizy widm ^{13}C szeregu znanych węglowodanów, których pierwsze widma opisane zostały jeszcze w latach 60. [25] ustalono, że sygnały grup metinowych obserwowane są w zakresie 100–65 ppm. Sygnały węgla anomerycznych, w zależności od konfiguracji, obserwowane są w zakresie 100–90 ppm (Rys. 2).



Rysunek 2. Widmo ^{13}C związku 1. Na rozciągu przestawiono zakres cukrowy widma z naniesionymi przypisaniami sygnałów wg klucza jako zastosowano do opidu widma protonowego (patrz. Rys. 1).

W tym przypadku jednak symbol A1 – oznacza atom węgla C1 pierścienia cukrowego A.

Oznaczenia liczbowe odnoszą się do części aglikonowej. Oznaczenia te są zgodne z numeracją zastosowaną na Schemacie 1

Wartość heterojądrowej stałej sprzężenia $^1\text{J}(\text{C}-\text{H})$ dla węgla anomerycznego odzwierciedla jego konfigurację. Przyjmuje się, że stała sprzężenia $^1\text{J}(\text{C1}-\text{H1})$ wynosząca ok. 170 Hz jest charakterystyczna dla anomerów α , natomiast anomery β charakteryzują się mniejszą stałą sprzężenia, rzędu 160 Hz. Sygnały pochodzące od egzocyklicznych grup metylenowych (CH_2OH), obserwuje się w zakresie 70–60 ppm pod warunkiem, że nie są one zaangażowane w wiązanie glikozydowe (1→6).

Zmiany przesunięcia chemicznego obserwowane w widmach ^{13}C , spowodowane zaangażowaniem atomów węgla w wiązanie glikozydowe, wynoszą ok. 10 ppm dla węgli biorących udział w wiązaniu i ok. 1–2 ppm dla atomów sąsiadujących z miejscem podstawienia. Zmiany te są znacznie lepiej powtarzalne w widmach ^{13}C niż w widmach ^1H . Również dla widm węglowych opracowane zostały bazy danych zawierające wartości przesunięć chemicznych dla mono- i oligosacharydów [26, 27, 28].

Analiza widm 1D oparta o powyższe zasady, znane w literaturze pod nazwą *structural-reporter-group concept* [29], pozwala na wstępne opisanie struktury pierwszorzędowej bardziej złożonych oligosacharydów. Wykorzystując reguły empiryczne i dostępne bazy danych, możliwe jest przybliżone zdefiniowanie konfiguracji anomerycznej, położenia wiązań glikozydowych oraz grup egzocyklicznych. Metodę tę

wykorzystano z powodzeniem również do badań glikolipidów [30] i polisacharydów [31].

1.2. METODY EKSPERYMENTALNE

Jeśli widma ^1H i ^{13}C nie są podobne do żadnego z przypadków opisanych w dostępnych bazach lub chcemy uzyskać potwierdzenie przypisań strukturalnych, w drugim etapie analizy zwykle wykorzystywane są dwuwymiarowe techniki NMR, takie jak: COSY, TOCSY [32] oraz NOESY lub ROESY [4]. Eksperyment TOCSY, poprzez obserwację oddziaływań między spinami w obrębie każdego z pierścieni cukrowych oligosacharydu, pozwala na poprawne przypisanie wszystkich sygnałów ^1H , nawet tych z zakresu 3–4 ppm. Analiza widm ROESY lub NOESY (zależnie od wielkości cząsteczki) pokazujących oddziaływania dipolarnie spinów, pozwala ustalić sekwencję reszt glikozydowych oraz miejsce wiązania glikozydowego [14]. Przykłady praktycznego zastosowania omawianych sekwencji pulsowych dostępne są w literaturze [23, 33, 34].

1.2.1. Wyznaczanie rodzaju oraz liczby reszt cukrowych

Strategia pozwalająca zdefiniować strukturę oligosacharydu i określić liczbę reszt cukrowych podzielona jest na dwa etapy:

1. precyzyjne przypisanie linii rezonansowych (uwzględniając multipletowość sygnałów protonowych)

2. integrację sygnałów ^1H i ^{13}C .

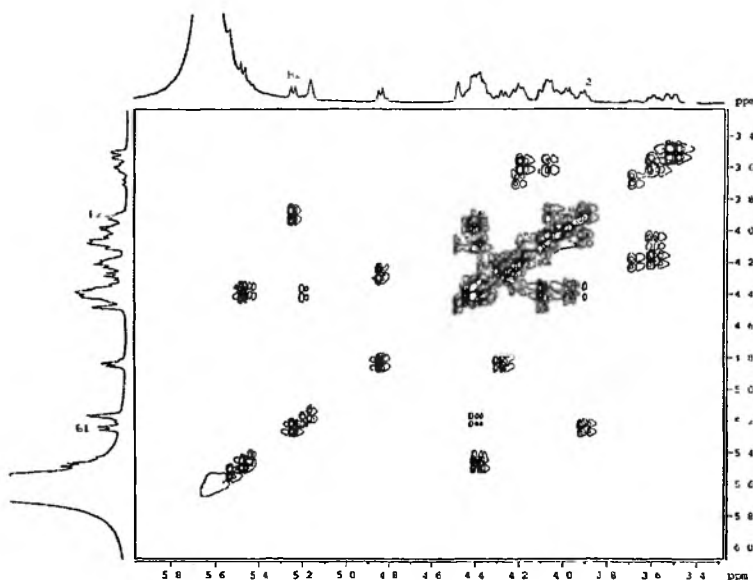
Kluczowym etapem dla całej strategii jest etap pierwszy.

Badania oligosacharydów często prowadzone są w roztworach D_2O . Z tego też względu, jak już wcześniej wspomniano, w widmach obserwowane są tylko protony nie ulegające wymianie chemicznej, czyli protony bezpośrednio związane z atomami węgla.

Zatem każda z reszt cukrowych reprezentowana jest w widmie przez sprzężony system spinów, który dla heksoz składa się z siedmiu protonów. Przesunięcia chemiczne i oddziaływanie spinowo-spinowe poszczególnych protonów w obrębie każdej reszty cukrowej mogą być wyznaczone wieloma alternatywnymi metodami. Najprostszą i najczęściej wykorzystywaną do tego celu techniką jest eksperyment COSY.

Sygnały protonów anomerycznych są dobrze rozseparowane od pozostałych, łatwo je wyróżnić w widmie ^1H i właśnie od nich najwygodniej jest rozpocząć analizę widma 2D. Śledząc ścieżkę połączeń poprzez analizę sygnałów korelacyjnych (*cross-pick*) odpowiadających sprzężeniom: H1/H2, H2/H3, H3/H4, itd. możliwe jest przypisanie wszystkich sygnałów w obrębie rozpatrywanej reszty cukrowej [32]. Często jednak, nawet w przypadku małych oligosacharydów, mamy do czynienia z silnym nakładaniem się linii rezonansowych pochodzących od różnych reszt cukrowych

i przypisanie sygnałów tylko na podstawie widma COSY nie jest możliwe (Rys. 3). Sytuacja ta komplikuje się coraz bardziej wraz ze wzrostem masy badanego oligosacharydu [35].



Rysunek 3. Widmo DQF-COSY-90 1. Dla uproszczenia przedstawia tylko zakres protonów cukrowch (6,0–3,3 ppm). Doskonale widać, że z powodu silnego stłoczenia sygnałów dokonanie jednoznacznych przypisań nie jest możliwe.

Ograniczenia sekwencji COSY stymulowały rozwój nowych technik NMR. W konsekwencji doprowadziło to do opracowania eksperymentów eliminujących wiele wcześniejszych ograniczeń. Do przypisania protonów w obrębie poszczególnych reszt cukrowch, stosowane są następujące metody:

- RCT-COSY [36] (*Relayed Coherence Transfer COSY*), gdzie magnetyzacja przenoszona jest od selektywnie wzbudzonego protonu poprzez 1, 2 lub 3 niesprzężone skalarnie protony.
- TOCSY [6b, 37] (*Total Correlation Spectroscopy*) – eksperyment wykorzystujący transfer polaryzacji w warunkach izotropowego mieszania, co w efekcie daje widmo całkowicie skorelowane.

Sekwencje najczęściej stosowane dla wywołania warunków izotropowego mieszania to: MLEV-17 [6a], WALTZ-16, DIPSI 1-2 [38] oraz sekwencje zaproponowane przez Glasera i Drobny'ego [39]. Transfer polaryzacji jest bardziej efektywny w eksperymencie TOCSY niż w RCT-COSY, co pozwala na śledzenie dłuższej ścieżki spinowej w pojedynczym eksperymencie (innymi słowami, eksperyment TOCSY ma „większy zasięg” w porównaniu z RCT-COSY). Prowadzi to do znacznego skrócenia czasu eksperymentu, nawet w przypadkach dużych oligosacharydów, zawierających w cząsteczce 40 jednostek cukrowch ($M. cz. > 8 \text{ kDa}$) [40].

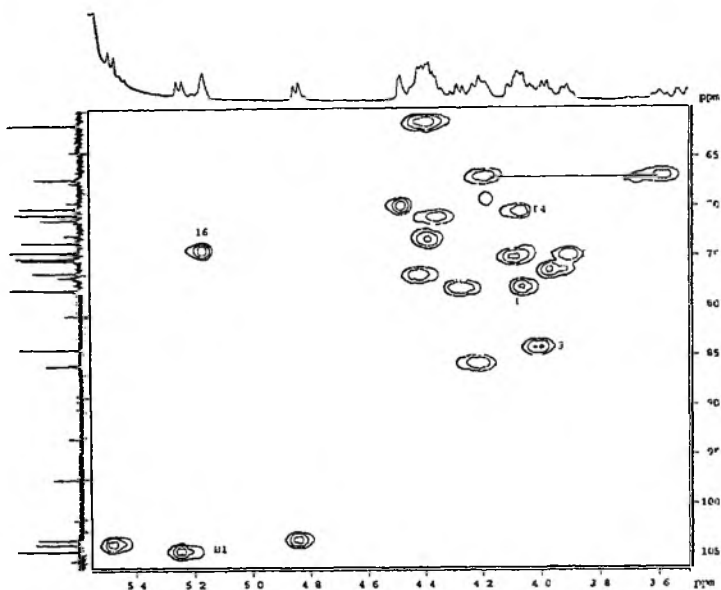
Obecnie często wykorzystuje się również sekwencję HSQC-TOCSY [41, 42]; eksperyment ten będzie omówiony w dalszej części pracy.

Przeszkodą w pełnym przypisaniu wszystkich protonów w obrębie poszczególnych pierścieni cukrowych, może być mała wartość stałej sprzężenia między wycynalnymi protonami. Z taką sytuacją często mamy do czynienia w przypadkach reszt β -mannozy $^3J(\text{H1-H2}) < 1$ Hz), galaktozy $^3J(\text{H4-H5})$ kwasu sialowego $^3J(\text{H6-H7})$, fukozy $^3J(\text{H4-H5})$ oraz β -ramnozy $^3J(\text{H1-H2})$ [20, 33].

Metody wykorzystujące sekwencję DANTE [43], polegające na selektywnym wzbudzeniu określonego protonu, eliminują problem zaniku transferu magnetyzacji w układzie słabo sprzężonych spinów. Sekwencja ta umożliwia przypisanie linii rezonansowych w widmach ^1H nawet w przypadku, gdy rozpatrywane sygnały różnią się tylko nieznacznie przesunięciem chemicznym (rzędu kilku herców). Taka sytuacja bardzo często ma miejsce, gdy w badanej cząsteczce znajduje się kilka takich samych reszt cukrowych, bądź różnią się one jedynie konfiguracją anomeryczną. Przykłady praktycznego zastosowania sekwencji DANTE dostępne są w literaturze [44] i pokazują jej nadzwyczajną wręcz selektywność oraz możliwości aplikacyjne w badaniach oligosacharydów.

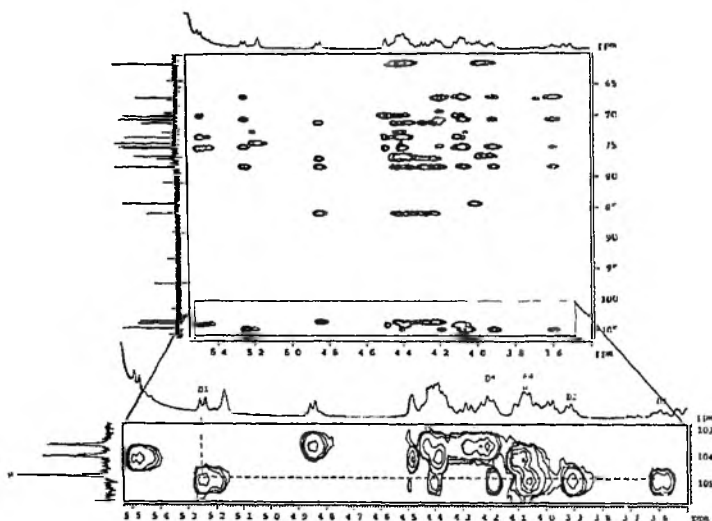
Mała wartość wycynalnej stałej sprzężenia jest efektem ułożenia protonów w konformacji *gauche*. Taka konformacja powoduje, że protony dzieli mała, odległość „przez przestrzeń”, ok. 2,5 Å. Duże zbliżenie pozwala na efektywny transfer magnetyzacji poprzez oddziaływanie dipolarnie. Wykorzystując dość silny efekt Overhausera w takim układzie spinowym, można obserwować całą ścieżkę spinową w obrębie każdej reszty cukrowej, nawet w przypadkach słabo sprzężonych spinów. Eksperymentem pozwalającym na praktyczne wykorzystanie tego zjawiska jest sekwencja TORO [45], stanowiąca połączenie dwóch, wcześniej opisanych sekwencji: TOCSY i ROESY. Efekt zastosowania dwuwymiarowego eksperymentu TORO jest taki sam, jak efekt osiągalny przy pomocy o wiele bardziej skomplikowanych metod trójwymiarowych (3D). Należy w tym miejscu zaznaczyć, że choć modyfikacje 3D i 4D metod 1D i 2D wykorzystywane w badaniach oligosacharydów zostały opisane w literaturze [46], ich stosowanie wymaga bardzo długich czasów akumulacji widm i jest raczej rzadko niezbędne do rozwiązania problemów strukturalnych węglowodanów.

Po przypisaniu wszystkich sygnałów w widmach protonowych można, wykorzystując techniki heterojądrowe, przypisać sygnały w widmach ^{13}C . Do przypisania pików pochodzących od protonowanych atomów węgla badanej cząsteczki, szeroko wykorzystywany jest eksperyment HMQC [16]. Taki sam, bądź lepszy efekt, można uzyskać poprzez wykorzystanie sekwencji HSQC [47], która zapewnia lepszą czułość i rozdzielczość widma NMR [48] (Rys. 4). Natomiast sygnały czwartorzędowych atomów węgla są przypisywane w oparciu o analizę widm HMBC [18].



Rysunek 4 Widmo HSQC 1 – widoczny tylko zakres cukrowy widma
Na rysunku opisane zostały sygnały należące do poszczególnych pierścieni cukrowych

W przypadkach bardzo silnie stłoczonych widm ^1H , gdy interesujący nas proton jest trudny do jednoznacznego przypisania i jest trudny do selektywnego wzbudzenia, wykorzystywane jest połączenie sekwencji HSQC z sekwencją TOCSY. Sekwencja ta jest szczególnie przydatna do analizy silnie stłoczonych widm (Rys. 5).



Rysunek 5 Zakres cukrowy widma HSQC-TOCSY saponinu 1 Na rozciągu zakresu anomerycznego ^{13}C
– zaznaczono pełne ścieżki spinowe poszczególnych pierścieni cukrowych

Poprzez wykorzystanie transferu magnetyzacji w pierwszej części tej kombinowanej sekwencji (HSQC), możliwe jest rozpoczęcie analizy układu spinowego od protonu anomerycznego, który jest zazwyczaj dobrze odseparowany od pozostałych sygnałów. Wykorzystanie tego eksperymentu, dzięki lepszemu rozseparowaniu poszczególnych sygnałów w widmie węglowym, w znacznym stopniu ułatwia prześledzenie pełnej ścieżki spinowej w drugiej części sekwencji (TOCSY) i dokonanie pełnego przypisania protonów należących do poszczególnych pierścieni cukrowych. Eksperyment HSQC-TOCSY, umożliwia jednocześnie dokonanie przypisań ^{13}C , dzięki czemu do analizy układu nie jest potrzebne widmo HSQC lub HMQC.

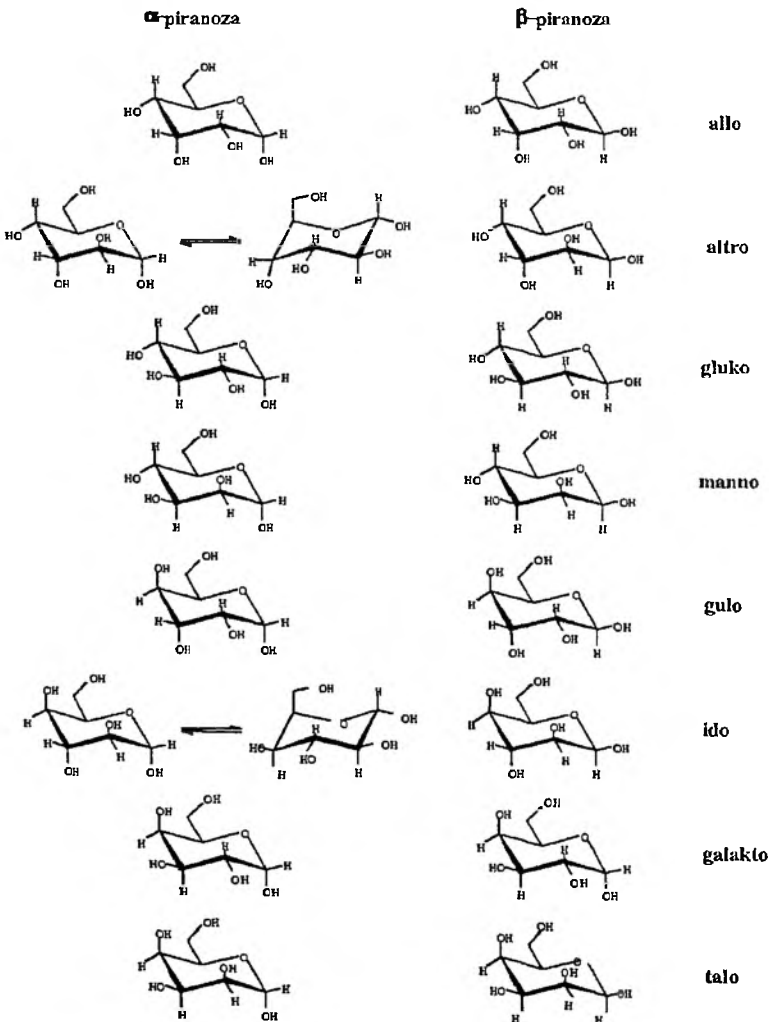
Wszystkie te eksperymenty, oparte na zasadzie detekcji odwrotnej, pozwalają na wykonanie całkowicie czytelnych widm korelacyjnych ^1H - ^{13}C , nawet dla próbek o wielkościach submilimolowych, w czasie zaledwie kilku godzin. Obecnie sekwencje te są szeroko i rutynowo wykorzystywane w wersjach z zastosowaniem gradientu pola B_0 (PFG-HMBC, PFG-HMQC; PFG = *Pulse Field Gradient*). Zastosowanie gradientów pola w znakomity sposób zwiększyło czułość metod z odwrotną detekcją, jak również pozwoliło na znaczne skrócenie czasu niezbędnego do akumulacji widm. Zalety gradientowych technik homo- i heterojądrowych wykorzystujących detekcję odwrotną powodują, że cieszą się one bardzo dużym zainteresowaniem spektroskopistów, są stale rozwijane i znajdują coraz nowsze zastosowanie [49].

Sekwencje pulsowe wykorzystujące gradienty pola B_0 , poza skróceniem całkowitego czasu eksperymentu, wykorzystywane są również w celu osiągnięcia jego większej selektywności, zarówno w technikach homojądrowych [50], jak i heterojądrowych [51]. Oczywiście, szczegółowe omówienie wszystkich zalet i możliwości technik gradientowych, wymagałoby monografii o objętości znacznie przekraczającej tę pracę. Obecnie dostępnych jest wiele prac przeglądowych [52, 49] oraz wydań monograficznych poświęconych NMR [53], które w sposób szczegółowy omawiają zagadnienia związane ze stosowaniem technik gradientowych, jak również prezentują ich praktyczne wykorzystanie [54]. Z tych też względów, powyższy wątek nie będzie w tej pracy szerzej rozwijany.

Gdy zostanie zakończony pierwszy etap i uzyskamy pewność co do przypisań sygnałów w widmach ^1H i ^{13}C , liczba poszczególnych reszt cukrowych może być wyznaczona w oparciu o integrację dobrze rozdzielonych sygnałów w widmach protonowych. Najczęściej do analizy ilościowej wykorzystuje się sygnały pochodzące od protonów anomerycznych. Oczywiście możliwe jest wykorzystanie dobrze rozseparowanych sygnałów innych protonów np.: H2 dla mannozy i β -glukozy, H6 dla fukozy i ramnozy, czy wreszcie sygnału protonu H3 w przypadku kwasu sialowego [33]. Dla liniowych oligosacharydów rzadko mamy do czynienia z przypadkami kiedy poszczególne, nawet takie same reszty cukrowe, nie dają się rozróżnić metodami NMR. Sytuacja taka jest natomiast często spotykana w badaniach oligosacharydów wyodrębnionych z glikolipidów [40, 32, 14] oraz glikoprotein [55, 56, 57].

1.2.2. Ustalanie konfiguracji anomerycznej

Znakomita większość reszt cukrowych oligosacharydów występuje w stabilnej konformacji heksapiranozowej (Rys. 6). Ich konfiguracje anomeryczne mogą być określone na podstawie wicynalnej stałej sprzężenia $^3J(\text{HH})$. Przyjmuje się, że dla orientacji antiperiplanarnej protonów wicynalnych, stała sprzężenia 3J jest duża i osiąga wartości powyżej 6 Hz. Jeśli natomiast wicynalne protony są w ułożeniu *gauche*, wartość stałej sprzężenia 3J jest mała – poniżej 5 Hz. Oczywiście orientacji *gauche* odpowiadać może zarówno ekwatorialno-aksjalne, jak i diekwatorialne ułożenie dwóch sąsiednich protonów. Z tego względu, w oparciu o wartość wicynalnej stałej sprzężenia, niemożliwe jest rozróżnienie anomerów mannoz i ramnoz [33].



Rysunek 6. Uprzywilejowane konformacje anomerów aldopiranoz szeregu konfiguracyjnego [1]

Jednak oddziaływanie dipolarne (NOE) pomiędzy protonami H1 i H3 oraz H1 i H5 w pierścieniach tych sacharydów jest charakterystyczne dla ich β -anomerów i poprzez obserwację efektu Overhausera możliwa jest ich identyfikacja [58, 59]. Do określenia konformacji anomerycznej reszty cukrowej wystarczy rozróżnienie pomiędzy dużą i małą wartością stałej sprzężenia 3J i w przeciwieństwie do badań konformacyjnych nie jest potrzebna duża dokładność.

Wartości homojądrowych stałych sprzężenia mogą być wyznaczone wieloma metodami eksperymentalnymi. Pierwszą metodą wykorzystywaną w tym celu był eksperyment dwuwymiarowy *J-resolved* [60]. Jednak ze względu na wiele trudności występujących podczas interpretacji tego rodzaju widm, technika ta była stosowana niechętnie [61].

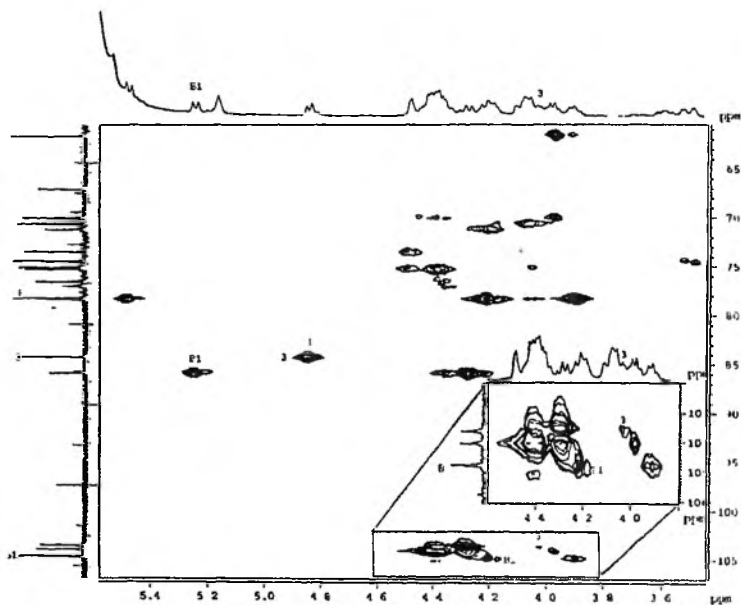
Obecnie, w celu wyznaczenia wartości stałej sprzężenia, szeroko stosowana jest fazoczuła wersja eksperymentu COSY: PH-COSY. Eksperyment ten początkowo był szeroko wykorzystywany w badaniach aminokwasów [62] i wszystkie doświadczenia w interpretacji widm PH-COSY nabyte w tej dziedzinie zostały wykorzystane przy adaptacji tej sekwencji do badań sacharydów [63, 57]. W literaturze dostępny jest szereg dokładnie zanalizowanych układów spinowych występujących w różnych układach sacharydowych, gotowych do wykorzystania w analizie oligosacharydów [64].

1.2.3. Wyznaczanie sekwencji reszt cukrowych i położenia wiązań glikozydowych

W badaniach zmierzających do ustalenia sekwencji reszt cukrowych oraz położenia wiązań glikozydowych istotne znaczenie ma obserwacja oddziaływań dipolarnych pomiędzy protonami sąsiednich reszt cukrowych. Współczynnik NOE – w widmach 1D – może być wyznaczony przez selektywne naświetlanie sygnału protonu anomerycznego jednej reszty cukrowej i obserwację intensywności sygnału protonu aglikonowego reszty sąsiedniej. Procedura taka, znana jako spektroskopia różnicowa NOE (*NOE Difference*), początkowo stosowana do szacowania odległości w przestrzeni między protonami [65], szybko została zastosowana do badań sekwencji i położenia wiązania glikozydowego w oligosacharydach [66].

Identyfikacja wiązania glikozydowego oparta na pomiarze NOE jest stosunkowo prosta poza sygnalizowanymi już wcześniej przypadkami, kiedy przy węglu sąsiadującym z miejscem glikozydacji znajduje się proton w położeniu ekwatorialnym. Sytuacja taka ma miejsce w przypadku protonu H4 w galaktozie połączonej wiązaniem 3-glikozydowym oraz w przypadkach 2-glikozydowanych α -sacharydów, gdzie proton H1 zajmuje pozycję ekwatorialną [67]. Z tych samych powodów sterycznych, w znaczny sposób utrudniona jest analiza fragmentu disacharydowego GlcNAc β →2Man α , który bardzo często występuje w glikoproteinach [68]. Należy zaznaczyć, że przy analizie sekwencji reszt cukrowych oraz ustalaniu położenia wiąza-

nia glikozydowego, wymagane jest jednoznaczne przypisanie wszystkich linii rezonansowych. W przeciwnym wypadku, interpretacje widm NOE nie będą rozstrzygające.



Rysunek 7. Korelacja HMBC 1. Na rozciagu – zakres anomeryczny projekcji ^{13}C – doskonale widać jednoznaczne położenie wiązań glikozydowych

Eksperymenty dwuwymiarowe: NOESY, ROESY, TORO [69, 70, 71, 45] wykorzystywane powszechnie do analizy wiązania glikozydowego, zostały scharakteryzowane we wcześniejszych fragmentach niniejszej pracy. Niezwykle przydatną do tego celu sekwencją, jest heterojądrowa korelacja dalekiego zasięgu HMBC [72].

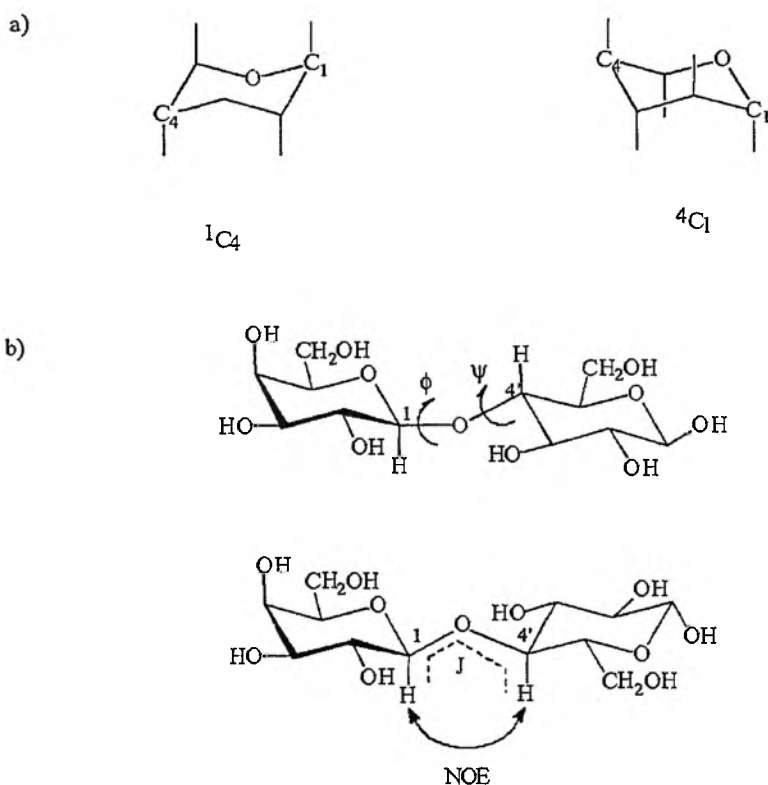
Obecnie, sekwencja ta jest rutynowo wykorzystywana i dostarcza jednoznacznych informacji pozwalających określić położenie wiązań glikozydowych. Poza tym, analiza widm HMBC umożliwia również określenie położenia w badanej cząsteczce, wszystkich niecukrowych podstawników. Eksperyment ten – poprzez analizę sprzężeń C–H dalekiego zasięgu – można również wykorzystać do sprawdzenia poprawności dokonanych przypisań ^1H i ^{13}C (Rys. 7).

Opisana powyżej metodologia jest powszechnie wykorzystywana w badaniach struktury, węglowodanów, zarówno w postaci oligosacharydów, jak również glikokonjugatów [73].

2. BADANIE STRUKTURY TRÓJWYMIAROWEJ

Struktura trójwymiarowa oligosacharydów jest zdefiniowana parametrami opisanymi we wcześniejszych fragmentach pracy. Istotnym elementem i jednym z głównych czynników determinujących przestrzenne ułożenie węglowodanów jest konformacja pierścieni cukrowych. W zależności od wielkości pierścienia (pięcio- lub sześcioczłonowy) zróżnicowany jest charakter zmian konformacyjnych.

W przypadku pierścieni furanozowych obserwuje się pseudorotację i inwersję pierścienia, co w konsekwencji prowadzi do bardzo dużej elastyczności. Natomiast w przypadku heksapiranoz (np.: glukoza), inwersja występuje rzadko i zjawisko to w analizie konformacyjnej układów heksapiranozowych może być zaniedbane [74]. Najbardziej energetycznie uprzywilejowanymi konformacjami pierścienia heksapiranozowego są dwie konformacje krzesłowe: 1C_4 oraz 4C_1 [Rys. 8 a]; mannoza (Man) i galaktoza (Gal) występują najczęściej w konformacji 4C_1 , natomiast konformacja 1C_4 jest charakterystyczna dla fukozy (Fuc) i kwasu neuraminowego (Neu5Ac).



Rysunek 8. a) Definicja konformacji krzesłowych dla D-heksapiranoz (zaznaczone zostały tylko położenia aksjalne podstawników); b) Definicja kątów torsyjnych wokół wiązania glikozydowego (na przykładzie wiązania 1→4)

Do wyznaczenia konformacji pierścienia piranozowego niezbędny jest pełny zestaw wartości wycylnych stałych sprzężenia $^3J(\text{HH})$. Badania konformacyjne wymagają dużej dokładności pomiarów wartości stałej sprzężenia. Dostępnych jest wiele technik NMR zapewniających wymaganą dokładność i większość z nich została dokładnie opisana w literaturze [33, 57, 32, 75–78]. Obecnie jednak, najszerzej stosowane są metody oparte na selektywnym wzbudzeniu [79–81], które są szczególnie użyteczne w badaniach oligosacharydów. Pomiar homojądrowego efektu Overhausera może być bardzo użyteczny a w badaniach tych wykorzystywane są wcześniej opisane eksperymenty, np. eksperyment ROESY [82].

Kolejnym krokiem w analizie struktury drugorzędowej jest ustalenie położenia grupy $-\text{CH}_2\text{OH}$ względem pierścienia cukrowego. Na tym etapie prac wymagane jest stereospecyficzne przypisanie protonów metylenowych. Z uwagi na fakt, że protony te, wraz z protonem H5 pierścienia cukrowego tworzą sprzężony układ trójspinowy, przypisanie można dokonać w oparciu o potrójnie kwantowaną wersję eksperymentu COSY [83, 33] bądź wykorzystując w tej sekwencji potrójnie kwantowany filtr [76]. Alternatywę dla tych eksperymentów stanowią selektywne widma 1D TOCSY [33] lub jednowymiarowe modyfikacje sekwencji COSY z wykorzystaniem selektywnego filtra przesunięcia chemicznego (*chemical-shift selective filter*) [84]. Jeśli jednak słożenie sygnałów w widmie ^1H nie pozwala na dokładne wyznaczenie stałej sprzężenia w oparciu o powyższe metody homojądrowe, cel ten można osiągnąć poprzez wykorzystanie heterojądrowych technik z detekcją odwrotną. Najczęściej w tym celu wykorzystywana jest jednowymiarowa sekwencja HSQC [47].

Decydującym etapem analizy struktury trójwymiarowej oligosacharydów jest określenie geometrii wiązania glikozydowego, definiowanego poprzez wartości dwóch kątów torsyjnych [Rys. 8 b]: $\Phi = \text{H1}-\text{C1}-\text{O1}-\text{C4}'$ oraz $\Psi = \text{C1}-\text{O1}-\text{C4}'-\text{H4}'$. Wartości tych kątów określane są na podstawie pomiarów wielkości stałych sprzężenia $^3J(\text{H1}-\text{C4}')$ i $^3J(\text{C1}-\text{H4}')$ oraz NOE pomiędzy protonami H1 i H4' [66, 85]. Pierwszą metodą wykorzystywaną do wyznaczenia wartości $^3J(\text{CH})$, dwuwymiarowa wersja sekwencji DEPT [72]. Postęp jaki dokonał się w dziedzinie pomiarów heterojądrowych stałych sprzężenia dalekiego zasięgu, spowodował, że obecnie szeroko wykorzystywane są techniki dwuwymiarowe oparte na detekcji odwrotnej [86]. Najbardziej dokładny pomiar heterojądrowej stałej sprzężenia dalekiego zasięgu umożliwił eksperyment HSQC [47, 87, 88] przy czym bardzo często jest on wykonywany w wersji selektywnego wzbudzenia oraz z filtrem przesunięcia chemicznego [88, 89].

Stałe sprzężenia $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ dalekiego zasięgu używane są od długiego czasu w badaniach strukturalnych i konformacyjnych różnych klas związków organicznych [90, 91], natomiast możliwości ich wykorzystania w analizie konformacyjnej sacharydów zaprezentowali Tvarowska i Taravel w pracy przeglądowej [92].

Konwersja wyznaczonych wartości homo- i heterojądrowych stałych sprzężenia 3J na wartości odpowiadających im kątów torsyjnych dokonywana jest w oparciu o zależność Karplusa [7, 93]. Altona i współpracownicy [94] zaproponowali pa-

rametryzację oryginalnego równania, uwzględniającą wpływ podstawienia oraz charakter podstawnika na wartość stałej sprzężenia $^3J(\text{HH})$. Schwarcz i Perlin [95], wykorzystując pomiary heterojądrowej stałej sprzężenia $^3J(\text{CH})$, na podstawie zależności typu Karplusa, analizowali konformację wiązania glikozydowego. Inne, dające równoważne wyniki parametryzacje równania Karplusa, wykorzystywane w badaniach geometrii wiązania glikozydowego oligosacharydów zaproponowali Tvarowska [96] i Mulloy [97] ze współpracownikami.

W przypadkach, gdy procesy dynamiczne zachodzące w badanych cząsteczkach są szybkie w porównaniu ze skalą czasu NMR, otrzymane wartości stałych sprzężenia są wielkościami uśrednionymi [98]. Interpretacja tych wyników, mająca na celu wyznaczenie udziału poszczególnych konformerów, nie jest prosta i wymaga wykorzystania metod modelowania molekularnego [76, 98–100].

3. PODSUMOWANIE

Przedstawione w niniejszej pracy przykłady technik magnetycznego rezonansu jądrowego wykorzystywanych w badaniach cukrów i ich pochodnych, pokazują ich ogromne możliwości. Spektroskopia NMR jest prawdopodobnie obecnie najczęściej wykorzystywaną w tej dziedzinie metodą analityczną, mogącą dostarczyć wielu informacji dotyczących budowy cząsteczki sacharydu. Ilość informacji jakie dostarcza NMR jest nieporównywalna, z żadną inną, stosowaną pojedynczo, metodą badawczą. Należy zatem oczekiwać, że rozwój tej techniki jest bardzo uważnie śledzony przez chemików zajmujących się badaniem połączeń cukrowych.

Po gwałtownym wzroście zainteresowania sekwencjami trójwymiarowymi (3D NMR), jaki nastąpił w pierwszej połowie lat 90, obecnie obserwuje się odwrót od tych aplikacji. Główna przyczyna tego faktu, leży w znacznej komplikacji interpretacji otrzymanych wyników jak również, w problemach technicznych związanych z praktycznym wykorzystaniem tych technik. Pod koniec lat dziewięćdziesiątych nastąpił powrót do szerszego wykorzystania eksperymentów 1D i 2D co daje się obserwować do dnia dzisiejszego. Obecnie obserwuje się udane próby pełniejszego wykorzystania możliwości technik jednowymiarowych. Dziś gradienty pola B_0 stały się w zasadzie rutynowo dostępną aplikacją dla użytkowników spektrometrów. Dzięki ich wykorzystaniu, możliwe jest znaczne uproszczenie wielu sekwencji pulsowych a skutkiem takiego podejścia jest coraz szersze wykorzystywanie jednowymiarowych wersji eksperymentów TOCSY, NOESY, ROESY [49, 50b], często przy tym wykorzystuje się również techniki selektywnego wzbudzenia (*shape pulse*). W efekcie, uzyskuje się dokładnie taką samą informację jak w analogicznym eksperymencie 2D ale, w kilkunastokrotnie krótszym czasie. Stale również poprawia się skuteczność dotychczas wykorzystywanych sekwencji, poprzez „przystosowanie” ich parametrów do konkretnych klas związków, w tym również połączeń cukrowych [52].

Postęp technologiczny spowodował, że obecnie komercyjnie dostępne są magnesy nadprzewodzące, pracujące przy częstości 600–800 a nawet 900 MHz. Ocenia

się jednak, że technologia produkcji magnesów osiągnęła swą granicę i z tego względu, dalszy postęp będzie następować w dziedzinie konstrukcji sond pomiarowych. Obserwuje się dążenie do budowy sond umożliwiających wykorzystanie do badań możliwie małych, submilimolowych wręcz, ilości substancji. Sondy te – zwane nanosondami (*nanoprobes*) – pozwalają na znaczne zwiększenie czułości. Jak dotąd trend ten spowodował wprowadzenie, oprócz omówionych już nanosond, sond chłodzonych helem (*cryoprobes*) [101] również powodujących znaczne podniesienie czułości oraz sond umożliwiających przepływowe pomiary NMR, będące połączeniem magnetycznego rezonansu jądrowego z chromatografią cieczową (LC-NMR) [102]. Właśnie połączenie tych dwóch technik analitycznych, wydaje się być szczególnie przydatne w analizie mieszanin produktów naturalnych zawierających połączenia cukrowe. Należy więc oczekiwać, że dalszy rozwój technik NMR wykorzystywanych w badaniach połączeń cukrowych, zmierzał będzie raczej w kierunku pełnego wykorzystania „mocy” już istniejących sekwencji pulsowych w połączeniu z gradientami pola, selektywnymi pulsami i wykorzystaniem możliwości nowych sond pomiarowych niż w kierunku wykorzystania większych magnesów nadprzewodzących.

4. PRZYKŁADOWE DANE EKSPERYMENTALNE

Jako modelowe połączenie wykorzystany został saponin z grupy GOTCAB [103] ((1→2)-β-D-galaktopiranozo-(1→3)-β-D-ksylopiranozo]-3-O-β-D-glukaran kwasu quillowego **1** wyizolowany z korzeni ziela z rodziny *Silene Vulgaris* (praca przygotowywana do druku). Podobne związki zostały opisane w pracy [104].

Należy zaznaczyć, że użyta próbka nie jest związkiem handlowym i z tego względu zawiera niewielką (ok. 2%) ilość związku o zbliżonej strukturze i masie cząsteczkowej, którego nie można usunąć obecnie dostępnymi metodami i jest on widoczny na prezentowanych widmach. Wydaje się jednak, że nie przeszkadza to w wykorzystaniu takiej próbki do prezentacji możliwości aplikacyjnych spektroskopii NMR a wręcz może je uwiarygodnić.

Wszystkie prezentowane w tej pracy widma NMR zostały wykonane samodzielnie przez autora przy użyciu spektrometru BRUKER DRX400 pracującego z częstotliwością rezonansową 400,13 MHz i 100,60 MHz odpowiednio dla ^1H i ^{13}C . Spektrometr wyposażony jest w przystawkę do generowania gradientów pola B_0 . Do pomiarów wykorzystana była 5 mm sonda szerokopasmowa umożliwiająca pomiary technikami inwersowymi oraz w gradientie pola B_0 .

Do badań przygotowany został roztwór zawierający 35 mg związku **1** w 2 ml deuterowanej pirydyny ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ – Eurisotop).

Poszczególne widma wykonane zostały w temperaturze 303 K z wybranymi parametrami wyszczególnionymi poniżej:

^1H : Zakres spektralny 4800 Hz, 64 scany.

^{13}C : Zakres spektralny 25000 Hz, 1024 scany, widmo odsprężane od protonów.

DQF-COSY: Zakres spektralny 4800 Hz, 512 eksperymentów po 16 skanów.

HSQC: Zakres spektralny 4800 i 25000 Hz odpowiednio dla ^1H i ^{13}C , 512 eksperymentów po 8 skanów z odsprzęganiem ^{13}C w czasie akwizycji (sekwencja GARP).

HSQC-TOCSY: Zakres spektralny 4800 i 25000 Hz odpowiednio dla ^1H i ^{13}C , 480 eksperymentów po 64 skany z odsprzęganiem ^{13}C w czasie akwizycji (sekwencja GARP). Do uzyskania warunków izotropowego mieszania spinów (*spin locking*) wykorzystano sekwencję DIPSI-2.

HMBC: Zakres spektralny 4800 i 25000 Hz odpowiednio dla ^1H i ^{13}C , 512 eksperymentów po 64 skany z odsprzęganiem ^{13}C w czasie akwizycji (sekwencja GARP).

Wszystkie eksperymenty 2D wykonane zostały w gradiencie pola B_0 a eksperymenty heterojądrowe z wykorzystaniem detekcji odwrotnej.

Widma poddane zostały obróbce z wykorzystaniem oprogramowania dostarczonego wraz ze spektrometrem przez producenta (program XWIN-NMR 2.6) a w celu uzyskania lepszej rozdzielczości widm 2D wykorzystana została procedura *linear prediction*.

PODZIĘKOWANIA

Panu Docentowi Markowi J. Potrzebowskiemu, Kierownikowi Pracowni Badań Strukturalnych CBMiM PAN w Łodzi, dziękuję za cenne uwagi i inspirujące dyskusje w trakcie pisania tej pracy.

Wyrażam podziękowania dla profesora Maxa Henry'ego oraz dr Mohameda Rochd z Wydziału Farmacji Uniwersytetu H. Poincaré w Nancy za udostępnienie związku **1** a dr P. Mutzenhardtowi z Laboratorium Metodologii NMR Uniwersytetu H. Poincaré w Nancy, dziękuję za umożliwienie wykonania widm saponinu **1**.

Autor jest wdzięczny Komitetowi Badań Naukowych za wsparcie finansowe, grant numer 3 T09A 02619.

PIŚMIENICTWO CYTOWANE

- [1] W.J. Lennarz, G.W. Hart, *Methods in Enzymol.*, 1994, **230**, 283.
- [2] W.P. Aue, E. Bartholdi, R.R. Ernst, *J. Chem. Phys.*, 1976, **64**, 2229.
- [3] a) A.A. Shaw, C. Salaun, J.-F. Dauphin, B. Ancian, *J. Magn. Reson. A.*, 1996, **120**, 110.
b) B. Ancian, I. Bourgeois, J.-F. Dauphin, A.A. Shaw, *J. Magn. Reson. A.*, 1997, **125**, 348.
- [4] a) J. Dabrowski, *Methods in Enzymol.*, 1989, **179**, 122.
b) C. Abeygunawardana, C.A. Bush, *Adv. Biophys. Chem.*, 1993, **3**, 199.
- [5] A. Bax, D.G. Davis, *J. Magn. Reson.*, 1985, **65**, 355.
- [6] a) C.A. Bush, *Bull. Magn. Reson.*, 1998, **18**, 73.
b) S. Subramanian, A. Bax., *J. Magn. Reson.*, 1987, **71**, 325.

- [7] M. Karplus, *J. Chem. Phys.*, 1959, **30**, 11.
- [8] T.A.W. Koerner Jr., J.H. Prestegard, P.C. Demou, R.K. Yu., *Biochemistry*, 1983, **22**, 1687.
- [9] D. Neuhaus, M. Williamson, *The Nuclear Overhauser Effect in Structural and Conformational Analysis*, VCH, New York, 1989.
- [10] B.N.N. Rao, V.K. Dua, C.A. Bush, *Biopolymers*, 1985, **24**, 2207.
- [11] H. Kovacs, S. Bagley, J. Kowalewski, *J. Magn. Reson.*, 1989, **85**, 530.
- [12] P. Cagas, C.A. Bush., *Biopolymers*, 1992, **32**, 277.
- [13] A. Bax, D.D. Davis, *J. Magn. Reson.*, 1985, **63**, 207.
- [14] A.A. Bothner-Bay, R.L. Stephens J.-M. Lec, C.D. Warren, R.W. Jeanloz, *J. Am. Chem.Soc.*, 1984, **106**, 811.
- [15] A. Ejchart, L. Kozerski, *Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego ¹³C*, PWN, Warszawa, 1988.
- [16] A. Bax, R.H. Griffey, B.L. Hawkins, *J. Magn. Reson.*, 1983, **55**, 301.
- [17] a) R.A. Byrd, W. Egan, M.F. Summers, A. Bax, *Carbohydrate Res.*, 1987, **166**, 47.
b) C. Abeyguanawardana, C.A. Bush, J.O. Cisar, *Biochemistry*, 1991, **30**, 8568.
- [18] A. Bax, M.F. Summers, *J. Am. Chem. Soc.*, 1986, **108**, 2093.
- [19] a) D.A. Powell, W.S. York, H. van Halbeek, J.T. Etsch, A.T. Gray, P.G. Waterman, *Can. J. Chem.*, 1990, **68**, 1044.
b) J. Glushka, F.J. Cassels, R.W. Carlson, H. van Halbeek, *Biochemistry.*, 1992, **31**, 1074.
- [20] H. van Halbeek, *Carbohydrates & Glycoconjugates*, [in:] *Encyclopedia of Nuclear Magnetic Resonance*, D. M. Grant, R.K. Harris (eds), John Wiley & Sons, New York, 1996, vol. 2, p. 1107.
- [21] G. Kotowycz, R.U. Lumieux, *Chem. Rev.*, 1973, **73**, 669.
- [22] A.S. Perlin, B. Casu, [in:] *The Polysaccharides*, G.O. Aspinall (eds), Academic Press, New York, 1982, vol 1., 133.
- [23] A.S. Sierani [in:] *Glycoconjugates: Composition, Structure and Function*, H.J. Allen and E.C. Kisailus (eds), Merce! Dekker, New York, 1992.
- [24] a) A.S. Sashakow, N.E. Nifant'ev, V.Y. Amocheva, N.K. Kochetkov, *Magn. Reson. Chem.*, 1993, **31**, 599.
b) K. Bock, M. Thogersen, *Annu. Rep. NMR Spectrosc.*, 1982, **13**, 1.
- [25] A.S. Perlin B. Casu, *Tetrahedron Lett.*, 1969, 2921.
- [26] G. Stecker J.-M. Wieruszewski, J.-C. Michalski, J. Montreuil, *Carbohydrate Res.*, 1992, **226**, 1.
- [27] J.H. Bradrury, C.A. Jenkins, *Carbohydrate Res.*, 1984, **126**, 125.
- [28] J.-M. Wieruszewski, J.-C. Michalski, J. Mentreuil, G. Stecker, *Glycoconjugate J.*, 1990, **7**, 13.
- [29] a) H. van Halbeek, *Methods in Enzymol.*, 1994, **230**, 132.
b) J.F.G. Vliegthart, L. Dorland, H. van Halbeek, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 1983, **41**, 209.
- [30] F. Inagaki, *Magn. Reson. Chem.*, 1992, **30**, S 125.
- [31] K. Bock, C. Pedersen, H. Pedersen, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 1984, **42**, 193.
- [32] T.A. Koerner Jr., J.H. Prestegard, R.K. Yu, *Methods in Enzymol.*, 1987, **138**, 38.
- [33] J. Dabrowski, *Application of Two-Dimensional NMR Methods in the Structural Analysis of Oligosaccharides and Polysaccharides*, [in:] *Methods in Stereochemical Analysis* vol 9, W.R. C'rossmun, R.M.K. Carlson (eds), VCH Publishers Inc., 2 ed., New York, 1994, 741.
- [34] F.J. Cassels, H. van Halbeek, *Methods in Enzymol.*, 1995, **253**, 69.
- [35] a) J. Dabrowski, H. Egge, U. Dabrowski, *Carbohydrate Res.*, 1983, **141**, 1.
b) J. Dabrowski, U. Dabrowski, P. Hanfland, M. Kordowicz, W.E. Hull, *Magn. Reson. Chem.*, 1986, **24**, 59.
- [36] a) G. Batta, K.E. Kövér, *Tetrahedron*, 1991, **47**, 3535.
b) P. Berthault, F. Dejadi, B. Perly, *J. Magn. Reson.*, 1991, **91**, 102.

- [37] L. Brüenschweiler, R.R. Ernst, *J. Magn. Reson.*, 1992, **91**, 102.
- [38] S.P. Rucker, A.J. Shaka, *Mol. Phys.*, 1989, **68**, 509.
- [39] S.J. Glaser, G.P. Drobny, *Adv. Magn. Reson.*, 1990, **14**, 35.
- [40] J. Dabrowski, U. Dabrowski, W. Bermel, M. Kordowicz, P. Hanfland, *Biochemistry*, 1988, **27**, 5149.
- [41] D. Uhrin, A. Mele, J. Boyd, M.R. Wormald, R.A. Dweck, *J. Magn. Reson.*, 1992, **97**, 411.
- [42] F.J. Moy, H.A. Sheraga, J.F. Liu, R. Wu, G. Montelione, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, **86**, 983.
- [43] G.A. Morris, R. Freeman, *J. Magn. Reson.*, 1978, **29**, 433.
- [44] a) A. Gamian, E. Romanowska, U. Dabrowski, J. Dabrowski, *Biochemistry*, 1991, **30**, 5032.
b) A. Ejchart, J. Dabrowski, C.W. Lieth, *Magn. Reson. Chem.*, 1992, **30**, S 105.
- [45] H. Kessler, G. Gemmecker, B. Haase, *J. Magn. Reson.*, 1988, **77**, 401.
- [46] a) G.A. Vuister, P. DeWaard, R. Boelens, J.F.G. Vliegthart, R. Kaptein, *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, **111**, 772.
b) T.J. Ruthenford, S.W. Homans, *Glycobiology*, 1992, **2**, 293.
c) P. DeWaard, B.R. Leeftang, J.F.G. Vliegthart, R. Boelens, G.A. Vuister, R. Kaptein, *J. Biomol. NMR*, 1992, **2**, 211.
- [47] G. Bodenhausen, D.J. Ruben, *Chem. Phys. Lett.*, 1980, **69**, 185.
- [48] W.F. Reynolds, S. McLean, L.-L. Tay, M. Yu, R.G. Enriquez, D.M. Estwick, K.O. Pascoe, *Magn. Reson. Chem.*, 1997, **35**, 455.
- [49] T. Parella, *Magn. Reson. Chem.*, 1998, **36**, 467.
- [50] a) R. Wagner, S. Berger, *J. Magn. Reson. A*, 1996, **123**, 119.
b) A.M. Dixon, G. Widmalm, T.E. Bull, *J. Magn. Reson.*, 2000, **147**, 266.
- [51] a) G. Mackin, A.J. Shaka, *J. Magn. Reson. A*, 1996, **118**, 247.
b) T. Parella, J. Belloc, *J. Magn. Reson.* 2001, **148**, 78.
- [52] W.F. Reynolds, R.G. Enriquez, *J. Nat. Prod.*, 2002, **65**, 221.
- [53] a) D. Canet, *Nuclear Magnetic Resonance – Concepts and Methods*, John Wiley & Sons, Chichester, 1996.
b) D. Canet, J.-C. Boubel, E. Canet Soulas, *La RMN – Concepts, méthodes et applications*, 2^e édition, Dondou, Paris 2002.
- [54] S. Braun, H.O. Kalinowski, S. Berger, *150 and More Basic NMR Experiments. A Practical Course*, Wiley VCH, Weinheim, 1998.
- [55] S. Homans, R.A. Dweck, T.W. Rademacher, *Biochemistry*, 1987, **26**, 6571.
- [56] J.P. Carver, A.A. Grey, *Biochemistry*, 1981, **20**, 6607.
- [57] J. Dabrowski, *Application of Two-Dimensional NMR Methods in the Structural Analysis of Oligosaccharides and Other Complex Carbohydrates*, [in:] *Methods in Stereochemical Analysis*, vol 9, p. 349, 2nd ed., W.R. Croasmun, R.M.K. Carlson (eds), VCH Publishers Inc., New York, 1987.
- [58] F. Michon, J.R. Brisson, R. Roy, F.E. Ashton, H.J. Jennings, *Biochemistry*, 1985, **24**, 5592.
- [59] M.A. Berstein, H.E. Morton, Y.J. Guindon, *J. Chem. Soc. Perkin. Trans. 2*, 1986, 1155.
- [60] L.D. Huil, S. Sukumar, *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, 1979, 291.
- [61] a) A. Kumar, *J. Magn. Reson.*, 1978, **30**, 227.
b) G. Bodenhausen, R. Freeman, G.A. Morris, D.L. Turner, *J. Magn. Reson.*, 1978, **31**, 75.
- [62] a) D. Neuhaus G. Wagner, M. Vasak, H.R. Kägi, K. Wüthrich; *Eur. J. Biochem.*, 1985, **151**, 257.
b) J. Cavanagh, W.J. Fairbrother, A.G. Palmer III, N.J. Skelton, *Protein NMR Spectroscopy. Principles and Practice*, Academic Press, San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto, 1996.
- [63] a) J. Dabrowski, A. Ejchart, M. Kordowicz, P. Hanfland, *Magn. Reson. Chem.*, 1987, **25**, 338.
b) E. Bernau, U. Dabrowski, J. Dabrowski, *Carbohydrate Res.*, 1988, **1**, 176.
- [64] E. Bernau, *Eur. J. Biochem*, 1987, **165**, 385.

- [65] R.U. Lemieux, K. Bock, L.T.J. Delbaerc, S. Koto, U.S. Rao, *Can. J. Chem.*, 1980, **58**, 631.
- [66] a) P. Hanfland, H. Egge, U. Dabrowski, S. Kuhn, D. Rodcke, J. Dabrowski, *Biochemistry.*, 1981, **20**, 5310.
b) J.P. Carver, A.A. Grey, F.M. Winnik, J. Hakimmi, C. Ceccarini, P.H. Atkinson, *Biochemistry.*, 1981, **20**, 6600.
c) M. Berstein, L.D. Hall, *J. Am. Chem. Soc.*, 1982, **104**, 5553.
- [67] E. Katzenellenbogen, A. Gamin, E. Romanowska, U. Dabrowski, J. Dabrowski, *Eur. J. Biochem.*, 1991, **196**, 197.
- [68] J.-R. Brisson, J.P. Carrer, *Can. J. Biochem.*, 1990, **258**, 1431.
- [69] D. Acguotti, L. Poppe, J. Dabrowski, C.W. Lieth, S. Sonnino, G. Tettamanti, *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, **112**, 7772.
- [70] L. Poppe, C.W. Lieth, J. Dabrowski, *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, **112**, 7762.
- [71] L. Poppe, J. Dabrowski, *J. Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1989, **159**, 618.
- [72] G. Batta, A. Liptak, *J. C. S. Chem. Comm.*, 1985, 368.
- [73] C.A. Bush, *Polysaccharides and Complex Oligosaccharides*, [in:] *Encyclopedia of Nuclear Magnetic Resonance*, D. M. Grant, R.K. Harris (eds), John Wiley & Sons, New York, 1996, vol. 6, p. 3746.
- [74] C.A. Podlasek, W.A. Stripe, J. Charmichael, Y. Sang, B. Basu, A.S. Sieranni, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, **118**, 1413.
- [75] C.A. Bush, *Bull. Magn. Reson.*, 1988, **10**, 75.
- [76] S.W. Homans, *Progress in NMR Spect.*, 1990, **22**, 55.
- [77] B. Meyer, *Top. Curr. Chem.*, 1990, **154**, 141.
- [78] H. van Halbeek, L. Poppe, *Magn. Reson. Chem.*, 1992, **30**, S 74.
- [79] R. Freeman, *Chem. Rev.*, 1991, **91**, 1397.
- [80] H. Kessler, S. Mronga, G. Gemmecker, *Magn. Reson. Chem.*, 1991, **29**, 527.
- [81] Ch. Roumestand, C. Delay, J.A. Gavin, D. Canet, *Magn. Reson. Chem.*, 1999, **37**, 451.
- [82] A. Gayer, U. Huchel, R.R. Schmidt, *Magn. Reson. Chem.*, 1998, **37**, 145.
- [83] S. Brownstein, J. Baranis, *J. Magn. Reson.*, 1990, **86**, 247.
- [84] a) L.D. Hall, T.J. Norwood, *J. Magn. Reson.*, 1998, **76**, 548.
b) L. Poppe, J. Dabrowski, C.W. Lieth, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1991, **174**, 1169.
- [85] C. Motat, R.F. Taravel, *Tetrahedron Lett.*, 1988, **29**, 199.
- [86] a) G. Zhu, A. Bax, *J. Magn. Reson. A*, 1993, **104**, 353.
b) T.J. Norwood, J. Boyd, J.E. Heritage, N. Soffe, J. D. Campbell, *J. Magn. Reson.*, 1990, **97**, 488.
- [87] G. Otting, K. Wüthrich, *J. Magn. Reson.*, 1988, **76**, 569.
- [88] L. Poppe, H. van Halbeek, *Magn. Reson. Chem.*, 1991, **29**, 848.
- [89] L. Poppe, H. van Halbeek, *J. Magn. Reson.*, 1991, **93**, 214.
- [90] M. Eberstadt, G. Gemmecker, D.F.Mierke, H. Kessler, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1995, **34**, 1671.
- [91] W.A. Thomas, *Progress in NMR Spect.*, 1997, **30**, 183.
- [92] I. Tvarowska, F.R. Taravel, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.*, 1995, **51**, 15.
- [93] M. Karplus, *J. Am. Chem. Soc.*, 1963, **85**, 2870.
- [94] a) C.A.G. Haasnoot, F.A.A.M. Leeuw, C. Altona, *Tetrahedron*, 1980, **36**, 2783.
b) L.A. Donders, F.A.A.M. Leeuw, C. Altona, *Magn. Reson. Chem.*, 1989, **27**, 556.
- [95] J.A. Schwarcz, A.S. Perlin, *Can. J. Chem.*, 1972, **50**, 3667.
- [96] I. Tvarowska, M. Hritovini, E. Ptrakova, *Carbohydrate Res.*, 1989, **189**, 359.
- [97] B. Mulloy, T.A. Frankier, D.B. Davies, *Carbohydrate Res.*, 1988, **184**, 39.
- [98] J.P. Carver, *Curr. Opin. Struc. Biol.*, 1991, **1**, 716.
- [99] C.A. Bush, *Curr. Opin. Struc. Biol.*, 1992, **2**, 655.

- [100] S.W. Homans, *Glycobiology*, 1993, **3**, 551.
[101] BRUKER Report, 2001, **149**, 19.
[102] BRUKER Report, 2001, **149**, 22.
[103] N. Tan, J. Zhou, S. Zhao, *Phytochem*, 1999, **52**, 153.
[104] S. Bouguet-Bonnet, M. Rochd, P. Mutzenhardt, M. Henry, *Magn. Reson. Chem.*, 2002, **40**, 618.

Praca wpłynęła do Redakcji 24 września 2002

**BADANIA UKŁADÓW RACEMAT/ENANCJOMER
ORAZ OKREŚLANIE NADMIARU
ENANCJOMERYCZNEGO ZA POMOCĄ
WYSOKOROZDZIELCZEJ SPEKTROSKOPII NMR
W CIECZY I W CIELE STAŁYM**

STUDIES OF RACEMATE/ENANTIOMER SYSTEMS
AND DETERMINATION OF ENANTIOMER EXCESS
BY HIGH RESOLUTION LIQUID
AND SOLID STATE NMR

Elżbieta Jolanta Tadeusiak

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

Abstract

Wstęp

1. Badanie nadmiaru enancjomerycznego za pomocą magnetycznego rezonansu jądrowego w cieczy
 - A. Zastosowanie odczynników tworzących chiralne pochodne (CDAs)
 - B. Zastosowanie chiralnych odczynników solwatujących (CSAs)
 - C. Zastosowanie chiralnych lantanowych odczynników przesuujących (CLSRs)
2. Badanie nadmiaru enancjomerycznego za pomocą magnetycznego rezonansu jądrowego w ciele stałym

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane



Dr nauk chemicznych Elżbieta Jolanta Tadeusiak ukończyła Uniwersytet Łódzki w 1974 roku uzyskując tytuł mgr chemii. Od 1975 roku pracuje w Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych Polskiej Akademii Nauk w Łodzi, gdzie w 1986 roku obroniła pracę doktorską pt: „Reakcje tioloestrów kwasów fosforu z halogenami”. Poprzednio zajmowała się syntezą związków organicznych, a obecnie pracuje nad zagadnieniami związanymi ze spektroskopią magnetycznego rezonansu jądrowego. Jest adiunktem w Samodzielnej Pracowni Badań Strukturalnych w CBMiM PAN w Łodzi.

ABSTRACT

Over the past decade there has been a surge of interest in enantioselective synthesis which has led to convenient methods of measuring enantiomeric purity or enantiomeric excess of many compounds. The enantiomeric excess (*ee*) can be determined by the following principal methods: (a) chiroptical, (b) chromatography (GS, HPLC, TLC), (c) isotopic dilution, (d) kinetics, (e) electrophoresis, (f) calorimetry, (g) nuclear magnetic resonance.

In this paper there are presented studies, which were performed in aim to determine *ee* by NMR in liquid and solid state.

Determination of enantiomeric purity using NMR in liquids requires the intervention of a chiral auxiliary to convert an enantiomeric mixture into a mixture of diastereomers. Three types of chiral auxiliaries are widely used. Chiral derivatising agents (CDAs) form diastereomers while chiral solvating agents (CSAs) and chiral lanthanide shift reagents (CLSRs) form diastereomeric complexes *in situ* with the substrate enantiomers.

In recent years Solid-State NMR (SS NMR) has emerged as a powerful tool for the analysis of solids. In particular the ODESSA (One Dimensional Exchange Spectroscopy by Sideband Alternation) technique permits to recognize differences between enantiomers and racemates as well to assess the enantiomeric excess.

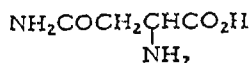
WSTĘP

Obecnie obserwuje się rosnącą tendencję do produkowania związków w postaci czystych enancjomerów.

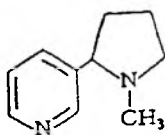
Enancjomery jednego związku, choć posiadają identyczne właściwości fizyczne z wyjątkiem tej, że skręcają płaszczyznę polaryzacji światła w tym samym stopniu lecz w przeciwnych kierunkach, mogą różnić się między sobą zapachem, smakiem [1–3] czy aktywnością biologiczną [4–6]. Np. *R*-(+)-limonen ma zapach pomarańczy, a jego enancjomer – cytryny, prawoskrętna asparagina ma smak słodki, a lewoskrętna – jest bez smaku. Toksyczność występującej w przyrodzie *S*-(-)-nikotyny jest znacznie większa niż jej *R*-enancjomeru. Alkaloid (-)-leworfanol jest silnym narkotycznym środkiem przeciwbólowym, a jego enancjomer nie wykazuje tego rodzaju aktywności (rys. 1).



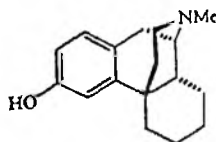
limonen



asparagina



nikotyna



leworfanol

Rysunek 1. Wzory limonenu, asparaginy, nikotyny i leworfanolu

W przemyśle farmaceutycznym, kosmetycznym, spożywczym i chemicznym w coraz większym stopniu dąży się więc do produkowania związków enancjomerycznie czystych, a przed chemikami stoi zadanie przeprowadzania enancjoselektywnych syntez.

Miarą sukcesu syntetycznego jest zdolność wyodrębnienia produktu o określonej stereochemii. Równie ważnym elementem tej strategii jest umiejętność określenia nadmiaru enancjomerycznego.

W mieszaninie składającej się z czystego enancjomeru (*R* lub *S*) i racematu *RS* nadmiar enancjomeryczny (*enantiomer excess*) jest procentowym nadmiarem enancjomeru nad racematem [7].

$$\% ee = \frac{|R - S|}{R + S} \times 100 \quad (1)$$

Wielkość *ee* można oznaczyć różnymi metodami fizykochemicznymi [8, 9]. Wśród nich można wyróżnić: metody chiralooptyczne, chromatograficzne, kalorymetryczne, elektroforezę, rozcieńczenie izotopowe, magnetyczny rezonans jądrowy.

Magnetyczny rezonans jądrowy to atrakcyjna, szybka i prosta technika dzięki której można łatwo określić nadmiar enancjomeryczny. Aby to było możliwe muszą być spełnione dwa warunki:

- musi istnieć czynnik zależny od struktury, różnicujący diastereoizomery,
- musi istnieć czynnik niezależny od struktury, zależny natomiast od względnych udziałów molowych diastereoizomerów.

Obydwa te warunki są spełnione w NMR. Pierwszy – spełnia przesunięcie chemiczne, a drugi – intensywności rezonansowe [10].

1. BADANIE NADMIARU ENANCJOMERYCZNEGO ZA POMOCĄ MAGNETYCZNEGO REZONANSU MAGNETYCZNEGO W CIECZY

Zazwyczaj enancjomery nie mogą być rozróżnione w achiralnym środowisku za pomocą widm NMR, ponieważ występujące w nich jądra są jednakowo ekranowane przez otoczenie i stąd wykazują identyczne przesunięcia chemiczne. O takich jądrach mówimy, że są izochroniczne. Natomiast w diastereoizomerach jądra znajdują się w różnych otoczeniach i jako anizochroniczne wykazują różne przesunięcia chemiczne; aby enancjomery zostały w widmie NMR rozróżnione trzeba je przekształcić w diastereoizomery. Można to osiągnąć stosując chiralne odczynniki pomocnicze.

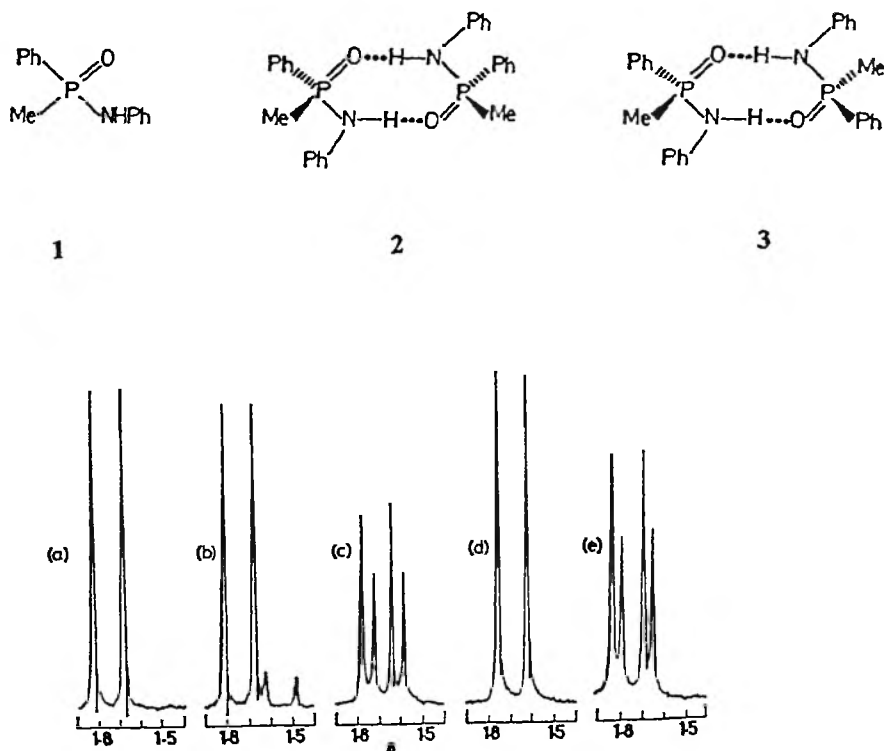
Skuteczny, chiralny odczynnik pomocniczy powinien w widmach wielu substratów indukować znacząco duże przesunięcie chemiczne.

Stosowane są trzy typy chiralnych odczynników pomocniczych: odczynniki tworzące chiralne pochodne (CDAs – *Chiral Derivatizing Agents*) [11], chiralne odczynniki solwatujące (CSAs – *Chiral Solvating Agents*) [12, 13] i chiralne odczynniki przesuwające zwane także chiralnymi odczynnikiem przesunięcia chemicznego; ponieważ są to odczynniki zawierające atom lantanowca stąd nazwa CLSRs (*Chiral Lanthanide Shift Reagents*) [14].

Zastosowanie CDAs prowadzi do utworzenia diastereoizomerów posiadających wiązanie kowalencyjne, zaś wskutek działania CSAs i CLSRs tworzą się *in situ* diastereoizomeryczne kompleksy, będące w równowadze z wyjściowymi enancjomercami.

Zdarza się, że jest możliwy pomiar stosunku enancjomerów bez dodania optycznych czynnych odczynników, rozpuszczalnika czy lantanowych odczynników przesuwających [15]. Dzieje się tak wtedy, gdy możliwe jest powstawanie dimerów. Np. nadmiar enancjomeryczny w próbkach optycznie czynnego amidu kwasu mety-

lofosfonowego (**1**) został określony z proporcji diastereoizomerów **2** i **3** otrzymanych wskutek dimeryzacji (rys. 2) [16, 17].



Rysunek 2. Widma ^1H NMR (100 MHz) amidu **1** w CDCl_3 (zakres obejmujący ugrupowanie PCH_2) dla próbek zawierających różne enancjomeryczne składy: (a) 100% S; (b) 90% S, 10% R; (c) 60% S, 0% R; (d) 50% S, 50% R; (e) 40% S, 60% R

Podobną sytuację zaobserwowano w przypadku optycznie czynnych olefin: 1,2-cyklononadienu i *cis, trans*-1,4-cyklooktadienu [18, 19].

A. ZASTOSOWANIE ODCZYNNIKÓW TWORZĄCYCH CHIRALNE POCHODNE (CDAS)

CDAs są zwykle prostymi, wielofunkcyjnymi związkami, najczęściej dostępnymi handlowo. Ich zastosowanie daje pięciokrotnie większe różnice w przesunięciach chemicznych między enancjomerami niż zastosowanie chiralnych odczynników solwujących (CSAs).

Istnieje jednak kilka niedogodności związanych z ich zastosowaniem: a) przed analizą próbki potrzebne jest przeprowadzenie dodatkowej reakcji chemicznej; b) istnieje możliwość otrzymania fałszywych wyników wskutek kinetycznego rozdziału spowodowanego różnicą w szybkości reakcji enancjomerycznych substratów

(odczynniki Moshera) – $C_6H_5(CF_3)C(OCH_3)COOH$, co pozwoliło na badanie *ee* także za pomocą magnetycznego rezonansu jądrowego dla jąder ^{19}F . Innym związkiem wykorzystanym do badań za pomocą rezonansu ^{19}F jest chiralna *N,N'*-dimetylo-1,2-bis[*o*-, *m*-, *p*-(trifluorometylo)fenylo]-1,2-etanodiamina (**4**) skuteczny reagent dla określania *ee* aldehydów (rys. 3) [23].

Ciekawym odczynnikiem służącym do określania nadmiaru enancjomerycznego alkoholi i tioli za pomocą widm 1H okazała się diazafosfolidyna **5** [24], a do określenia amin, alkoholi i tioli ATEA czyli kwas α -[1-(9-antrylo)-2,2,2-trifluorooctoksy]oetowy (**6**) [25].

Oprócz wykorzystania w spektroskopii NMR jąder 1H i ^{19}F , także jądra ^{13}C , ^{29}Si , ^{77}Se , ^{31}P i ^{195}Pt służą do określania nadmiaru enancjomerycznego.

Jako przykład można przedstawić oznaczanie *ee* z wykorzystaniem ^{77}Se dla alkoholi [26] i kwasów karboksylowych [27], 2H pochodnych kwasów karboksylowych i amidów [28], ^{13}C ketonów [29], ^{29}Si alkoholi [30], ^{31}P fosfin [31], 1-hydroksyalkilofosfonianów [32] oraz ich pochodnych [33–37] oraz ^{195}Pt dla pochodnych allilowych [38].

Nie tylko diastereoizomery związane wiązaniem kowalencyjnym wykorzystywane są do określania *ee*. Także diastereoizomery występujące w postaci soli dają różnialne widma NMR [39–44].

Ta nierównocенność diastereoizomerycznych soli była obserwowana m.in. za pomocą widm 1H , ^{31}P lub ^{13}C w niepolarnych, aprotonowych rozpuszczalnikach ($CDCl_3$, C_6H_6 , a zwłaszcza w pirydynie), tj. w takich w których obecne są pary jonowe lub agregaty. Natomiast zastosowanie protonowych rozpuszczalników (np. CH_3OH) burzyło efekt agregacji par jonowych.

Warto zwrócić uwagę na to, że zwłaszcza spektroskopia ^{31}P NMR jest bardzo wygodnym narzędziem do określania *ee* z powodu obserwowanego dużego chemicznego rozszczepienia sygnałów oraz prostoty widm, gdy zastosowane jest szerokokopasmowe odsprężenie protonowe [45, 46].

Dzięki niej, z pomocą pochodnych P^{III} i P^V , można określić *ee* wielu związków. Np. reagenty Feringa (**7**), (**8**) [47, 48], chlorek kwasu binaftylofosforowego, (BNP)Cl (**9**), [49] czy 2-chloro-4(*R*),5-(*R*)-dimetylo-2-okso-1,3,2-oksafofolan (**10**) [50] posłużyły do określenia *ee* alkoholi (rys. 4).

Fering, Smaardijk, Wynberg [53] do określenia nadmiaru enancjomerycznego alkoholi zastosowali tzw. metodę duplikacyjną.

Alkohole takie jak np. 2-oktanol (**13**) mogą być ilościowo przekształcane w mieszaninę diastereoizomerycznych *O,O*-dialkilo fosfonianów w reakcji z PCl_3 (schemat 1) tak, by ich stosunek bezpośrednio odpowiadał proporcji enancjomerów w substracie.

Analizując te diastereoizomery za pomocą widm ^{31}P , w oparciu o ich stosunek powierzchni, można za pomocą wzoru:

$$p^2 = (k-1)/(k+1) \quad (2)$$

gdzie $p = ee$, a k – to stosunek powierzchni oszacowanych za pomocą MRJ określić nadmiar enancjomeryczny.

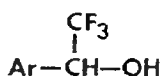
B. ZASTOSOWANIE CHIRALNYCH ODCZYNNIKÓW SOLWATUJĄCYCH (CSAS)

W 1965 roku Mislow [9] zasugerował, że enancjotopowe jądra będą anizochroniczne w chiralnym rozpuszczalniku. Zostało to udowodnione w następnym roku przez Pirkle [54], który zastosował chiralne odczynniki solwatające CSAs. Utworzone dzięki nim nietrwałe diastereoizomeryczne solwaty dysocjują szybko w skali czasu NMR, a obserwowane przesunięcie chemiczne jest wypadkową układów solwatowanych i niesolwatowanych.

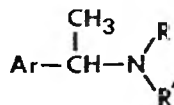
Niepolarne, achiralne rozpuszczalniki zwiększają anizochroniczność pomiędzy utworzonymi diastereoizomerycznymi kompleksami, natomiast polarne wykluczają tworzenie tych kompleksów i redukują indukowane zmiany w wielkości przesunięcia chemicznego $\Delta\Delta\delta$ do zera.

Większość najczęściej stosowanych chiralnych odczynników solwatających to 1-arylo-2,2,2-trifluoroetanol (**A**) i 1-aryloetyloaminy (**B**) (rys. 5).

Ogólnie, opierając się na pracach Eassona i Stedmana [55], przyjmuje się, że każdy solwatacyjny kompleks musi posiadać minimum trzy miejsca oddziaływania. Dwa z nich są potrzebne do tworzenia struktury podobnej do chelatu (*chelate-like structure*), a trzecie (zależne stereochemicznie) odpowiada za anizochroniczność substancji rozpuszczonej [56]. Oddziaływania te mogą mieć charakter wiązania wodorowego, kompleksu z przeniesieniem ładunku typu *charge transfer*, oddziaływania typu dipol–dipol czy przeniesienia protonu.



(A)



(B)

Rysunek 5

W przeciwieństwie do kompleksów utworzonych przez chiralne lantanowe odczynniki przesuwające CLSRs, chiralne odczynniki solwatujące CSAs są prostymi, diamagnetycznymi związkami. Większość indukowanych zmian w wielkości przesunięcia chemicznego, $\Delta\Delta\delta$, jest generalnie mniejsza niż obserwowana w przypadku zastosowania CDAs i CLSRs. Ponieważ CSAs są diamagnetyczne, poszerzenie sygnału nie stanowi tak znacznego problemu, jak w przypadku stosowania CLSRs. Często jest więc możliwe oszacowanie stosunku enancjomerów przez porównanie powierzchni sygnałów i określenie enancjomerycznej czystości.

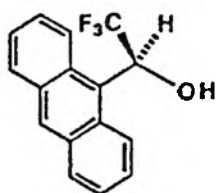
Sam odczynnik CSAs nie musi być idealnie enancjomerycznie czysty. Jeśli jego czystość enancjomeryczna jest mniejsza niż 100% to nie ma to zdecydowanego wpływu na intensywność sygnału.

Na wielkość różnicy przesunięć chemicznych $\Delta\Delta\delta$ wpływa stosunek molowy optycznie czynnego rozpuszczalnika i substancji rozpuszczonej. Początkowo zwiększenie udziału molowego rozpuszczalnika powoduje wzrost $\Delta\Delta\delta$, ale po przekroczeniu pewnej wartości nie obserwuje się zmian [57].

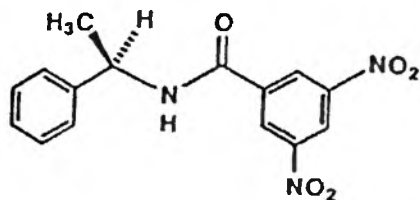
Zaobserwowano także, że zmiana temperatury przy której jest wykonywane widmo wpływa na wielkość różnicy przesunięcia chemicznego $\Delta\Delta\delta$. W przypadku solwatów związanych wiązaniem wodorowym wzrost temperatury powoduje przesunięcie równowagi na korzyść istnienia form nie związanych, co łączy się ze zmniejszeniem $\Delta\Delta\delta$. Z kolei spadek temperatury może nawet podwajać $\Delta\Delta\delta$, ponieważ stereochemicznie ważne konformacje mogą wtedy zwiększać swoją populację [58, 59].

Stosując odczynniki CSAs określono czystość enancjomeryczną wielu substancji, takich jak: alkohole, aminy, aminokwasy, ketony, kwasy karboksylowe, laktony, estry, sulfotlenki czy tlenki fosfin.

Np. enancjomerycznie czysty (*R*)-(-)-2,2,2-trifluoro-1-(antrylo)-etanol (TFAE) (**14**) posłużył do pomiaru czystości optycznej laktonów [60–63], eterów, [64] oraz oksazirydyn [65, 66], a (*R*)-(-)-*N*-(3,5-dinitro-benzoilo)- α -metylobenzyloamina (**15**) do tlenków fosfin [67] i chiralnych metylowych sulfotlenków (rys. 6) [68].

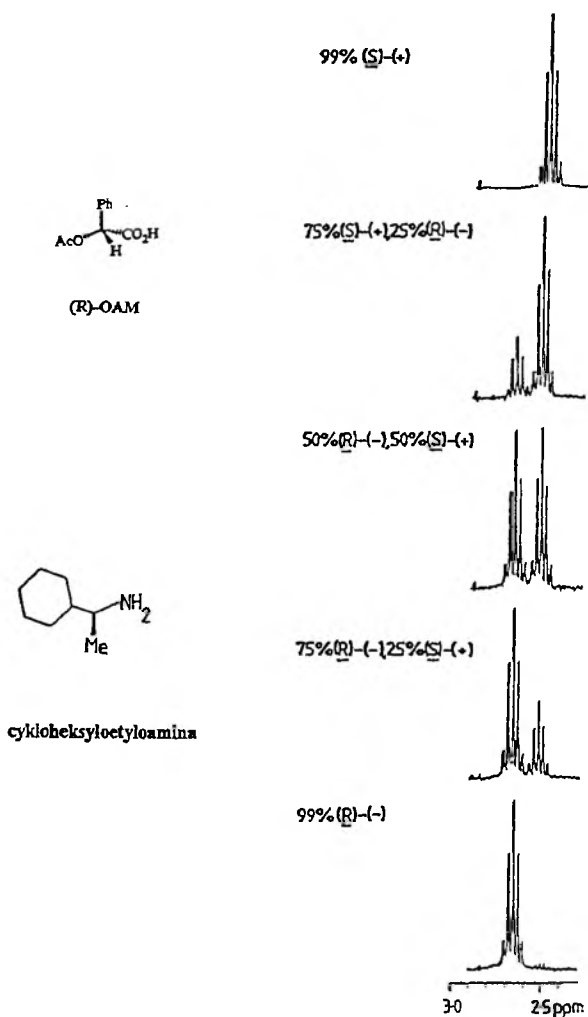


14



15

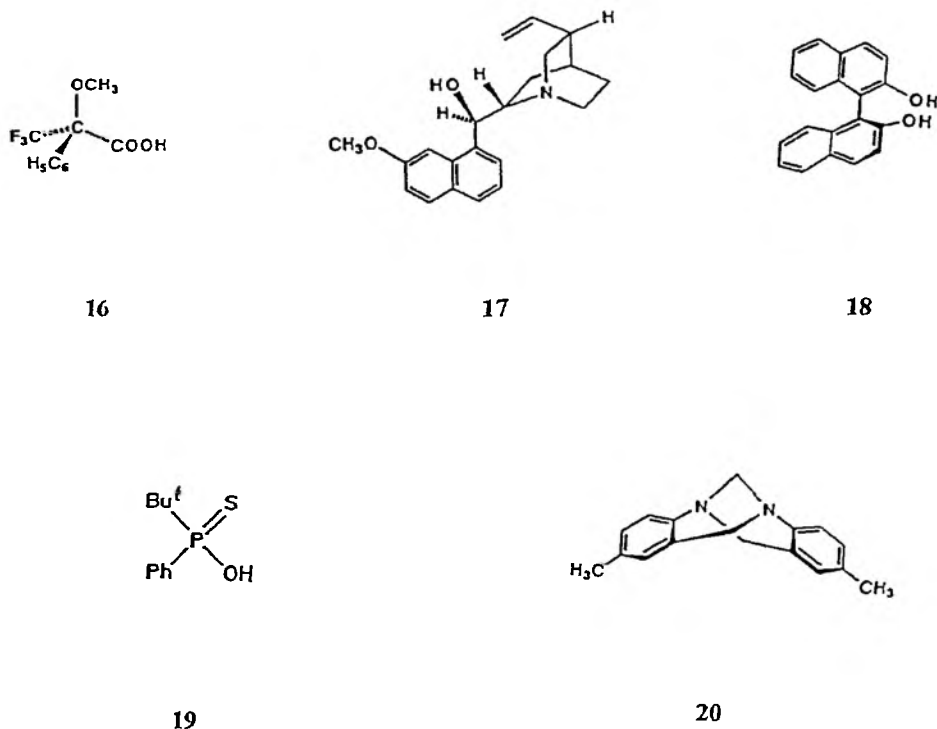
Rysunek 6



Rysunek 7. Widma ^1H NMR (298 K, C_6D_6) diastereoizomerycznych kompleksów cykloheksyloetyloaminy i (R)-OAM

Wykorzystując jako odczynnik solwujący kwas (*R*)-*O*-acetylomigdałowy (R-OAM) Parker i Taylor [69] badali skład enancjomeryczny w różnych próbkach cykloheksyloetyloaminy. W widmach ^1H NMR soli utworzonych z kwasu R-OAM i aminy zaobserwowali wyraźne różnice w przesunięciach sygnałów pochodzących od α C-H protonu cykloheksyloetyloaminy, co pozwoliło za pomocą integracji określić skład enancjomeryczny próbek (rys. 7).

Nierównocенność w widmach ^1H amin, diamin i aminoalkoholi została zaobserwowana, kiedy jako chiralny odczynnik solwujący zastosowano optycznie czynny odczynnik Moshera (**16**) (rys. 8) [70].



Rysunek 8

Chinina (**17**) jest niedrogim, chiralnym odczynnikiem solwującym i może służyć do określania nadmiaru enancjomerycznego pochodnych binafitylowych oraz alkoholi [71], natomiast asymetryczne związki, takie jak np. 2,2''-dihydroksy-1,1'-binafityl (**18**) jako chiralni gospodarze mogą być pomocni w określeniu *ee* szeregu innych związków [72].

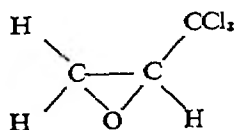
Enancjomery kwasu *t*-butylofenylofiofosfinowego (**19**) są także bardzo skutecznymi, solwującymi odczynnikami. Dzięki nim udało się określić nadmiar enancjomeryczny takich związków jak: alkohole, diole, tiole, merkptoalkohole, aminy, aminokwasy, hydroksy kwasy i związki fosforylowe [73–76].

Zasada Trögera (**20**) jest chiralną, heterocykliczną aminą, której chiralność jest spowodowana wyłącznie obecnością dwóch stereogenicznych atomów azotu. Ami- na ta może działać jako chiralny, solwujący odczynnik dla II i III rzędowych alko- holi i może służyć do określenia ich enancjomerycznej czystości [77].

Optycznie czynne substancje cyklodekstryny, są zdolne do tworzenia klatratów wykorzystywanych w procesie rozdziału. Klatraty są szczególnie ważne przy otrzy- mywaniu optycznie czynnych substancji, które nie mają odpowiednich grup funkcyj- nych niezbędnych do tworzenia diastereoizomerów. Cyklodekstryny posiadają we- wnętrzną klatkę do której organiczne cząsteczki mogą wchodzić tworząc inkluzyjne kompleksy. Natura tych asocjacji była badana za pomocą NMR zarówno w cie- stałym [78, 79] jak i w roztworze [80–84].

Połączenia klatratowe utworzone przez mocznik opisał Schlank w 1973 roku [85]. Cząsteczki mocznika są symetryczne i w czasie krystalizacji układają się twor- ząc lewo- i prawoskrętne helisy sieci heksagonalnej. Jeżeli substancja wchodząca w skład klatratu jest odmianą racemiczną, to występują warunki sprzyjające do twor- zenia się diastereoizomerów. Podobnie jak diastereoizomery dowolnej pary, również i te różnią się właściwościami fizycznymi, które wykorzystuje się przy ich rozdziale. Dzięki tworzeniu klatratów przez mocznik otrzymano optycznie czynny 3-metylook- tan i 3-metylononan [86].

Także ciekłe kryształy były wykorzystane jako CSAs do określenia enancjome- rycznego składu: np. 1,2-epoksy-3,3,3-trichloropropanu (**21**) (rys. 9) [87, 88].



21

Rysunek 9

W ciekłych kryształach głównym czynnikiem rozróżniającym może być stopień orientacji cząsteczek substancji rozpuszczonej. Wiadomo, że faza nematyczna cie- kłych kryształów staje się makroskopowo zorientowana w polu magnetycznym i ta orientacja jest przenoszona na cząsteczki substancji rozpuszczonej. W wyniku tej orientacji, bezpośrednie jądrowe oddziaływania dipol–dipol stają się oddziaływaniami dominującymi [89]. Stopień orientacji enancjomerów *R* i *S* optycznie czynnych czą- steczek substancji rozpuszczonej będzie różny. Zatem jądrowe oddziaływania dipol– dipol będą różne i ukażą się różnice w przesunięciach dwóch enancjomerów [90].

Np. syntetyczny polipeptyd poli- γ -benzylo-L-glutaminian (PBLG) został zasto- sowany do określenia *ee* kwasu 2-chloropropionowego [91]. Działanie PBLG polega na tym, że jego polipeptydowa helisa w fazie ciekłokrystalicznej jest zdolna do enan-

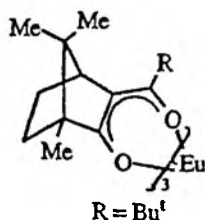
cjoselektywnego oddziaływania zarówno z polarnymi jak i apolarnymi chiralnymi związkami, dając wystarczająco duże różnice w przesunięciach chemicznych dla *R* i *S* form badanych związków.

Zastosowanie chiralnych odczynników solwatujących do określenia nadmiaru enancjomerycznego zostało przedstawione obszernie przez Pirkle i Hoovera [92], Weismana [11] oraz Parkera [93].

C. ZASTOSOWANIE CHIRALNYCH LANTANOWYCH ODCZYNNIKÓW PRZESUWAJĄCYCH (CLSRs)

Użycie chiralnych lantanowych odczynników przesuwających (CLSRs) daje pewne korzyści w porównaniu z innymi metodami. Dzięki nim możliwe jest badanie szerszego zakresu związków, chiralny odczynnik przesuwający nie musi być enancjomerycznie czysty a ponadto $\Delta\Delta\delta$ (różnica między przesunięciem chemicznym adduktu utworzonego przez substrat i lantanowy odczynnik przesuwający, a przesunięciem chemicznym substratu) jest większa niż podczas zastosowania CDAs i CSAs.

Po raz pierwszy CLSRs wprowadził w 1970 roku Whitesides i Lewis [94]. Był nim tris(3-*t*-butylohydroksymetyleno-*d*-kamforo)europ III (**22**) (rys. 10), który okazał się bardzo skuteczny w rozdzielaniu sygnałów enancjomerów α -fenyloetyloaminy i innych amin.



22

Rysunek 10

CLSRs to związki otrzymane w reakcji soli niektórych metali przejściowych (np. Eu, Pr lub Yb) z nieracemicznymi β -diketonami. W niepolarnych rozpuszczalnikach (CDCl_3 , CCl_4 lub CS_2) te paramagnetyczne sole są zdolne wiązać zasady Lewisa, zwłaszcza amidy, aminy, kwasy karboksylowe, estry, ketony, sulfidy, sulfiny i sulfotlenki wskutek rozszerzenia sfery koordynacyjnej metalu. Ponieważ $\Delta\Delta\delta$ jest funkcją stężenia, temperatury i zastosowanego ligandu porównanie „siły przesuwającej” wśród różnych odczynników przesuwających jest trudne.

Głównym ograniczeniem w zastosowaniu lantanowych odczynników przesuwających jest to, że substrat musi zawierać jeden lub więcej atomów zdolnych do koordynacji z jonem lantanowca.

Przesunięcia indukowane przez te paramagnetyczne jony mogą pochodzić zarówno z oddziaływań kontaktowych (oddziaływanie przez wiązanie) jak i dipolarnych (oddziaływanie przez przestrzeń). To dipolarne oddziaływanie było po raz pierwszy opisane dokładnie przez McConnella i Robertsona [95].

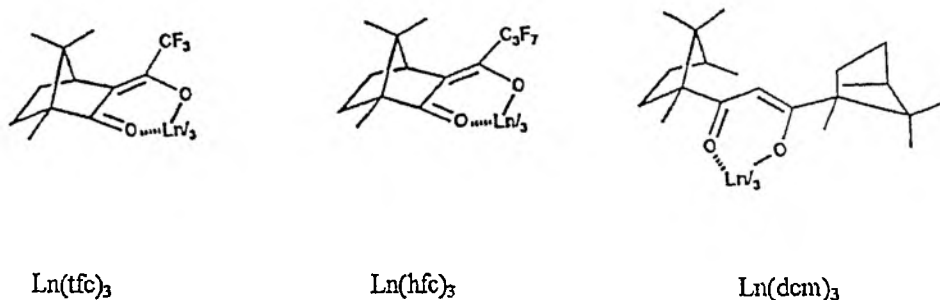
Bardziej dokładne dyskusje na temat oddziaływań kontaktowych i dipolarnych zawarte są w literaturze [96–100].

Lantanowce są „twardymi” kwasami Lewisa: najlepsze wiązanie przebiega z ligandami zawierającymi atomy „twardej” zasady Lewisa. Można przedstawić szereg malejącego powinowactwa wiązaniowego do CLSRs wśród następujących związków [101]:

I-rzędowa amina > grupa hydroksylowa > keton > aldehyd > eter > ester > nityl

Własności lantanowego odczynnika przesuwającego określają dwa składniki: jon metalu i ligand.

Fraser [14] badając cztery odczynniki przesuwające ustalił, że można utworzyć następujący szereg ich zdolności przesuwających: $\text{Eu}(\text{dcm})_3 > \text{Pr}(\text{hfc})_3 \approx \text{Yb}(\text{hfc})_3 > \text{Eu}(\text{hcf})_3$ (rys.11). Jeśli z kolei porównać $\text{Eu}(\text{tfc})_3$ i $\text{Eu}(\text{dcm})_3$, to ostatni indukuje większą wartość $\Delta\Delta\delta$, choć dla ograniczonej liczby związków.



Ln = atom lantanowca (np. Eu, Yb, Gd, Pr)

Rysunek 11. Chiralne lantanowe odczynniki przesuwające

Zaobserwowano, że kompleksy Eu i Co powodują przesunięcia sygnałów rezonansowych protonów w analizowanym związku w kierunku pól magnetycznych o mniejszym natężeniu, a kompleksy Pr w kierunku pól o większym natężeniu [102].

Jeśli chodzi o ligandy, to są nimi organiczne aniony zdolne do rozpuszczania jonów lantanowców w niepolarnych rozpuszczalnikach; praktycznie wszystkie pochodzą z 1,3-diketonowych związków. Najczęściej stosowanymi i handlowo dostęp-

nyymi ligandami są: tfc (3-trifluoroacetylo-*d*-kamforo) [103] i hfc (3-heptafluorobutyrylo-*d*-kamforo) [104] dla kompleksów Eu, Yb i Pr i dcm (*d,d*-dikamfolilometano) [105] dla Eu.

W badaniach z zastosowaniem CLSRs stosuje się niskie stężenie badanego substratu (0,1–0,25 M), a stosunek CLSRs/substrat mieści się w granicach 0,5–1 [106]. Substrat musi być suchy, podobnie jak rozpuszczalnik i sam lantanowy odczynnik przesuujący, który często jest sublimowany lub suszony nad P₂O₅. CLSRs może być stosowany w postaci ciała stałego lub jako stężony roztwór. Dodaje się go w małych dawkach. Roztwór przesącza się po każdym dodaniu, gdyż zbyt duża obecność lantanu może powodować poszerzenie linii jak również powodować redukcję indukowanych przesunięć.

Wartości $\Delta\Delta\delta$ otrzymane dzięki zastosowaniu CLSRs mogą być duże ($\Delta\Delta\delta = 1$ ppm) stąd są one wystarczające dla określenia czystości optycznej różnych związków enancjomerycznych, posiadających blisko centrum asymetrycznego atomu, który może ulegać koordynacji z jonem lantanowca. Wielkość $\Delta\Delta\delta$ wzrasta ze wzrostem stężenia chelatu.

Określenie czystości enancjomerycznej z użyciem CLSRs powinno być prowadzone w niezasadowych rozpuszczalnikach, ponieważ rozpuszczalnik obecny w dużym nadmiarze względem substratu, nawet słabo zasadowy, jest zdolny do skutecznego współzawodnictwa z substratem o miejsce koordynacyjne z atomem lantanowca, co w konsekwencji obniża obserwowane wartości przesunięcia chemicznego δ oraz różnicę przesunięć enancjomerów $\Delta\Delta\delta$. Najlepszymi rozpuszczalnikami dla tych badań są: pentan (lub inne węglowodory), CCl₄ i CDCl₃.

Stosując CLSRs określano nadmiary enancjomeryczne wielu związków. Przykładem mogą być m.in. prace Whitesdesa i Wernicka [107], Goeringa i Koermiera [108] oraz wielu innych [109–117].

2. BADANIE NADMIARU ENANCJOMERYCZNEGO ZA POMOCĄ MAGNETYCZNEGO REZONANSU JĄDROWEGO W CIELE STAŁYM

Czystość enancjomeryczną można także określić za pomocą magnetycznego rezonansu jądrowego substancji w fazie stałej, tj. w *Solid-State NMR* (SS NMR) stosując technikę szybkiego wirowania próbki ustawionej pod kątem magicznym $\alpha = 54^\circ 44,1'$ w stosunku do zewnętrznego pola magnetycznego.

W tym podejściu wykorzystuje się fakt, że czysty enancjomer i racemat krystalizują zwykle w różnych grupach przestrzennych i dają możliwe do zaobserwowania za pomocą tego rezonansu, różnice w izotropowych wartościach przesunięcia chemicznego.

Dzięki zastosowaniu tej metody Hill [118] odróżnił (+) enancjomer kwasu winowego, krystalizujący w grupie przestrzennej P₂₁ (obecność 2-krotnej osi śrubowej w cząsteczce) od racematu krystalizującego w grupie przestrzennej P₁ (obecność

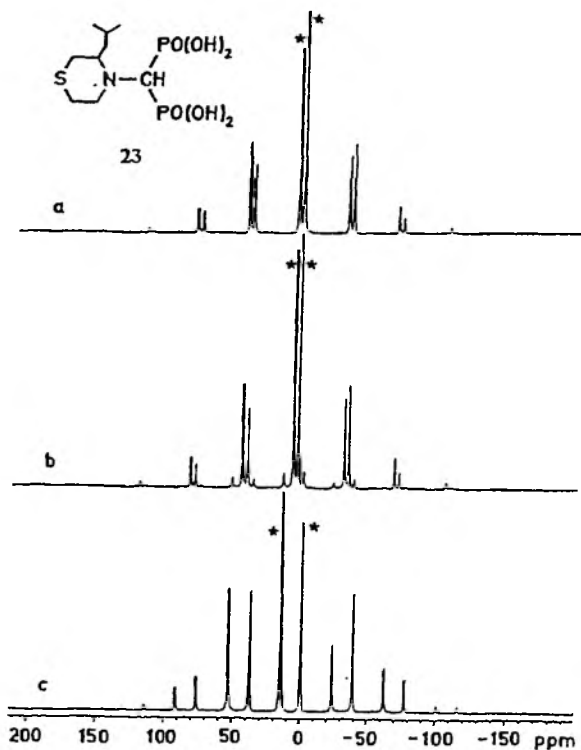
w cząsteczce środka symetrii) obserwując różne chemiczne przesunięcia α atomów C i atomów C w grupach karbonylowych obu tych związków (tabela 1).

Tabela 1. Przesunięcia chemiczne kwasu winowego otrzymane za pomocą ^{13}C NMR ciała stałego

Kwas winowy $\text{COOH}(\text{CHOH})_2\text{C}$ OOH	Przesunięcie chemiczne, ppm			
	grupa C=O		α atom węgla	
optycznie czysty (2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)	175,98	171,16	74,11	71,78
<i>dl</i>	179,24	177,45	74,26	73,10

Rezonans fosforowy ze względu na znaczną czułość detekcji i 100% zawartość izotopu ^{31}P , jest bardzo wygodnym i często wykorzystywanym narzędziem w badaniach związków fosforoorganicznych.

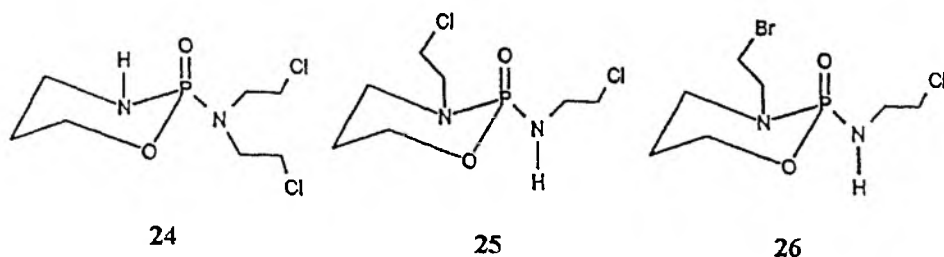
Znaczenie spektroskopii NMR w ciele stałym wiąże się z odkryciem zjawiska *cross*-polaryzacji (CP) [119] oraz rotowaniem próbki pod kątem magicznym (MAS) [120]. Połączenie tych dwóch metod pozwala uzyskać widma o wysokiej zdolności rozdzielczej.



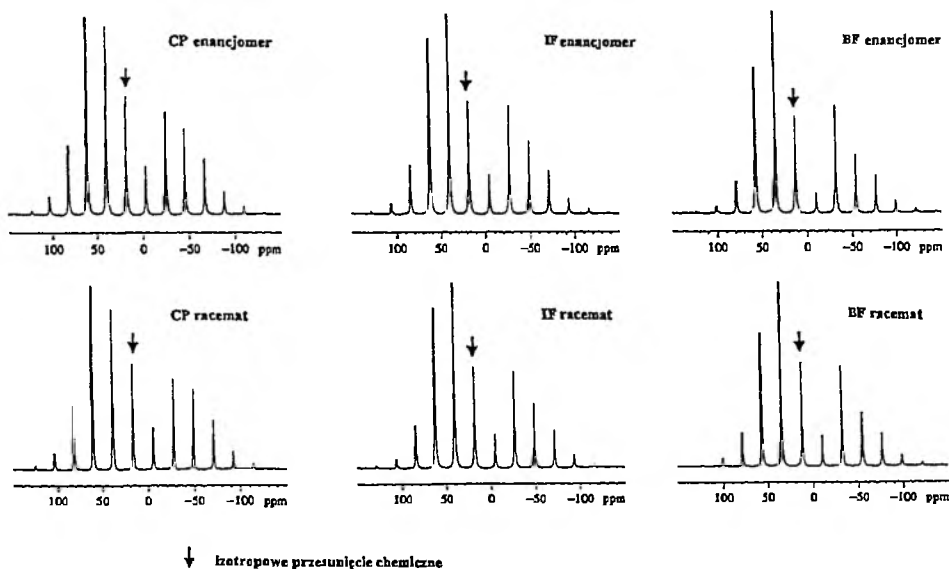
Rysunek 12. Widma ^{31}P CP/MAS (a) (-)-23, (b) (+)-23, (c) racemicznej- 23

Wykorzystując ^{31}P CP/MAS NMR Jakobsen i wsp. [121] określili nadmiar enancjomeryczny w próbkach pochodnej tiomorfoliny 23. Widma enancjomerów i racematu tego związku wykazywały różne izotropowe przesunięcia chemiczne i różne wzory pasm bocznych (rys.12).

Problem powstaje jednak, gdy enancjomer i racemat wykazują tę samą izotropową wartość przesunięcia chemicznego i kiedy ich wzory pasm bocznych są takie same lub prawie takie same, jak to ma miejsce w przypadku pochodnych oksazafosforinanów tj. cyklofosfamidu 24, ifosfamidu 25 i bromofosfamidu 26 – związkach stosowanych w leczeniu nowotworów (rys. 13 i 14).



Rysunek 13 Pochodne oksazafosforinanów



Rysunek 14 Widma ^{31}P CP/MAS cyklofosfamidu 24, ifosfamidu 25 i bromofosfamidu 26

Wartości przesunięć chemicznych ^{31}P δ_{iso} są następujące CP(rac) = 15,9 ppm,
 CP(enanc) = 16,7 ppm, IF(rac) = 12,2 ppm, IF(enanc) = 11,8 ppm, BF(rac) = 11,6 ppm,
 BF(enanc) = 11,4 ppm

Okazało się, że stosując sekwencje pulsową ODESSA (*One Dimensional Exchange Spectroscopy by Sideband Alternation*) [122], można odróżnić enancjomer od racematu w przypadku pochodnych oksazafosforinianów oraz określić nadmiary enancjomeryczne w próbkach cyklofosfamidu [123].

PODSUMOWANIE

Rosnąca tendencja do otrzymywania związków enancjomeryczne czystych jaką obserwuje się w ostatnich latach, stymuluje rozwój metod prowadzących do określania nadmiaru enancjomerycznego otrzymanych związków. Wśród wielu technik, zastosowanie magnetycznego rezonansu jądrowego znajduje coraz szersze zastosowanie. Można dzięki niemu prowadzić badania w cieczy i w ciele stałym. Jest to technika bezinwazyjna, szybka i coraz bardziej dostępna. Oznaczanie ee tą metodą waha się w granicach błędu od 1 do kilku procent.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] D.J. Caldwell, H. Eyring, *The Theory of Optical Activity*, Wiley: New York, 1971.
- [2] E. Charnay, *The Molecular Basis of Optical Activity, Optical Rotatory Dispersion and Circular Dichroism*, Wiley: New York, 1979.
- [3] L.D. Barron, *Molecular Light Scattering and Optical Activity*, Cambridge University, Cambridge, 1983.
- [4] W.-L. Tsai, K. Hermann, E. Hug, B. Rohde, A.S. Dreiding, *Helv. Chim. Acta*, 1985, **68**, 2238.
- [5] S.F. Mason, *Modern Optical Activity and the Chiral Discriminations*, Cambridge University, Cambridge, 1982.
- [6] J.H. Brewster, [w:] *Topics in Stereochemistry*, E.L. Eliel, N.L. Allinger, eds, Wiley-Interscience, New York, 1967; Vol. 2, s. 1.
- [7] Czystość optyczna określana następującym wzorem: % cz.opt. = $100 [\alpha]_{\lambda}^t / [\alpha]_0^t$, gdzie $[\alpha]_{\lambda}^t$ jest obserwowaną skręcalnością właściwą, $[\alpha]_0^t$ jest skręcalnością właściwą czystego enancjomeru w analogicznych warunkach jest często, ale nie zawsze równa ee (A. Horeau, *Tetrahedron Lett.*, 1969, **36**, 3121).
- [8] G.G. Lyle, R.E. Lyle, [w:] *Asymmetric Synthesis*, J.D. Morrison ed., Academic Press, Inc., 1983, vol. 1, s. 13.
- [9] E.L. Eliel, S.H. Wilen, *Stereochemistry of organic compounds*, A Wiley-Interscience Publication, J. Wiley & Sons, Inc., 1994, s. 214.
- [10] M. Raban, K. Mislow, *Tetrahedron. Lett.*, 1965, **48**, 4249
- [11] S. Yamaguchi, [w:] *Asymmetric Synthesis*, J.D. Morrison ed., Academic Press; New York, 1983, Vol. 1, s. 125.
- [12] G.R. Weisman, [w:] *Asymmetric Synthesis*, J.D. Morrison ed., Academic Press, Inc., 1983; Vol. 1, s. 153.
- [13] W.H. Pirkle, D.J. Hoover, *Top. Stereochem.*, 1982, **13**, 263.
- [14] R.R. Fraser, [w:] *Asymmetric Synthesis*, J.D. Morrison ed., Academic Press, Inc., 1983, Vol. 1, s. 173.
- [15] J.P. Vigneron, M. Dhaenens, A. Horeau, *Tetrahedron*, 1973, **29**, 1055.

- [16] M.J.P. Harger, J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1976, 555.
- [17] M.J.P. Harger, J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2, 1977, 1882.
- [18] W.R. Moore, R.D. Bach, T.M. Ozretch, J. Am. Chem. Soc., 1969, **91**, 5918.
- [19] J. Leitich, Tetrahedron Lett., 1978, **38**, 3589.
- [20] J. Jacobus, M. Raban, K. Mislow, J. Org. Chem., 1968, **33**, 1142.
- [21] J.A. Dale, H.S. Mosher, J. Am. Chem. Soc., 1968, **90**, 3732.
- [22] J.A. Dale, D.L. Dull, H.S. Mosher, J. Org. Chem., 1969, **34**, 2543.
- [23] D. Cuvinot, P. Mangeney, A. Alexakis, J.-F. Normant, J. Org. Chem., 1989, **54**, 2420.
- [24] A. Alexakis, S. Mutti, P. Mangeney, J. Org. Chem., 1992, **57**, 1224.
- [25] W.H. Pirkle, K.A. Simmons, J. Org. Chem., 1981, **46**, 3239.
- [26] P.M. Michelsen, U. Annby, S. Gronowitz, Chem. Scr., 1984, **24**, 251.
- [27] L.A. Silks, III, J. Peng, J.D. Odom, R.B. Dunlop, J. Org. Chem., 1991, **56**, 6733.
- [28] J.M. Brown, D. Parker, Tetrahedron Lett., 1981, **22**, 2815.
- [29] D. Bordeaux, G. Gagnaire, Tetrahedron Lett., 1982, **23**, 3353.
- [30] T.H. Chan, Q. J-Peng, D. Wang, J.A. Guo, J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1987, 325.
- [31] J.P. Casey, R.A. Lewis, K. Mislow, J. Am. Chem. Soc., 1969, **91**, 2789.
- [32] T. Gajda, Tetrahedron: Asymmetry, 1994, **5**, 1965.
- [33] A.E. Wróblewski, D.G. Piotrowska, Tetrahedron: Asymmetry, 1999, **10**, 2037.
- [34] A.E. Wróblewski, D.G. Piotrowska, Tetrahedron: Asymmetry, 2000, **11**, 2615.
- [35] A.E. Wróblewski, A. Hałajewska-Wosik, Tetrahedron: Asymmetry, 2000, **11**, 2053.
- [36] A.E. Wróblewski, K.B. Balcerzak, Tetrahedron: Asymmetry, 2001, **12**, 427.
- [37] A.E. Wróblewski, D.G. Piotrowska, Tetrahedron: Asymmetry, 2001, **12**, 2977.
- [38] P. Salvadori, G. Uccello-Barretta, S. Bertozzi, R. Settambolo, R. Lazzaroni, J. Org. Chem., 1988, **53**, 5768.
- [39] L. Mamlok, A. Marquet, L. Lacombe, Tetrahedron Lett., 1971, **15**, 1039.
- [40] M. Mikołajczyk, J. Omelańczuk, Tetrahedron Lett., 1972, **16**, 1539.
- [41] M. Mikołajczyk, J. Omelańczuk, M. Leitloff, J. Drabowicz, A. Ejchart, J. Jurczak, J. Am. Chem. Soc., 1978, **100**, 7003.
- [42] M. Kabaczniak, T.A. Matriukova, E.I. Fedin, M.S. Vaisberg, L.L. Morozov, P.V. Petrovskii, A.E. Shipov, Tetrahedron, 1976, **32**, 1719.
- [43] F.A. L. Anet, S.S. Miura, J. Siegel, K. Mislow, J. Am. Chem. Soc., 1983, **105**, 1419.
- [44] F. Björking, J. Boutelje, M. Hjalmarsson, K. Hult, T. Norin, J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1987, 1041.
- [45] D.G. Gorenstein, *Phosphorus-31 NMR. Principles and Application*, Academic Press, Orlando, 1984.
- [46] J.G. Verkade, L.D. Quin, *Phosphorus-31 NMR Spectroscopy in Stereochemical Analysis*, VCH Publ. Inc., Deerfield Beach, 1987.
- [47] B.L. Feringa, A.A. Smaardijk, H. Wynberg, B. Strijtveen, R.M. Kellogg, Tetrahedron Lett., 1986, **27**, 997.
- [48] B. Strijtveen, B.C. Feringa, R.M. Kellogg, Tetrahedron, 1987, **43**, 123.
- [49] N. Kato, J. Am. Chem. Soc., 1990, **112**, 254.
- [50] R.C. Anderson, M.J. Shapiro, J. Org. Chem., 1984, **49**, 1304.
- [51] L. Fauconnot, C. Nugier-Chauvin, N. Noiret, H. Patin, Tetrahedron Lett., 1997, **38**, 7875.
- [52] K. Błażejewska, T. Gajda, Tetrahedron: Asymmetry, 2002, **13**, 671.
- [53] B.L. Feringa, A. Smaardijk, H. Wynberg, J. Am. Chem. Soc., 1985, **107**, 4798.
- [54] W.H. Pirkle, J. Am. Chem. Soc., 1966, **88**, 1837.
- [55] C.H. Easson, E. Stedman, Biochem. J., 1933, **27**, 1257.

- [56] W.H. Pirkle, D.J. Hoover [w:] *Topics in Stereochemistry*, E.L. Eliel, N.L. Allinger, eds., Wiley-Interscience, New York, 1982; Vol. 13, s. 263.
- [57] F.A.L. Anet, L.M. Sweeting, T.H. Whitney, D.J. Cram, *Tetrahedron Lett.*, 1996, **8**, 2617.
- [58] T.G. Burlingame, W.H. Pirkle, *J. Am. Chem. Soc.*, 1966, **88**, 4294.
- [59] J. Jochims, G. Taigel, A. Seeliger, *Tetrahedron Lett.*, 1967, **20**, 1901.
- [60] L. Streckowski, M. Visnick, M.A. Battiste, *J. Org. Chem.*, 1986, **51**, 4836.
- [61] W.H. Pirkle, P.E. Adams, *J. Org. Chem.*, 1980, **45**, 4111.
- [62] W.H. Pirkle, P.E. Adams, *J. Org. Chem.*, 1980, **45**, 4117.
- [63] W.H. Pirkle, D.L. Sikkenga, M.S. Pavlin, *J. Org. Chem.*, 1977, **42**, 384.
- [64] W.H. Pirkle, C.W. Boeder, *J. Org. Chem.*, 1977, **42**, 3697.
- [65] W.H. Pirkle, P.L. Rinaldi, *J. Org. Chem.*, 1977, **42**, 3217.
- [66] W.H. Pirkle, P.L. Rinaldi, *J. Org. Chem.*, 1978, **43**, 4475.
- [67] E. Dunach, H.B. Kagan, *Tetrahedron Lett.*, 1985, **26**, 2649.
- [68] M. Deshmukh, E. Dunach, S. Juga, H.B. Kagan, *Tetrahedron Lett.*, 1984, **25**, 3467.
- [69] D. Parker, R. J. Taylor, *Tetrahedron*, 1987, **43**, 5451.
- [70] S.C. Benson, P. Cai, M. Colon, M.A. Haiza, M. Tokles, J. K. Snyder, *J. Org. Chem.*, 1988, **53**, 5335.
- [71] C. Rosini, G. Ucello-Barretta, D. Pini, C. Abete, P. Salvadori, *J. Org. Chem.*, 1988, **53**, 4579.
- [72] F. Toda, K. Mori, J. Okada, H. Node, A. Itah, K. Oomina, K. Fryi, *Chem. Lett.*, 1988, 131.
- [73] J. Omelańczuk, *Phosphorus, Sulfur and Silicon*, 1996, **111**, 22.
- [74] J. Omelańczuk, M. Mikołajczyk, *Tetrahedron: Asymmetry*, 1996, **7**, 2687.
- [75] M.J.P. Harger, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 1980, 1505.
- [76] M. Mikołajczyk, J. Omelańczuk, M. Leitloff, J. Drabowicz, A. Ejchart, J. Jurczak, *J. Am. Chem. Soc.*, 1978, **100**, 7003.
- [77] S.H. Wilen, J.Z. Qi, P.G. Williard J., *Org. Chem.*, 1991, **56**, 485.
- [78] K. Uekama, F. Hirayama, A. Fujise, O. Akihiko, M. Otagiri, K. Inaba, H. Saito, *J. Pharm. Sci.*, 1984, **73**, 382.
- [79] L.D. Hall, T.K. Lim, *J. Am. Chem. Soc.*, 1984, **106**, 1858.
- [80] T. Nakajima, M. Sunagawa, H. Tushiyuki, K. Fujioka, *Chem. Pharm. Bull.*, 1984, **32**, 383.
- [81] M. Suzuki, Y. Sasaki, *Chem. Pharm. Bull.*, 1984, **32**, 832.
- [82] Y. Inoue, T. Okuda, Y. Miyata, R. Chujo, *Carbohydr. Res.*, 1984, **125**, 65.
- [83] H. Ueda, T. Nagai, *Chem. Pharm. Bull.*, 1980, **28**, 1415.
- [84] D. Greatbanks, R. Pickford, *Magn. Reson. Chem.*, 1987, **25**, 208.
- [85] W. Schlank jr., *Liebigs Ann. Chem.*, 1973, **7**, 1145.
- [86] E.J. Klabunowski, W.W. Patrikijew, A.A. Baładin, *Izvw. Akad. Nauk SSSR, Otd. Chim. Nauk*, 1960, **3**, 552.
- [87] E. Lafontaine, J.M. Pechine, J. Courtieu, C.L. Mayne, *Liq. Cryst.*, 1990, **7**, 293.
- [88] E. Lafontaine, J.P. Bayle, J. Courtieu, *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, **111**, 8294.
- [89] G. Englert, A. Saube, *Mol. Cryst.*, 1966, **1**, 503.
- [90] E. Sachmann, S. Meiboom, L.C. Snyder, *J. Am. Chem. Soc.*, 1968, **90**, 2183.
- [91] P. Lesot, M. Sarfati, D. Merlet, J. Courtieu, B. Ancian, Ch. Brevard, Bruker, 2001, 29.
- [92] W.H. Pirkle, D.J. Hoover, *Top. Stereochem.*, 1982, **13**, 263.
- [93] D. Parker, *Chem. Rev.*, 1991, **91**, 1441.
- [94] G.M. Whitesides, D.W. Lewis, *J. Am. Chem. Soc.*, 1970, **92**, 6979.
- [95] M.M. McConnell, R.E. Robertson, *J. Chem. Phys.*, 1958, **29**, 1361.
- [96] A.F. Cockerill, G.L.O. Davies, R.C. Harden, D.M. Rackham, *Chem. Rev.*, 1973, **73**, 553.
- [97] J. Reuben, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 1973, **9**, część 1.
- [98] B.D. Flockhart, *C.R.C. Crit. Rev. Anal. Chem.*, 1976, **5**, 69.

- [99] R. von Ammon, R.D. Fischer, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1972, **11**, 675.
- [100] O. Hofer, *Top. Stereochem.*, 1975, **9**, 111.
- [101] G.R. Sullivan, [w:] *Topic in Stereochemistry*, E.L. Eliel, N.L. Allinger, eds, Wiley-Interscience, New York, 1978, vol. 10, s. 287.
- [102] W. Zieliński, A. Rajcza, *Metody spektroskopowe i ich zastosowanie do identyfikacji związków organicznych*, praca zbiorowa, Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa 2000, s. 124.
- [103] H.L. Goering, J.N. Eikenberg, G.S. Koerner, *J. Am. Chem. Soc.*, 1971, **93**, 5913.
- [104] R.R. Fraser, M.A. Petit, J.K. Saunders, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1971, 1450.
- [105] M.D. McCreary, D.W. Lewis, D.L. Wernick, G.M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.*, 1974, **96**, 1038.
- [106] E.L. Eliel, S.H. Wilen, *Stereochemistry of organic compounds*, A Wiley-Interscience Publication, J. Wiley & Sons, Inc., 1994, s. 237.
- [107] M.D. McCreary, D.W. Lewis, D.L. Wernick, G.M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.*, 1974, **96**, 1038.
- [108] H.L. Goering, J.N. Eikenberry, G.S. Koerner, C.J. Lattimer, *J. Am. Chem. Soc.*, 1974, **96**, 1493.
- [109] E.B. Dongala, A. Solladie-Cavallo, G. Solladie, *Tetrahedron Lett.*, 1972, **41**, 4233.
- [110] R.R. Fraser, M.A. Petit, J.K. Saunders, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1971, 1450.
- [111] R.R. Fraser, M.A. Petit, M. Mislow, *J. Am. Chem. Soc.*, 1972, **94**, 3253.
- [112] P.E. Petersen, M. Stepanian, *J. Org. Chem.*, 1988, **53**, 1907.
- [113] C.R. Hall, T.D. Inch, G.J. Lewis, R.A. Chittenden, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1975, 720.
- [114] D.B. Cooper, C.R. Hall, J.M. Harrison, T.D. Inch, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 1977, 1969.
- [115] C. Alvarez, L. Barkaoni, N. Goasdone, J.C. Daran, N. Platzter, H. Rudler, J. Vaissermann, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1989, 1507.
- [116] L.M. Sweeting, D.C. Crans, G.M. Whitesides, *J. Org. Chem.*, 1987, **52**, 2273.
- [117] D.C. Crans, G.M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* 1985, **107**, 7019.
- [118] H.D.W. Hill, A.P. Zens, J. Jacobus, *J. Am. Chem. Soc.*, 1979, **101**, 7090.
- [119] A. Pines, M.G. Gibby, J.S. Waugh, *J. Chem. Phys.*, 1973, **59**, 569.
- [120] E.R. Andrew, A. Bradbury, R.G. Eades, *Nature*, 1958, **182**, 1659.
- [121] K.V. Andersen, H. Bildsoc, H.J. Jakobsen, *Magn. Res. Chem.*, 1990, **28**, S47.
- [122] V. Gérardy-Montouillout, C. Malveau, P. Tekely, Z. Olender, Z. Luz, *J. Magn. Reson. A*, 1996, **123**, 7.
- [123] M.J. Potrzebowski, E. Tadeusiak, K. Misiura, W. Ciesielski, G. Bujacz, P. Tekeky, *Eur. J. Chem.*, 2002, **8**, 5007.

Praca wpłynęła do Redakcji 29 listopada 2002.

STEREOKONTROLOWANA SYNTEZA TLENOWYCH ANALOGÓW PENICYLIN I CEFALOSPORYN

STEREOCONTROLLED SYNTHESIS OF OXYGEN ANALOGS OF PENICILLINS AND CEPHALOSPORINS

**Robert Łysek, Bartłomiej Furman, Katarzyna Borsuk,
Marek Chmielewski**

*Instytut Chemii Organicznej Polskiej Akademii Nauk
ul. M. Kasprzaka 44/52, 01-224 Warszawa*

Abstract

Stosowane skróty i symbole reagentów, rozpuszczalników oraz grup zabezpieczających
Wstęp

1. Synteza 5-oksacefamów, klawamów i 4-oksapenemów z penicylin i metody pokrewne
 - 1.1. Synteza 5-oksacefamów
 - 1.2. Synteza klawamów i 4-oksapenemów
2. Synteza klawamów z 4-acetoksy-azetydyn-2-onu
3. Synteza 5-oksacefamów z 4-winyloksy-azetydyn-2-onu
4. Tworzenie klawamów i 5-oksacefamów drogą cykloaddycji ketenów do iminocterów
5. Tworzenie klawamów i 5-oksacefamów drogą cykloaddycji izocyjanianów do chiralnych eterów winylowych
 - 5.1. Reakcje cykloaddycji izocyjanianów do eterów winylowych
 - 5.2. Reakcje cykloaddycji izocyjanianu trichloroacetylowego i chlorosulfonylowego do glikali
 - 5.3. Reakcje [2+2]cykloaddycji izocyjanianu chlorosulfonylowego do chiralnych eterów winylowych
 - 5.4. Reakcje [2+2]cykloaddycji izocyjanianu chlorosulfonylowego od alkoksyallenów.
 - 5.5. Reakcje [2+2]cykloaddycji izocyjanianu chlorosulfonylowego do eterów winylowych prowadzona na podłożu stałym.

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

Dr Robert Łysek ukończył studia chemiczne na Wydziale Matematyczno – Przyrodniczym WSP w Kielcach w 1995 r. Doktorat z wyróżnieniem – 2000 r., Instytut Chemii Organicznej PAN w Warszawie. W latach 1997–1999 przebywał trzykrotnie na stażach naukowych na Uniwersytecie w Tybindze (Niemcy) w zespole prof. W. Voeltera. Dr Robert Łysek jest członkiem PTCh od 1997 roku. W roku 2001 został laureatem Stypendium Krajowego Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej. Jest także zdobywcą nagrody Sigma–Aldrich 2001. Jest współautorem 5 prac przeglądowych i 15 prac oryginalnych. Obecnie przebywa na stażu naukowym na Politechnice Federalnej w Lozannie (Szwajcaria) w zespole Prof. P. Vogela.

Dr Bartłomiej Furman ukończył studia chemiczne na Wydziale Chemicznym Politechniki Warszawskiej w 1993 roku. Doktorat z wyróżnieniem - 1998 r., Instytut Chemii Organicznej PAN w Warszawie. W roku 1998 został laureatem Stypendium Krajowego Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej. Jest także zdobywcą Nagrody Premiera za wyróżnioną pracę doktorską w 1998 r. Jest współautorem 28 publikacji oryginalnych i przeglądów. W latach 2000–2001 przebywał na Stypendium Fundacji Humboldta na Uniwersytecie w Moguncji (Niemcy) w zespole Prof. H. Kuntza. Obecnie pracuje na stanowisku adiunkta w IChO PAN.

Dr Katarzyna Borsuk ukończyła studia chemiczne na Wydziale Biologiczno - Chemicznym Uniwersytetu w Białymstoku w 1998 r. W tym samym roku rozpoczęła studia doktoranckie w Instytucie Chemii Organicznej PAN w Warszawie, zakończone w roku 2002 uzyskaniem tytułu doktora nauk chemicznych. Jest współautorem 5 publikacji oryginalnych i 2 prac przeglądowych. Obecnie przebywa na stażu naukowym na Uniwersytecie Nijmegen (Holandia) w zespole Prof. F. Rutjesa.

Prof. dr hab. Marek Chmielewski uzyskał dyplom mgra inż. na Politechnice Warszawskiej w 1965 r. 1972 – dr, Instytut Chemii Organicznej PAN w Warszawie; 1981 – dr hab., IChO PAN, 1991 – prof. Od 1987 r. jest zastępcą dyrektora IChO PAN; od 1994 r. zastępcą przewodniczącego Wydziału III PAN. Zainteresowania badawcze: chemia węglowodanów, synteza antybiotyków β -laktamowych, synteza asymetryczna.

ABSTRACT

Synthesis of oxacephalotin and oxacephamandol which are more active than natural, containing sulfur congeners, and isolation of clavulanic acid, a potent inhibitor of β -lactamase enzymes, directed attention of academic and industrial laboratories to the synthesis of oxygen analogs of penicillins and cephalosporins.

The present review directs attention to the stereocontrol of a desired configuration in the formation of the bridgehead carbon atom. Five possible methods leading to basic skeletons of the title compounds are discussed (Scheme 1). Three of them involve nucleophilic substitution at C-4 of the azetidin-2-ones performed as inter or intramolecular process, and two of them involve cycloaddition reactions between ketenes and iminoethers, or between vinyl ethers and isocyanates. Owing to the general application stereospecificity, and high asymmetric induction, the last method seems to be most advantageous. The weak point of the nucleophilic substitution methodology is that a nucleophile enters 3-substituted azetidin-2-one ring preferentially *anti* to the existing substituent or if there is no substituent at C-3, stereoselectivity in generation of a new stereogenic center at C-4 is low. All methods are illustrated by examples taken from the literature.

STOSOWANE SKRÓTY I SYMBOLE REAGENTÓW, ROZPUSZCZALNIKÓW ORAZ GRUP ZABEZPIECZAJĄCYCH

I. Reagenty i związki chemiczne:

AIBN	– azo-bis(izobutyronitryl)
BEMP	– 2- <i>tert</i> -butylimino-2-dietylamino-1,3-dimetylperhydro-1,3,2-diazafosforinan
CSI	– izocyjanian chlorosulfonylowy
DEAD	– dietylo azadikarboksylan
DME	– dimetoksyetan
DMSO	– dimetylosulfotlenek
LDA	– diizopropylamidek litu
PTC	– warunki katalizy międzyfazowej
Py	– pirydyna
Red-Al	– bis(2-metoksyetoksy)glinowodorek sodu
TABF	– fluorek tetrabutylamoniumowy
THF	– tetrahydrofuran
TPP	– trifenylofosfina
DBU	– 1,8-diazabicyklo[5,4,0]undec-7-en

II. Grupy zabezpieczające:

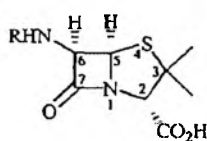
Ac	– acetyl
Boc	– <i>t</i> -butoksykarbonyl
Bn	– benzyl
<i>t</i> -Bu	– <i>tert</i> -butyl
Bzh	– difenyloetyl = benzhydryl
Cbz	– benzyloksykarbonyl
CBS	– <i>p</i> -chlorobenzenosulfonyl
Et	– etyl
Pht	– ftalimid
Piv	– piwaloil
Me	– metyl
MNB	– 4-metoksy-3-nitrobenzyl
Ph	– fenyl
PMB	– <i>p</i> -metoksybenzyl
PNB	– <i>p</i> -nitrobenzyl
TBS = TBDMS	– <i>tert</i> -butylodimetylosilil
TIBS	– 2,4,6-triizopropylbenzenosulfonyl
TMS	– trimetylosilil
Tf	– trifluorometanosulfonyl
Tr	– trifenyloetyl = trityl
Ts	– tosyl

III Inne oznaczenia:

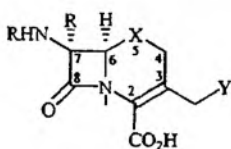
CD	– dichroizm kołowy
de	– nadmiar diastereomeryczny
ee	– nadmiar enancjomeryczny
NOE	– jądrowy efekt Overhausera
RT	– temperatura pokojowa
Δ	– ogrzewanie

WSTĘP

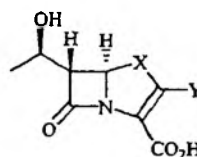
Antybiotyki β -laktamowe (Rys. 1), należą do najważniejszych leków stosowanych w leczeniu zakażeń bakteryjnych. Swoją karierę zawdzięczają wysokiej aktywności przeciwbakteryjnej wobec drobnoustrojów chorobotwórczych, przy równocześnie niskiej toksyczności dla organizmu człowieka i zwierząt. Pomimo, że pierwszy β -laktam otrzymany został przez Staudingera [1] w 1907 roku, dopiero odkrycie [2] i wprowadzenie do użycia klinicznego penicyliny [3] spowodowało intensywny rozwój metod syntezy czterocłonowego pierścienia laktamowego.



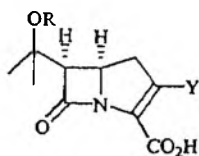
Penicyliny (1929)



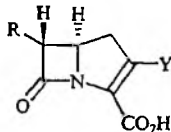
Cefalosporyny R= H, X= S (1945)
 Cefamycyny R= OMe, X= S (1971)
 5-Karbacefemy R= H, X= CH₂
 5-Oksacefemy R=H, OMe, X= O



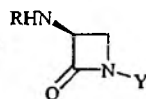
Karbapenemy X = CH₂ (1976)
 Penemy X = S (1978)
 Oksapenemy X = O (1977)



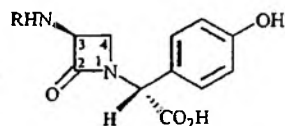
Karpetymycyna A R= H (1980)
 Karpetymycyna B R= SO₃H



PS-5 R= Et (1982)
 PS-8 R= *i*-Pr



Monobaktamy (1981)



Nokardycyny (1976)

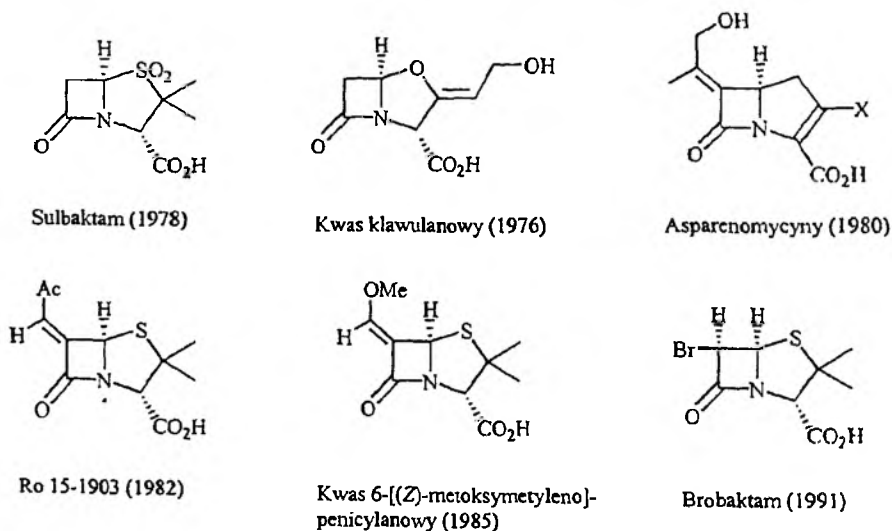
Rysunek 1. Antybiotyki β -laktamowe

W ciągu kilkudziesięciu lat wiele szczepów bakteryjnych uodporniło się całkowicie lub częściowo na stosowane antybiotyki β -laktamowe. Naturalne penicyliny i cefalosporyny stopniowo zastępowano nowo odkrytymi lub syntetycznymi antybiotykami coraz nowszych generacji. Do takich związków zaliczają się penicyliny

i cefalosporyny, w których zmieniono peryferyjne podstawniki, lub ich heteroanalogi, w których atom siarki zastąpiono atomem węgla (karbapenamy [4], karbacefamy [5]), lub tlenu (oksapenemy [6], oksacefemy [7]), a także antybiotyki o nowych szkieletach (penemy [8], monobaktamy [9], nokardycyny [10]). Nowe leki znacznie przewyższają swoje naturalne pierwowzory zarówno pod względem aktywności biologicznej, jak i odporności na β -laktamazy, enzymy wydzielane przez bakterie, które powodują otwarcie pierścienia azetydyn-2-onu i dezaktywację leku.

Kluczowym elementem strukturalnym penicylin, cefalosporyn, a także ich naturalnych i syntetycznych analogów jest konfiguracja mostkowego atomu węgla (C-5 w penamach i C-6 w cefamach). Aktywne antybiotyki mają konfigurację (*R*). Interesujące, pod tym względem, właściwości wykazują klawaminy i oksapenemy (Rys. 1).

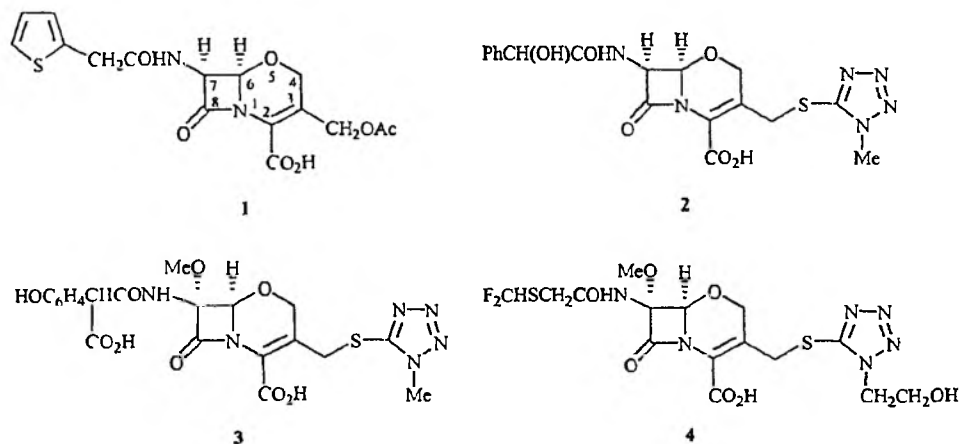
Odkrycie w połowie lat siedemdziesiątych kwasu klawulanowego [11] (Rys. 2), który w pięcioczłonowym pierścieniu heterocyklicznym w miejscu atomu siarki zawiera atom tlenu i wykazuje wprawdzie niską aktywność przeciwbakteryjną, ale wysoką aktywność jako inhibitor β -laktamaz, umożliwiło stosowanie antybiotyków, na które wiele szczepów bakteryjnych uodporniło się. Kombinacja leku wraz z inhibitorem umożliwia efektywne zwalczanie choroby. Do najbardziej znanych inhibitorów β -laktamaz, obok kwasu klawulanowego, należy sulbaktam (Rys. 2).



Rysunek 2. Inhibitory β -laktamaz

Wyzolowanie kwasu klawulanowego [11] i synteza tlenowych analogów cefalosporyn [7], a zwłaszcza oksacefalotyny 1 [12] i oksacefamandolu 2 [13] wykazały, że obecność atomu siarki w cząsteczce antybiotyku β -laktamowego nie jest wa-

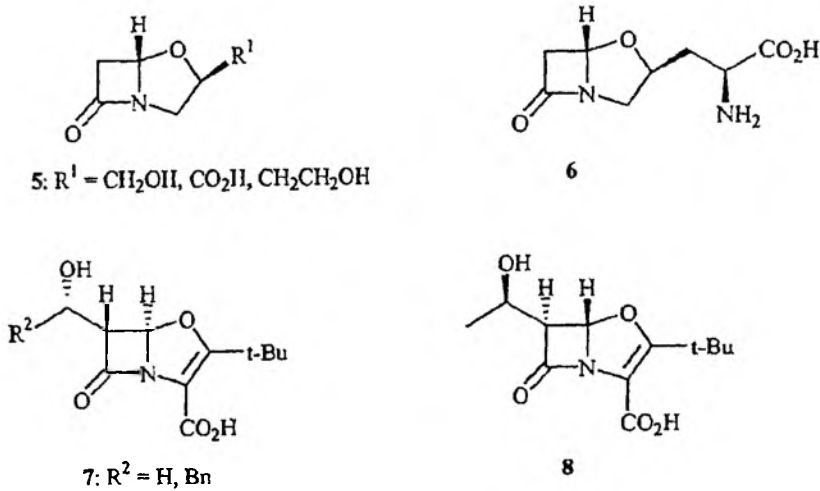
runkiem koniecznym występowania wysokiej aktywności antybakteryjnej. Ta obserwacja rozpoczęła poszukiwania nowych syntetycznych antybiotyków, w których atom siarki jest zastąpiony przez inny heteroatom lub atom węgla. Niezwykle istotne dla rozwoju tych prac było stwierdzenie wysokiej aktywności przeciwbakteryjnej oksacefalosporyn, która okazała się wielokrotnie wyższa od aktywności odpowiednich siarkowych analogów. W wyniku tych prac do lecznictwa wprowadzono dwie oksacefamycyny, latamoksef **3** [14] i flomoksef **4** [14], które zaliczane są do cefalosporyn III generacji (Rys. 3).



Rysunek 3. Syntetyczne 5-oksacefemy

Na przełomie lat siedemdziesiątych i osiemdziesiątych odkryto grupę naturalnych β -laktamów o szkielecie klawamu, które nie mają grupy karboksylowej przy C-2, mają natomiast łańcuch boczny przy C-3 (**5,6**). Związki te mają konfigurację (*S*) przy atomie C-5 i wykazują działanie przeciwgrzybiczne [15] (Rys. 4). Klawamy o konfiguracji (*R*) atomu C-5, np. kwas klawulanowy (Rys. 2), wykazują słabe właściwości antybiotyczne, ale są silnymi inhibitorami β -laktamaz [11].

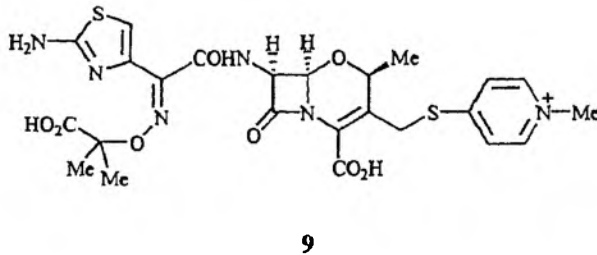
Oksapenemy (2,3-dehydroklawamy) po raz pierwszy zostały otrzymane w 1977 roku [6]. Wykazują one aktywność przeciwbakteryjną i jako inhibitory β -laktamaz, lecz są mało stabilne [16–18]. Najtrwalsze z nich (**7,8**) miały podstawnik *t*-butylowy przy C-2 [16–18] (Rys. 4).



Rysunek 4. Przykłady klawamów oraz oksapenemów o interesującej aktywności biologicznej

Niespodziewanie okazało się, że obie enancjomeryczne formy **7** i **8** są aktywnymi antybiotykami i inhibitorami β -laktamaz [16]. Jest to, jak dotąd, jedyny przypadek bicyklicznych β -laktamów, które wykazują aktywność antybakteryjną w obu formach enancjomerycznych.

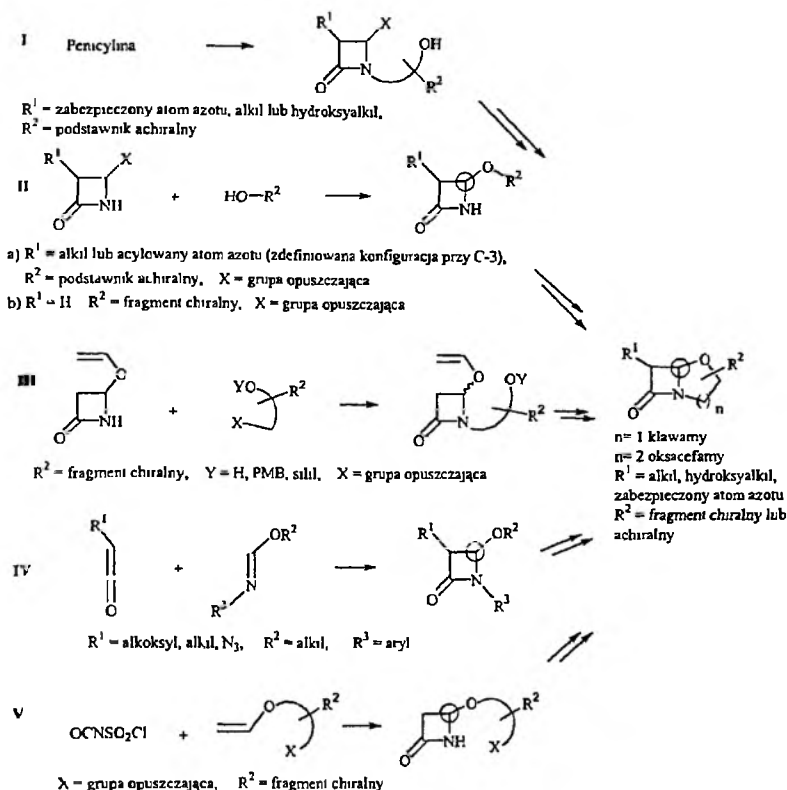
W roku 1988 odkryto 5-oksacefem OCP-9-176 **9**, który zawiera podstawnik metylowy w pozycji C-4 i posiada wysoką aktywność przeciwbakteryjną [19] (Rys. 5).



Rysunek 5. 5-Oksacefem OCP-9-176

W przypadku tlenowych analogów penicylin i cefalosporyn konfiguracja mostkowego atomu węgla jest kluczowa dla aktywności antybiotyku. Dlatego metody tworzenia, 4-alkoksy-azetydyn-2-onu o zdefiniowanej konfiguracji absolutnej na atomie C-4 są istotne dla syntezy klawamów i 5-oksacefamów. Kontrolę stereochemiczną takiego procesu można osiągnąć na drodze wymiany nukleofilowej przy atomie C-4 azetydyn-2-onu, lub drogą cykloaddycji, kiedy to formowaniu pierścienia czterocłonowego towarzyszy równoczesne tworzenie centrum stereogenicznego przy C-4. Pięć możliwych sposobów syntezy tlenowych analogów penicylin

i cefalosporyn przedstawia Schemat 1. Niniejszy przegląd podejmuje analizę tych strategii, ze szczególnym uwzględnieniem stereochemicznej kontroli konfiguracji mostkowego atomu węgla, a także względnej konfiguracji atomów wodoru pierścienia czterocząłowego.



Schemat 1

1. SYNTEZA 5-OKSACEFEMÓW I KŁAWAMÓW Z PENICYLIN I METODY POKREWNE

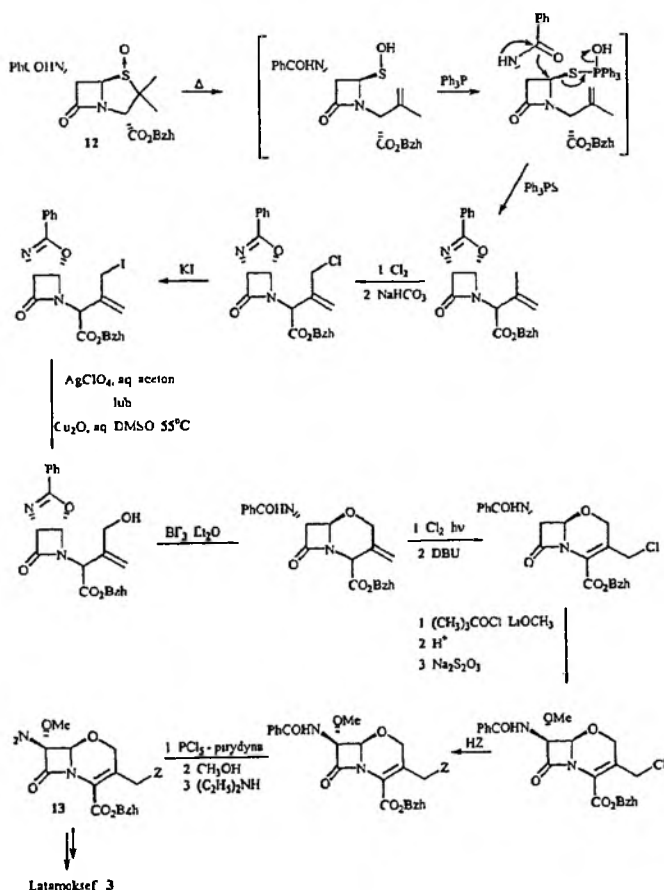
1.1. SYNTEZA 5-OKSACEFEMÓW

Strategia syntezy 5-oksacefemów z penicylin (Schemat 1, droga I) wymaga otwarcia pięciocząłowego pierścienia antybiotyku, wprowadzenia grupy opuszczającej w pozycję C-4 azetydyn-2-onu i nn nukleofilowego atomu tlenu do łańcucha bocznego, który pozostaje związany z β -laktamowym atomem azotu. Bicykliczny szkielet 5-oksacefemu powstaje w wyniku wymiany nukleofilowej przy atomie C-4

Pierwszą syntezę 5-oksacefemu, którą zrealizował w 1974 r. Wolfe z zespołem [20] przedstawia Schemat 2. Kluczowy etap tworzenia związku o szkieletce cefemu prowadzi do powstania mieszaniny diastereomerów **10** i **11** w proporcji 1:1. Wyższej zawartości izomeru *cis* **11** w produkcie cyklizacji nie udało się osiągnąć. Zmniejszenie nadmiaru katalizatora (SnCl_2) spowodowało powstawanie wyłącznie niepożądanego izomeru *trans* **10**.

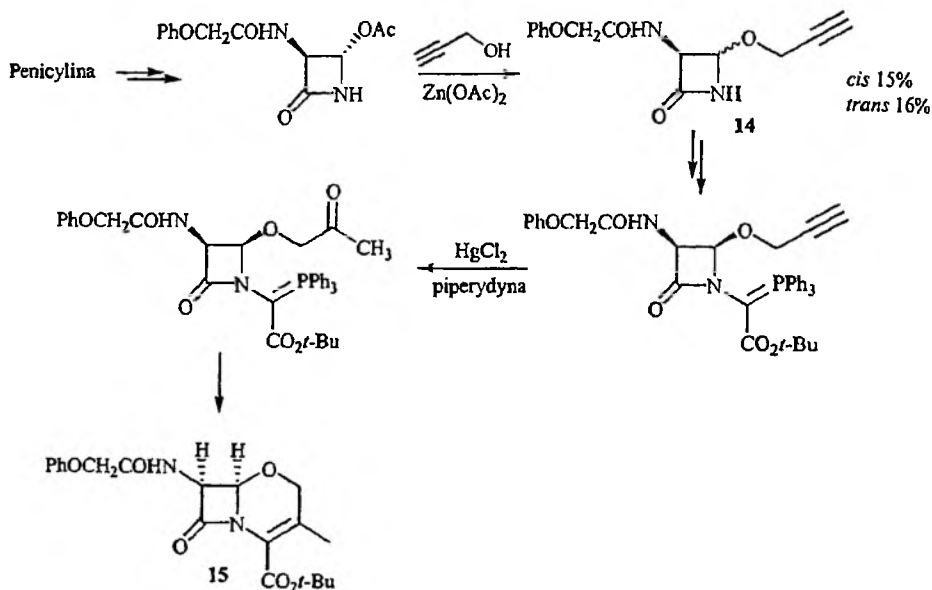
Zbliżony sposób postępowania wybrała japońska firma Kokai [21] otrzymując oksacefem o niezidentyfikowanej konfiguracji mostkowego atomu węgla, oraz firma Bristol [22], która poinformowała o otrzymaniu 6-epi-5-oksacefalosporyny o niewielkiej aktywności antybakteryjnej.

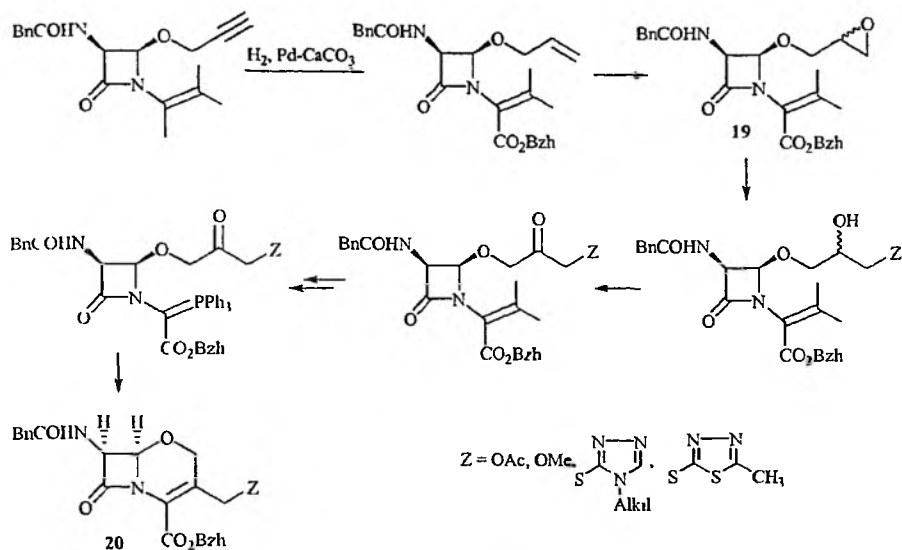
Rozpoczęcie podobnego cyklu przemian z 6-epipenicyliny **12** pozwoliło firmie Shinogi [14] uzyskać pożądaną konfigurację (*R*) mostkowego atomu węgla. Utlenienie podchlorynem *t*-butylu atomu węgla C-7, a następnie wprowadzenie grupy metoksyłowej, doprowadziło do otrzymania związku o szkieletce 5-oksacefamy-**13** (Schemat 3), który przeprowadzono w lek o nazwie latamoksef **3** (Rys. 3).



Schemat 3

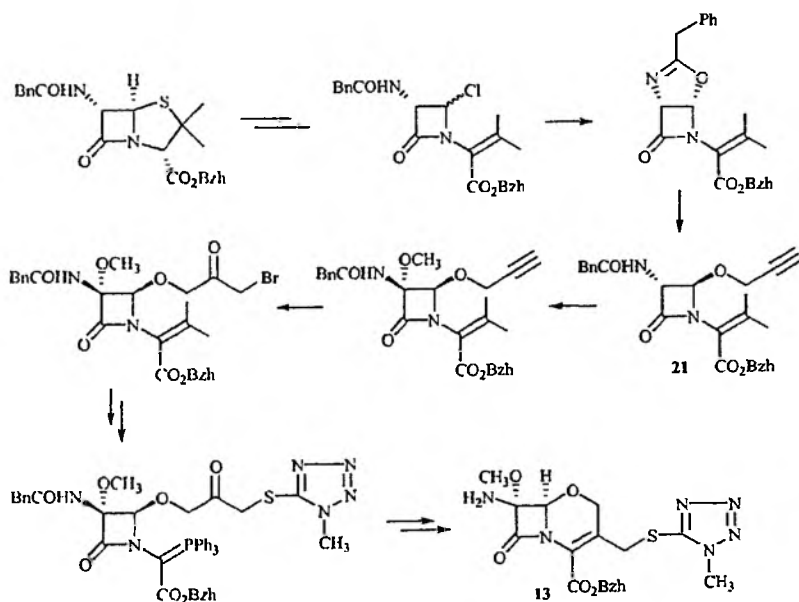
Alternatywny sposób postępowania, który polega na wymianie nukleofilowej przy C-4 w reakcji międzycząsteczkowej, wybrała firma Beecham [23] dokonując syntezy 5-oksza-3'-deoksycefalosporyny (Schemat 4). Diastereomeryczne 4-propargiloksy-azetydyn-2-ony **14** rozdzielono na czyste składniki. Izomer *cis* **14** poddano sekwencji przemian, w której sześcioczłonowy pierścień oksazyny utworzono przy pomocy reakcji Wittiga.





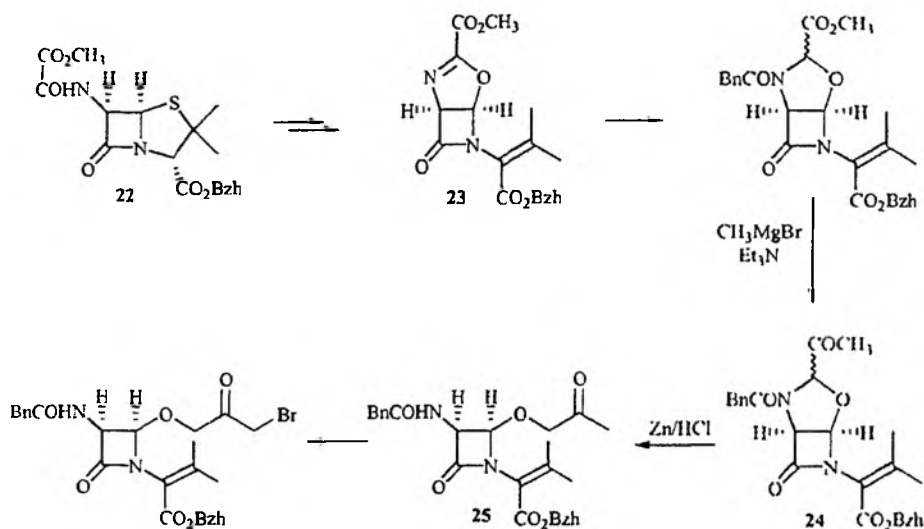
Schemat 6

Kolejne syntezы firmy Shionogi [25] usprawniały zaprezentowany na Schemacie 6 sposób formowania podstawowego szkieletu cząsteczki i wprowadzenia peryferyjnych podstawników. Wychodząc z 6-epipenicyliny otrzymano 4-propargiloksy-azytydyn-2-on **21**, który poddano metoksyloowaniu, a następnie w kolejnych przejściach utworzono związek o szkielecie 5-oksacefamyliny **13** (Schemat 7).



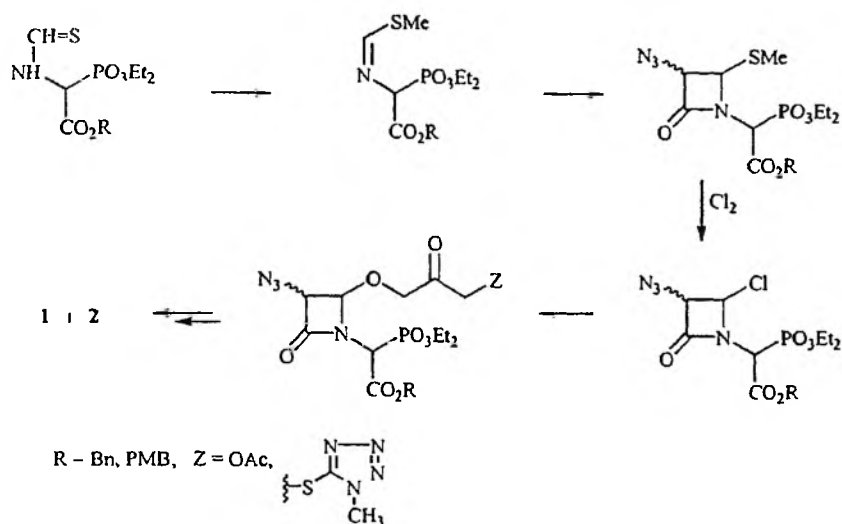
Schemat 7

Ta sama firma podjęła interesującą próbę utworzenia wyłącznie *cis* 3,4-podstawionego azetydyn-2-onu o konfiguracji 4*R* [26] (Schemat 8). Rozpoczynając syntezę z pochodnej penicyliny **22** otrzymano oksazolinę **23**, którą przekształcono w oksazolidynę **24**. Reduktywne otwarcie pierścienia pięcioczłonowego w związku **24** zachowało pożądaną konfigurację podstawników przy czteroczłonowym pierścieniu β-laktamu, dostarczając atrakcyjnego półproduktu **25** w syntezie 5-oksacefemów (Schemat 8). O konfiguracji związku **25** decydował etap utworzenia bicyklicznej *cis* oksazolidyny **23**.



Schemat 8

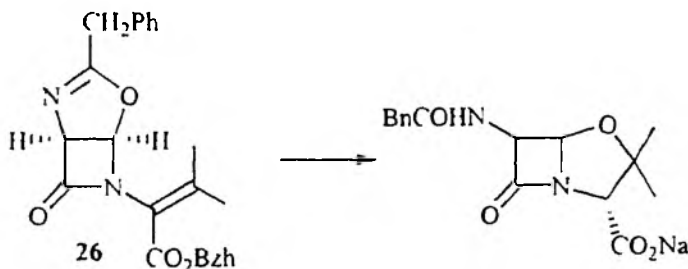
3,4-Dipodstawione azetydyn-2-ony można z powodzeniem otrzymać dokonując [2+2]cykloaddycji azydoketenu do odpowiednio przygotowanej iminy. Ten sposób postępowania dostarcza związków pokrewnych do tych, które można otrzymać z penicyliny, ale nie rozwiązuje problemu formowania *cis* 3,4-dipodstawionego azetydyn-2-onu i prowadzi do racemicznych produktów. W ten sposób badacze z firmy Merck otrzymali (\pm)-oksacefalotynę **1** [12] i (\pm)-oksacefamandol **2** [13] (Schemat 9).



Schemat 9

1.2. SYNTEZA KLAWAMÓW I 4-OKSAPENEMÓW

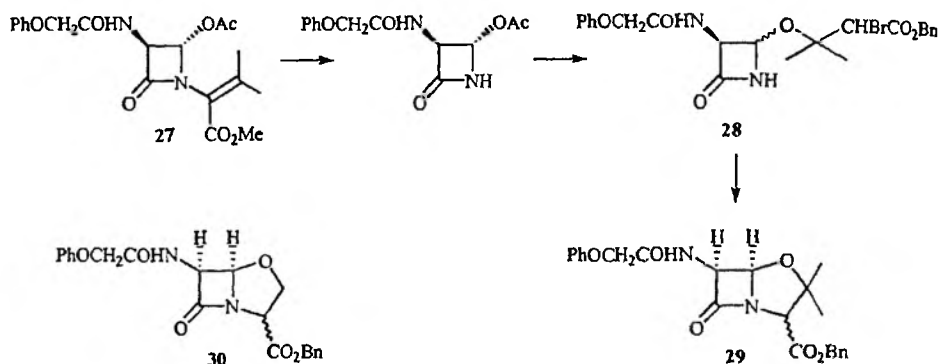
Kontrola stereochemiczna syntezy tlenowych analogów penicylin stwarza te same problemy, które napotkano przy syntezie 5-oksacefemów. Pierwszej syntezie dokonano wykorzystując, łatwo dostępną z penicyliny, oksazolinę **26**. Nie podano jednakże przekonujących dowodów konfiguracji otrzymanego związku [27] (Schemat 10).



Schemat 10

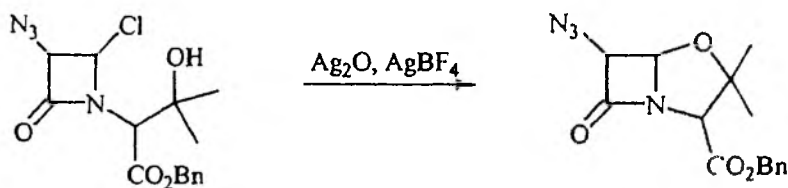
Prostej syntezie oksapenicyliny dokonali naukowcy z firmy Beecham [28]. Łatwodostępny z penicyliny związek **27** pozbawiono podstawnika związanego z atomem azotu. Następnie dokonano wymiany nukleofilowej przy C-4 otrzymując mieszaninę diastereomerów **28** z wydajnością 20% i w proporcji *cis:trans* równej 1:1,2 (Schemat 11). Wewnątrzcząsteczkowe alkilowanie atomu azotu w diastereo-*cis* **28** dało dwa C-2 stereoizomery oksapenicyliny **29** w proporcji 2:1.

W podobny sposób otrzymano związki **30** pozbawione grup metylowych przy C-3 [28].

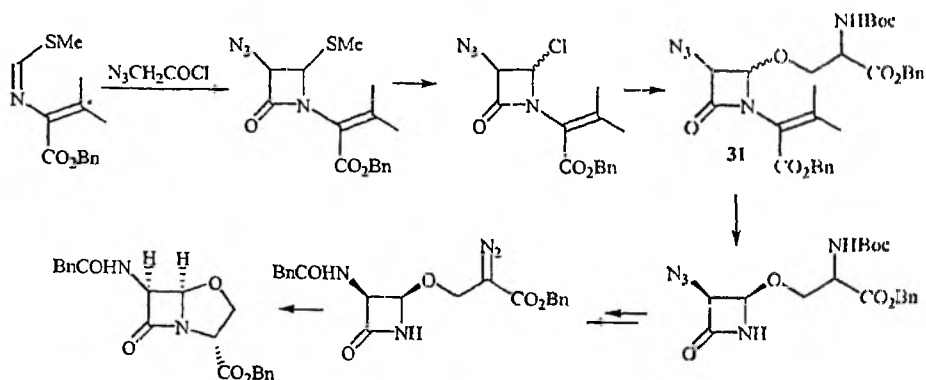


Schemat 11

Drogą wewnątrzcząsteczkowej wymiany nukleofilowej przy C-4 Christensen i Ratcliffe [29] otrzymali pochodną 6-azydo-oksapenicyliny (Schemat 12). Jednakże ich przypisania konfiguracyjne zostały zakwestionowane [28].



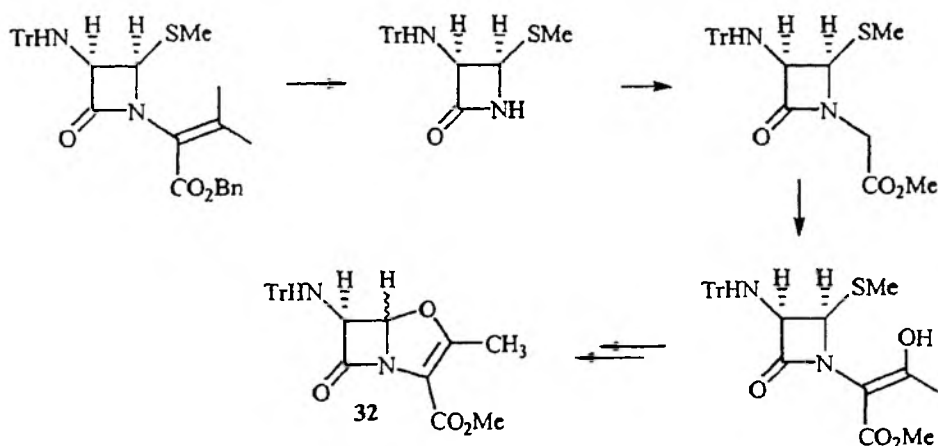
Schemat 12



Schemat 13

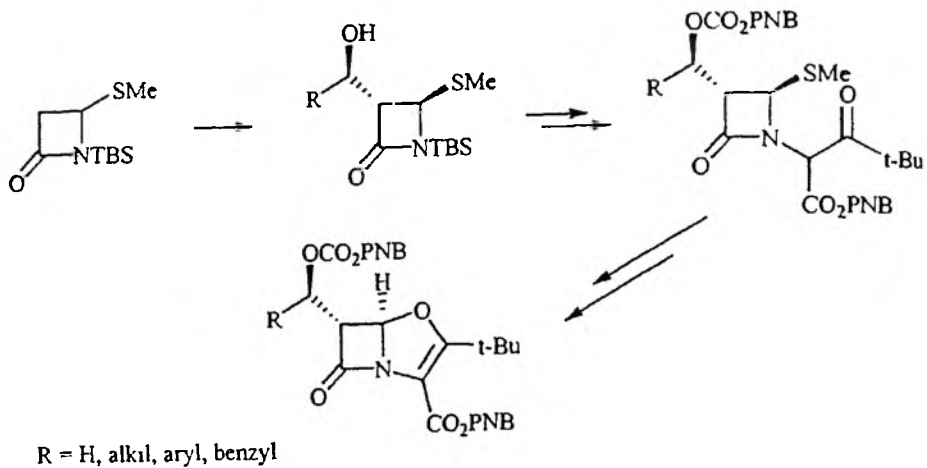
Racemiczny klawam strukturalnie pokrewny do **30** został otrzymany drogą pełnej syntezy z azydoketenu i tioiminoeteru [30] (Schemat 13). Etap wymiany nukleofilowej przy C-4 dostarczył mieszaniny izomerów *cis:trans* **31** w proporcji *ca.* 2:3. Pierścień oksazolidynowy utworzony został drogą insercji karbenu do wiązania N-H w obecności octanu rodu [30].

Syntezy przedstawione na Schematach 11 i 13 wskazują na ten sam istotny problem, który napotkano przy syntezie 5-oksacefemów, a mianowicie selektywne uzyskanie konfiguracji *cis* atomów wodoru pierścienia czteroczłonowego. Identyczny problem pojawił się podczas pierwszej próby otrzymania 4-oksapenemu, która doprowadziła do otrzymania mieszaniny nietrwałych stereoizomerów **32** [6]. Składu tej mieszaniny nie określono. Próba rozdzielu izomerów zakończyła się niepowodzeniem (Schemat 14).

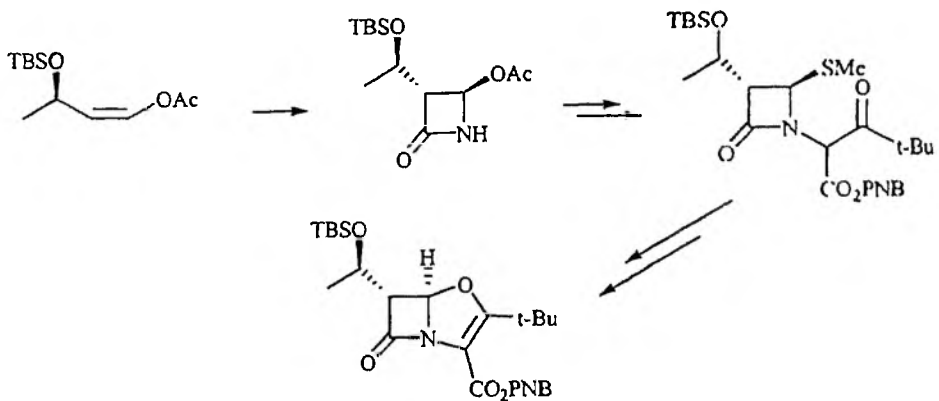


Schemat 14

Wyzolowanie w 1976 r. karbapenemów [4] i synteza penemów [8], antybiotyków β -laktamowych o znacznej aktywności antybakteryjnej, zwróciły uwagę na oksapenemy, w których protony pierścienia czteroczłonowego są względem siebie *trans*, a konfiguracja mostkowego atomu węgla jest *R* [6]. Związki o takiej strukturze, racemiczne i o zdefiniowanej konfiguracji, zostały otrzymane drogą pełnej syntezy [16–18]. Sposób postępowania ilustrują wybrane syntezy przedstawione Schematami 15 [17] i 16 [31]. W pierwszej (Schemat 15) otrzymano racemiczny 4-oksapenem, a w drugiej (Schemat 16), dzięki rozpoczęciu sekwencji przemian z chiralnego substratu o zdefiniowanej konfiguracji, otrzymano związek enancjomerycznie czysty. W obu syntezach pierścień pięcioczłonowy tworzony jest w reakcji wewnątrzcząsteczkowej wymiany nukleofilowej przy atomie C-4 azetydyn-2-onu (Schemat 1, droga I). 4-Oksapenem o konfiguracji *trans* dominuje lub jest jedynym produktem.



Schemat 15



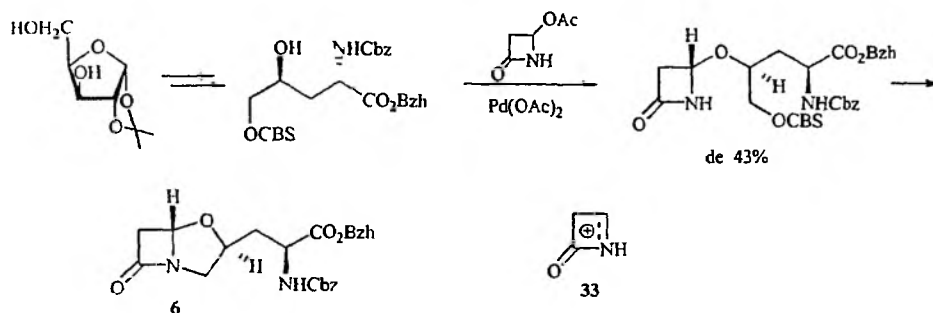
Schemat 16

Oksapenemy okazały się antybiotykami o wysokiej aktywności antybakteryjnej. Są one aktywne w obu formach enancjomerycznych [16], niestety ich niska trwałość spowodowała, że w przeciwieństwie do penemów nie znalazły się, jak dotąd, na rynku.

2. SYNTEZA KLAWAMÓW Z 4-ACETOKSY-AZETYDYN-2-ONU

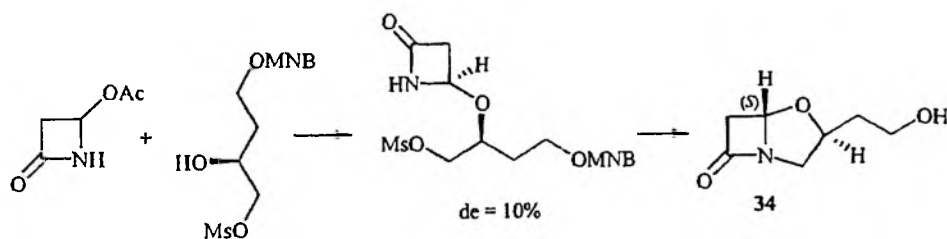
W 1974 roku Clauss, Grimm i Prossel [32] zaobserwowali, że 4-acetoksy-azetydyn-2-on łatwo ulega reakcji wymiany nukleofilowej przy atomie C-4. Ponieważ naturalne klawamy nie mają podstawnika przy atomie C-6 (kwas klawulanowy, związki 5 i 6), obserwacja ta otworzyła możliwość syntezy klawamów drogą

wymiany nukleofilowej pomiędzy chiralnym alkoholem i 4-acetoksy-azetydyn-2-onem [33–35]. Ten sposób postępowania stał się najbardziej popularną strategią syntezy klawamów. Reakcja wymiany przebiega poprzez etap płaskiego jonu iminowego **33**. Niestety, indukcja asymetryczna w takich reakcjach jest niewielka. Przykładem może być synteza klawalaniny **6** wykonana przez firmę Hoffman La Roche [33] (Schemat 17). Kluczowy etap wymiany nukleofilowej przebiega z 43% nadmiarem diastereomerycznym. Ten sam zespół, postępując w podobny sposób, dokonał syntezy epimeru klawalaniny [34].



Schemat 17

Znacznie niższy nadmiar diastereomeryczny osiągnięto dokonując syntezy nietrwałego naturalnego klawamu **34** [35] (Schemat 18).

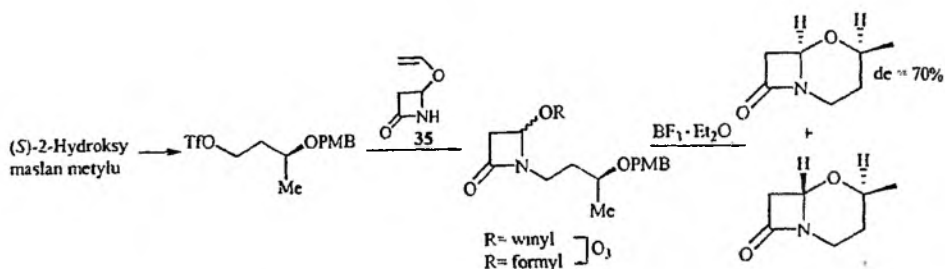


Schemat 18

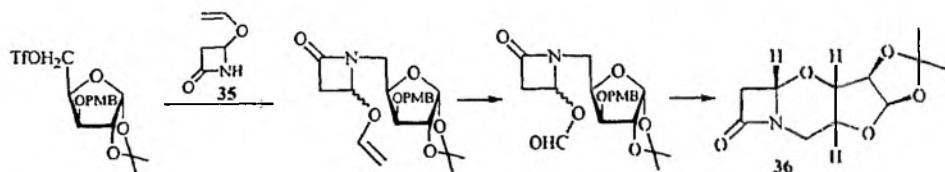
3. SYNTEZA 5-OKSACEFAMÓW Z 4-WINYLOKSY-AZETYDYN-2-ONU

Przedstawione w rozdziale 3 reakcje wymiany nukleofilowej z udziałem 4-acetoksy-azetydyn-2-onu i chiralnego alkoholu przebiegają z niewielkim stereoróżnicowaniem. Aby poprawić indukcję asymetryczną, postanowiono dokonać wymiany nukleofilowej przy C-4 w reakcji wewnątrzcząsteczkowej (Schemat 1, droga III). W tym celu należało najpierw poddać alkirowaniu β -laktamowy atom azotu, a dopiero w kolejnym etapie zamknąć drugi pierścień antybiotyku [36–39]. Ponieważ 4-acetoksy-azetydyn-2-on jest nietrwały w warunkach *N*-alkilowania,

wprowadzono 4-winyloksy-azetydyn-2-on **35** [36]. Związek ten uzyskany drogą [2+2]cykloaddycji izocyjanianu chlorosulfonylowego (CSI) do eteru diwinylowego może być łatwo *N*-alkilowany. Podstawnik winyloksyowy może być następnie utleniony do formyloksyowego lub acetoksyowego [36]. Sposób postępowania ilustruje Schemat 19 [37]. Osiągnięty nadmiar diastereomeryczny 70% jest znacznie lepszy od tego, który uzyskano w reakcji wymiany z udziałem 4-acetoksy-azetydyn-2-onu (Schemat 18).



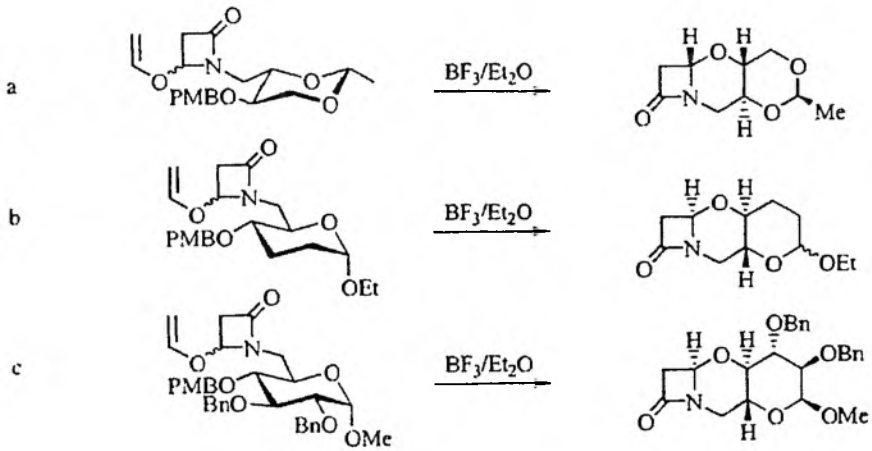
Schemat 19



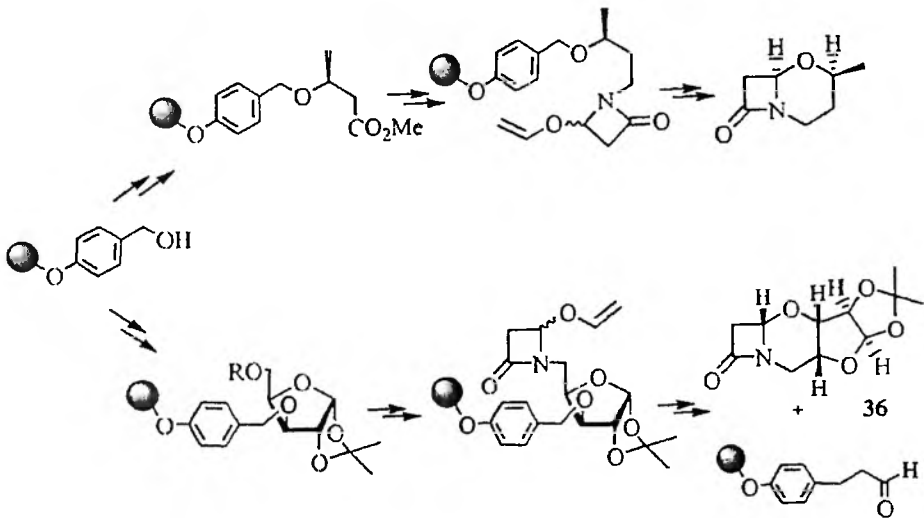
Schemat 20

Jeszcze lepszy nadmiar diastereomeryczny uzyskano w syntezie tetracyklicznego β -laktamu **36** [37] (Schemat 20). Warto odnotować rolę reszty *p*-metoksybenzylowej, która zabezpiecza grupę hydroksylową podczas *N*-alkilowania, a jest usuwana w obecności kwasu Lewisa w etapie wymiany nukleofilowej. Okazało się również, że winyloksyl obecny w cząsteczce β -laktamu jest grupą opuszczającą, w obecności kwasu Lewisa [39]. Obserwacja ta upraszcza postępowanie eliminując dwa etapy syntezy. Zaprezentowane na Schemacie 21 trzy przykłady a, b i c ilustrują wyjątkową efektywność strategii wykorzystującej 4-winyloksy-azetydyn-2-on. Okazała się ona możliwa do zrealizowania w warunkach syntezy na nośniku [40, 41]. Sekwencje reakcji przedstawione na Schematach 19 i 20 mogą być skutecznie wykonane na żywicy Wanga, przy czym resztę *p*-metoksybenzylową zastępuje terminal nośnika. Tworzeniu pierścienia sześciocłonowego towarzyszy równoczesne zdjęcie produktu z żywicy (Schemat 22). Nie obserwowaliśmy istotnych różnic (wydajność, kierunek i wielkość indukcji) pomiędzy reakcjami w roztworze i na żywicy.

Warto zwrócić uwagę na jeszcze jeden istotny element omawianej metodologii. Otóż, o różnicowaniu decyduje konfiguracja centrów chiralności we fragmencie, który tworzy sześciocłonowy pierścień cefamu. Widać to wyraźnie porównując drogi b i c Schematu 21 [42, 43]. Podstawienie i konfiguracja przy atomach C-2 i C-3 piranozydu nie ma wpływu na wielkość i kierunek indukcji [43]. Niestety, ta bardzo efektywna metodologia, jak dotychczas, z powodzeniem stosowana była do tworzenia związków o szkieletie 5-oksacefamu. Próby zamknięcia pierścienia pięciocłonowego skondensowanego z pierścieniem β -laktamu nie dały oczekiwanego rezultatu.



Schemat 21

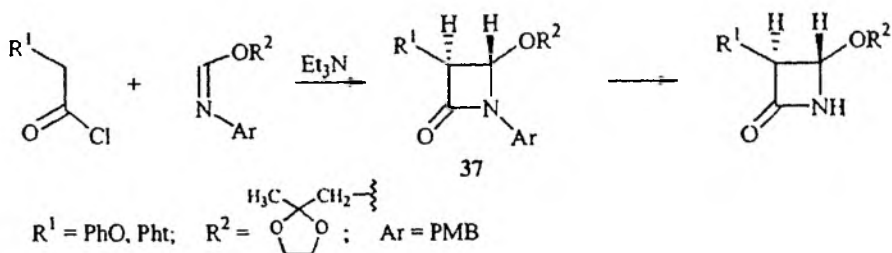


Schemat 22

4. TWORZENIE KLAWAMÓW I OKSACEFAMÓW DROGĄ CYKLOADDYCJI KETENÓW DO IMINOETERÓW

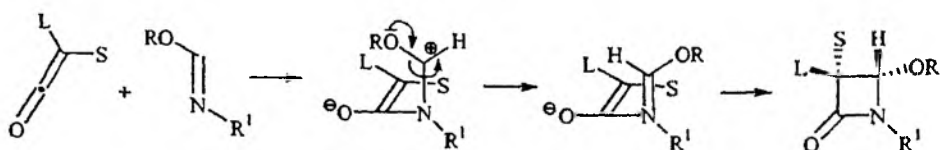
W przeciwieństwie do dobrze poznanych reakcji cykloaddykcji ketenów lub ich ekwiwalentów do tioiminoeterów, reakcje z udziałem łańcuchowych bądź cyklicznych iminoeterów doczekały się tylko kilku doniesień [44-47] (Schemat 1, droga IV).

Claudi z zespołem [44, 45] badał reakcje pomiędzy chlorkami kwasowymi i iminoeterami w obecności Et_3N . Zauważono, że reakcje cykloaddykcji prowadzą wyłącznie do *trans* dipodstawionego azetydyn-2-onu **37** (Schemat 23). Podobne obserwacje poczynili naukowcy amerykańscy [46, 47] badając addycje iminoeterów i ketenów w zależności od sposobu generowania ketenów. Zarówno otwarte, jak i cykliczne iminoetery dawały wyłącznie *trans* podstawione 4-alkoksyazetydyn-2-ony lub 5-oksacefamy.



Schemat 23

Otrzymywanie wyłącznie *trans* 3,4-dipodstawionych azetydyn-2-onów jest interesującą obserwacją, ponieważ addycja ketenów lub ich ekwiwalentów do imin prowadzi do *cis* podstawionych izomerów [48]. Tę wysoką *trans* selektywność tłumaczono stabilizacją ładunku dodatniego na iminowym sp^2 atomie węgla przez wolną parę elektronową atomu tlenu w dwubiegunowym jonie, który jest związkiem przejściowym cykloaddykcji [47]. Stabilizacja ta osłabia oddziaływanie pomiędzy wolną parą atomu azotu i karbokationem ułatwiając obrót wokół wiązania C-N i w konsekwencji otrzymywane są termodynamicznie trwalsze związki *trans* (Rys. 6). Nie podejmowano prób zastosowania w tych reakcjach chiralnych iminoeterów. Wysokie indukcje osiągnęte w reakcjach [2+2]cykloaddykcji izocyjanianów do chiralnych eterów winylowych (Rozdział 5) mogą sugerować również wysokie indukcje w reakcjach z udziałem ketenów i chiralnych iminoeterów.

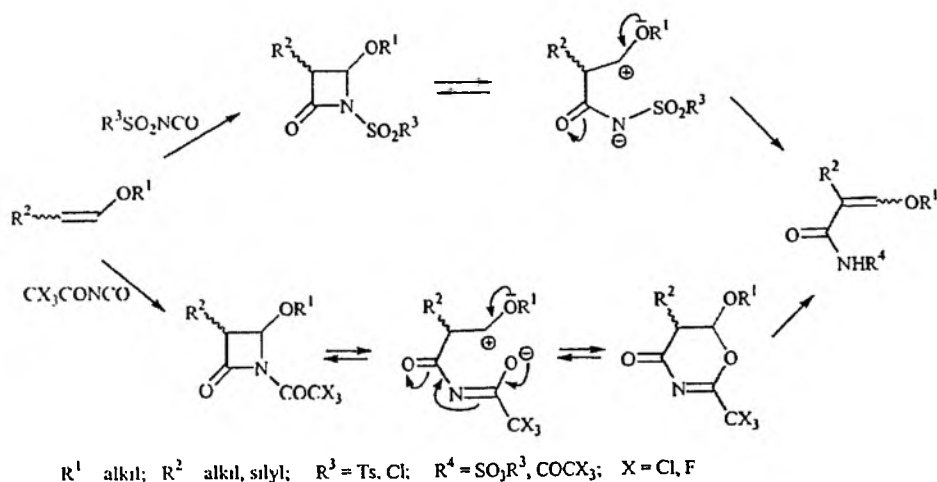


Rysunek 6. Stereochemiczny przebieg reakcji cykloaddykcji ketenu do iminoeteru

5. TWORZENIE KLAWAMÓW I 5-OKSACEFAMÓW DROGĄ CYKLOADDYCJI IZOCYJANIANÓW DO CHIRALNYCH ETERÓW WINYLOWYCH

5.1 REAKCJE CYKLOADDYCJI IZOCYJANIANÓW DO ETERÓW WINYLOWYCH

Etery winylowe ulegają łatwo [2+2]cykloaddycji z izocyjanianami sulfonyłowymi, jednakże tylko w nielicznych przypadkach addukty są wystarczająco trwałe, aby je można było wyodrębnić [49–51] (Rys. 7). Alkoksylowe grupy obecne w eterze i sulfonylowe w izocyjanianie, które są niezbędne, aby reakcja mogła mieć miejsce, powodują małą trwałość produktu, ułatwiając heterolityczne rozerwanie wiązania N–C-4 azetydyn-2-onu i w konsekwencji utworzenie α,β -nienasyconego amidu poprzez pośrednio tworzący się dwubiegunowy związek przejściowy [49, 50, 52]. W celu otrzymania trwałego β -laktamu należy usunąć grupę sulfonylową z atomu azotu. Jest to możliwe w przypadku grupy chlorosulfonylowej, którą usuwa wiele odczynników redukujących, takich jak: siarczyn sodowy lub Red-Al [53–56]. Reakcje pomiędzy eterami winylowymi i izocyjanianami sulfonyłowymi są odwracalne [57] i stereospecyficzne [52, 58]. *Z*-Olefiny tworzą *cis* podstawione β -laktamy, a *E*-olefiny *trans*. Przedłużenie czasu reakcji może powodować izomeryzację adduktu [52] (Rys. 7).



Rysunek 7. Reakcje [2+2]cykloaddycji z udziałem izocyjanianów sulfonylowych i trihaloacetylowych

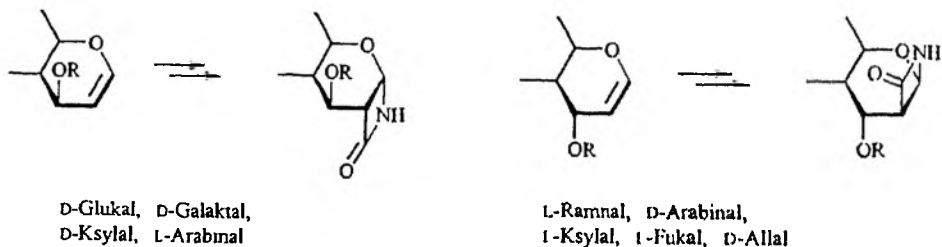
Izocyjaniany acylowe są mniej aktywne od sulfonylowych z wyjątkiem trichloroacetylowego [59–61] i trifluoroacetylowego [62]. Tworzą one z eterami winylowymi obok [2+2], również [4+2]cykloaddukty. [2+2]Cykloaddukty są zwykle produktami kinetycznymi. Przedłużenie czasu reakcji powoduje zwiększenie zawartości [4+2]cykloaddktu, a następnie przegrupowanie go do α,β -nienasyconego amidu. Grupa trichloroacetylowa może być usunięta z β -laktamowego atomu

azotu działaniem pierwszorzędowych amin [59]. Izocyjanian trichloroacetylowy z prostymi eterami winylowymi tworzy wyłącznie [4+2]cykloaddukty [61, 63].

Praktyczne znaczenie mają cykloaddycje z udziałem izocyjanianu chlorosulfonylowego i trichloroacetylowego. Jednakże, handlowo dostępny izocyjanian chlorosulfonylowy CSI, ze względu na zanieczyszczenie kwaśne (HCl, SO₃), wymaga odkwaszenia. Można tego dokonać przechowując CSI nad bezwodnym węglanem sodu lub potasu, oraz dodając tych zasad do środowiska reakcji [64]. Nicodkwaszony CSI działa jak katalizator kwaśny powodując oligomeryzację eteru lub rozkład adduktu.

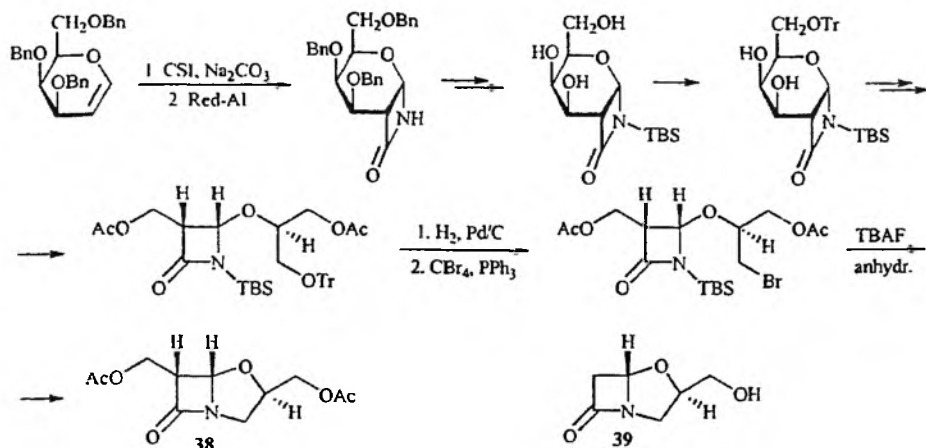
5.2. REAKCJE CYKLOADDYCJI IZOCYJANIANU TRICHLOROACETYLOWEGO I CHLOROSULFONYLOWEGO DO GLIKALI

Glikale sześciocłonowe zabezpieczone podstawnikami benzyłowymi lub silylowymi ulegają [2+2]cykloaddycji z izocyjanianem trichloroacetylowym [59] i CSI [64, 65], glikale pięciocłonowe tworzą addukty jedynie z izocyjanianem trichloroacetylowym [66]. Cząsteczka izocyjanianu podchodzi do glikalu wyłącznie *anti* do podstawnika przy atomie C-3. Konfiguracja pozostałych centrów stereogenicznych glikali, ani obecność terminalnego podstawnika, nie ma znaczenia dla kierunku i wielkości indukcji asymetrycznej [59, 60]. Kontrolę stereochemiczną nowotworzonych centrów stereogenicznych można zatem uzyskać przez dobór glikalu (Rys. 8).



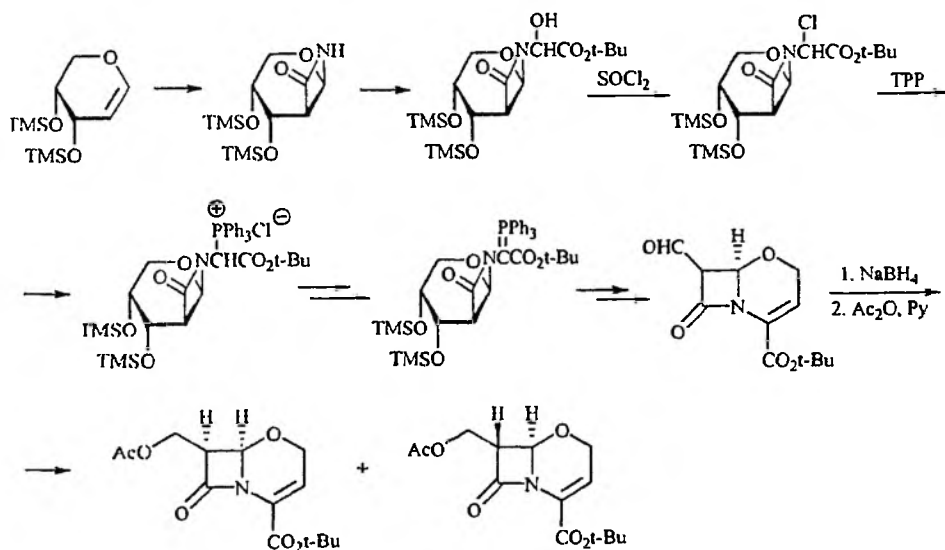
Rysunek 8. Kontrola stereochemiczna [2+2]cykloaddycji izocyjanianów do glikali

Brak podstawnika przy atomie C-3 glikalu powoduje znaczne obniżenie stereoselektywności cykloaddycji [50]. Odbezpieczenie grup hydroksylowych przy atomach C-3 i C-4, a następnie rozcięcie glikolowe pomiędzy tymi atomami otwiera drogę do stereokontrolowanej syntezy klawamów lub 5-oksacefamów. Warto przy tym podkreślić, że ten sposób postępowania prowadzi wyłącznie do *cis* podstawionych azetydyn-2-onów. Schematy 24, 25 i 26 ilustrują możliwości zastosowania tej strategii [67, 68, 65]. Schemat 24 przedstawia syntezę klawamu **38** [67], który jest strukturalnie zbliżony do naturalnego związku **39** o właściwościach przeciwwgrzybiczych [69].



Schemat 24

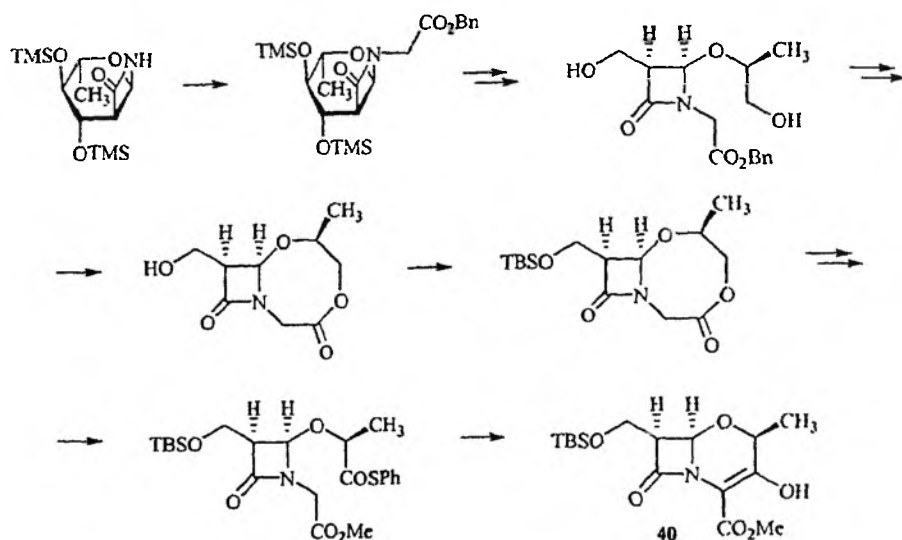
Synteza 5-oksacefemu z D-arabinalu pokazana jest na Schemacie 25 [68]. Pierścień sześcioczłonowy tworzony jest w wyniku wewnątrzcząsteczkowej reakcji Wittiga. Zasadowe warunki reakcji Wittiga sprzyjają częściowej epimeryzacji przy C-7 5-oksacefemu.



Schemat 25

Kolejna synteza 5-oksacefemu **40**, który strukturalnie przypomina aktywną oksacefalosporynę **9**, przedstawiona jest na Schemacie 26 [65]. Istotnym problemem w syntezach przedstawionych na Schematach 25 i 26 jest rozróżnienie grup

aldehydowych, które powstają podczas rozcięcia glikolowego. W syntezie przedstawionej na Schemacie 25 [68] różnicowanie osiągane jest przy pomocy reakcji Wittiga, a w syntezie przedstawionej na Schemacie 26 w wyniku tworzenia laktonu ośmioczłonowego [65].

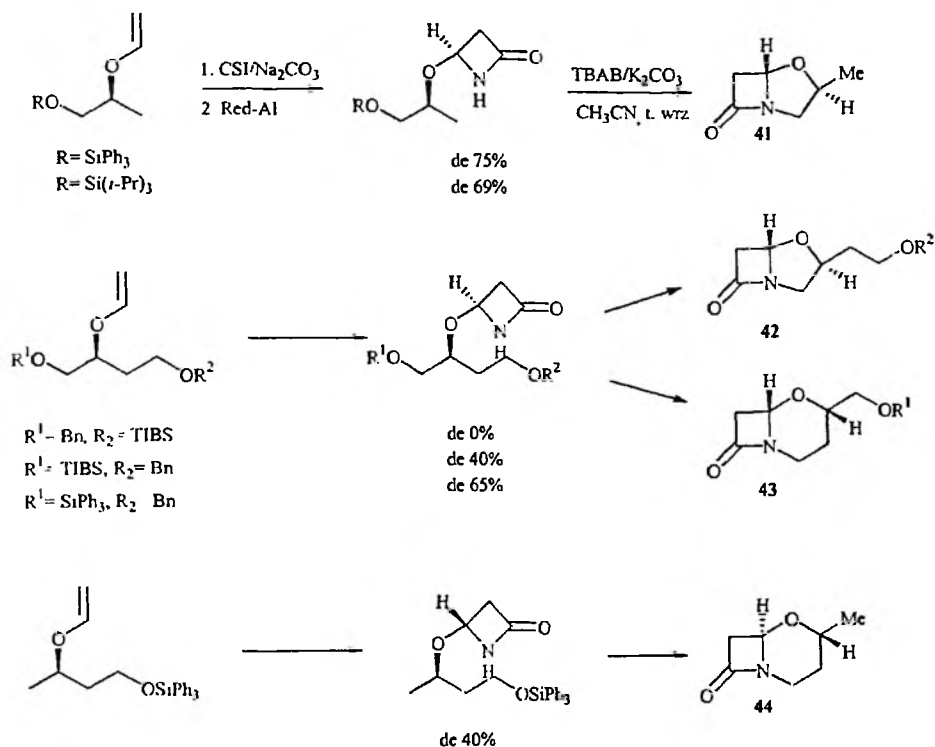


Schemat 26

5.3. REAKCJE [2+2]CYKLOADDYCJI IZOCYJANIANU CHLOROSULFONYLOWEGO DO CHIRALNYCH ETERÓW WINYLOWYCH

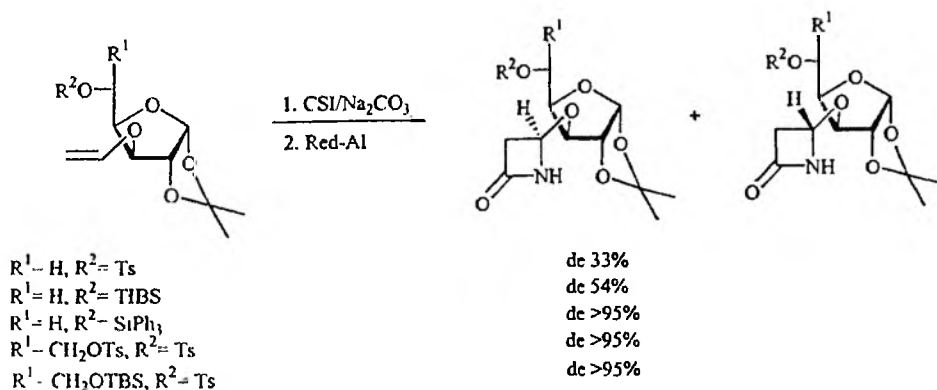
[2+2]Cykloadycja CSI do prostych eterów winylowych, otrzymanych standardowymi metodami z estrów metylowych kwasów: (*S*)-jabłkowego, (*S*)-mlekowego i (*R*)-3-hydroksymasłowego, prowadzi do azetydyn-2-onów z dobrą indukcją asymetryczną (Schemat 27) [70].

Kierunek i wielkość indukcji asymetrycznej zależy od sterycznych wymagań obu podstawników alkilowych związanych z centrum stereogenicznym. Zwiększenie rozmiaru jednego podstawnika względem drugiego powoduje poprawę stereoróżnicowania. Konfigurację nowo utworzonego centrum chiralności (C-4 pierścienia azetydyn-2-onu) ustalono po przekształceniu 4-alkoksy-azetydyn-2-onów w klawamy **41**, **42**, bądź 5-oksacefamy **43**, **44** dokonując wewnątrzcząsteczkowego alkilowania atomu azotu [70] (Schemat 27).



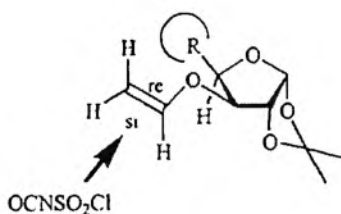
Schemat 27

Badanie [2+2]cykloadycji CSI do różnych 1,2-*O*-izopropylideno-3-*O*-winylo- α -D-ksylo- i glukofuranoz wykazało, że stereoselektywność reakcji może być znakomita [71] (Schemat 28).



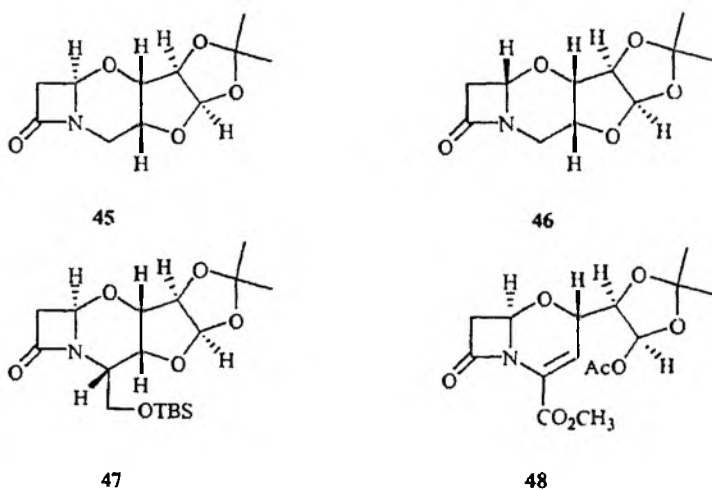
Schemat 28

Analizując kierunek indukcji asymetrycznej można przyjąć, że konformacja eteru winylowego w stanie przejściowym jest *s-trans*, a duży podstawnik w pozycji C-4 pierścienia furanozowego blokuje dostęp cząste-czki izocyjanianu do strony *re* wiązania podwójnego i w konsekwencji z wysoką stereoselektywnością powstaje diastereomer 4'*R* (Rys. 9).



Rysunek 9. Stereochemiczny model [2+2]cykloaddycji CSI do 3-*O*-winylo- α -D-ksylo- i glukofuranoz.

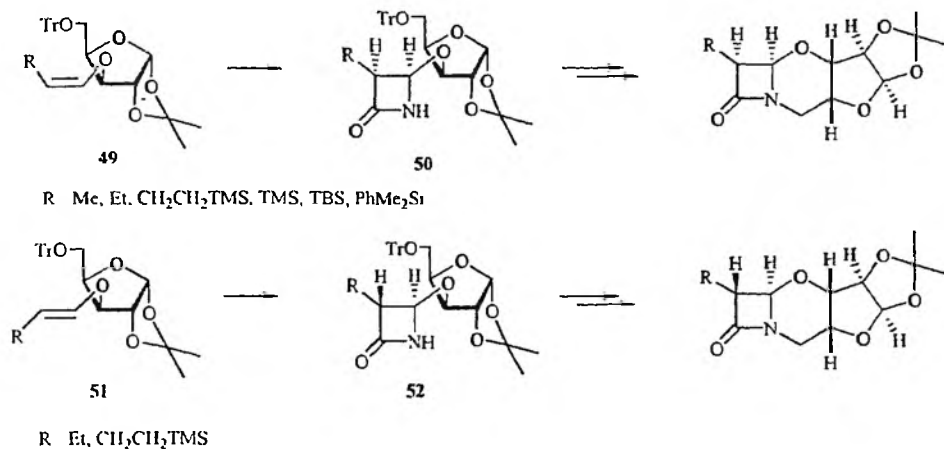
Otrzymane w wyniku cykloaddycji do 3-*O*-winylo- α -D-ksylofuranoz β -laktamy przekształcono w diastereomeryczne cefamy **45** i **46**, których budowę określono na podstawie eksperymentu NOE i analizy rentgenostrukturalnej [71, 72]. Wewnątrzcząsteczkowego alkiłowania atomu azotu dokonano w warunkach dwufazowych. W przypadku alkiłowania drugorzędowym atomem węgla, stosowano mieszaninę 1.1 równoważnika Bu_4NHSO_4 i 2.2 równoważnika *n*-BuLi w THF [36, 73]. Otrzymany 5-oksacefam **47** przekształcono następnie w 5-oksacefam **48** [73] (Rys. 10).



Rysunek 10. Bi- i tetracykliczne β -laktamy otrzymane na drodze [2+2]cykloaddycji CSI do 3-*O*-winylo- α -D-ksylo- i glukofuranoz

[2+2]Cykloaddycja ($\text{CSI}/\text{Na}_2\text{CO}_3$) do eterów (*Z*) 3-*O*-prop-1'-enyłowych, eterów (*Z*) i (*E*) 3-*O*-but-1'-enyłowych, eterów (*Z*) i (*E*) 3-*O*-(4'-TMS-but-1'-enyłowych,

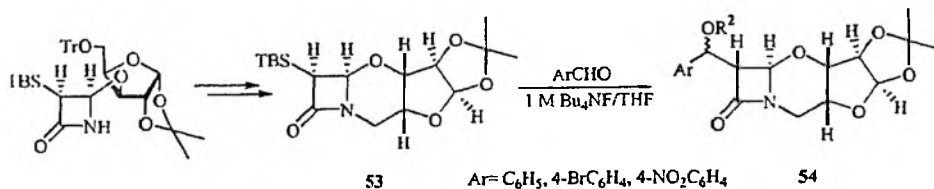
wych) i eterów 2'-silylowinytowych pochodnych 1,2-*O*-izopropylideno- α -D-ksylofuranozy, przebiega nie tylko z wysoką indukcją asymetryczną, ale również stereospecyficznie [58, 75] (Schemat 29). Olefina o konfiguracji (*Z*) **49** w wyniku [2+2]cykloaddycji CSI tworzy jako wyłączny produkt *cis*-3,4-dipodstawiony azetydyn-2-on **50**, podczas gdy olefina o konfiguracji (*E*) **51** daje wyłącznie produkt *trans* **52**. Związki **50** i **52** w standardowy sposób przeprowadzono w tetracykliczne cefamy [58, 75] (Schemat 29).



Schemat 29

Stereospecyficzność [2+2]cykloaddycji izocyjanianów do eterów winytowych posłużyła Effenbergerowi [52] do postawienia tezy o uzgodnionym mechanizmie tych reakcji. Teza ta została później wsparta obliczeniami *ab initio* wykonanymi przez grupę hiszpańską [74].

Wprowadzenie podstawnika silylowego do cząsteczki eteru winylowego (np. **49**, R = TBS) prowadzi do zwiększenia wydajności otrzymywanych adduktów, w porównaniu z prostymi eterami enoli, daje możliwość otrzymania „sila- β -laktamów” o potencjalnej aktywności mikrobiologicznej i umożliwia dalsze modyfikacje struktury cząsteczki poprzez specyficzne wprowadzenie grupy hydroksylowej lub przeprowadzenie reakcji indukowanych działaniem jonu fluorkowego [75, 76].

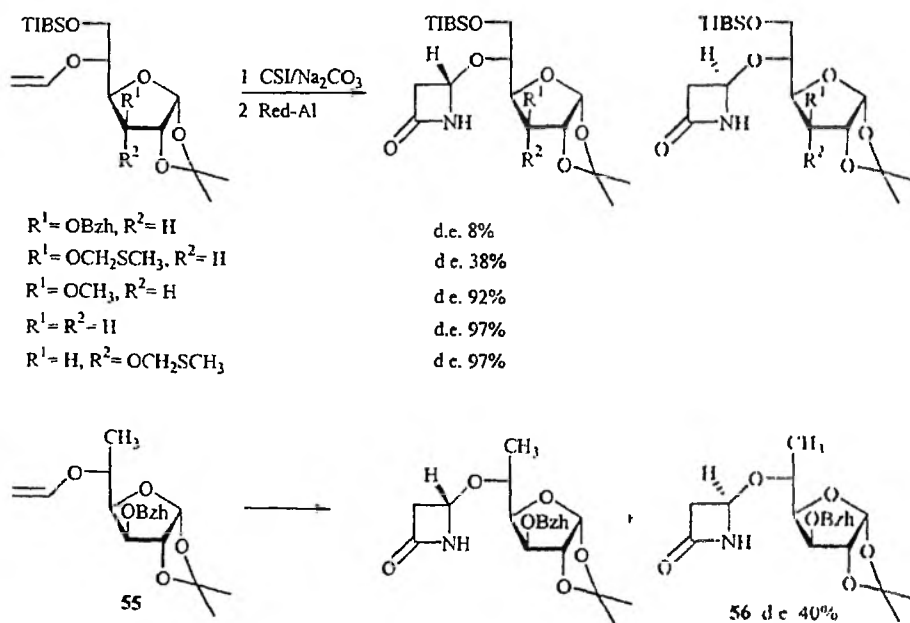


Schemat 30

Cefam **53** poddany alkilowaniu aldehydami aromatycznymi wobec bezwodnego TBAF, w bezwodnym THF, dostarcza 3'-(α -hydroksybenzylowanych) β -laktamów **54** z dobrymi wydajnościami [75] (Schemat 30).

Otrzymane β -laktamy **54** mają *trans* 3',4'-dipodstawiony pierścień azetydyn-2-onu i tworzą mieszaninę epimerów, w stosunku *ca.* 3:1. Takie same mieszaniny stereoisomerów **54**, w stosunku *ca.* 3:1, ale z niższą wydajnością, daje cefam **45** pod działaniem mocnych zasad (*n*-BuLi, LDA) w THF [75].

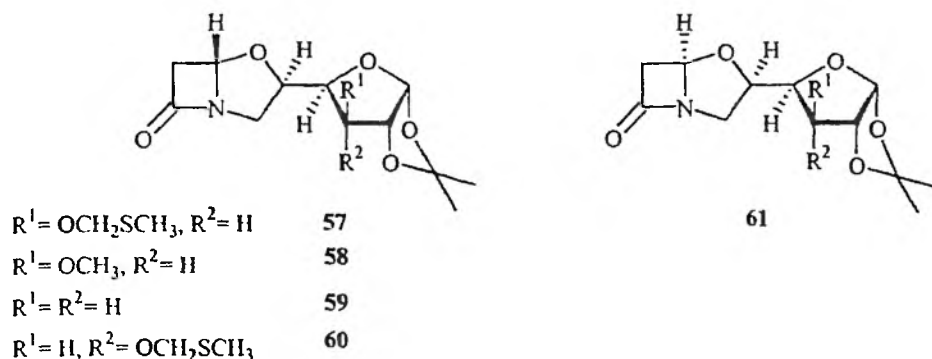
Wyniki uzyskane dla reakcji [2+2]cykloaddycji CSI do 5-(*O*-winylo- α -D-glukofuranoz wskazują, że stereoselektywność reakcji może być kontrolowana nawet, jeżeli eter winylowy znajduje się w łańcuchu bocznym (Schemat 31) [77]. Mały podstawnik przy atomie węgla C-3 glukofuranozy, albo duży zlokalizowany poniżej pierścienia (konfiguracja *allo*), daje wysoką indukcję asymetryczną. Niewielki podstawnik R przy C-3 umożliwia łatwy dostęp CSI do strony *re* olefiny tworząc w przewodzie diastereoizomery o konfiguracji (4'*S*). W przypadku związku 3-deoksy i związku o konfiguracji *allo*, produktami były wyłącznie azetydyn-2-ony o konfiguracji 4'*S* (Schemat 31).



Schemat 31

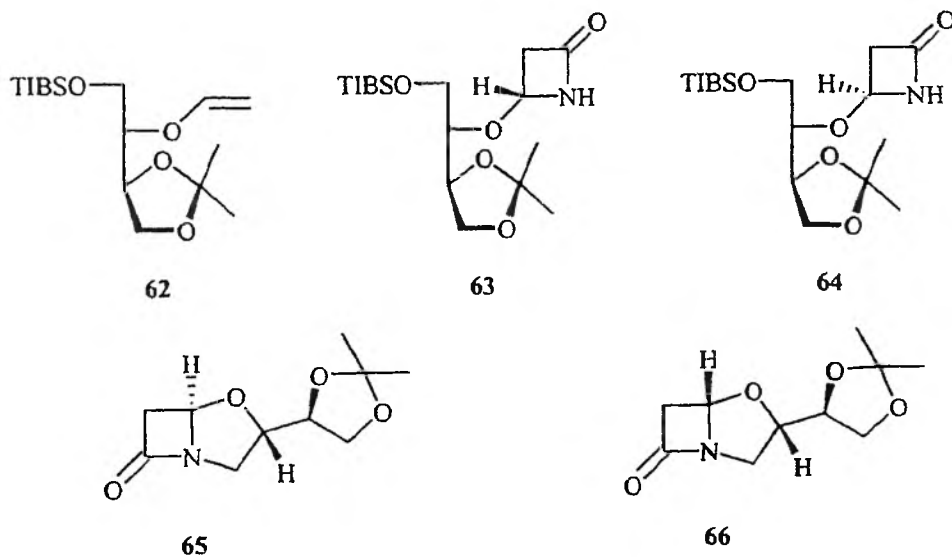
Usunięcie dużego podstawnika z pozycji C-6 (związek **55**) spowodowało odwrócenie kierunku indukcji w [2+2]cykloaddycji. Powstający w przewodzie azetydyn-2-on **56** ma konfigurację *R* na atomie C-4' [77]. Azetydyn-2-ony otrzymane w reakcji [2+2]cykloaddycji do 5-(*O*-winylo-glukofuranoz przekształcono w związki o strukturze klawamów **57–61** (Rys. 11) dokonując wewnątrzcząsteczkowego

alkilowania w warunkach PTC. Konfigurację absolutną atomu C-5 w klawamach **57–61** ustalono przy pomocy pomiarów NOE i CD [71, 78].



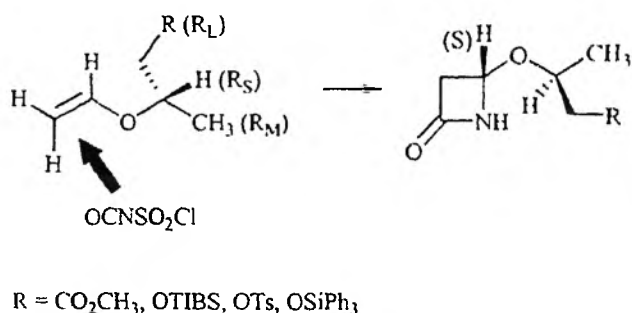
Rysunek 11. Klawamy otrzymane na drodze [2+2]cykloaddycji CSI do 5-*O*-winylo-glikofuranoz

Wynik [2+2]cykloaddycji CSI do eterów przedstawionych na Schemacie 31 wskazuje, że pierścień furanozowy może być zamieniony na inny pierścień pięciodłonowy. W celu udowodnienia tej tezy otrzymano z kwasu L-winowego związek **62** posiadający zamiast pierścienia furanozowego, grupę 1,3-dioksoolanową [74] (Rys. 12). [2+2]Cykloaddycja CSI do eteru **62** dała mieszaninę adduktów **63** i **64** w stosunku 95,5:4,5. Po alkilowaniu w standardowych warunkach, otrzymano dwa klawamy **65** i **66**. Główny produkt **65** miał konfigurację *R* przy atomie C-5 i wykazywał znaczną aktywność jako inhibitor β -laktamazy [79].



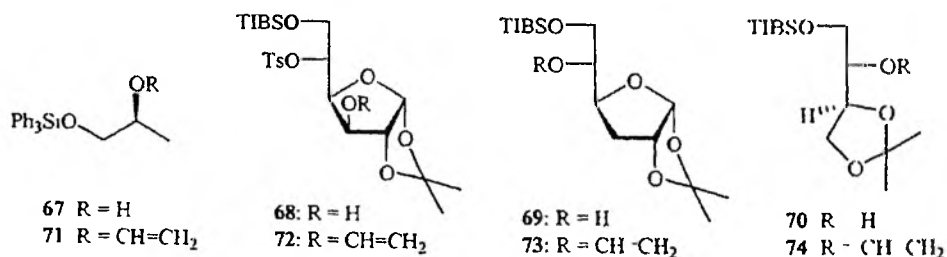
Rysunek 12. Związki otrzymane z kwasu L-winowego

Porównanie równowagowych współczynników NOE zmierzonych dla winylo-
podstawionych izopropylesterów i obliczonych dla konformacji generowanych przy
pomocy programu mechaniki molekularnej, umożliwiło oznaczenie konformacji
stanu podstawowego eteru (Rys. 13) [80]. Biorąc pod uwagę, iż dla reakcji egzoter-
micznych, do których należą omawiane [2+2]cykloaddycje, konformacja stanu przej-
ściowego powinna być zbliżona do konformacji stanu podstawowego, można było
zapropionować model stereochemiczny reakcji. Model ten charakteryzuje diastereo-
meryczna płaszczyzna zerowa, na której leży ugrupowanie eteru w konformacji
s-trans, centralny atom reszty izopropylowej i grupa metylowa. Atom węgla z pod-
stawnikiem i centralny atom wodoru reszty izopropylowej znajdują się po obu stro-
nach płaszczyzny i decydują o stereoróżnicowaniu [80] (Rys. 13). Przyjęty model
tłumaczy fakty doświadczalne i umożliwia zaplanowanie syntezy w taki sposób,
aby uzyskiwać pełną kontrolę stereochemiczną etapu cykloaddycji.



Rysunek 13. Stereochemiczny model [2+2]cykloaddycji CSI do eterów winylo-
wyczych

W trakcie badań nad syntezą oksabicyklicznych b-laktamów drogą [2+2]cy-
kloaddycji CSI do prostych eterów winylo-
wyczych skonfrontowano otrzymane wyniki
z alternatywną metodą syntezy tych samych związków, która wykorzystuje kon-
densację alkoholi z 4-acetoksy-azetydyn-2-onem [81] (Schemat 1, droga IIb). Do
badań porównawczych użyto cztery chiralne alkohole 67–70 (Rys. 14).



Rysunek 14. Chiralne alkohole i etery winylo-
wyczych wybrane do porównania drogi IIb i V na Schemacie 1

Alkohole 67–70 poddano reakcji kondensacji z 4-acetoksy-azetydyn-2-onem. Te same alkohole wykorzystano także jako chiralne związki wyjściowe w syntezie eterów winylowych 71–74, które w reakcji z CSI tworzyły β -laktamy o wysokiej czystości optycznej (Tabela 1, metoda A). Reakcję kondensacji racemicznego 4-acetoksy-azetydyn-2-onu z alkoholami 67–70 prowadzono w roztworze toluenowym, stosując octan palladu jako katalizator (Metoda B). Wyniki indukcji asymetrycznej dla reakcji kondensacji przedstawia Tabela 1. Jak widać [2+2]cykloaddycja CSI do chiralnych eterów winylowych zapewnia wyższą indukcję na nowo tworzonym centrum chiralności β -laktamów [81].

Tabela 1. Porównanie diastereoselektywności w alternatywnych metodach syntezy 4-alkoksy-azetydyn-2-onów

Alkohol	Nadmiar diastereomeryczny (%)	Eter winylowy	Nadmiar diastereomeryczny (%)
67	75	71	9
68	>97	72	82
69	>97	73	20
70	91	74	44

W rozdziale 4 zaprezentowaliśmy zalety syntezy 5-oksacefamów z 4-winyloksy-azetydyn-2-onu (Schemat 1, droga III) [37, 38, 42, 43]. Warto porównać wyniki tej metody z alternatywną metodą [2+2]cykloaddycji CSI do eterów winylowych (Schemat 1, droga V).

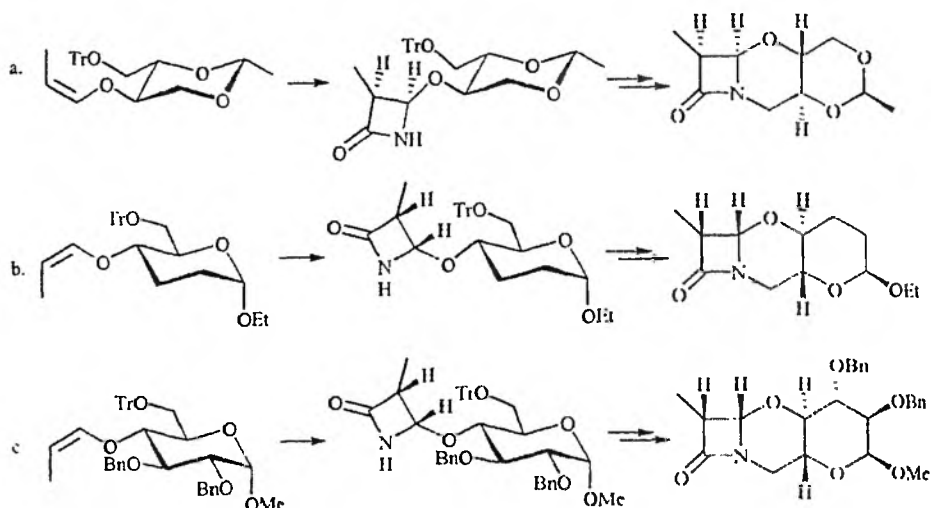
Synteza eterów winylowych polega na przeprowadzeniu reakcji transestryfikacji w obecności katalizatora kwaśnego. Ze względu na obecność w testowanych związках kwasolabilnych ugrupowań acetalowych, proste etery winylowe zastąpiono eterami *Z*-propenyłowymi [42, 43].

Etery propenyłowe otrzymuje się dokonując przegrupowania wiązania podwójnego w eterze allilowym działaniem świeżo sublimowanego *t*-BuOK w DMSO [82]. Reakcję cechuje wysoka (*Z*) selektywność, którą tłumaczono koordynacją atomów tlenu i terminalnego atomu węgla układu allilowego przez kation potasu [82]. Biorąc pod uwagę, iż konfiguracja olefiny nie ma wpływu na kierunek indukcji, a reakcje są stereospecyficzne, podejmując modelowe badanie [2+2]cykloaddycji nie ma znaczenia, czy do reakcji stosowano proste etery winylowe, czy *Z*-propenyłowe.

Komplementarny charakter metodologii [2+2]cykloaddycji i metodologii wykorzystującej 4-winyloksy-azetydyn-2-on demonstrują Schematy 21 i 32 [43].

Porównanie kierunku indukcji asymetrycznej w reakcjach przedstawionych na Schemacie 21 i w reakcjach przedstawionych na Schemacie 32 dostarcza kolejnych przykładów komplementarności obu metod [42, 43]. Porównując te metody warto zauważyć, że w metodzie cykloaddycji otoczenie wiązania podwójnego i jego prze-

strzenna aranżacja decydują o wielkości i kierunku indukcji. Na przykład, Schemat 32 b i c w porównaniu ze Schematem 21 b i c pokazują, że w reakcjach cykloaddycji podstawienie przy C-3 odgrywa istotną rolę w różnicowaniu stron wiązania podwójnego, powodując istotne zmniejszenie indukcji asymetrycznej.

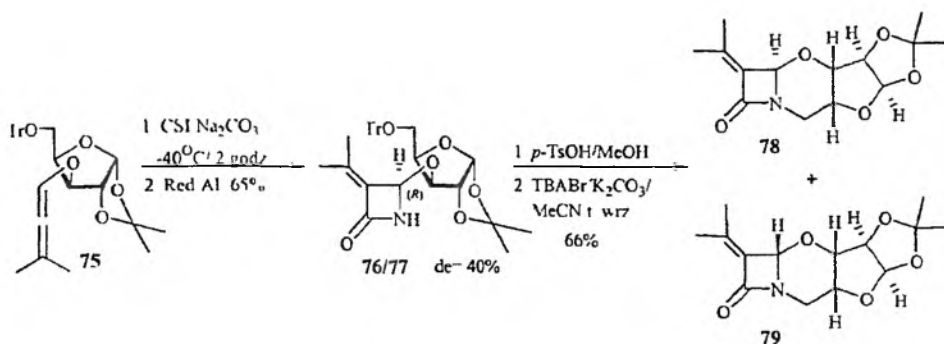


Schemat 32

5.4. REAKCJE [2+2]CYKLOADDYCJI IZOCYJANIANU CHLOROSULFONYLOWEGO DO ALKOKSYALLENÓW

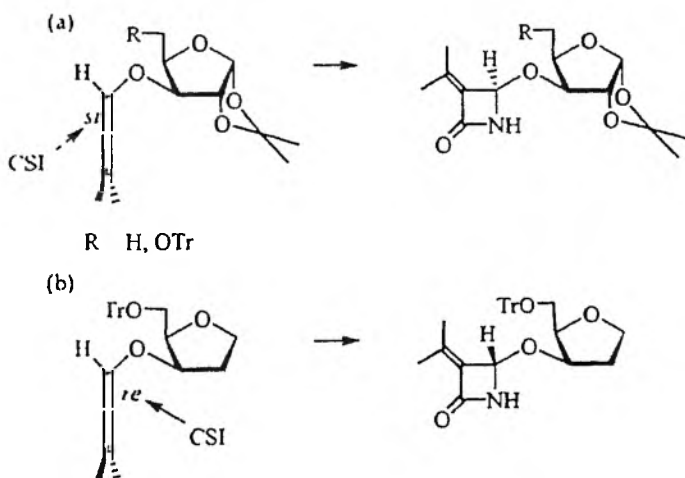
Antybiotyki β -laktamowe mają w sąsiedztwie grupy karbonylowej wiele różnych podstawników [83]. Reakcje [2+2]cykloaddycji CSI do allenów podstawionych grupami elektronodonorowymi prowadzą do β -laktamów *z. egzo*-alkilidenującą grupą przy atomie C-3 azetydyn-2-onu. Podstawniki alkilidenujące w tym położeniu występują w asparenomycynach i kilku syntetycznych inhibitorach β -laktamaz (Rys. 2), mogą również posłużyć do otrzymania całej gamy grup funkcyjnych poprzez różnorodne przemiany wiązania podwójnego [84–86]. Reakcje pomiędzy CSI i chiralnymi alkoksyallenami były przedmiotem badań indukcji asymetrycznej [87]. Aktywne w reakcjach cykloaddycji okazały się aleny podstawione przy terminalnym atomie węgla dwoma grupami metylowymi lub podstawione resztą trimetylosilylową w sąsiedztwie atomu tlenu.

[2+2]Cykloaddycja CSI do alkoksyallenu **75** daje mieszaninę dwóch azetydyn-2-onów **76/77**, w proporcji *ca.* 2,5:1. Główny diastereomer ma konfigurację *R* przy atomie C-4' pierścienia azetydyn-2-onu. Drogą wewnątrzcząsteczkowego alkilowania β -laktamowego atomu azotu związki **76/77** zostały przekształcone w 5-oksacefamy **78** i **79**, które rozdzielono na czyste składniki [87] (Schemat 33).



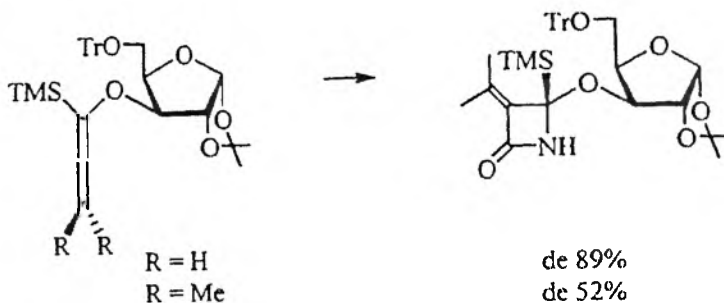
Schemat 33

Usunięcie grupy trytyloksylowej zmniejsza indukcję, ale nie zmienia jej kierunku, natomiast usunięcie reszty izopropylidenu zmienia kierunek indukcji (Rys. 15). W porównaniu do eterów winylowych, addycja do alkoxyallenów przebiega z niższą indukcją. Badania konformacji stanu podstawowego alkoxyallenów wykazały, że dominuje zdecydowanie konformacja *s-cis* [87, 88] (Rys. 15). Konformacja *s-cis* alkoxyallenu została przyjęta w modelu stereochemicznym cykloadycji. Model ten próbuje wyjaśnić zarówno kierunek, jak i wielkość indukcji asymetrycznej.



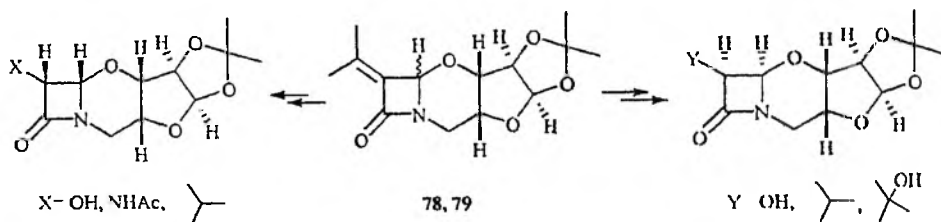
Rysunek 15 Stereochemiczny model addycji CSI do alkoxyallenów

Wprowadzenie grupy trimetylosilylowej do atomu C-1' allenu zdecydowanie zwiększa indukcję asymetryczną [87] (Schemat 34).



Schemat 34

Możliwości przemian reszty izopropylidenowej w pozycji C-7 cefamamów 78 i 79 pokazano otrzymując związki z grupą hydroksylową, izopropylową, hydroksyizopropylową i aminową [89] (Schemat 35).



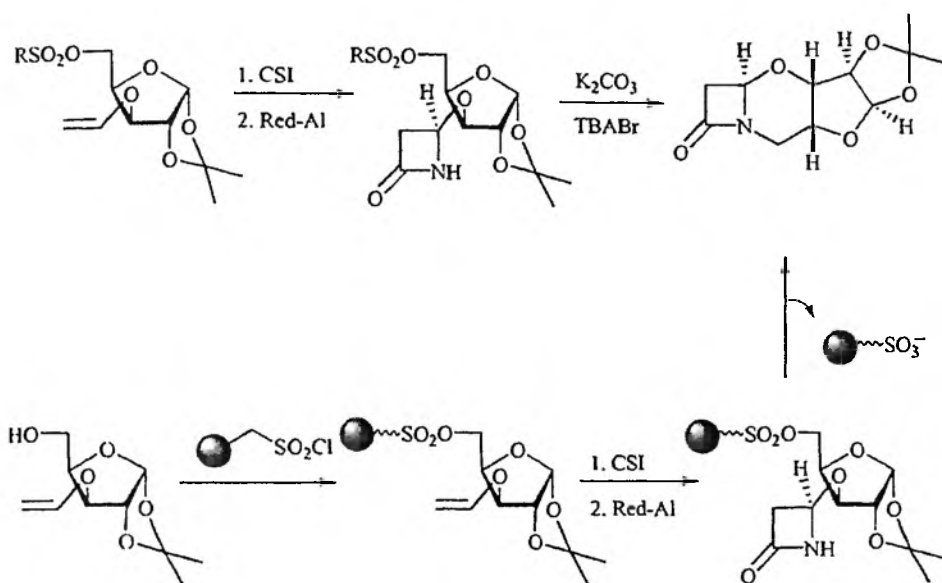
Schemat 35

5.5. REAKCJE [2+2]CYKLOADDYCJI IZOCYJANIANU CHLOROSULFONYLOWEGO DO ETERÓW WINYLOWYCH PROWADZONE NA PODŁOŻU STAŁYM

Próba przeprowadzenia na podłożu stałym reakcji [2+2]cykloaddykcji izocyjanianu chlorosulfonylowego do eteru winylowego według koncepcji przedstawionej na Schemacie 36 zakończyła się niepowodzeniem [90]. Koncepcja ta była bezpośrednim przeniesieniem na fazę stałą sekwencji reakcji wykonanych z powodzeniem w roztworze. Przyczyną niepowodzeń jest prawdopodobnie obecność wolnych grup sulfonylowych na żywicy, które nie zostają wykorzystane w etapie sulfonylowania alkoholu. Grupy takie mogą powodować rozkład cykloadduktu CSI do eteru winylowego.

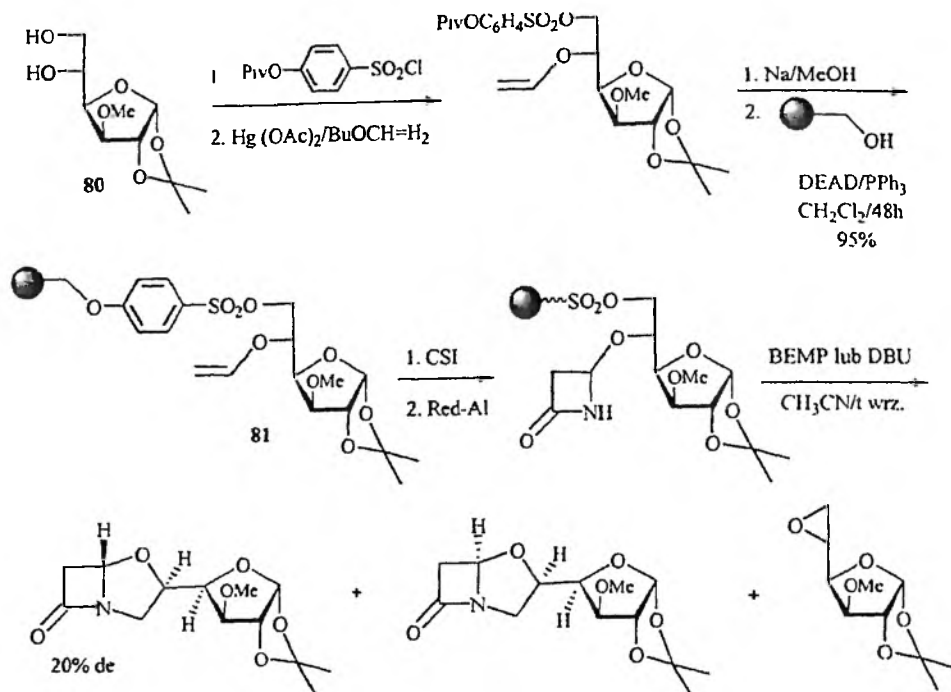
Przyłączenie eteru winylowego do żywicy może być osiągnięte przy pomocy linkera *p*-oksybenzenosulfonylowego [90, 91] (Schemat 37) lub metylosulfonylowego (Schemat 38). W pierwszym przypadku przyłączenie następuje w trzyczetapeowej sekwencji reakcji i polega na sulfonylowaniu chlorkiem *p*-piwaloiloksybenzenosulfonylowym grupy hydroksylowej substratu, usunięciu zabezpieczenia piwa-

loilowego, oraz połączeniu z żywicą, uwolnionej grupy fenolowej sulfonianu z resztą hydroksymetylową żywicy Wanga w warunkach reakcji Mitsunobu. Ten sposób postępowania umożliwia połączenie substratu z żywicą poprzez resztę sulfonilową, równocześnie wykluczając obecność na żywicy wolnych grup sulfonilowych. Przygotowane w ten sposób etery winylowe zostały z powodzeniem wykorzystane do dalszych badań.



Schemat 36

Sulfonylowanie związku **80** chlorkiem *p*-piwaloiloksybenzenosulfonilowym oraz przeprowadzenie katalizowanej $\text{Hg}(\text{OAc})_2$ reakcji transestryfikacji pozwoliło uzyskać eter winylowy z wysoką wydajnością. W następnym etapie usunięto zabezpieczenie piwaloilowe (Na/MeOH) i otrzymany fenol połączono z żywicą Wanga w warunkach reakcji Mitsunobu ($\text{DEAD}/\text{PPh}_3/\text{CH}_2\text{Cl}_2/48$ godz.). Eter **81** poddano reakcji z CSI i uzyskano mieszaninę azetydyn-2-onów, która po alkiowaniu dała mieszaninę diasterecomerycznych klawamów oraz 5,6-anhydrocukier (Schemat 37).



Schemat 37

Na tej samej drodze otrzymano inne klawamy i 5-oksacefamy, które powstawały z umiarkowaną wydajnością i niskim nadmiarem diastereomerycznym [90].

Podobne rezultaty uzyskano przyłączając eter winylowy do żywicy Merrifielda przy pomocy linkera metylosulfonylowego (Schemat 38). W tym celu wykorzystano metodę Musickiego i Widlanskiego [92] otrzymywania alkilosulfonianów. Metoda ta polega na generowaniu pochodnej litoorganicznej mesylanu, którą następnie poddaje się alkirowaniu odpowiednim halogenkiem. W celu przyłączenia cukrowego eteru winylowego do żywicy, pochodną mesylową przeprowadzono w sól litową, a następnie poddano ją alkirowaniu żywicą Merrifielda (Schemat 38). Z wydajnością 30% otrzymano mieszaniny cefamów **82** i **83** oraz anhydrocukier **84** w proporcji 12:10:0.4 [93].

PODSUMOWANIE

Przedstawiony przegląd metod syntezy tlenowych analogów penicylin i cefalosporyn demonstruje różnorodność możliwości syntezy tych związków (Schemat 1), koncentrując uwagę na kontroli stereochemicznej konfiguracji mostkowego atomu węgla i względnej konfiguracji obu centrów stereogenicznych pierścienia czterocząłowego. Najbardziej uniwersalną metodą okazuje się metoda cykloaddycji CSI do chiralnych eterów winylowych (Schemat 1, V). Umożliwia ona pełną kontrolę stereochemiczną. Słabym punktem tego sposobu postępowania są ograniczone możliwości wprowadzania podstawników peryferyjnych do podstawowego szkieletu. Wyjątkowo wysokie indukcje asymetryczne uzyskano stosując 4-winyloksy-azetydyn-2-on i odpowiednio przygotowane chiralne etery *p*-metoksybenzylowe (Schemat 1, III). Niestety, metoda ta może być zastosowana tylko w syntezie oksacefamów.

Syntezy wykorzystujące pochodne penicyliny dają dobry rezultat jedynie w syntezie oksacefamocyn. Uzyskanie pożądanej konfiguracji mostkowego atomu węgla wymaga rozpoczęcia cyklu przemian z pochodnej 6-cipenicyliny. Utlenienie, w ostatnim etapie, sąsiedniego do grupy karbonylowej atomu węgla, umożliwia wprowadzenie grupy metoksylowej z pełną kontrolą konfiguracji.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] H. Staudinger, Liebigs Ann. Chem., 1907, 356, 51.
- [2] A. Fleming, Brit. J. Exp. Pathol., 1929, 10, 226.
- [3] H.W. Florey, E. Chain, N.G. Heatley, M.A. Jennings, A.G. Sanders, E.P. Abraham, N.F. Florey, *Antibiotics*, Vol. 2, Oxford University Press: Oxford, 1949.
- [4] a) R.W. Ratcliffe, G. Albers-Schönberg [w:] *Chemistry and Biology of β -Lactam Antibiotics*, Ed. R.B. Morin, M. Gorman, Academic Press: New York, vol.2, 1982, 227; b) F. Perrone, G. Franceschi, *Recent Progress in the Chemical Synthesis of Antibiotic*, Ed. G. Lukacs, M. Ohno, Springer-Verlag: Berlin, New York, 1990, 613; J. Kant, D.G. Walker, *The Organic Chemistry of β -Lactams*, Ed. G.I. Georg, VCH, 1993, 121.
- [5] S. Uedo, H. Ona, Chem. Pharm. Bull., 1980, 28, 1563.
- [6] A.J. Eglinton, J. Chem. Soc., Chem. Commun., 1977, 720.
- [7] a) W. Nagata, M. Narisada, T. Yoshida [w:] *Chemistry and Biology of β -Lactam Antibiotics*, Ed. R.B. Morin, M. Gorman, Academic Press: New York, vol. 2, 1982, 1; b) W. Nagata, M. Yoshioka, T. Tsuji, T. Aoki, Y. Nishitani, S. Yamamoto, M. Narisada, T. Yoshida, S. Matsuura, Y. Komatsu, *Frontiers of Antibiotic Research*, Ed. H. Umezawa, Academic Press: Tokyo, 1987, 193.
- [8] a) I. Ernest *Chemistry and Biology of β -Lactam Antibiotics*, Ed. R.B. Morin, M. Gorman, Academic Press: New York, vol. 2, 1982, 315; b) R.B. Woodward, [w:] *Recent Advances in the Chemistry of β -Lactam Antibiotics*, Ed. J. Elks, Chem. Soc., Spec. publ. No 28, 167.
- [9] W.H. Koster, Ch.M. Cimarusti, R.B. Sykes [w:] *Chemistry and Biology of β -Lactam Antibiotics*, Ed. R.B. Morin, M. Gorman, Academic Press: New York, vol.3, 1982, 339.
- [10] T. Kamiya, H. Aoki, Y. Mine [w:] *Chemistry and Biology of β -Lactam Antibiotics*, Ed. R.B. Morin, M. Gorman, Academic Press: New York, vol.2, 1982, 166.

- [11] A.G. Brown, D. Butlerworth, M. Colc, G. Hanscomb, J.D. Hood, C. Reading, G.N. Rolinson, *J. Antibiot.*, 1976, **29**, 668; A.G. Brown, D.F. Corbett, J. Goodacre, J.B. Harbridge, T.T. Howarth, R.J. Ponsford, I. Stirling, T.I. King, *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1*, 1984, 635.
- [12] L.D. Cama, B.G. Christensen, *J. Am. Chem. Soc.*, 1974, **96**, 7582.
- [13] R.A. Firestone, J.L. Fahey, N.S. Maciejewicz, G.S. Patel, B.G. Christensen, *J. Med. Chem.*, 1977, **20**, 551.
- [14] W. Nagata, *Pure Appl. Chem.*, 1989, **61**, 325.
- [15] R. Evans jr, H. Ax, A. Jacoby, T.H. Williams, E. Jenkins, J.P. Scannel, *J. Antibiot.*, 1982, **36**, 213.
- [16] H.R. Pfaendler, T. Neumann, R. Bartsch, *Synthesis*, 1992, 1179.
- [17] H. Wild, K.-G. Metzger, *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, 1993, **3**, 2205.
- [18] H.R. Pfaendler, F. Weisner, K. Metzger, *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, 1993, **3**, 2211.
- [19] S. Shibahara, T. Okonogi, Y. Murai, K. Kudo, T. Yoshida, S. Kondo, B.G. Christensen, *J. Antibiot.*, 1988, **41**, 1154.
- [20] S. Wolfe, J.-B. Ducep, K.-C. Tin, S.-L. Lee, *Can. J. Chem.*, 1974, **52**, 3996.
- [21] Japanese Kokai Tokyo Koho, 1974, No 7641, 385; C.A. 84, 180239.
- [22] C. U. Kim, D.N. Gregor, *Tetrahedron Lett.*, 1978, 409.
- [23] C.L. Branch, M.J. Pearson, *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1*, 1979, 2268.
- [24] M. Narisada, T. Yoshida, H. Onoue, M. Ohtani, T. Okada, T. Tsuji, I. Kikkawa, N. Haga, H. Satoh, H. Itani, W. Nagata, *J. Med. Chem.*, 1979, **22**, 757.
- [25] S. Uyeo, I. Kikkawa, Y. Hamashima, H. Ona, Y. Nishitani, K. Okada, T. Okada, T. Kubota, K. Ishikura, Y. Ide, K. Nakano, W. Nagata, *J. Am. Chem. Soc.*, 1979, **101**, 4403.
- [26] M. Yoshioka, I. Kikkawa, T. Tsuji, Y. Nishitani, S. Mori, K. Okada, M. Murakami, F. Matsubara, M. Yamaguchi, W. Nagata, *Tetrahedron Lett.*, 1979, 4287.
- [27] US Pat. 3, 948, 927.
- [28] R.G. Alexander, R. Southgate, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1977, 405.
- [29] B.G. Christensen, R.W. Ratcliffe, *German Off.* 2411856, 1974.
- [30] L.D. Cama, B.G. Christensen, *Tetrahedron Lett.*, 1978, 4233.
- [31] M. Murakami, T. Aoki, M. Matsuura, W. Nagata, *J. Antibiot.*, 1990, **43**, 1141.
- [32] K. Clauss, D. Grimm, G. Prossel, *Liebigs Ann. Chem.*, 1974, 539.
- [33] S. De Bernardo, J.P. Tengi, G.J. Sasso, M. Weigle, *J. Org. Chem.*, 1985, **50**, 3457.
- [34] J.C. Müller, V. Toome, D.L. Pruess, J.F. Blount, M. Weigle, *J. Antibiot.*, 1983, **36**, 217.
- [35] D. Hoppe, T. Hilpert, *Tetrahedron*, 1987, **43**, 2467.
- [36] Z. Kaluza, H.-S. Park, *Synlett.*, 1996, 895.
- [37] Z. Kaluza, R. Lysek, *Tetrahedron: Asymmetry*, 1997, **8**, 2553.
- [38] Z. Kaluza, *Tetrahedron Lett.*, 1998, **39**, 8349.
- [39] Z. Kaluza, *Tetrahedron Lett.*, 1999, **40**, 1025.
- [40] B. Furman, R. Thürmer, Z. Kaluza, R. Lysek, W. Voelter, M. Chmielewski, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 1999, **38**, 1121.
- [41] B. Furman, R. Thürmer, Z. Kaluza, W. Voelter, M. Chmielewski, *Tetrahedron Lett.*, 1999, **40**, 5909.
- [42] K. Borsuk, K. Suwińska, M. Chmielewski, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2001, **12**, 979.
- [43] K. Borsuk, A. Kazimierski, J. Solecka, Z. Urbańczyk-Lipkowska, M. Chmielewski, *Carbohydr. Res.*, 2002, **337**, 2005.
- [44] M. Cardellini, F. Claudi, F. Micheletti Moracci, *Synthesis*, 1984, 1070.
- [45] I. Antonini, M. Cardellini, F. Claudi, F. Micheletti Moracci, *Synthesis*, 1986, 379.
- [46] L.S. Hegedus, R. Imwinkelried, M. Alarid-Sargent, D. Dvorak, Y. Satoh, *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, **112**, 1109.
- [47] L.S. Hegedus, J. Montgomery, Y. Narukawa, D.S. Snustad, *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, **113**, 5784.

- [48] W.T. Brady, Y.Q. Gu, *J. Org. Chem.*, 1989, **54**, 2838.
- [49] F. Effenberger, R. Gleiter, *Chem. Ber.*, 1964, **97**, 1576.
- [50] M. Chmielewski, Z. Kałuża, C. Bełżecki, P. Sałański, J. Jurczak, M. Adamowicz, *Tetrahedron*, 1985, **41**, 2441.
- [51] M. Chmielewski, Z. Kałuża, P. Sałański, J. Jurczak, *High Pressure Res.*, 1992, **11**, 171.
- [52] F. Effenberger, P. Fischer, G. Prossel, G. Kiefer, *Chem. Ber.*, 1971, **104**, 1987; F. Effenberger, P. Fischer, G. Prossel, *ibid.*, 1971, **104**, 2002.
- [53] E.J. Moriconi, J.F. Kelly, *J. Org. Chem.*, 1968, **33**, 3036.
- [54] T. Durst, M.J. O'Sullivan, *J. Org. Chem.*, 1970, **35**, 2043.
- [55] R. Graf, *Org. Synth.*, 1966, **46**, 51; E.J. Moriconi, W.C. Crawford, *J. Org. Chem.*, 1968, **33**, 370.
- [56] a) T. Ohashi, K. Kan, I. Sada, A. Miyama, K. Watanabe, *Eur. Pat. Appl.*, 1986, 167155; b) E. Hungerbühler, M. Biolo, F. Ernest, J. Kalwoda, M. Langa, P. Schneider, [w:] *New Aspects of Organic Chemistry I*, Ed. Z. Yoshida, T. Shiba, Y. Ohshiro, VCh, New York, 1989, 419.
- [57] M. Chmielewski, Z. Kałuża, P. Sałański, J. Jurczak, *Chem. Ber.*, 1993, **126**, 165.
- [58] a) B. Furman, Z. Kałuża, M. Chmielewski, *Tetrahedron*, 1996, **52**, 6019; b) R. Łysek, B. Furman, Z. Kałuża, M. Chmielewski, *Polish J. Chem.*, 2000, **74**, 51.
- [59] M. Chmielewski, Z. Kałuża, J. Grodner, R. Urbański, *Cycloaddition Reaction in Carbohydrate Chemistry*, Ed. R.M. Giuliano, ACS Symposium Series 1992, **494**, 50.
- [60] M. Chmielewski, Z. Kałuża, B. Furman, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1996, 2689; B. Furman, Z. Kałuża, R. Łysek, M. Chmielewski, *Polish J. Chem.*, 1999, **73**, 43.
- [61] J.L. Chitwood, P.G. Gott, J.C. Martin, *J. Org. Chem.*, 1971, **36**, 2228.
- [62] A.G.M. Barrett, A. Fenwick, M.J. Betts, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1983, 299.
- [63] Z. Kałuża, Wang Fudong, C. Bełżecki, M. Chmielewski, *Tetrahedron Lett.*, 1990, **30**, 5171.
- [64] Z. Kałuża, W. Abramski, C. Bełżecki, J. Grodner, D. Mostowicz, R. Urbański, M. Chmielewski, *Synlett*, 1994, 539.
- [65] C. Bełżecki, R. Urbański, Z. Urbańczyk-Lipkowska, M. Chmielewski, *Tetrahedron*, 1997, **53**, 14153.
- [66] W. Abramski, K. Badowska-Rosfonek, M. Chmielewski, *Biomed. Chem. Lett.*, 1993, **3**, 2403.
- [67] M. Chmielewski, J. Grodner, *J. Carbohydr. Chem.*, 1992, **11**, 691.
- [68] J. Grodner, M. Chmielewski, *Tetrahedron*, 1995, **51**, 829.
- [69] D. Brown, J.R. Evans, R.A. Fletton, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1979, 282.
- [70] B. Furman, Z. Kałuża, M. Chmielewski, *J. Org. Chem.*, 1997, **62**, 3135.
- [71] Z. Kałuża, B. Furman, M. Patel, M. Chmielewski, *Tetrahedron: Asymmetry*, 1994, **5**, 2179.
- [72] R. Łysek, K. Borsuk, M. Chmielewski, Z. Kałuża, Z. Urbańczyk-Lipkowska, A. Klimek, J. Frelek, *J. Org. Chem.*, 2002, **67**, 1472.
- [73] B. Furman, S. Molotov, R. Thürmer, Z. Kałuża, W. Voelter, M. Chmielewski, *Tetrahedron: Asymmetry*, 1997, **53**, 5883.
- [74] F.P. Cossio, B. Lecea, X. Lopez, G. Roa, A. Arrieta, J.M. Ugalde, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1993, 1450; F.P. Cossio, G. Roa, B. Lecea, J.M. Ugalde, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, **117**, 12306.
- [75] R. Łysek, Z. Kałuża, B. Furman, M. Chmielewski, *Tetrahedron*, 1998, **54**, 14065.
- [76] S. Gehanne, M. Giammaruco, M. Taddei, P. Ulivi, *Tetrahedron Lett.*, 1994, **35**, 2047.
- [77] Z. Kałuża, B. Furman, M. Chmielewski, *Tetrahedron: Asymmetry*, 1995, **6**, 1719.
- [78] B. Furman, P. Krajewski, Z. Urbańczyk-Lipkowska, J. Frelek, Z. Kałuża, L. Kozerski, M. Chmielewski, *J. Chem. Soc., Perkin Trans 2*, 1998, 1737.
- [79] O. Neub, B. Furman, Z. Kałuża, M. Chmielewski, *Heterocycles*, 1997, **45**, 265.
- [80] B. Furman, P. Krajewski, Z. Kałuża, R. Thürmer, W. Voelter, L. Kozerski, M.P. Williamson, M. Chmielewski, *J. Chem. Soc., Perkin Trans 2*, 1999, 217.
- [81] Z. Kałuża, B. Furman, P. Krajewski, M. Chmielewski, *Tetrahedron*, 2000, **56**, 5553.
- [82] T.J. Prosser, *J. Am. Chem. Soc.*, 1961, **83**, 1701.

- [83] H. Wild, *The Organic Chemistry of β -Lactams*, Ed. G.I. Georg, VCH, 1993, 49.
- [84] J.D. Buynak, H. Pajouhesh, D.L. Lively, Y. Pramalakshimi, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1984, 984.
- [85] J.D. Buynak, M.N. Rao, H. Pajouhesh, R.Y. Chandrasekaran, K. Finn, P. de Meester, S.C. Chu, *J. Org. Chem.*, 1985, **50**, 4245.
- [86] J.D. Buynak, M.N. Rao, *J. Org. Chem.*, 1986, **51**, 1571.
- [87] R. Łysek, B. Furman, Z. Kałuża, J. Frelek, K. Suwińska, Z. Urbańczyk-Lipkowska, M. Chmielewski, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2000, **11**, 3131.
- [88] R. Łysek, P. Krajewski, Z. Urbańczyk-Lipkowska, B. Furman, Z. Kałuża, L. Kozerski, M. Chmielewski, *J. Chem. Soc., Perkin Trans 2*, 2000, 61.
- [89] R. Łysek, Z. Urbańczyk-Lipkowska, M. Chmielewski, *Tetrahedron*, 2001, **57**, 1301.
- [90] R. Łysek, B. Furman, M. Cierpucha, B. Grzeszczyk, Ł. Matyjasek, M. Chmielewski, *Eur. J. Org. Chem.*, 2002, 2377.
- [91] B. Furman, R. Łysek, Ł. Matyjasek, W. Wojtkielewicz, M. Chmielewski, *Synth. Commun.*, 2001, **31**, 2795.
- [92] B. Musicki, T.S. Widlanski, *J. Org. Chem.*, 1990, **55**, 4231.
- [93] R. Łysek, B. Furman, B. Grzeszczyk, M. Cierpucha, M. Chmielewski, dane niepublikowane.

Praca wpłynęła do Redakcji 3 stycznia 2003

**SYNTEZA WIELOFUNKCYJNYCH POCHODNYCH
TIOPIRANU W REAKCJACH CYKLOADDYCJI
DIELSA-ALDERA**

**SYNTHESIS OF POLYFUNCTIONALIZED
THIOPYRANS *via* HETERO-DIELS-ALDER
REACTIONS**

Krystyna Bogdanowicz-Szwed, Artur Budzowski

*Wydział Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego,
ul. Ingardena 3, 30-060 Kraków*

Abstract

Wprowadzenie

Synteza układu tiopiranu w cykloaddycji 1-tia-1,3-butadienów z elektroakceptorowymi alkenami

1. Synteza i reaktywność układu tiochalkonu
2. Zastosowanie enaminotionów w reakcjach hetero-Dielsa-Aldera
3. Synteza i reaktywność α,β -nienasyconych tioamidów
4. Reaktywność związków tiokarbonylowych sprzężonych z układami aromatycznymi

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane

Prof. dr hab. Krystyna Bogdanowicz-Szwed jest profesorem na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego, gdzie uzyskała kolejne stopnie naukowe: mgr w 1956, dr w 1962, dr hab. w 1978 i tytuł profesora w 1996 r. Od 1984 r. kieruje zespołem chemii enaminy w Zakładzie Chemii Organicznej UJ. Odbyła staże naukowe w Uniwersytecie Ruhry w Bochum oraz Uniwersytecie w Getyndze.

Jej zainteresowania badawcze koncentrują się na syntezie związków heterocyklicznych z wykorzystaniem reakcji heterodienowych oraz skoniugowanej addycji. Wypromowała pięciu doktorów.

Dr Artur Budzowski uzyskał dyplom magistra chemii na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego w 1997 r. Po rocznym stażu podjął studia doktoranckie. Pracę doktorską obronił z wyróżnieniem w 2002 r. i jest asystentem w Zakładzie Chemii Organicznej na Wydziale Chemii UJ.

Obecnie zajmuje się reakcjami cykloaddycji z udziałem α,β -nienasyconych związków tiokarbonylowych. Jest autorem czterech prac opublikowanych w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym.

ABSTRACT

The hetero-Diels-Alder (HDA) methodology employing α,β -unsaturated thiocarbonyl compounds represents a straightforward and efficient approach to sulfur-containing six-membered heterocycles. This review presents applications of α,β -unsaturated thiocarbonyl compounds in heterodiene reactions and covers the literature published in the last two decades.

The α,β -unsaturated thiocarbonyl compounds, formally present 1-thia-1,3-butadiene system and include the following groups of compounds: thiochalcones, enaminothiones, α,β -unsaturated thioamides and compounds containing thiocarbonyl groups conjugated with carbon-carbon double bonds of carbo- and heteroaromatic rings. In general, reactions of 1-thia-1,3-butadiene systems with dienophiles belong to cycloadditions with normal electron demand, although there are some examples of cycloadditions with inverse electron demand.

The first chapter concerns the cycloadditions of thiochalcones. Most of them are synthesized from chalcones in reactions with Lawesson reagent. Thiochalcones are unstable, at room temperature they are in equilibrium with two dimeric forms: thiopyran and 3,4-dihydro-1,2-dithiin. Both compounds are formed by heterodiene cycloaddition of two molecules of thiochalcone. At higher temperatures the dimers undergo decomposition to thiochalcones. Thiochalcones generated *in situ* by heating the dimers were successfully used in cycloadditions to acryloamide, styrene and enol ethers as well as in an asymmetric hetero Diels-Alder (AHDA) reactions with (-) dimethyl fumarate and in the reactions catalyzed by ytterbium triflate.

The next chapter deals with the reactions of enaminothiones. These compounds reacted smoothly with dienophiles containing electron withdrawing groups yielding cycloadducts in high yields. Some cycloadducts easily eliminated amine furnishing stable 2*H*-thiopyran derivatives. Reactions of enaminothiones with substituted β -nitrostyrenes proceeded in regio- and stereoselective manner.

In contrast to enaminothiones, α,β -unsaturated thioanilides were found to be less reactive in hetero-Diels-Alder reactions. Two molecules of thiocinnamamide underwent cycloaddition in acetyl chloride yielding *N*-acylated derivative of 3,4-dihydro-2*H*-thiopyran. *N*-Acylated α,β -unsaturated thioanilides was successfully used in heterodiene reactions with *N*-phenylmaleimide, cyclopentene and enol ether. A recent applications of *N*-acylated α,β -unsaturated thioanilides deal with intramolecular hetero-Diels-Alder reactions leading to tricyclic thiopyran derivatives.

The compounds containing thiocarbonyl group conjugated with carbon-carbon double bond of furan or thiophene skeleton undergo cycloaddition with maleic anhydride, cyclopentene and norbornene yielding fused 2*H*-thiopyran derivatives in good yield. Some of the cycloadducts are unstable and spontaneously rearrange to aromatized compounds. An application of some organometallic reagents e.g. $(\text{Me}_2\text{Al})_2\text{S}$ in thionation of aromatic ketones extended their use to synthesis of various thiopyrans *via* hetero-Diels-Alder reactions.

WPROWADZENIE

Reakcja Dielsa-Aldera zwana powszechnie reakcją dienową stanowi jedną z najbardziej użytecznych metod syntezy związków organicznych zawierających w swojej strukturze sześciocłonowe pierścienie karbocykliczne oraz heterocykliczne. Należy ona do najbardziej cennych reakcji w chemii organicznej. Główną jej zaletą jest możliwość utworzenia w jednym etapie dwóch wiązań chemicznych w wyniku czego powstają pierścienie sześciocłonowe. Reakcje dienowe charakteryzują się regioselektywnością i diastereoselektywnością oraz bardzo dobrą wydajnością produktów, dlatego są szeroko stosowane w syntezie wielu produktów naturalnych [1].

Ze względu na mechanizm tworzenia się wiązań pomiędzy reagentami, określanymi jako 1,3-dieny i dienofile, reakcje dienowe należą do cykloaddycji typu $4\pi + 2\pi$. Jeżeli w dienie lub dienofilu znajduje się jeden lub więcej heteroatomów to reakcje określane są w literaturze mianem hetero-Dielsa-Aldera (HDA). Umożliwiają one syntezę częściowo uwodornionych układów heterocyklicznych, zawierających jeden lub więcej heteroatomów [2]. Wśród reakcji HDA wyróżnić można cykloaddycje z udziałem α,β -nienasyconych związków karbonylowych oraz alkenów, które stanowią dogodną metodę syntezy pochodnych tiopirany [3]. Układ pirydyny można otrzymywać stosując 1- lub 2-aza-1,3-butadieny jako heterodieny [4]. Związki o strukturze tiopirany można zsyntetyzować w reakcjach cykloaddycji heterodienowej pomiędzy α,β -nienasyconymi związkami tiokarbonyłowymi i alkenami lub też w reakcjach pomiędzy 1,3-butadienami i związkami tiokarbonyłowymi. Oba podejścia nie są jednak równoważne. Pomijając ewentualne reakcje następcze, pierwsza droga umożliwia otrzymywanie produktów o strukturze 3,4-dihydro-2*H*-tiopirany, druga natomiast prowadzi do 3,6-dihydro-2*H*-tiopiranów.

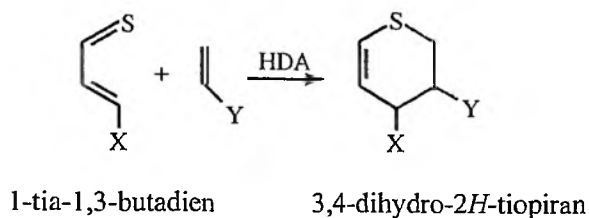
W niniejszym artykule przedstawimy reakcje cykloaddycji heterodienowej prowadzące do syntezy pochodnych tiopirany. Pierwsze doniesienia literaturowe dotyczące opisywanej dziedziny badań pochodzą z lat siedemdziesiątych. Ze względu na bogactwo danych, niniejszy artykuł został opracowany na podstawie oryginalnych prac opublikowanych głównie w okresie od 1981 do 2001.

SYNTEZA UKŁADU TIOPIRANU W CYKLOADDYCJI 1-TIA-1,3-BUTADIENÓW Z ELEKTRONOAKCEPTOROWYMI ALKENAMI

Zainteresowanie chemików związkami o strukturze tiopirany wiąże się z ich potencjalnym zastosowaniem. Układy te wchodzi w skład wielu związków biologicznie aktywnych. Szczególnie obiecujące są wyniki badań nad trwałymi tioanalogami tromboksanu A_2 , o przewidywanym dużym znaczeniu w medycynie [5, 6].

α,β -Nienasycone związki tiokarbonyłowymi formalnie reprezentują układ 1-tia-1,3-butadienu. Reakcje heterodienowe tego typu połączeń z alkenami należą

do cykloaddycji z normalnymi wymaganiami elektronowymi (Rys 1). Zgodnie z teorią orbitali granicznych (FMO) reakcje cykloaddycji polegają na nakładaniu się HOMO dienu i LUMO dienofila. Dla ich przebiegu korzystny jest dobór dienofili o silnych właściwościach elektroakceptorowych, w celu zmniejszenia różnicy energii pomiędzy HOMO dienu a LUMO dienofila. Znane są także nieliczne przykłady reakcji 1-tia-1,3-butadienów, które należą do cykloaddycji z odwróconymi wymaganiami elektronowymi.

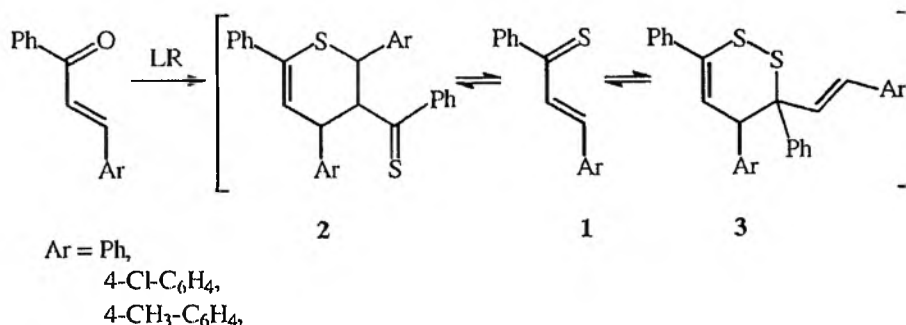


X – grupa elektronodonorowa
Y – grupa elektroakceptorowa

Związki zawierające układ 1-tia-1,3-butadienu należą do jednej z czterech klas połączeń, są to tiochalkony oraz pochodne arylieno-1-tiotetralonu, enaminotiony wraz z enaminoditioestrami, α,β -nienasycone tioamidy oraz związki tiokarbonylowe sprzężone z układami aromatycznymi. Zgodnie z tym podziałem, prezentowany materiał został podzielony na cztery rozdziały.

1. SYNTEZA I REAKTYWNOŚĆ UKŁADU TIOCHALKONU

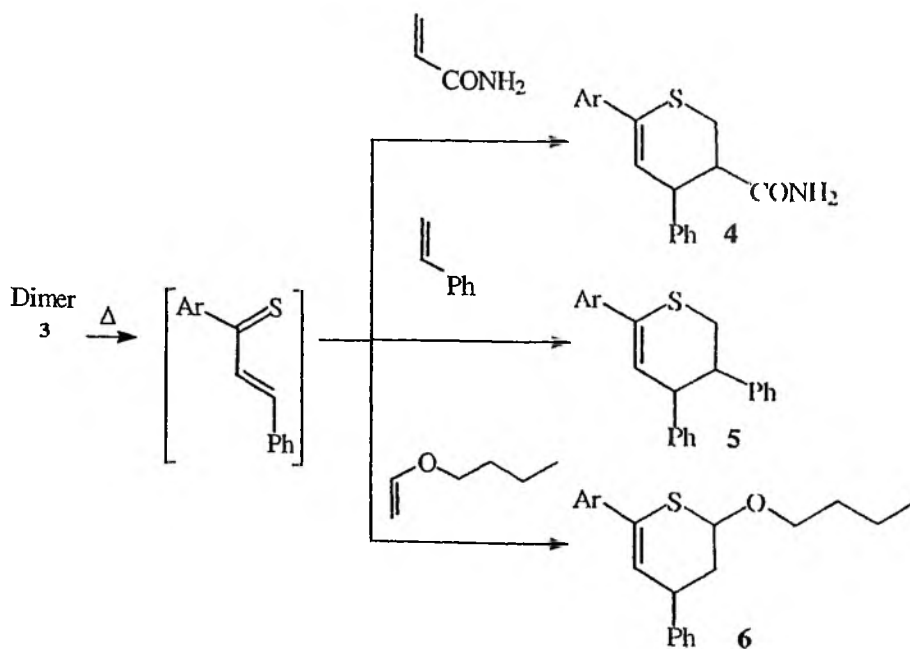
Najprostszymi połączeniami zawierającymi układ 1-tia-1,3-butadienu są związki określane zwyczajowo jako tiochalkony. Posiadają one dwa podstawniki aryłowe, w położeniach 2 i 4 sprzężonego układu heterodienowego.



Schemat 1

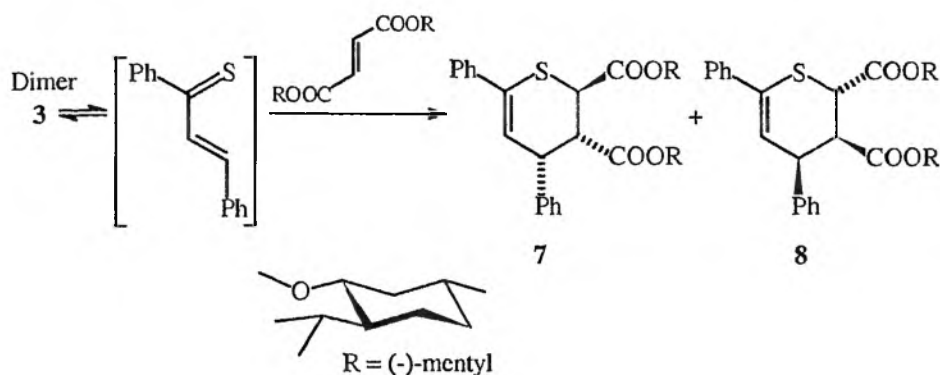
Badania nad reakcją tionowania odpowiednich, łatwo dostępnych α,β -nienasyconych związków karbonylowych przy pomocy odczynnika Lawessona (LR) [7] doprowadziły do ustalenia, iż powstające tiochalkony **1** pozostają w równowadze z dwoma różnymi formami dimerycznymi, o strukturze tiopiranu **2**, oraz 3,4-dihydro-1,2-ditianu **3**. Powstawanie obu produktów można wyjaśnić na podstawie reakcji cykloaddycji, w której jako heterodien służy α,β -nienasycony układ tiokarbonylowy. Druga cząsteczka tiochalkonu może natomiast pełnić rolę klasycznego dienofila lub też heterodienofila (Schemat 1).

W temperaturze pokojowej opisany stan równowagi przesunięty jest na korzyść obu dimerów, natomiast wraz ze wzrostem temperatury zwiększa się ilość wolnego tiochalkonu. Na tej podstawie opracowano metodę cykloaddycji polegającą na termicznym rozkładzie wyizolowanego dimeru **3** w obecności odpowiedniego dienofila. Przeprowadzono w ten sposób szereg reakcji z dienofilami o różnych właściwościach elektronowych [8] i potwierdzono wysoką reaktywność tiochalkonów w typowych cykloaddycjach z normalnymi wymaganiami elektronowymi, m.in. z akrylamidem **4**. Stwierdzono ponadto, iż z równie dobrą wydajnością zachodzą cykloaddycje z odwróconymi wymaganiami elektronowymi, np. z eterem *n*-butylo-wo-winylowym **6**. W reakcjach z alkenami nie zawierającymi grup aktywujących lub dezaktywujących, takimi jak styren **5**, uzyskano nieco niższe wydajności. Istotną cechą opisywanych reakcji jest ich regioselektywność. W każdym przypadku reakcji tiochalkonu z niesymetrycznym dienofilem wyizolowano tylko jeden regioizomer (Schemat 2).



Schemat 2

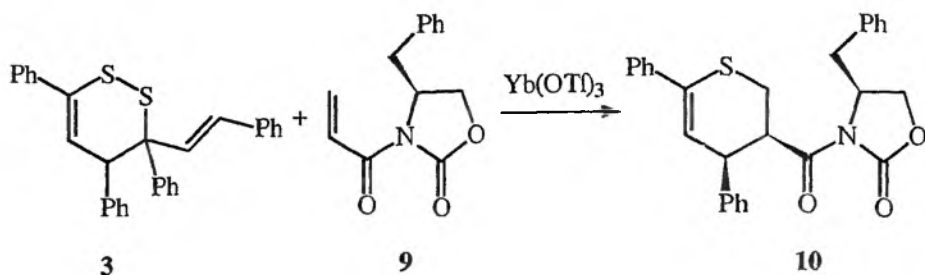
Generowanie tiochalkonu *in situ* poprzez ogrzewanie dimeru **3** zostało wykorzystane w syntezach określanych mianem asymetrycznych reakcji hetero-Dielsa-Aldera (AHDA) [9]. W reakcjach z (-)fumaraniem dimetylu jako heterodienofilem, zaobserwowano powstawanie tylko dwóch produktów *endo*, oznaczonych jako **7** i **8**, spośród czterech możliwych. *endo*-Selektywność zaobserwowano już wcześniej w reakcji z achiralnym dienofilem np. fumaraniem dietylu. Głównym celem przytoczonej pracy był dobór warunków reakcji umożliwiających uzyskanie dużego nadmiaru jednego z dwóch diastereoizomerów *endo* (diastereoselektywność facjalna). W przypadku cykloaddycji prowadzonej w chloroformie uzyskano 48% d.e. Rezultat poprawiono stosując $AlCl_3$ jako kwas Lewisa katalizujący reakcję. Uzyskano w tych warunkach 71% d.e. (Schemat 3).



Schemat 3

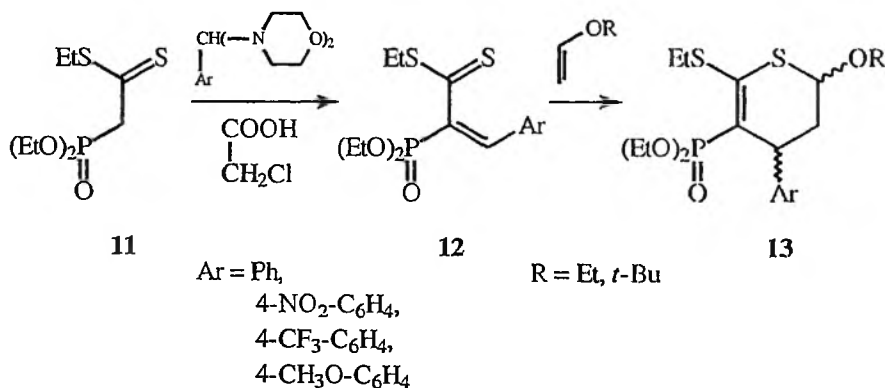
Znacznie lepsze wyniki osiągnięto przeprowadzając asymetryczną reakcję hetero-Dielsa-Aldera katalizowaną triflatem iterbu [10]. Katalizator ten jest twardym kwasem Lewisa. Dzięki możliwości koordynowania substratów, znajduje on zastosowanie w syntezie asymetrycznej. Jako dienofila w reakcji z dimerem tiochalkonu **3** użyto pochodnej kwasu akrylowego **9** połączonej z 2-oksazolidynonem służącym jako pomocnik chiralny. Stwierdzono, że dodatek triflatu iterbu, oprócz spadku *endo*-selektywności, powodował odwrócenie diastereoselektywności facjalnej. W mieszaninie izomerów *endo:egzo* = 52:48, zamiast izomeru (3*S*,4*S*)-*endo*, tworzącego się z 67% d.e. bez dodatku katalizatora, uzyskiwano prawie z ilościową wydajnością drugi izomer (3*R*,4*R*)-*endo* **10** (Schemat 4).

Bardzo podobną reakcję, pomiędzy substratem **3** a achiralnym *N*-akryloilookszazolidynonem prowadzono w obecności kompleksów kwasów Lewisa z chiralnymi katalizatorami, uzyskując wysokie wartości nadmiarów enancjomerycznych (do 98% e.e.) jednego z izomerów *endo* [11].



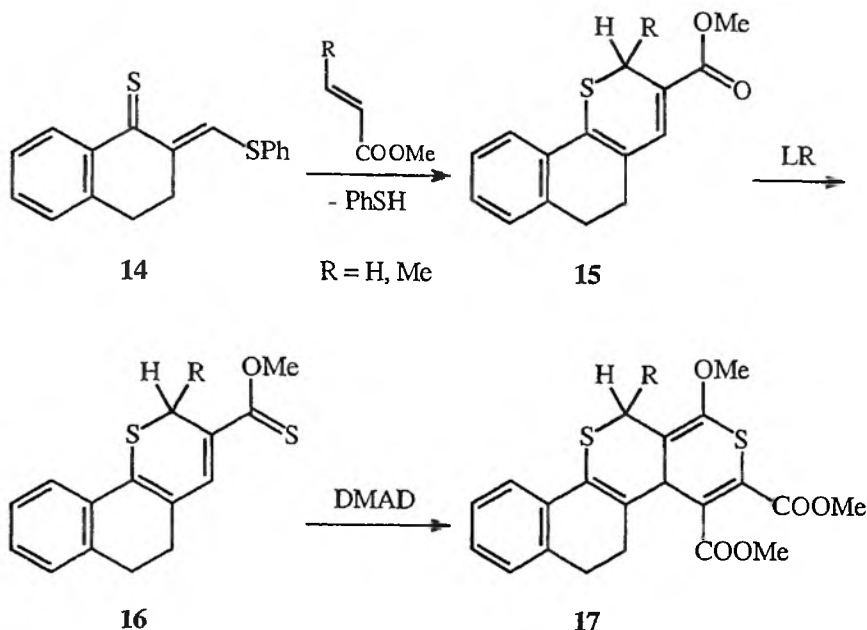
Schemat 4

Do heterodienów o zbliżonych właściwościach do tiochalkonów można zaliczyć α,β -nienasycone ditioestry. Związki **12**, dzięki obecności elektronoakceptorowej grupy fosfonianowej, można było uzyskać w reakcji kondensacji Knoevenagla pomiędzy substratem **11** a aminalem odpowiedniego aldehydu (Schemat 5). Heterodieny **12** ulegały cykloaddycji z odwróconymi wymaganiami elektronicznymi, do eterów winylowych z utworzeniem mieszanin produktów *cis* i *trans* **13** [12]. W większości reakcji termicznych uzyskano nadmiar diastereoizomerów *cis*. W przypadku niektórych syntez obniżenie temperatury oraz wzrost ciśnienia spowodował odwrócenie diastereoselektywności.



Schemat 5

W reakcjach z udziałem heterodieny **14**, otrzymano produkty **15**, które powstały w wyniku cykloaddycji, a następnie eliminacji tiofenolu (Schemat 6). Tionowanie grup karbonylowych w **15** doprowadziło do utworzenia nowych układów heterodienowych **16**, które ulegały reakcji tylko z bardzo aktywnymi dienofilami, tworząc cykloaddukty np. z estrem dimetylowym kwasu acetylenodikarboksylowego (DMAD) [13].



Schemat 6

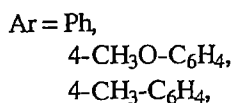
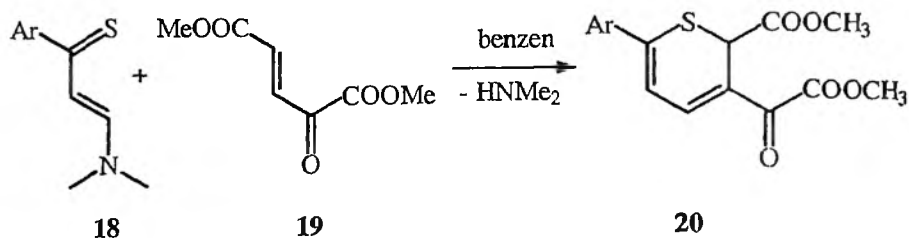
2. ZASTOSOWANIE ENAMINOTIONÓW W REAKCJACH HETERO-DIELSA-ALDERA

Enaminotiony stanowią odrębną klasę związków zawierających układ 1-tia-1,3-butadienu, odmienną od tiochalkonów. Ze względu na znaczną reaktywność, są one szeroko wykorzystywane w preparatyce organicznej, na przykład jako substraty w syntezie izotiazoli [14, 15]. Metody otrzymywania tych połączeń najczęściej polegają na przemianic grup karbonylowych w odpowiednich enaminonach na grupy tiokarbonylowe przy pomocy odczynnika Lawessona (LR). W porównaniu do wcześniej stosowanego pięciosaarczku fosforu reagent ten posiada wiele zalet [16]. Stwierdzono, iż reakcje enaminonów z LR prowadzące do enaminotionów zachodzą często już w temperaturze pokojowej, z dobrą wydajnością [17].

Jednym z prekursorów zastosowania enaminotionów jako heterodienów w reakcjach cykloaddycji był Lawesson [17, 18]. Przeprowadził on serię reakcji enaminotionów zawierających w pozycji β fragment piroldynowy z DMAD. Uzyskane cykloaddukty posiadały strukturę 4*H*-tiopyranu.

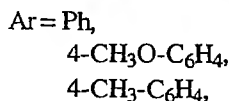
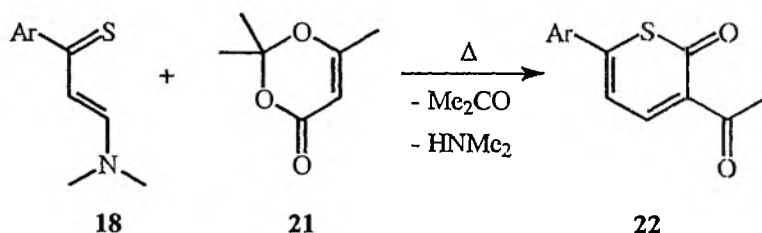
Enaminotiony **18**, podstawione grupą *N,N*-dimetyloaminową łatwo reagowały z dienofilem **19** o bardzo silnych właściwościach elektronoakceptorowych. W wyniku spontanicznej eliminacji dimetyloaminy z powstających cykloadduktów tworzyły się związki **20** o strukturze 2*H*-tiopyranu. Proces ten zachodził nawet w temperaturze obniżonej do -25°C . Łatwość eliminacji aminy autorzy wytłumaczyli na

podstawie rozważań konformacji tworzących się cykloadduktów [19]. Produkty **20** powstawały regioselektywnie, przy czym pochodzące od dienofila podstawniki o silniejszych właściwościach elektronoakceptorowych były usytuowane w położeniu 3 układu *2H*-tiopiranu (Schemat 7).



Schemat 7

Regioselektywnością odznaczały się także reakcje enaminotiońców **18** z acetyloketenem [20]. Produkty **22** posiadały trudną do uzyskania innymi metodami strukturę 3-acetylo-*2H*-tiopiran-2-onu (Schemat 8). Acetyloketen był generowany *in situ* w wyniku ogrzewania związku **21** będącego adduktem diketenu i acetonu.

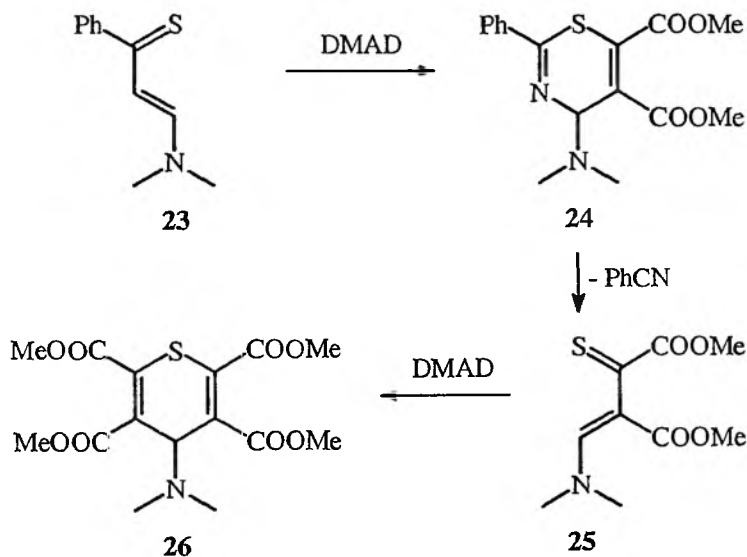


Schemat 8

Studując reakcje hetero-Dielsa-Aldera z udziałem enaminotiońców starano się tak dobierać warunki, aby reakcjom z klasycznymi dienofilami nie towarzyszyła eliminacja aminy. Badacze francuscy [21, 22] w reakcji enaminotiońcu **18** z akrylanem metylu w temperaturze -30°C uzyskali mieszaninę cykloadduktów *endo:egzo* o składzie 91:9. Wraz ze wzrostem temperatury reakcji, wzrastała zawartość izomeru *egzo*. Niestety, wzrastała także ilość produktu ubocznego powstającego na sku-

tek samorzutnej eliminacji dimetyloaminy. Porównywalne, choć nieco lepsze rezultaty uzyskano stosując jako dienofil *N*-akryloilo-oksazolidyn-2-on. W obniżonej temperaturze wynik był podobny, natomiast już w temperaturze 18°C stosunek *endo:egzo* wyniósł 28:72 po 10 minutach. Zawartość trwalszego termodynamicznie diastereoizomeru zwiększała się w miarę upływu czasu, co umożliwiło wyizolowanie tego związku w postaci czystej.

Większość uzyskiwanych 2*H*-tiopiranów zawierała w pozycjach 5 i 6 podstawniki alkilowe lub aryłowe, co wynikało z budowy heterodienów. Tymczasem wykazano, że enaminotiony posiadające dwie grupy elektronoakceptorowe mogą także służyć jako reaktywne heterodieny [23]. Związkiem wyjściowym dla opisywanego ciągu syntetycznego był heterodien **23** o strukturze 1-tia-3-azabutadienu. Chemia tego rodzaju połączeń wykazuje wiele analogii do chemii 1-tia-1,3-butadienów. W reakcji heterodienu **23** z DMAD powstawał układ 4*H*-1,3-tiazyny **24** (Schemat 9). Termiczny rozkład cykloadduktu **24**, polegający na eliminacji benzonitrylu, prowadził do enaminotyonu **25** z dwoma ugrupowaniami estrowymi. Związek ten, poddany ponownie reakcji z DMAD, tworzył symetryczny cykloaddukt **26** o budowie 4*H*-tiopiranu, podstawiony czterema grupami metoksykarbonyłowymi. Autorzy zaprojektowali ponadto modyfikację polegającą na przeprowadzaniu opisywanej serii eksperymentów jako reakcji *one-pot*. Wymagało to zastosowania nadmiaru DMAD oraz regulacji temperatury w starannie dobranym zakresie.



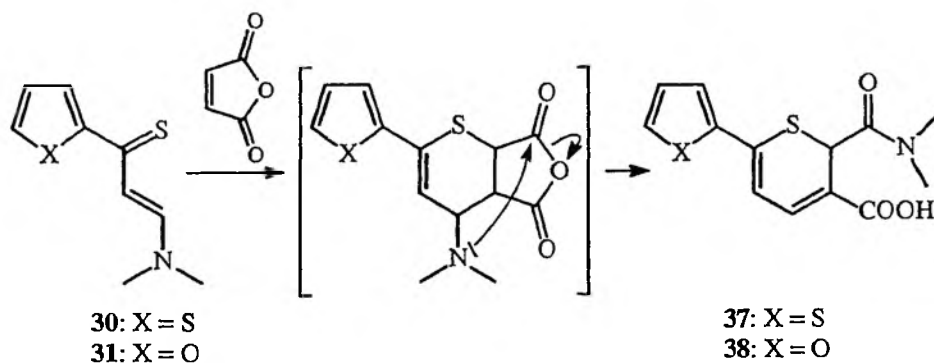
Schemat 9

Badania nad zastosowaniem ω -nitrostyrenów jako dienofili w reakcjach z enaminotyonami zakończyły się powodzeniem [24]. Jako substraty zastosowano 1-tia-butadieny **27**, podstawione w położeniu 4 pochodnymi pierwszorzędowych amin

31, z grupą 2-furylową, przebiegały już w temperaturze pokojowej. Wyizolowane, trwalsze termodynamicznie diastereoizomery **33** i **34** w roztworach rozpuszczalników polarnych ulegały *retro*-cykloaddycji. Ponadto, pod wpływem kwasu octowego ulegały eliminacji dimetyloaminy, tworząc pochodne 3-nitro-2*H*-tiopirano **35** i **36** (Schemat 11). Oprócz opisanej diastereoselektywności, dotyczącej wszystkich reakcji z udziałem ω -nitrostyrenów, na uwagę zasługuje także całkowita regioselektywność.

W reakcjach enaminotionów **30** i **31** z kwasem maleinowym oraz fumarowym tworzyły się trwałe cykloaddukty, nie ulegające eliminacji aminy nawet pod wpływem kwasu octowego. W przypadku reakcji z kwasem maleinowym uzyskano znaczny nadmiar diastereoizomeru *endo* (d.e = 80–83%).

W cykloaddycjach enaminotionów **30** i **31** z bezwodnikiem maleinowym zaobserwowano powstawanie produktów **37** i **38** zawierających ugrupowanie (dimetyloamino)karbonylowe w pozycji 2 pierścienia tiopiranowego. Budowa regioizomerów **37** i **38** została potwierdzona za pomocą analizy rengenostukturalnej [27]. Jako wyjaśnienie obserwowanej regioselektywności zaproponowano mechanizm reakcji polegający na cykloaddycji oraz wewnątrzcząsteczkowym przegrupowaniu (Schemat 12).

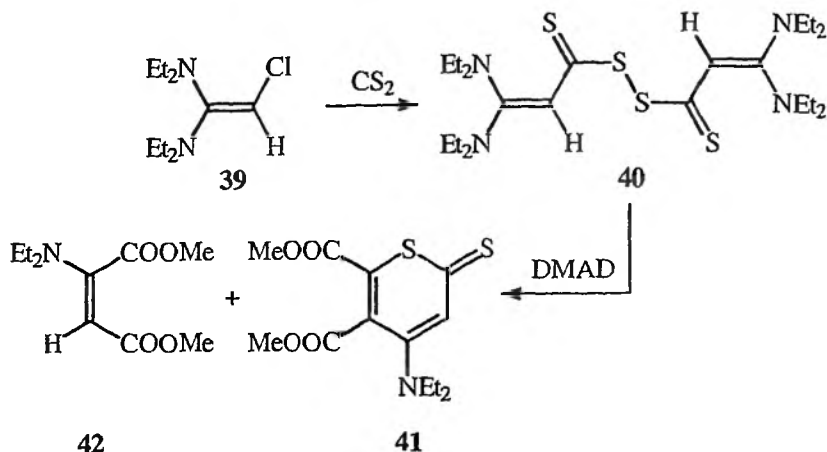


Schemat 12

Powyższe rezultaty są zgodne z wcześniejszymi badaniami nad cykloaddycjami z udziałem bezwodnika maleinowego oraz α,β -nienasyconych tionów z niepodstawioną lub monopodstawioną grupą aminową [28] w których uzyskiwano bicykliczne produkty.

Nietypowy układ heterodienowy uzyskano w reakcji alkenu **39** z disiarczkiem węgla. Otrzymany disiarczek tioacylowy **40**, poddano następnie reakcji z nadmiarem DMAD, otrzymując mieszaninę 2*H*-tiopirano-2-tionu **41** wraz z produktem ubocznym **42** [29] (Schemat 13). W celu wyjaśnienia powstawania powyższych związków zaproponowano mechanizm, uwzględniający cykloaddycję dwóch cząsteczek DMAD do substratu **40** oraz rozpad cykloadduktu z utworzeniem rodników

sulfanylowych, które następnie dysocjują do produktu 41 z odszczepieniem rodnika dimetyloaminowego. Rodnik ten ulega dalszym przemianom uwzględniającym reakcję z nadmiarem DMAD oraz oderwanie atomu wodoru od rozpuszczalnika.

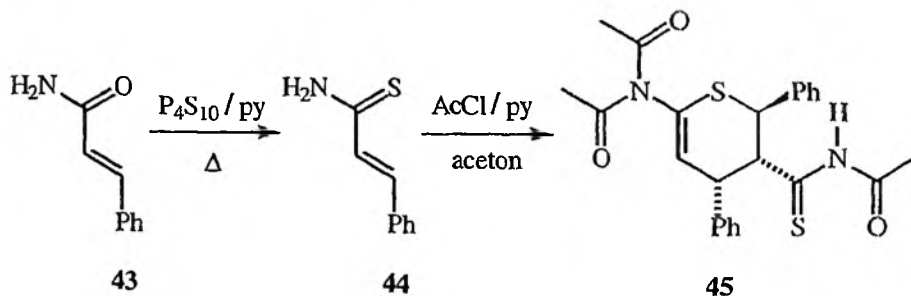


Schemat 13

Dostępna literatura zawiera liczne przykłady reakcji enaminotionów z dicnofilami zawierającymi podstawniki elektroakceptorowe. Dotychczas nie zostały natomiast opisane udane próby cykloaddycji z odwróconymi wymaganiami elektronicznymi z udziałem tych heterodienów.

3. SYNTEZA I REAKTYWNOŚĆ α,β -NIENASYCONYCH TIOAMIDÓW

Kolejną grupą związków zawierających układ 1-tia-1,3-butadienu są α,β -nienasycone tioamidy. Większość powszechnie stosowanych metod otrzymywania tych połączeń polega na tionowaniu odpowiednich amidów za pomocą odczynnika Lawessona [30].

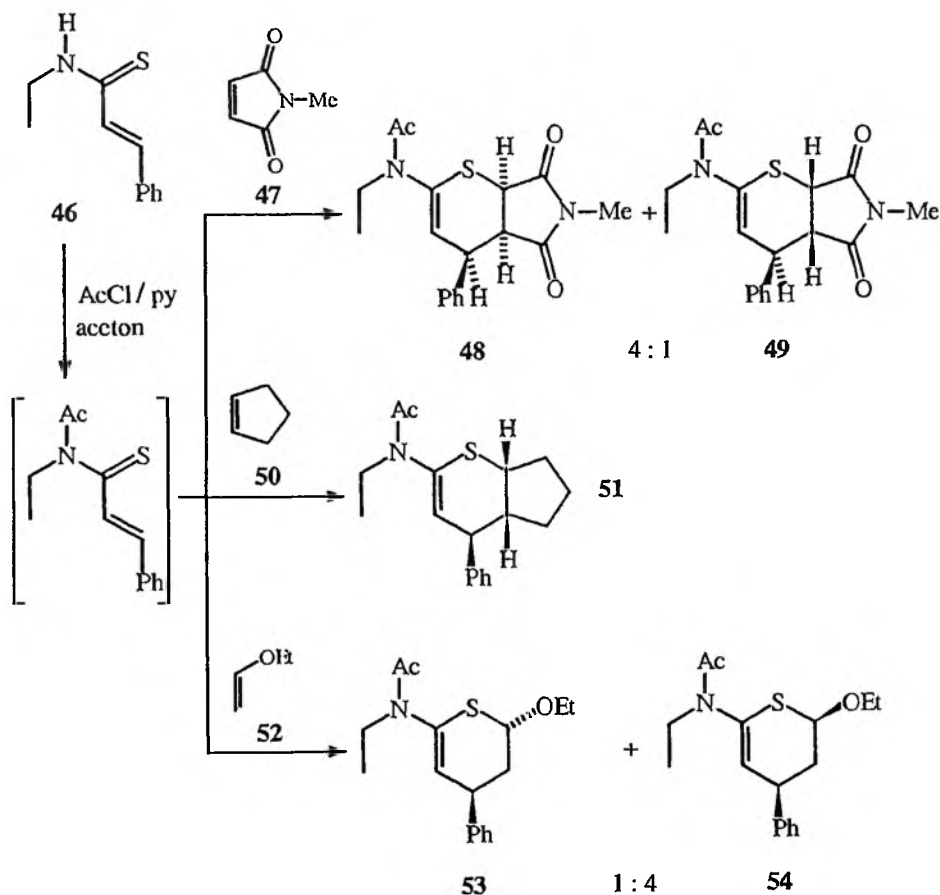


Schemat 14

Fishwick i współ. [31, 32] otrzymali amid kwasu tiocynamonowego **44** w wyniku bezpośredniego działania pięciosiarczkiem fosforu na amid **43**. Autorzy stwierdzili, że tioamid **44** jest nieaktywnym heterodienem. Dopiero po wprowadzeniu nadmiaru chlorku acetylmu do środowiska reakcji następowała cyklodaddycja, w wyniku której utworzył się tylko jeden produkt o strukturze **45** (Schemat 14).

Uzyskany analogiczną metodą *N*-etyloamid kwasu tiocynamonowego **46** pod wpływem chlorku acetylmu także tworzył produkt o strukturze 3,4-dihydro-2*H*-tiopiranu [31]. Acetylowaniu ulegała wyłącznie grupa aminowa w położeniu 6 pierścienia tiopiranowego. Na podstawie zaawansowanych technik NMR ustalono, że badane produkty są diastereoizomerami *endo*. Powyższe przykłady wskazują, że oprócz tiochalkonów, także α,β -nienasycone tioamidy ulegają dimeryzacji, służąc zarówno jako heterodieny, jak i dienofile.

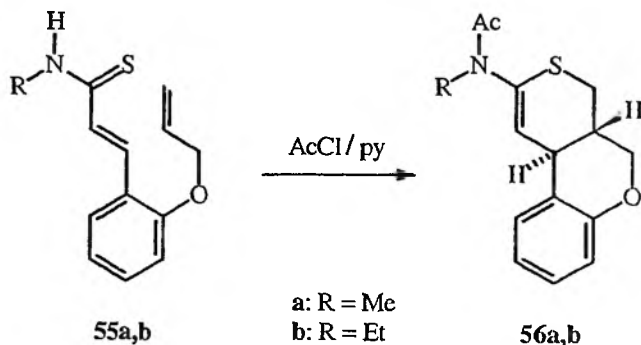
Wykorzystanie procedury polegającej na acyloowaniu α,β -nienasyconych tioamidów umożliwiło autorom syntezę kolejnych połączeń [33].



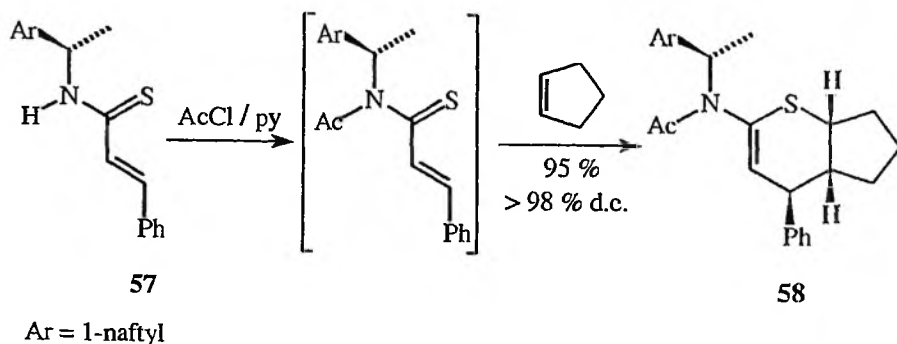
Schemat 15

W cykloaddycjach z udziałem innych dienofili zawierających podstawniki elektronoakceptorowe, np. z *N*-metylomaleimidem **47** uzyskiwano w przewadze produkt *endo* **48**. Jednak już w reakcji z cyklopentcnem **50** tworzył się wyłącznie produkt *egzo* **51**. W cykloaddycji z odwróconymi wymaganiami elektronowymi, z udziałem eteru etylowo-winylowego **52** uzyskano związki **53** i **54** z niską wydajnością (Schemat 15). Produkty te tworzyły się regioselektywnie, z grupą ctoksylową w pozycji 2 pierścienia tiopiranowego. Powstawał ponadto czterokrotny nadmiar diastereoizomeru **54**.

Wykorzystując możliwość zachodzenia reakcji pomiędzy acylowanymi tioamidami a eterami winyłowymi, zaprojektowano substraty **55a,b**, które pod wpływem chlorku acetylu ulegały wewnątrzcząsteczkowej cykloaddycji (Schemat 16). Użytkano w ten sposób produkty **56a,b**, zawierające dwa pierścienie heterocykliczne usytuowane *trans* względem siebie [34].



Schemat 16



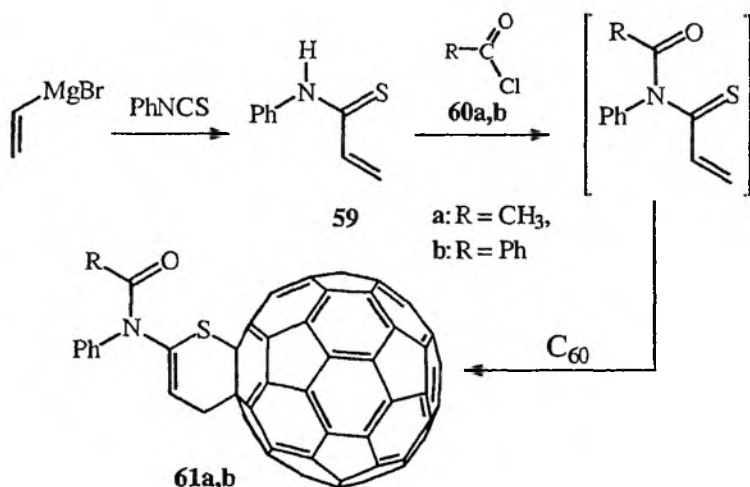
Schemat 17

Badano także wpływ pomocników chiralnych na diastereoselektywność cykloaddycji acylowanych tioamidów z *N*-fenylomaleimidem oraz cyklopentcnem [35].

Przykładowo, w reakcji substratu **57**, podstawionego odpowiednio dobraną chiralną aminą i cyklopentenenem jako dienofilem otrzymano tylko jeden produkt **58** spośród czterech możliwych, z nadmiarem diastereoizomerycznym d.e. > 98% (Schemat 17).

Przeprowadzono ponadto próby cykloaddycji z udziałem tioamidów acylowanych chiralnymi chlorkami kwasowymi [35]. W reakcjach tych uzyskano jednak niewielkie wartości nadmiaru diastereoizomerycznego.

Zespół badaczy japońskich opracował metodę funkcjonalizacji [5,6]fullerenu- C_{60} wykorzystującą cykloaddycję heterodienową z udziałem substratu **59**, o budowie 1-tiabutadienu, pozbawionego zawady sterycznej [36]. Pod wpływem acylowania chlorkiem acetylu lub benzoilu **60a,b** układ ten stawał się na tyle aktywny, iż mógł reagować z fullerenem (Schemat 18). Powstające produkty **61a,b**, jak twierdzili autorzy, były pierwszymi połączeniami, w których atom siarki wiązał się bezpośrednio z powierzchnią C_{60} .



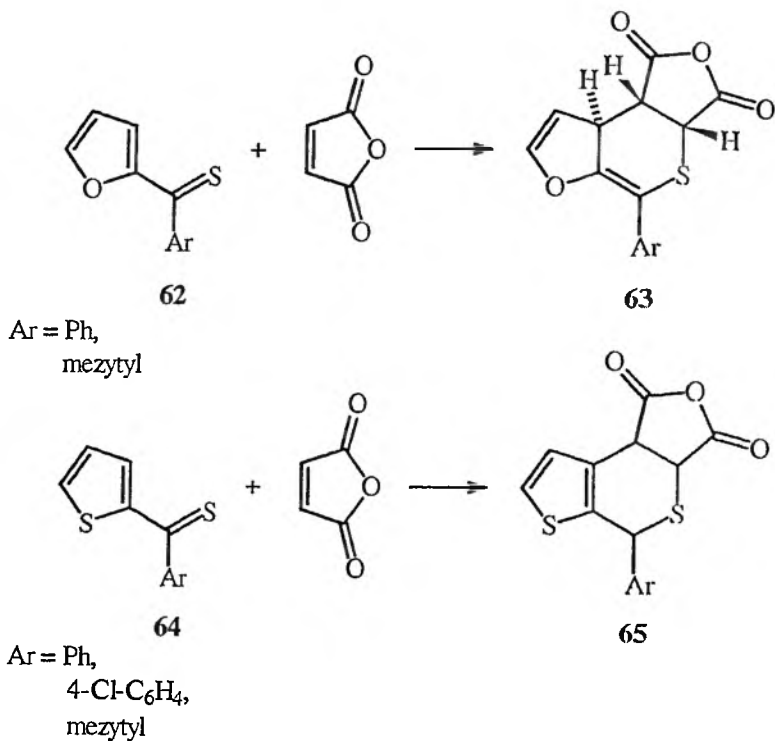
Schemat 18

4. REAKTYWNOŚĆ ZWIĄZKÓW TIOKARBONYLOWYCH SPRZĘŻONYCH Z UKŁADAMI AROMATYCZNYMI

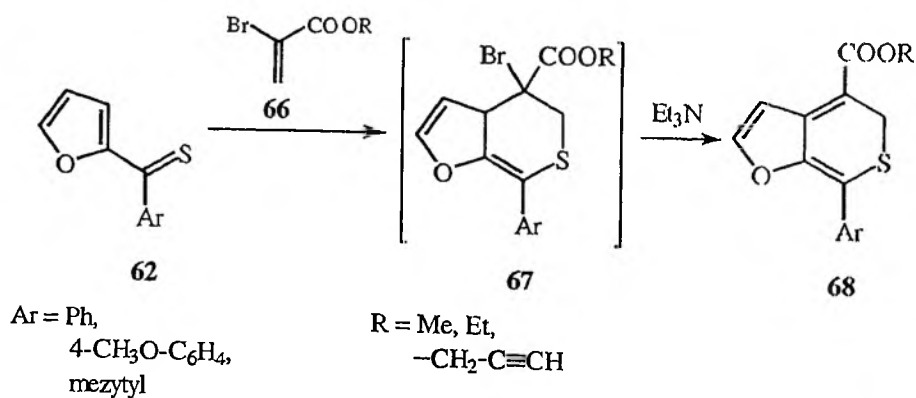
Odrębną grupę związków, która znalazła zastosowanie jako heterodieny w reakcjach hetero-Dielsa-Aldera, stanowiły połączenia z grupami tiokarbonyłowymi sprzężonymi z karbocyklicznymi lub heterocyklicznymi układami aromatycznymi.

Substraty o strukturze niesymetrycznych tionów **62** i **64** otrzymano w reakcji odpowiednich ketonów z odczynnikiem Lawessona [37]. Związki **62** ulegały cykloaddycji z bezwodnikiem maleinowym tworząc stereoizomery *egzo* **63** (Schemat 19). Analogiczna reakcja z udziałem heterodienów **64** zawierających grupę 2-tienylową

prowadziła z niewielką wydajnością do cykloadduktów, które ulegały izomeryzacji do produktów **65** z odtworzonym aromatycznym układem tiofenu.



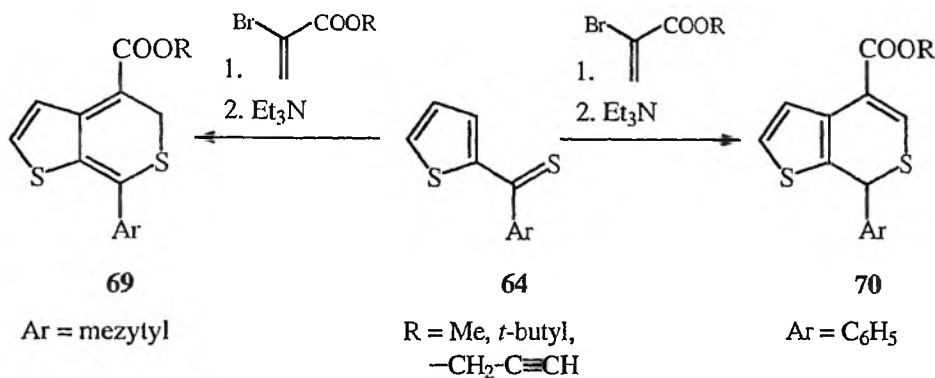
Schemat 19



Schemat 20

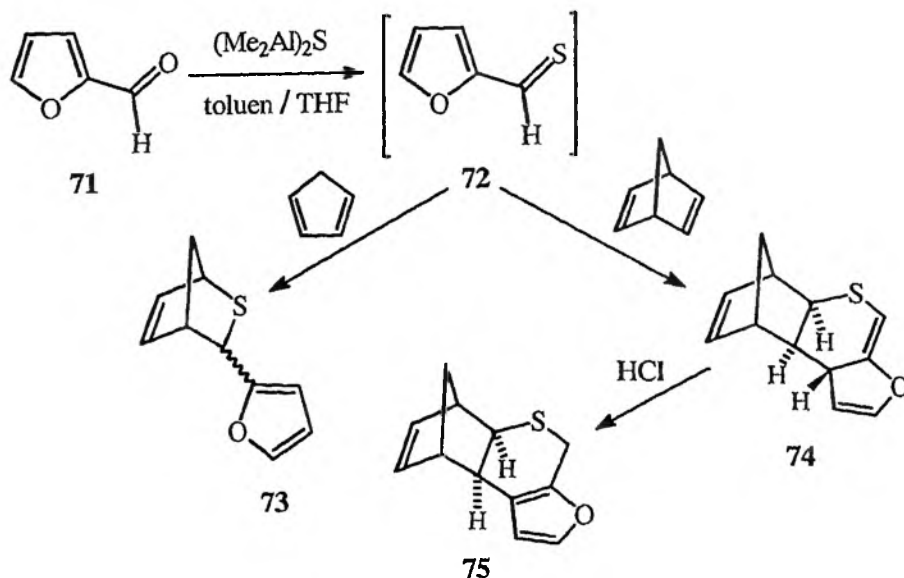
Heterodieny **62** zawierające grupy 2-furylowe oraz 2-tienylowe poddano również reakcjom z estrami kwasu α -bromoakrylowego **66** w obecności trietyloaminy ułatwiającej eliminację bromowodoru z nietrwałych cykloadduktów **67** [38]. Otrzymane związki **68** zawierały układy *ortho*-chinoidowe, które znane są ze znacznej reaktywności (Schemat 20). W niektórych przypadkach produkty **68** ulegały samorzutnej izomeryzacji z odtworzeniem układu furanowego.

Tendencja do odtworzenia układu aromatycznego zaznaczała się jeszcze silniej w przypadku pochodnych tiofenu **64**. Większość utworzonych cykloadduktów pod wpływem trietyloaminy, ulegała eliminacji bromowodoru oraz izomeryzacji polegającej na przesunięciu protonu tworząc produkty **70**. Tylko w przypadku tionu zawierającego podstawnik meczytylowy wyizolowano niezmienny produkt **69** (Schemat 21).



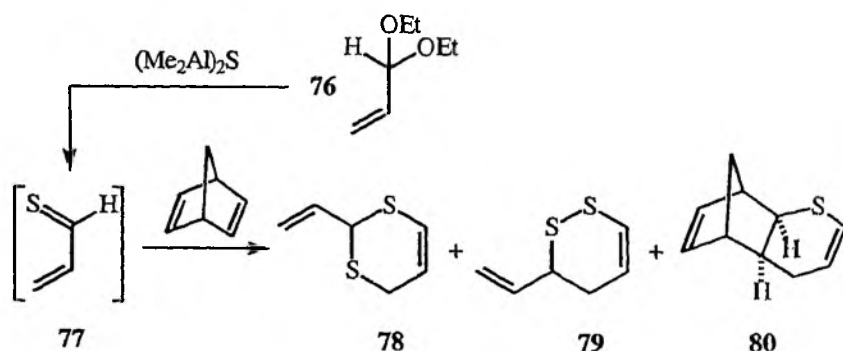
Schemat 21

Wykorzystanie reagentów metaloorganicznych w reakcjach tionowania otworzyło nowe możliwości syntezy α,β -nienasyconych związków tiokarbonylowych. Dzięki zastosowaniu siarczku bis(dimetyloglinu) dostępna stała się synteza układów nicosiągalnych innymi drogami [39]. Przykładowo, aldehyd cynamonowy poddany działaniu tego odczynnika ulegał przemianom do pochodnej tiokarbonylowej, która ulegała dimeryzacji z utworzeniem produktu o strukturze 1,2-ditianu. W reakcji tionowania furfuralu **71** w analogicznych warunkach nie następowała dimeryzacja, jednak tioaldehydu furylowego **72** także nie udało się wyizolować. Stwierdzono, że tioaldehyd **72**, powstający jako produkt pośredni, może reagować zarówno jako heterodien, jak i heterodienofil. Gencrowanie tioaldehydu **72** *in situ* w obecności cyklopentadienu prowadziło do cykloadduktu **73**. W reakcji z norbornadieniem tioaldehyd **72** reagował jako heterodienofil tworząc cykloaddukt **74**, zawierający częściowo uwodorniony układ furanu skondensowany z pierścieniem tiopiranowym (Schemat 22). Związek **74**, pod wpływem kwasu łatwo ulegał izomeryzacji do produktu **75** z odtworzonym układem heteroaromatycznym. W analogiczny sposób uzyskano pochodne aldehydu 2-tienylowego.



Schemat 22

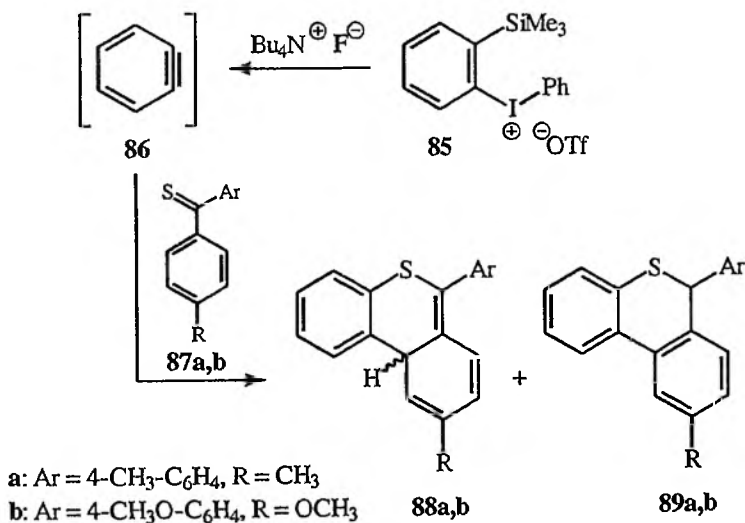
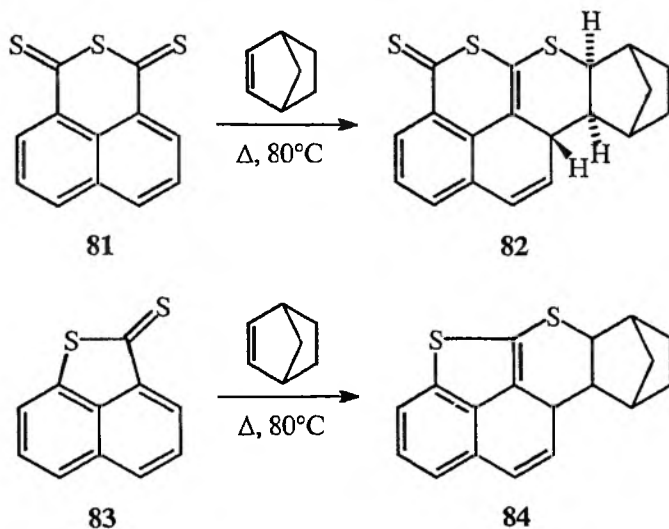
Odczynnik metaloorganiczny umożliwił ponadto uzyskanie z acetalu akroleiny 76 tioakroleiny 77, która spontanicznie ulegała dimeryzacji prowadzącej do mieszaniny regioizomerów 78 i 79. Podczas prób reakcji z norbornadienem otrzymano jedynie niewielką ilość oczekiwanego cykloadduktu 80, ponieważ głównymi składnikami mieszaniny poreakcyjnej okazały się dimery tioakroleiny 78 i 79 (Schemat 23).



Schemat 23

Znane są także nieliczne przykłady wykorzystania jako heterodienów związków tiokarbonylowych sprzężonych z karbocyklicznymi układami aromatycznymi [40]. Przykładowo związek 81 w reakcji z norbornenem tworzył trwały cykloaddukt 82 z dobrą wydajnością. Na podstawie badań krystalograficznych ustalono, iż

produkt **82** jest diastereoizomerem *egzo*. Podobnej reakcji ulegał ditiolakton **83** (Schemat 24), jednak powstający cykloaddukt **84** w wyższej temperaturze ulegał izomerizacji z odtworzeniem układu naftalenu.



Stwierdzono, że pochodne tiobenzofenonu ulegają również reakcji hetero-Dielsa-Aldera [41]. Reaktywnym dienofilem użytym w tych cykloaddycjach był ben-

zyn **86**, generowany *in situ* z substratu **85** pod wpływem fluorku tetrabutylamoniowego. Benzyn reagował z heterodienami **87a,b** już w temperaturze 0°C, tworząc niewielkie ilości cykloadduktów **88a,b**. Głównymi produktami były izomeryczne związki **89a,b** o strukturze dibenzo-2*H*-tiopiranu. W wyższych temperaturach uzyskiwano wyłącznie produkty izomeryzacji **89a,b** (Schemat 25).

Stwierdzono, że pochodne tiobenzofenonu nie zawierające podstawników aktywujących nie ulegały cykloaddycji. Reakcji tych nie udało się także powtórzyć przy wykorzystaniu innych dostępnych prekursorów benzynu.

PODSUMOWANIE

Przedstawiony przegląd literaturowy wskazuje, iż najbardziej efektywną metodą konstrukcji pierścienia tiopiranowego jest cykloaddycja heterodienowa z udziałem 1-tia-1,3-butadienów. Zaletą tej metody jest możliwość uzyskania w jednym etapie reakcji związków zawierających podstawniki o przeciwnych właściwościach elektronowych. Reakcje z udziałem niesymetrycznych dienofili cechują się bardzo wysoką regioselektywnością. Wysoka diastereoselektywność cykloaddycji umożliwia ich zastosowanie w syntezie asymetrycznej. Związki o strukturze tiopiranu stanowią ponadto cenne substraty w syntezie wielopodstawionych pochodnych tiofenu, cyklopentenu oraz układów policyklicznych.

PIŚMIENICTWO CYTOWANE

- [1] W. Oppolzer, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1984, **23**, 867.
- [2] H. Waldmann, *Synthesis*, 1994, 535.
- [3] a) G. Desimoni, G. Tacconi, *Chem. Rev.*, 1975, **75**, 651.
b) K. Bogdanowicz-Szwed, A. Pałasz, *Wiad. Chem.*, 1996, **50**, 213.
- [4] a) D.L. Boger, *Chem. Rev.*, 1986, **86**, 781.
b) K. Bogdanowicz-Szwed, M. Krasodomska, *Wiad. Chem.*, 1998, **52**, 821.
- [5] S. Ohuchida, N. Hamanaka, M. Hayashi, *J. Am. Chem. Soc.*, 1981, **103**, 4597.
- [6] K.R. Lawson, B.P. McDonald, O.S. Mills, R.W. Steele, J.K. Sutherland, T.J. Wear, A. Brewster, P.R. Marsham, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 1988, 663.
- [7] S. Motoki, T. Saito, T. Karakasa, T. Matsushita, T. Furuno, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 1992, 2943.
- [8] T. Karakasa, S. Motoki, *J. Org. Chem.*, 1979, **44**, 4151.
- [9] S. Motoki, T. Saito, T. Karakasa, H. Kato, T. Matsushita, S. Hayashibe, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 1991, 2281.
- [10] T. Saito, M. Kawamura, J. Nishimura, *Tetrahedron Lett.*, 1997, **38**, 3231.
- [11] T. Saito, K. Takekawa, T. Takahashi, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1999, 1001.
- [12] H. Al-Badri, N. Collignon, J. Maddaluno, S. Masson, *Tetrahedron*, 2000, **56**, 3909.
- [13] S. Moriyama, T. Mochizuki, Y. Ohshima, T. Saito, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1994, **67**, 2876.
- [14] P. Sykes, H. Ullah, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 1972, 2305.
- [15] J. Liebscher, H. Hartmann, *Z. Chem.*, 1974, **14**, 189.

- [16] M. Cava, M.I. Levinson, *Tetrahedron*, 1985, **41**, 5061.
- [17] J.B. Rasmussen, R. Shabana, S.-O. Lawesson, *Tetrahedron*, 1981, **37**, 3693.
- [18] J.B. Rasmussen, R. Shabana, S.-O. Lawesson, *Tetrahedron*, 1982, **38**, 1705.
- [19] T. Blitzke, D. Greif, Rh. Kempe, M. Pink, M. Pulst, D. Sicker, H. Wilde, *J. Prakt. Chem.*, 1994, **336**, 163.
- [20] D. Greif, M. Pulst, A. Feindt, *J. Prakt. Chem.*, 1998, **340**, 578.
- [21] J.P. Pradere, T. N'Guessan, H. Quiniou, F. Tonnard, *Tetrahedron*, 1975, **31**, 3059.
- [22] A. Marchand, J.P. Pradere, A. Guingant, *Tetrahedron Lett.*, 1997, **38**, 1033.
- [23] D. Rondeau, E. Raoult, A. Tallec, S. Sinbandhit, L. Toupet, A. Imberty, J.P. Pradere, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 1996, 2623.
- [24] P.D. Baruah, S. Mukherjee, M.P. Mahajan, *Tetrahedron*, 1990, **46**, 1951.
- [25] K. Bogdanowicz-Szwed, A. Budzowski, *Monatsh. Chem.*, 2001, **132**, 947.
- [26] K. Bogdanowicz-Szwed, A. Budzowski, *Z. Naturforsch.*, 2002, **57 b**, 637.
- [27] M. Chruszcz, K. Stadnicka, A. Budzowski, K. Bogdanowicz-Szwed, *J. Mol. Struct.*, 2002, **609**, 169.
- [28] G. Adiwidjaja, T. Proll, W. Walter, *Tetrahedron Lett.*, 1981, **22**, 3175.
- [29] K. Akimoto, K. Masaki, J. Nakayama, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1996, **69**, 2091.
- [30] S. Scheibye, B.S. Pedersen, S.-O. Lawesson, *Bull. Soc. Chim. Belg.*, 1978, **87**, 229.
- [31] I.T. Barnish, C.W.G. Fishwick, D.R. Hill, C. Szantay Jr., *Tetrahedron*, 1989, **45**, 6771.
- [32] C. Szantay Jr., I. Moldvai, C.W.G. Fishwick, D.R. Hill, *Tetrahedron Lett.*, 1991, **32**, 2529.
- [33] I.T. Barnish, C.W.G. Fishwick, D.R. Hill, C. Szantay Jr., *Tetrahedron*, 1989, **45**, 7879.
- [34] I.T. Barnish, C.W.G. Fishwick, D.R. Hill, *Tetrahedron Lett.*, 1991, **32**, 405.
- [35] A.S. Bell, C.W.G. Fishwick, J.E. Reed, *Tetrahedron*, 1998, **54**, 3219.
- [36] M. Ohno, S. Kojima, S. Eguchi, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1995, 565.
- [37] H. Ohmura, S. Motoki, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1984, **57**, 1131.
- [38] T. Saito, T. Shizuta, H. Kikuchi, J. Nakagawa, K. Hirotsu, H. Ohmura, S. Motoki, *Synthesis*, 1994, 727.
- [39] G.M. Li, S. Niu, M. Segi, K. Tanaka, T. Nakajima, R.A. Zingaro, J.H. Reibenspies, M.B. Hall, *J. Org. Chem.*, 2000, **65**, 6601.
- [40] M.V. Lakshmikantham, W. Chen, M.P. Cava, *J. Org. Chem.*, 1989, **54**, 4746.
- [41] K. Okuma, T. Yamamoto, T. Shirokawa, T. Kitamura, Y. Fujiwara, *Tetrahedron Lett.*, 1996, **37**, 8883.

Praca wpłynęła do Redakcji 3 stycznia 2003

NEUROTOKSYCZNOŚĆ AMYLOIDALNEGO β-PEPTYDU ALZHEIMERA, ROLA MET³⁵ I MIEDZI KOMPLEKSOWANEJ PRZEZ PEPTYD[#]

NEUROTOXICITY OF THE ALZHEIMER AMYLOID
β-PEPTIDE, FUNCTION OF MET³⁵ AND COPPER
COMPLEXED BY THE PEPTIDE

Dariusz Pogocki¹, Katarzyna Serdiuk²

¹ Instytut Chemii i Techniki Jądrowej,

ul. Dorodna 16, 03-195 Warszawa, e-mail: pogo@orange.ichtj.waw.pl

² Instytut Chemii i Ochrony Środowiska, Wyższa Szkoła Pedagogiczna,

ul. Armii Krajowej 13/15, 42-200 Częstochowa, e-mail: k.serdiuk@wsp.czyst.pl

Abstract

Wykaz skrótów

Wprowadzenie

1. Choroba Alzheimera, udział peptydu β-amyloidowego w procesach neurodegeneracyjnych.
2. Sekwencje i konformacje fragmentów βAP obecne w patogenezie choroby Alzheimera
3. Postulowane przyczyny neurotoksyczności βAP
4. Hipoteza wolnorodnikowego mechanizmu toksyczności βAP. Korelacja pomiędzy obecnością metioniny w cząsteczce peptydu i kompleksowaniem miedzi a neurotoksycznością.

Podsumowanie

[#] Część materiału przedstawionego w pracy była prezentowana podczas konferencji *Nowe metody w spektroskopii molekularnej*. Szkoła Fizykochemii Organicznej organizowanej przez Wydział Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego oraz Sekcję Fizykochemii Organicznej Polskiego Towarzystwa Chemicznego, Karpacz 10–15 czerwca 2002.



Dr inż. Dariusz Pogocki ukończył Wydział Chemiczny Politechniki Łódzkiej. W 1996 r. uzyskał tytuł doktora nauk chemicznych w Instytucie Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie. W latach 1998–2001 przebywał na stażu na Wydziale Chemii Farmaceutycznej Uniwersytetu w Kansas (USA). Główne zainteresowania naukowe to procesy rodnikowe w układach o znaczeniu biologicznym oraz wykorzystanie metod spektroskopowych i modelowania molekularnego w ich badaniu.



Mgr Katarzyna Serdiuk ukończyła studia chemiczne na wydziale Matematyczno-Przyrodniczym Wyższej Szkoły Pedagogicznej w Częstochowie. W latach 1992–1993 pracowała w Instytucie Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie. Od roku 1993 jest pracownikiem naukowo-dydaktycznym Instytutu Chemii i Ochrony Środowiska Wyższej Szkoły Pedagogicznej w Częstochowie. Główne zainteresowania to chemia związków koordynacyjnych metali przejściowych z ligandami naturalnymi (aminokwasy, peptydy) oraz ich zastosowanie jako modeli układów biologicznych.

ABSTRACT

This short review gives an overview over the oxidation mechanism of methionine (Met) relevant for processes which may lead to the oxidation of amyloid β -peptide (β AP) involved in the pathogenesis of the Alzheimer disease. The β AP-structure dependent Cu^{II}-catalyzed oxidation of C-terminal Met³⁵ seems to be the key to the known propensities of this peptide to form reactive oxygen species and free radicals.

WYKAZ SKRÓTÓW

AD	– <i>Alzheimer's disease</i> , choroba Alzheimera (chA)
APP	– <i>amyloid precursor protein</i> , białko prekursor amyloidu
β AP	– <i>beta amyloid peptide</i> , amyloidalny beta peptyd
CD	– <i>circular dichroizm</i> , dichroizm kołowy
CJD	– <i>Creutzfeldt-Jakob disease</i> , choroba Jakoba-Creutzfeldta (CJC)
2D-NMR	– <i>two dimensional nuclear magnetic resonance</i> , dwuwymiarowy magnetyczny rezonans jądrowy
EPR	– <i>electron paramagnetic resonance</i> - ESR <i>electron spin resonance</i> , elektronowy rezonans paramagnetyczny (ERP)
ESI-TOF MS	– <i>electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry</i> , spektrometria masowa oparta na pomiarze czasu przelotu jonów (TOF MS) z elektro-rozpylaniem (ESI) jako metodą jonizacji
FALS	– <i>familial amyotrophic lateral sclerosis</i> , rodzinne stwardnienie boczne zanikowe
FDMR	– <i>fluorescence detected magnetic resonance</i> , rezonans magnetyczny z detekcją fluorescencyjną
FR	– <i>free radicals</i> , wolne rodniki (WR)
hGH	– <i>human growth hormone</i> , ludzki hormon wzrostu
MD	– <i>molecular dynamics</i> , dynamika molekularna
PrP	– <i>prion protein</i> , białka prionu
PrP ^c	– <i>prion protein cellular isoform</i> , białko prionowe forma „prawidłowa”
PrP ^{sc}	– <i>prion protein scrapie isoform</i> , białko prionowe forma „nieprawidłowa”
ROS	– <i>reactive oxygen species</i> , reaktywne formy tlenu (RFT)

WPROWADZENIE

Przedstawiona poniżej praca nie pretenduje do całościowego podsumowania stanu wiedzy na temat patogenezы neurodegeneracyjnej choroby Alzheimera. Odnosniki do szerszych i przeprowadzonych pod innym kątem opracowań, ukazujących się corocznie w ogromnej liczbie, można znaleźć w internecie pod adresami: www.alzheimers.org, www.alzheimers.org.uk, www.alzhforum.org, www.alzheimer.pl, a przede wszystkim w bazie danych MEDLINE/PubMed prowadzonej przez National Library of Medicine (USA) pod adresem www.nlm.nih.gov. Kilka z nich, które ukazały się w ostatnich latach, pozwalamy sobie wskazać czytelnikowi [1–29]. Celem pracy jest natomiast pokazanie w jaki sposób informacje strukturalne oraz koncepcje mechanistyczne opracowane przez fizykochemików z wykorzystaniem współczesnych metod badawczych mogą pomóc w zrozumieniu przyczyn i mechanizmu tej choroby. Znaczna część pracy została poświęcona utlenianiu grupy tioetrowej w metioninie, które, jak się przypuszcza, może mieć istotne znaczenie w inicjacji procesów rodnikowych w chorobie Alzheimera. Poznanie tego mechanizmu w układach modelowych nie byłoby możliwe bez użycia zaawansowanych metod spektroskopowych, takich jak radioliza impulsowa, fotoliza laserowa, techniki izolacji matrycowej, spektroskopia EPR czy spektroskopia ramanowska.

1. CHOROBA ALZHEIMERA, UDZIAŁ PEPTYDU β -AMYLOIDOWEGO W PROCESACH NEURODEGENERACYJNYCH.

Choroba Alzheimera (AD, *Alzheimer's disease*) jest jednym z głównych powodów otępienia starczego (demencji). Ocenia się, że u około piętnastu procent osób powyżej sześćdziesiątego piątego roku życia, które cierpią z powodu otępienia, ponad połowa przypadków chorobowych jest związana z AD. Przy czym, ogólny procent przypadków otępienia podwaja się wraz z wiekiem mniej więcej co dwadzieścia lat [14, 15, 24]. Zgodnie z obecnym stanem wiedzy, kluczowym dla patogenezы AD jest powstawanie i pozakomórkowa agregacja peptydu β -amyloidowego (β AP) [30] (poli-peptydu o masie cząsteczkowej rzędu 4–4,5 kDa [31]), której towarzyszy podwyższona ilość β AP obserwowana we wszystkich dziedziczonych formach choroby. Agregacja β AP w rejonach mózgu szczególnie podatnych na procesy neurodegeneracyjne jest jednym z podstawowych kryteriów diagnostycznych tej choroby. Przeważająca liczba badań wskazujących na fakt, że β AP jest toksyczny wobec neuronów i klonowanych kultur linii komórkowych [32–34], prowadzi do szeroko podzielnego przekonania o szczególnej roli β AP w patogenezie AD [35].

2. SEKWENCJE I KONFORMACJE FRAGMENTÓW β AP OBECNE W PATOGENEZIE CHOROBY ALZHEIMERA

Peptyd β API-42 (sekwencja w kodzie jednoliterowym: DAEFRH⁶DSGY-EVH¹³H¹⁴QKLVFFAEDVG²⁵SNKGA³⁰IIGLM³⁵VGGV³⁹V⁴⁰IA⁴²) został zidentyfikowany jako główny składnik złogów pozakomórkowych podczas gdy fragment β API-40 jest główną sekwencją cyrkulującą w płynie mózgowo-rdzeniowym [36, 37]. Inne fragmenty pełnej sekwencji β AP25-35 oraz β AP31-35, dla których metodami pułapek spinowych/EPR stwierdzono zdolność do tworzenia wolnych rodników (FR, *free radicals*) lub/i tzw. reaktywnych form tlenu (ROS, *reactive oxygen species* [38]), połączoną z neurotoksycznością *in vitro* [39], okazały się być mniej znaczące *in vivo*. Badania strukturalne β API-40 i β API-42 w układach micelarnych metodą 2D-NMR/MD [40, 41], pokazały, że rodzimy β AP pomiędzy resztami aminokwasowymi 1–14 i 37–40(42) ma strukturę nieuporządkowaną, posiada też dwa odcinki α -helikalne 15–24 i 28–36 rozdzielone przez zagięcie około reszt 25–27 [40, 42]. Stwierdzono ponadto, że utlenienie Met³⁵ do sulfotlenku w β API-40 zaburza strukturę C-końcowej helisy [43]. Podobne badania strukturalne wykonane dla N-końcowego fragmentu peptydu β API-28 w rozcieńczonym roztworze wodnym (< 300 μ M, pH 5,6) [44], pokazały kompletny brak helikalności, która pojawia się dopiero po przejściu do innych rozpuszczalników [45–47]. Co wielce znaczące, wprowadzenie kationów Cu²⁺ i Zn²⁺ do ujemnie naładowanego środowiska lipidowego indukuje w β API-28 i β API-42 zmiany konformacyjne od β -kartki do α -helisy, którym towarzyszą oligomeryzacja peptydu i pojawienie się zdolności do przenikania przez membrany [48].

3. POSTULOWANE PRZYCZYNY NEUROTOKSYCZNOŚCI β AP

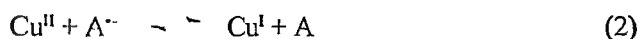
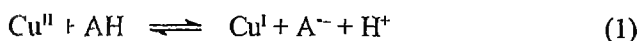
Jako przyczyny neurotoksyczności β AP wymienia się (i) oddziaływanie z receptorami powierzchniowymi komórek [49] lub niektórymi receptorami neuropeptydów [50] (ii) uszkodzenie membran komórkowych [16, 51] i/lub tworzenie kanałów jonowych [17, 52] i związane z tym (iii) naruszenie homeostazy jonowej komórki [28, 34, 53], (iv) tworzenie wolnych rodników i/lub reaktywnych form tlenu prowadzące do utleniania lipidów i białek [26, 39, 49, 54].

4. HIPOTEZA WOLNORODNIKOWEGO MECHANIZMU TOKSYCZNOŚCI β -PEPTYDU KORELACJA POMIĘDZY OBECNOŚCIĄ METIONINY W CZĄSTECZCE PEPTYDU I KOMPLEKSOWANIEM MIEDZI A NEUROTOKSYCZNOŚCIĄ-

Hipoteza wolnorodnikowego mechanizmu toksyczności β -peptydu wydaje się być bardzo racjonalna gdyż mózg chorego na AD charakteryzuje się wieloma symp-

tomami stresu oksydacyjnego i wysokim poziomem redokso-aktywnych metali przejściowych takich jak Cu i Fe [7, 9, 20–23, 29, 35, 53, 55–72] (chelatowanie których było nawet proponowane jako metoda terapii AD [18, 73, 74]). Jakkolwiek nie opracowano jeszcze szczegółowego mechanizmu chemicznego powstawania wolnych rodników i reaktywnych form tlenu zależnego od β AP [60], to przedstawiono dowody na „spontaniczne” utlenianie i fragmentację β AP1–40 w roztworze buforowym z jednoczesnym powstawaniem wolnych rodników, które zidentyfikowano metodą pułapek spinowych [58]. W istocie, zależne od β AP powstawanie wolnych rodników i reaktywnych form tlenu zostało zidentyfikowane jako potencjalnie znacząca droga patologii AD, gdyż przynajmniej częściowo, neurotoksyczność β AP wydaje się korelować ze zdolnością β AP do samorzutnej redukcji Cu^{II} kompleksowanej przez ten peptyd (zawartość Cu w złogach sięga $400 \mu\text{M}$ [75]) i tworzenia wolnych rodników [72, 76].

Ostatnio pokazano [77], że Cu^{II} kompleksowana przez β AP1–16, β AP1–28, β AP1–40, która w obecności fizjologicznego stężenia kwasu askorbinowego (*ca* $720 \mu\text{M}$) anacrobowo redukuje się do Cu^{I} (w reakcjach przedstawionych schematycznie jako 1 i 2, gdzie AH, $\text{A}^{\cdot-}$ i A oznaczają askorbinian, anionorodnik askorbylowy i dehydroaskorbinian),



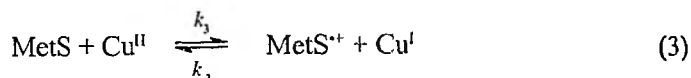
może w obecności tlenu lub H_2O_2 katalizować wolnorodnikowe utlenianie peptydu w procesie Fentona [8, 38, 69, 78–81] podobnie jak to ma miejsce w przypadku innych białek [8, 78, 79, 82–84] jak np. ludzki hormon wzrostu (hGH) [85] czy białko PrP^{Sc}, które gromadzi się w tkance mózgowej chorych dotkniętych przez chorobę Jakoba-Creutzfeldta [23, 86].

Zidentyfikowane metodą (ESI-TOF) MS/MS produkty utleniania β AP tj. 2-okso-His wskazują, że głównym obiektem ataku generowanego w procesie Fentona rodnika $\cdot\text{OH}$ są przede wszystkim aminokwasy His¹³ i His¹⁴, a w drugiej kolejności His⁶ i Tyr¹⁰ [77]. Jest to również pośredni dowód na to, że to właśnie reszty His¹³, His¹⁴, His⁶ i Tyr¹⁰ kompleksują Cu, co jest zgodne z wynikami badań spektroskopii EPR [48, 76] i Ramana [87]. Mniejszą podatność His⁶ niż His¹³ i His¹⁴ na utlenianie wyjaśniono sugerując, że His⁶ ma obniżoną gęstość elektronową w wyniku tworzenia mostka z drugim kompleksem Cu^{II} - β AP podobnie jak to zaobserwowano dla His⁶¹ łączącej jony Cu^{II} i Zn^{II} w wołowej dysmutazie ponadtlenkowej [88]. Z drugiej strony, związanie Tyr¹⁰ z jonem Cu poprzez tlen fenolowy obniża gęstość elektronową w pierścieniu aromatycznym co obniża stałą szybkości hydroksylacji (utleniania) tak, że kompleksowana Tyr nie jest w stanie konkurować z resztami His [77].

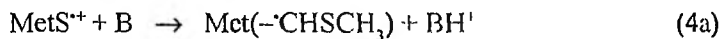
Ostatnio odkryto silną tendencję rodzimego β AP do redukcji kompleksowanej przez peptyd Cu^{II} [72, 76]. Co ważne, ani skrócona na C-końcu sekwencja

β AP1-28, ani skrócona na N-końcu sekwencja β AP25-35 nie redukują Cu^{II} . Na tej podstawie postuluje się, że związana przez reszty His na N-końcu peptydu Cu^{II} jest zredukowana przez elektron pochodzący z C-końcowej reszty Met [72, 76, 89]. Brak redukcji jonu Cu^{II} przez β AP1-42 podstawiony w pozycji 35 sulfotlenkiem metioniny (MetO) lub norleucyną (Nle) [72] wydaje się potwierdzać tę hipotezę.

Jednakże, różnica pomiędzy $E_{\text{Cu}^{\text{II}/\text{I}}}^0$ V [76] a potencjałem anodowym utleniania Met $\approx 1,5$ V [90–94] wynosząca $\approx 1,0$ V, w normalnych warunkach powinna zapewnić przesunięcie równowagi reakcji 3 w lewą stronę, a więc nie powinno dochodzić do redukcji Cu^{II} .

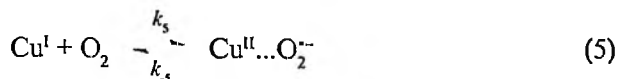


Z drugiej jednak strony, obydwa produkty reakcji, MetS^+ i Cu^{I} , mogą być wydajnie usuwane z równowagi 3 a w rezultacie równowaga ta może być przesunięta w prawo. W swojej pracy przeglądowej [95] Schöncich zacytował przykład podobnej sytuacji mającej miejsce podczas utleniania *p*-ksylenu przez Ce^{IV} , gdzie równie niekorzystne termodynamicznie przeniesienie elektronu napędzane jest przez następującą po nim silnie egzoenergetyczną reakcję deprotonacji prowadzącą do powstania rodnika 4-metylobenzylowego [96]. Kationorodniki MetS^+ także ulegają szybkiej deprotonacji (reakcje 4a i 4b) [97], z szacowaną $\text{p}K_{\text{a}}(\text{MetS}^+) \approx -6$ (zbliżona do ArCH_2^+ w *p*-ksylenie) dla deprotonacji w pozycji γ (reakcja 4a) i $\text{p}K_{\text{a}}(\text{MetS}^+) \approx -2$ dla deprotonacji w pozycji ϵ (reakcja 4b) [89].



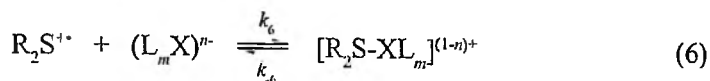
Stąd przez analogię do układu *p*-ksylen/ Ce^{IV} , jednociektronowe utlenianie Met^{35} w β AP przez Cu^{II} nie powinno być uważane za niemożliwe, jakkolwiek jego przebieg jeśli jest „napędzany” reakcjami 4a i 4b, właściwie nie powinien zależeć od struktury peptydu.

Zależne od obecności O_2 powstawanie H_2O_2 podczas inkubacji β AP1-42 [76] sugeruje że Cu^{I} jest usuwana z równowagi 3, najprawdopodobniej przez tworzenie kompleksów Cu^{II} /ponadtlenkowych (reakcja 5) [98, 99], które może prowadzić do powstawania anionorodnika ponadtlenkowego ulegającego dysmutacji z wytworzeniem H_2O_2 [38].



Istnieją także inne przyczyny, mogące wpływać na równowagę 3, wspierając powstawanie MetS^+ . W ogólności procesy jednociektronowego utleniania tioeterów organicznych przebiegają z udziałem grup sąsiadujących, które kinetycznie i termodynamicznie stabilizują kationorodnik tioeterowy (jak np. MetS^+) poprzez tworzenie

kompleksów typu kationorodnik–nukleofil [100–103]. Można to przedstawić ogólną reakcją 6, w której X reprezentuje heteroatomy S, Se, Te, O, N, P, Cl, Br, i I (L = ligand organiczny, $m = 0-2$; $n = 0,1$).



Stabilizacja utlenionego centrum siarkowego może zachodzić poprzez nakładanie obsadzonego orbitalu p (HOMO) heteroatomu z pojedynczo obsadzonym orbitalem p siarki (SOMO) prowadzące do powstania wiązania trójelektronowego typu $2\sigma/1\sigma^*$, w którym stany dwóch elektronów są opisywane przez orbital molekularny typu σ (wiązący) a jednego elektronu przez orbital antywiązący σ^* [100, 104, 105]. Co w przypadku Met może obniżać potencjał redukcji MetS^{2+} [90] zwiększając k_3 i odpowiednio zmniejszając k_3 . Wiązania typu $2\sigma/1\sigma^*$, jakkolwiek słabsze od wiązania pojedynczego [106, 107] (ΔE dysocjacji rzędu 100 kJ mol^{-1} [89, 101, 104, 108–111]), są trwale w roztworach wodnych w skali czasowej od nano- do submili-sekundowej. Rodniki z wiązaniem $2\sigma/1\sigma^*$ charakteryzują się absorpcją w zakresie UV-Vis, z reguły występującą jako szerokie i pozbawione struktury pasmo (w pierwszym przybliżeniu przypisane przejściu elektronowemu $\sigma \rightarrow \sigma^*$ [112]), którego położenie silnie zależy od czynników wpływających na gęstość elektronową na orbitalu antywiązącym σ^* takich jak elektrodonorowość podstawników przy siarce [104, 113] czy ograniczenia przestrzenne w nakładaniu się orbitali donora i akceptora [100, 104, 114, 115].

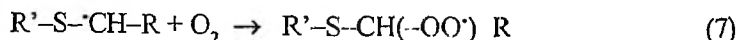
Obserwacje powstawania krótkożyjących kompleksów z wiązaniami trójelektronowymi umożliwiają techniki czasowo-rozdzielcze spektroskopii, takie jak radioliza impulsowa z detekcją UV-Vis [116] lub FDMR [117] i fotoliza laserowa [118], pracujące w reżimie submikrosekundowym, a także w układach kriogenicznych, dla których stosuje się metodami izolacji matrycowej z detekcją UV-Vis [115]. Oprócz tego niesparowane elektrony w wiązaniach typu $2\sigma/1\sigma^*$ absorbują promieniowanie elektromagnetyczne o częstościach mikrofalowych dając sygnał w widmie EPR [119–126]. Ukazały się ponadto nieliczne prace wykorzystujące spektrometrię masową [127–129], oraz spektroskopię ramanowską [130, 131] do detekcji wiązań $2\sigma/1\sigma^*$.

W przypadku β AP jedynym nukleofilem w bezpośrednim otoczeniu Met^{35} jest wiązanie peptydowe. Ostatnio przedstawiono eksperymentalne dowody oddziaływania pomiędzy kationorodnikiem tioeterowym a tlenem wiązania peptydowego podczas jednoelektronowego utleniania Met w modelowym amidzie *N*-acetylmetyoniny [132], oraz peptydach glicylo-metionylowych [133]. Wyniki te, otrzymane metodą radiolizy impulsowej z detekcją UV-Vis i konduktometryczną, potwierdzają potencjalną rolę tego rodzaju mechanizmu we wspomaganium utleniania Met w β AP. Ponieważ w kilku przypadkach pokazano, iż podobne wiązania mogą promować jednoelektronowe utlenianie związków modelowych [134], pojawiło się przypuszczenie że podobny mechanizm może towarzyszyć utlenianiu β AP.

Opierając się na rezultatach badań wykonanych dla modelowych peptydów przedstawiono hipotezę, że jednoelektronowe utlenianie Met³⁵ w βAP jest ułatwiane przez efekt grupy sąsiadującej, gdyż w α-helikalnym C-końcowym fragmencie βAP Ile³¹ jest położona bardzo blisko Met³⁵ (średnia odległość S–O pomiędzy Met³⁵ i Ile³¹-C=O w optymalizowanych strukturach ≈ 3,6 Å [42], jest bliska sumie promieni Van der Waalsa tych atomów ≈ 3,3 Å [135]). Dzięki temu tworzenie wiązania trójelektronowego siarka–tlen może stabilizować powstający w procesie jednoelektronowego utleniania Met³⁵ kationorodnik MetS^{•+}.

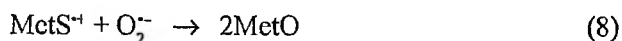
Ponieważ bezpośrednia detekcja eksperymentalna powstawania wiązania (S–O) w βAP z użyciem czasowo-rozdzielczej spektroskopii jest utrudniona ze względu na niewielką rozpuszczalność peptydu, hipoteza ta została częściowo potwierdzona z użyciem metod modelowania molekularnego. Modelowanie pokazało, że dzięki specyficznym własnościom strukturalnym fragment βAP26-40, reprezentatywny dla rodzimego βAP1-42, przejawia większą tendencję do tworzenia wiązania (S–O) pomiędzy Ile³¹C=O i Met³⁵ niż modelowy βAP26-36, czy peptyd o odwróconej sekwencji βAP40-26 [136]. Obliczenia wykonane dla peptydu βAP26-40(Ile³¹Pro) pokazały też, że peptyd βAP1-40(Ile³¹Pro) w którym Ile³¹ zastąpiono przez Pro (naruszając strukturę α-helisy), powinien być daleko mniej toksyczny niż rodzimy βAP, gdyż mutacja taka obniża „częstość spotkań” pomiędzy centrum siarkowym a tlenami wiązań peptydowych [136]. W ostatnim czasie wyniki tych obliczeń zostały potwierdzone w eksperymencie, który jednoznacznie pokazał, że mutacja Ile³¹Pro w βAP1-42 prowadzi do zmniejszenia stresu oksydacyjnego i kompletnie znosi neurotoksyczność peptydu [137]. Kluczowy dla procesu wydaje się fakt, że w rodzimym βAP reszty Met³⁵ i Ile³¹ należą do C-końcowego odcinka α-helisy, której topologia zapewnia bliski kontakt centrów aktywnych [42], podczas gdy w βAP1-42(Ile³¹Pro) otoczenie Met³⁵ nie ma struktury helikalnej, na co wskazują wyniki spektroskopii dichroizmu kołowego (CD) [137]. Jest to tym bardziej interesujące, że stosunkowo silne oddziaływania „niewiążące” pomiędzy siarką a tlenem, podobne do obserwowanych w szeregu biocząsteczek [138–140], mogą dodatkowo stabilizować α-helisę w βAP, jednocześnie promując jego neurotoksyczność.

Należy podkreślić, że jednoelektronowe utlenienie Met do MetS^{•+} stanowi dopiero początek łańcucha przemian rodnikowych jakie mogą zachodzić z udziałem βAP [39, 95]. Kationorodnik MetS^{•+} lub jego kompleks z nukleofilem ostatecznie ulega deprotonacji w praktycznie nieodwracalnych reakcjach 4a i 4b [89], co w obecności tlenu otwiera drogę powstawania rodników ponadtlenkowych (reakcja 7).



Rodniki ponadtlenkowe są klasycznymi inicjatorami peroksydacji lipidów [38], zjawiska silnie związanego z utlenianiem βAP [26, 39, 141]. Inną, alternatywną drogą zaniku MetS^{•+} *in vivo* może być utlenianie endogennych antyutleniaczy takich jak kwas askorbinowy czy tiole [142], prowadzące do powstawania rodników sulfany-

lowych (RS^{\cdot}), które same mogą uczestniczyć w łańcuchowych procesach utleniania lipidów i cukrów [143–164]. Wydajność tych reakcji zależy od stężenia zredukowanego glutationu GSH, który we wszystkich komórkach eukariotycznych występuje w dość wysokim stężeniu, rzędu 1–10 mM [38, 165] (np. w komórkach pobranych z mózgu szczura wynosi ono około 2 mM, przy czym może ono być różne w różnych obszarach komórki [165], wyższe w cytosolu niższe w membranach). Ponadto, zwiększony poziom homocysteiny (metabolicznego prekursora GSH) obserwowano w surowicy krwi chorych na AD [166–168]. Możliwa też jest bardzo szybka reakcja 8 ($k_8 \approx 5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) [169, 170] z anionorodnikiem ponadtlenkowym, źródłem którego może być kompleks powstający w reakcji 5, prowadząca do powstawania sulfotluciku metioniny (MetO) wykrytego w złogach amyloidu [171].



Oczywiście, dla β AP taki mechanizm powinien zależeć od odległości pomiędzy kompleksem ponadtlenkowym $\text{Cu}^{\text{II}}\text{..O}_2^{\cdot-}$ a MetS^{\cdot} . Proces ten zachodziłby z pomijalnie małą energią aktywacji jeśli dynamika peptydu pozwoliłaby na kolizję pomiędzy $\text{Cu}^{\text{II}}\text{..O}_2^{\cdot-}$ a MetS^{\cdot} w skali czasowej rzędu nanosekund (tj. znacznie krótszej niż średni czas życia MetS^{\cdot} lub jego kompleksów z nukleofilami [97, 132]). Przeprowadzone ostatnio przez nas badania z układami modelowymi zawierającymi Met pokazały, że reaktywne produkty przejściowe Met mogą oddziaływać z oddalonymi grupami funkcyjnymi dzięki dużej giętkości i dynamice łańcucha peptydowego [172]. MetO może oczywiście powstawać w reakcji Met z H_2O_2 generowanym podczas inkubacji β AP [75] (*in vivo*, źródłem H_2O_2 mogą być np. pobudzone komórki glejowe, otaczające „rdzeń” amyloidu [165], szczególnie w obecności wykrytych w złogach glinokrzemianów [38, 70, 173–177]). Pojawiła się także hipoteza, że dzięki stosunkowo niskiej energii dysocjacji wiązania $\text{C}_{\alpha}\text{-H}$ (*ca* 361 kJ mol⁻¹) w Gly położonej w antyrównoległej β -karcie wodór ten może być odrywany przez MetS^{\cdot} z wytworzeniem reaktywnych rodników alkilowych [89, 178]. Nie znalazła ona jednak jak dotychczas potwierdzenia eksperymentalnego.

PODSUMOWANIE

Zgromadzony w wielu ośrodkach naukowych materiał doświadczalny zdaje się potwierdzać szczególną rolę jaką w patogenezie AD pełnią Met^{35} i kompleksowane przez β AP redokso-aktywne kationy metali przejściowych. Konsekwencje istnienia proponowanego mechanizmu wolnorodnikowego mogą nie ograniczać się tylko do AD, ale dotyczyć mechanizmów innych chorób neurodegeneracyjnych, takich jak CJD (choroba Jakoba-Creutzfeldta) czy FALS (rodzina stwardnienie boczne zanikowe, *familial amyotrophic lateral sclerosis*). Intrygujący jest fakt, że jak ostatnio pokazano, białko APP będące prekursorem neurotoksyicznego peptydu

β AP, oraz PrP^c (prekursor PrP^{Sc} białka które gromadzi się w tkance mózgowej dotkniętej przez CJD) pełnią podobną rolę w organizmie. Rola ta polega na pośredniczeniu w transporcie toksycznej Cu²⁺ na zewnątrz komórki [179–181].

Ciekawe, że białka te, biorące udział w detoksykacji komórek nerwowych, mogą w specyficznych, „sprzyjających” warunkach stanowić dla nich śmiertelne zagrożenie.

PODZIĘKOWANIA

Praca powstała w zespole uczestniczącym w The Research Training Network „Sulphur Radical Chemistry of Biological Significance: The Protective and Damaging Roles of Thiol and Thioether Radicals” (SULFRAD), korzystającym ze wsparcia finansowego Komisji Europejskiej w ramach piątego programu ramowego.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] K. Beyreuther, A.I. Bush, T. Dyrks, C. Hilbich, G. Konig, U. Monning, G. Multhaupt, R. Prior, B. Rumble, W. Schubert, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1991, **640**, 129.
- [2] S.R. Robinson, G.L. Bishop, *Neurobiol. Aging*, 2002, **5657**, 1.
- [3] A.I. Bush, K. Beyreuther, C.L. Masters, *Pharmacol. Ther.*, 1992, **56**, 97.
- [4] A.I. Bush, K. Beyreuther, C.L. Masters, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1993, **695**, 175.
- [5] R. Tanzi, S. Gaston, A. Bush, D. Romano, W. Pettingell, J. Peppercorn, M. Paradis, S. Gurubhagavatula, B. Jenkins, W. Wasco, *Genetica*, 1993, **91**, 255.
- [6] R.E. Tanzi, A.I. Bush, W. Wasco, *Neurobiol. Aging*, 1994, **15**, Suppl. 2, S145-S148.
- [7] L.M. Sayre, M.G. Zagorski, W.K. Surewicz, G.A. Krafft, G. Perry, *Chem. Res. Toxicol.*, 1997, **10**, 518.
- [8] E.R. Stadtman, *The role of free radicals mediation of proteins oxidation in aging and disease*, [in:] T. Özben Ed., *Free radicals, oxidative stress, and antioxidants. Pathological and physiological significance*, Plenum Press, New York, 1998, pp. 131-144.
- [9] M.A. Smith, G. Perry, *The role of oxidative stress in the pathological sequelae of Alzheimer disease*, [in:] T. Özben Ed., *Free radicals, oxidative stress, and antioxidants. Pathological and physiological significance*, Plenum Press, New York, 1998, pp. 195-204.
- [10] C.S. Atwood, X. Huang, R.D. Moir, R.E. Tanzi, A.I. Bush, *Met. Ions. Biol. Syst.*, 1999, **36**, 309.
- [11] J. Kulczycki, *Neur. Neurochir. Pol.*, 1999, Supl. 1., 63.
- [12] A. Pfeffer, *Neur. Neurochir. Pol.*, 1999, Supl. 1., 51.
- [13] T. Parnowski, *Neur. Neurochir. Pol.*, 1999, Supl. 1., 39.
- [14] M. Barcikowska, *Neur. Neurochir. Pol.*, 1999, Supl. 1., 29.
- [15] T. Gabryelewicz, *Neur. Neurochir. Pol.*, 1999, Supl. 1., 11.
- [16] R. Buchet, S. Pikula, *Acta Biochim. Pol.*, 2000, **47**, 725.
- [17] B. Dworakowska, K. Dolowy, *Acta Biochim. Pol.*, 2000, **47**, 685.
- [18] M.P. Cuajungco, K.Y. Faget, X. Huang, R.E. Tanzi, A.I. Bush, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2000, **920**, 292.
- [19] X. Huang, M.P. Cuajungco, C.S. Atwood, R.D. Moir, R.E. Tanzi, A.I. Bush, *J. Nutr.*, 2000, **130**, 1488S.

- [20] T. Lynch, R.A. Cherny, A.I. Bush, *Exp. Gerontol.*, 2000, **35**, 445.
- [21] C.A. Rottkamp, A. Nunomura, A.K. Raina, L.M. Sayre, G. Perry, M.A. Smith, *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.*, 2000, **14**, Suppl. 1, S62-S66.
- [22] M.A. Smith, C.A. Rottkamp, A. Nunomura, A.K. Raina, G. Perry, *Biochim. Biophys. Acta*, 2000, **1502**, 139.
- [23] A.I. Bush, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2000, **4**, 184.
- [24] J. Evans, *Chem. Br.*, 2001, **37**, 47.
- [25] A. Kontush, *Free Radic. Biol. Med.*, 2001, **31**, 1120.
- [26] D.A. Butterfield, C.M. Lauderback, *Free Radic. Biol. Med.*, 2002, **32**, 1050.
- [27] C.M. Brown, E. Wright, C.A. Colton, P.M. Sullivan, D.T. Laskowitz, M.P. Vitck, *Free Radic. Biol. Med.*, 2002, **32**, 1071.
- [28] G.E. Gibson, *Free Radic. Biol. Med.*, 2002, **32**, 1061.
- [29] M.A. Smith, G. Perry, W.A. Pryor, *Free Radic. Biol. Med.*, 2002, **32**, 1049.
- [30] R.B. Knowles, T. Gomez-Isla, B.T. Hyman, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 1998, **57**, 1122.
- [31] J. Näslund, V. Haroutunian, R. Mosh, K.L. Davis, P. Davis, P. Greengard, J.D. Buxbaum, *JAMA*, 2000, **283**, 1571.
- [32] C.J. Pike, A.J. Walencewicz-Wasserman, C.G. Glabe, C.W. Cotman, *Eur. J. Pharmacol.*, 1991, **207**, 367.
- [33] B.A. Yankner, L.K. Duffy, D.A. Kirschner, *Science*, 1990, **250**, 279.
- [34] M.P. Mattson, *Physiol. Rev.*, 1997, **77**, 1081.
- [35] D.J. Selkoe, *J. Biol. Chem.*, 1996, **271**, 18295.
- [36] C. Haass, E.H. Koo, A. Mellon, A.Y. Hung, D.J. Selkoe, *Nature*, 1992, **357**, 500.
- [37] P. Seubert, C. Vigo-Pelfrey, F. Esch, M. Lee, H. Dovey, D. Davis, S. Sinha, M. Schlossmacher, J. Whaley, C. Swindlehurst, *Nature*, 1992, **359**, 325.
- [38] G. Bartosz, *Druga twarz tleniu*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 1995, pp. 1–371.
- [39] A.D. Butterfield, *Chem. Res. Toxicol.*, 1997, **10**, 495.
- [40] H. Shao, S. Jao, K. Ma, M.G. Zagorski, *J. Mol. Biol.*, 1999, **285**, 755.
- [41] H. Sticht, P. Bayer, D. Willbold, S. Dames, C. Hilbich, K. Beyreuther, R.W. Frank, P. Rosch, *Eur. J. Biochem.*, 1995, **233**, 293.
- [42] M. Coles, W. Bicknell, A.A. Watson, D.P. Fairlie, D.J. Craik, *Biochemistry*, 1998, **37**, 11064.
- [43] A.A. Watson, D.P. Fairlie, D.J. Craik, *Biochemistry*, 1998, **37**, 12700.
- [44] J.P. Lee, E.R. Stimson, J.R. Ghilardi, P.W. Mantyh, Y.A. Lu, A.M. Felix, W. Llanos, A. Behbin, M. Cummings, M. Van Crielinge, A. Timms, J.E. Maggio, *Biochemistry*, 1995, **34**, 5191.
- [45] K. Sorimachi, D.J. Craik, *Eur. J. Biochem.*, 1994, **219**, 237.
- [46] J. Talafous, K.J. Marciniowski, G. Klopman, M.G. Zagorski, *Biochemistry*, 1994, **33**, 7788.
- [47] M.G. Zagorski, C.J. Barrow, *J. Biol. Chem.*, 1992, **269**, 627.
- [48] C.C. Curtain, F. Ali, I. Volitakis, R.A. Cherny, R.S. Norton, K. Beyreuther, C.J. Barrow, C.L. Masters, A.I. Bush, K.J. Barnham, *J. Biol. Chem.*, 2001, **276**, 20466.
- [49] S.D. Yan, X. Chen, J. Fu, M. Chen, H. Zhu, A. Roher, T. Slattery, L. Zhao, M. Nagashima, J. Morser, A. Migheli, P. Nawroth, D. Stern, A.M. Schmidt, *Nature*, 1996, **382**, 685.
- [50] Y. Shimohigashi, H. Matsumoto, Y. Takano, R. Saito, T. Iwata, H. Kamiya, M. Ohno, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1993, **193**, 624.
- [51] J. McLaurin, A. Chakrabarty, *J. Biol. Chem.*, 1996, **271**, 26482.
- [52] S.R. Durell, H.R. Guy, N. Arispe, E. Rojas, H.B. Pollard, *Biophys. J.*, 1994, **67**, 2137.
- [53] K. Hensley, D.A. Butterfield, M. Mattson, M. Aksanova, M. Harris, J.F. Wu, R. Floyd, J. Carney, *Proc. West Pharmacol. Soc.*, 1995, **38**, 113.
- [54] J.W. Heinecke, *Free Radic. Biol. Med.*, 2002, **32**, 1090.
- [55] W. Flitter, D.A. Rowley, B. Halliwell, *FEBS Lett.*, 1983, **158**, 310.

- [56] C.D. Smith, J.M. Carney, P.E. Starke-Reed, C.N. Oliver, E.R. Stadtman, R.A. Floyd, W.R. Markesbery, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1991, **88**, 10540.
- [57] C.D. Smith, J.M. Carney, T. Tatsumo, E.R. Stadtman, R.A. Floyd, W.R. Markesbery, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1992, **663**, 110.
- [58] K. Hensley, J.M. Carney, M.P. Mattson, M. Aksenova, M. Harris, J.F. Wu, R.A. Floyd, D.A. Butterfield, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1994, **91**, 3270.
- [59] P.A. Riley, *Int. J. Radiat. Biol.*, 1994, **65**, 27.
- [60] D.A. Butterfield, K. Hensley, M. Harris, M. Mattson, J. Carney, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1994, **200**, 710.
- [61] M.E. Harris, K. Hensley, D.A. Butterfield, R.A. Leddle, J.M. Carney, *Exp. Neurol.*, 1995, **131**, 193.
- [62] K. Hensley, M. Aksenova, J.M. Carney, M. Harris, D.A. Butterfield, *Neuroreport*, 1995, **6**, 493.
- [63] D.A. Butterfield, L. Martin, J.M. Carney, K. Hensley, *Life Sci.*, 1996, **58**, 217.
- [64] W.R. Markesbery, *Free Radic. Biol. Med.*, 1997, **23**, 134.
- [65] M.A. Smith, P.L.R. Harris, L.M. Sayre, G. Perry, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1997, **94**, 9866.
- [66] M.A. Smith, K. Hirai, K. Hsiao, M.A. Papolla, P.L.R. Harris, S.L. Siedlak, M. Tabaton, G. Perry, *J. Neurochem.*, 1998, **70**, 2212.
- [67] S. Varadarajan, S. Yatin, M. Aksenova, D.A. Butterfield, *J. Struct. Biol.*, 2000, **130**, 184.
- [68] L.M. Sayre, G. Perry, P.L.R. Harris, Y. Liu, K.A. Schubert, M.A. Smith, *J. Neurochem.*, 2000, **74**, 270.
- [69] C.S. Atwood, X. Huang, A. Khatri, R.C. Scarpa, Y.S. Kim, R.D. Moir, R.E. Tanzi, A.F. Roher, A.I. Bush, *Cell Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*, 2000, **46**, 777.
- [70] Y. Christen, *Am. J. Clin. Nutr.*, 2000, **71**, 621S.
- [71] C.A. Rottkamp, A.K. Raina, X. Zhu, E. Gaier, A.I. Bush, C.S. Atwood, M. Chevion, G. Perry, M.A. Smith, *Free Radic. Biol. Med.*, 2001, **30**, 447.
- [72] S. Varadarajan, J. Kanski, M. Aksenova, C. Lauderback, D.A. Butterfield, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, **123**, 5625.
- [73] R.A. Cherny, K.J. Barnham, T. Lynch, I. Volitakis, Q.X. Li, C.A. McLean, G. Multhaup, K. Beyreuther, R.E. Tanzi, C.L. Masters, A.I. Bush, *J. Struct. Biol.*, 2000, **130**, 209.
- [74] R.A. Cherny, C.S. Atwood, M.E. Xilinas, D.N. Gray, W.D. Jones, C.A. McLean, K.J. Barnham, I. Volitakis, F.W. Fraser, Y. Kim, X. Huang, L.E. Goldstein, R.D. Moir, J.T. Lim, K. Beyreuther, H. Zheng, R.E. Tanzi, C.L. Masters, A.I. Bush, *Neuron*, 2001, **30**, 665.
- [75] X. Huang, C.S. Atwood, M.A. Hartshorn, G. Multhaup, L.E. Goldstein, R.C. Scarpa, M.P. Cuajungco, D.N. Gray, J. Lim, R.D. Moir, R.E. Tanzi, A.I. Bush, *Biochemistry*, 1999, **38**, 7609.
- [76] X. Huang, M.P. Cuajungco, C.S. Atwood, M.A. Hartshorn, J.D. Tyndall, G.R. Hanson, K.C. Stokes, M. Leopold, G. Multhaup, L.E. Goldstein, R.C. Scarpa, A.J. Saunders, J. Lim, R.D. Moir, C. Glabe, E.F. Bowden, C.L. Masters, D.P. Fairlie, R.E. Tanzi, A.I. Bush, *J. Biol. Chem.*, 1999, **274**, 37111.
- [77] C. Schöneich, T.D. Williams, *Chem. Res. Toxicol.*, 2002, **15**, 717.
- [78] E.R. Stadtman, *Free Radical Biol. Med.*, 1990, **9**, 315.
- [79] E.R. Stadtman. *Free radicals mediated oxidation of proteins*, [in:] T. Özben Ed., *Free radicals, oxidative stress, and antioxidants. Pathological and physiological significance*, Plenum Press, New York, 1998, pp. 39–50.
- [80] A.R. White, A.I. Bush, K. Beyreuther, C.L. Masters, R. Cappai, *J. Neurochem.*, 1999, **72**, 2092.
- [81] N.K. Urbański, A. Beręsewicz, *Acta Biochim. Pol.*, 2000, **47**, 951.
- [82] E.R. Stadtman, B.S. Berlett, *Chem. Res. Toxicol.*, 1997, **10**, 485.
- [83] C. Schöneich, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2000, **21**, 1093.

- [84] M.F. Beal, *Free Radic. Biol. Med.*, 2002, **32**, 797.
- [85] F. Zhao, E. Ghezzi-Schöneich, G.I. Aced, J. Hong, T. Milby, C. Schöneich, *J. Biol. Chem.*, 1997, **272**, 9019.
- [86] B.S. Wong, H. Wang, D.R. Brown, I.M. Jones, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1999, **259**, 352.
- [87] T. Miura, K. Suzuki, N. Kohata, H. Takeuchi, *Biochemistry*, 2000, **39**, 7024.
- [88] T. Kurahashi, A. Miyazaki, S. Suwan, M. Isobe, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, **123**, 9268.
- [89] A. Rauk, D.A. Armstrong, D.P. Fairlie, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**, 9761.
- [90] H.A. Schwarz, R.W. Dodson, *J. Phys. Chem.*, 1984, **88**, 3643.
- [91] G. Merényi, J. Lind, L. Engman, *J. Phys. Chem.*, 1996, **100**, 8875.
- [92] L. Engman, J. Lind, G. Merényi, *J. Phys. Chem.*, 1994, **98**, 3174.
- [93] R.E. Huic, C.L. Clifton, P. Neta, *Radiat. Phys. Chem.*, 1991, **92**, 477.
- [94] Sanaullah, S. Wilson, R.S. Glass, *J. Inorg. Biochem.*, 1994, **55**, 87.
- [95] C. Schöneich, *Arch. Biochem. Biophys.*, 2002, **397**, 370.
- [96] E. Baciocchi, C. Rol, L. Mandolini, *J. Am. Chem. Soc.*, 1980, **102**, 7597.
- [97] K.-O. Hiller, B. Masloch, M. Göbl, K.-D. Asmus, *J. Am. Chem. Soc.*, 1981, **103**, 2734.
- [98] S. Fox, K.D. Karlin, *Dioxygen reactivity in copper proteins and complexes*, [in:] J. Selverstone Valentine, C.S. Foote, A. Greenberg, J.F. Liebman Eds, *Active oxygen in biochemistry*, Blackie Academic & Professional, Glasgow, 1995.
- [99] A.D. Zuberbühler, *Kinetics and mechanism of Cu/O₂ reactions*, [in:] K.D. Karlin. Z. Tyeklar Eds, *Bioinorganic chemistry of copper*, Chapman & Hall, New York, London, 1993, pp. 264-276.
- [100] K.-D. Asmus, *Acc. Chem. Res.*, 1979, **12**, 436.
- [101] D. Pogocki, C. Schöneich, *J. Org. Chem.*, 2002, **67**, 1526.
- [102] L.K. Steffen, R.S. Glass, M. Sabahi, G.S. Wilson, C. Schöneich, S. Mahling, K.-D. Asmus, *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, **113**, 2141.
- [103] K. Bobrowski, G.L. Hug, B. Marciniak, B.L. Miller, C. Schöneich, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, **119**, 8000.
- [104] K.-D. Asmus, *Sulfur-centered three electron bonded radical species*, [in:] C. Chatgililoglu, K.-D. Asmus Eds, *Sulfur-Centered Reactive Intermediates in Chemistry and Biology*, Plenum Press, New York, 1990, pp. 155-172.
- [105] T. Clark, *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, **110**, 1672.
- [106] N.C. Baird, *J. Chem. Educ.*, 1977, **54**, 291.
- [107] P.M.W. Gill, L. Radom, *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, **110**, 4931.
- [108] S.A. Chaudhri, M. Göbl, T. Freyholdt, K.-D. Asmus, *J. Am. Chem. Soc.*, 1981, **106**, 5988.
- [109] Y. Deng, A.J. Illies, M.A. James, M.L. McKee, M. Peschke, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, **117**, 420.
- [110] I. Carmichael, *Acta Chem. Scand.*, 1997, **51**, 567.
- [111] I. Carmichael, *Nukleonika*, 2000, **41**, 11.
- [112] T. Clark, *J. Comput. Chem.*, 1981, **2**, 261.
- [113] M. Göbl, M. Bonifacic, K.-D. Asmus, *J. Am. Chem. Soc.*, 1984, **106**, 5984.
- [114] M. Bonifacic, K.-D. Asmus, *J. Org. Chem.*, 1986, **51**, 1216.
- [115] J. Rogowski, J. Adamus, J. Gebicki, S.F. Nelsen, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2*, 1994, **779**.
- [116] S.A. Chaudhri, K.-D. Asmus, *Anal. Chem.*, 1981, **93**, 680.
- [117] D.W. Werst, A.D. Trifunac, *J. Phys. Chem.*, 1991, **95**, 3466.
- [118] K. Bobrowski, B. Marciniak, G.L. Hug, *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, **114**, 10279.
- [119] M.C.R. Symons, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 1974, **1619**.
- [120] M.H. Champagne, M.W. Mullins, A.-O. Colson, M.D. Sevilla, *J. Phys. Chem.*, 1991, **95**, 6487.
- [121] D. Pogocki, G. Burlińska, T. Wasowicz, J. Sadlo, K. Bobrowski, *Mol. Phys. Rep.*, 1994, **6**, 224.
- [122] D. Pogocki, G. Burlińska, J. Sadlo, T. Wasowicz, *Radiat. Phys. Chem.*, 1995, **45**, 974.
- [123] B.C. Gilbert, D.K.C. Hodgeman, R.O.C. Norman, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 1973, **1749**.

- [124] R.L. Petersen, D.J. Nelsen, M.C.R. Symons, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2.*, 1978, 225.
- [125] W.B. Gara, J.R.M. Giles, B.P. Roberts, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2.*, 1979, 1444.
- [126] L. Bonazzola, J.P. Michaut, J. Roncin, *Can. J. Chem.*, 1988, **66**, 3050.
- [127] A.J. Illies, P. Livant, M.L. McKee, *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, **110**, 7980.
- [128] D. Sülze, T. Drewello, H. Schwarz, *Beam experiments as a means for the generation of elusive sulfur-containing molecules*, [in:] C. Chatgililoglu, K.-D. Asmus Eds, *Sulfur-Centered Reactive Intermediates in Chemistry and Biology*, Plenum Press, New York, 1990, pp. 185-192.
- [129] J.A. Syage, J.E. Pollard, R.B. Cohen, *J. Phys.Chem.*, 1991, **95**, 8560.
- [130] M. Wilbrant, N.H. Jensen, P. Pagsberg, A.H. Sillesen, K.B. Hansen, R.E. Hester, *J. Raman Spectrosc.*, 1981, **11**, 24.
- [131] G.N.R. Tripathi, T. Tobien, *J. Phys. Chem. A.*, 2001, **105**, 3498.
- [132] C. Schöneich, D. Pogocki, P. Wisniewski, G. Hug, K. Bobrowski, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**, 10224.
- [133] C. Schöneich, D. Pogocki, G. Hug, K. Bobrowski, *Free radicals of methionine in peptides: mechanism relevant to β -amyloid oxidation in Alzheimer's disease*. *Journal of American Chemical Society*. 2003. Ref Type: In Press
- [134] R.S. Glass, *Neighboring group participation: general principles and application to sulfur-centered reactive species*, [in:] C. Chatgililoglu, K.-D. Asmus Eds, *Sulfur-Centered Reactive Intermediates in Chemistry and Biology*, Plenum Press, New York, 1990, pp. 213-226.
- [135] A.J. Bondi, *J. Phys.Chem.*, 1964, **68**, 441.
- [136] D. Pogocki, C. Schöneich, *Chem. Res. Toxicol.*, 2002, **15**, 408.
- [137] J. Kanski, M. Aksenova, C. Schöneich, D.A. Butterfield, *Free Radic. Biol. Med.*, 2002, **32**, 1205.
- [138] F.T. Burling, B.M. Goldstein, *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, **114**, 2313.
- [139] J.I. Garcia, J.A. Mayoral, L. Salvatella, *Acc. Chem. Res.*, 2000, **33**, 658.
- [140] Y. Nagao, T. Hirata, S. Goto, S. Sano, A. Kakehi, K. Iizuka, M. Shiro, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **120**, 3104.
- [141] M.P. Mattson, R.J. Mark, K. Furukawa, A.J. Bruce, *Chem. Res. Toxicol.*, 1997, **10**, 507.
- [142] M. Bonifacic, J. Weiss, S.A. Chaudhri, K.-D. Asmus, *J. Phys. Chem.*, 1985, **89**, 3910.
- [143] W.A. Pryor, G. Gojon, J.P. Stanley, *J. Am. Chem. Soc.*, 1973, **95**, 945.
- [144] M.S. Akhlag, H.-P. Schuchmann, C. von Sonntag, *Int. J. Radiat. Biol.*, 1987, **51**, 91.
- [145] G.D. Smoluk, R.C. Fahey, J.F. Ward, *Radiat. Res.*, 1988, **114**, 3.
- [146] C. Schöneich, M. Bonifacic, K.D. Asmus, *Free Radic. Res. Commun.*, 1989, **6**, 393.
- [147] C. Schöneich, M. Bonifacic, U. Dillinger, K.-D. Asmus, *Hydrogen Abstraction by Thiyl Radicals From Activated C-H Bonds of Alcohols, Ethers and Polyunsaturated Fatty Acids*, [in:] C. Chatgililoglu, K.-D. Asmus Eds, *Sulfur-Centered Reactive Intermediates in Chemistry and Biology*, Plenum Press, New York, 1990, pp. 367-387.
- [148] C. Schöneich, K.D. Asmus, *Radiat. Environ. Biophys.*, 1990, **29**, 263.
- [149] C. von Sonntag, *Free-radicals reactions involving thiols and disulphides*, [in:] C. Chatgililoglu, K.-D. Asmus Eds, *Sulfur-Centered Reactive Intermediates in Chemistry and Biology*, Plenum Press, New York, 1990, pp. 359-366.
- [150] C. Schöneich, U. Dillinger, F. von Bruchhausen, K.D. Asmus, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1992, **292**, 456.
- [151] C. Schöneich, K.-D. Asmus, M. Bonifacic, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, 1995, **91**, 1923.
- [152] C. Schöneich, *Thiyl Radicals, Perthiyl Radicals and Oxidative Reactions*, [in:] L. Packer, E. Cadenas [Eds.], *Biothiols in Health and Disease.*, Marcel Dekker, New York, 1995, pp. 21-47.
- [153] P. Wardman, *Reaction of thiyl radicals*, [in:] L. Packer, E. Cadenas Eds, *Biothiols in Health and Disease.*, Marcel Dekker, New York, 1995, pp. 1-19.
- [154] R. Zhao, J. Lind, G. Merényi, T.E. Eriksen, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2.*, 1997, 569.

- [155] A. Rauk, D. Yu, D.A. Armstrong, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **120**, 8848.
- [156] P. Wardman, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, 1998, **232**, 23.
- [157] R. Zhao, *Thiyl Radicals, Reaction and Redox Chemistry*. 1998. Department of Chemistry. Nuclear Chemistry Royal Institute of Technology, Stockholm, Sweden. Ref Type: *Thesis/Dissertation*.
- [158] J. Schwinn, H. Sprinz, K. Dröbfler, S. Leistner, O. Brede, *Int. J. Radiat. Biol.*, 1998, **74**, 359.
- [159] J. Stubbe, W. van der Donk, *Chem. Rev.*, 1998, **98**, 705.
- [160] M.J. Robins, G.J. Ewing, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, **121**, 5823.
- [161] C. Ferreri, C. Costantino, L. Landi, Q.G. Mulazzani, C. Chatgililoglu, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1999, 407.
- [162] N.K. Carter, T. Taverner, C.H. Schiesser, M.M. Greenberg, *J. Org. Chem.*, 2000, **65**, 8375.
- [163] C. Chatgililoglu, C. Ferreri, M. Ballestri, Q.G. Mulazzani, L. Landi, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**, 4593.
- [164] D. Pogocki, C. Schöneich, *Free Radic. Biol. Med.*, 2001, **31**, 98.
- [165] B. Halliwell, J.M. Gutteridge, *Free radicals in biology and medicine*, Oxford University Press, Oxford, 1999, pp. 1–936.
- [166] R. Clarke, A.D. Smith, K.A. Jobst, H. Refsum, L. Sutton, P.M. Ueland, *Arch. Neurol.*, 1998, **55**, 1449.
- [167] R. Diaz-Arrastia, *Arch. Neurol.*, 1998, **55**, 1407.
- [168] E. Mosharov, M.R. Cranford, R. Banerjee, *Biochemistry*, 2000, **39**, 13005.
- [169] B. Miller, T.D. Williams, C. Schöneich, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, **118**, 11014.
- [170] B. Miller, K. Kuczera, C. Schöneich, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **120**, 3345.
- [171] J. Näslund, A. Schierhorn, U. Hellman, L. Lannfelt, A.D. Roses, L.O. Tjernberg, J. Silberring, S.E. Gandy, B. Winblad, P. Greengard, C. Nordstedt, L. Terenius, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1994, **91**, 8378.
- [172] D. Pogocki, E. Ghezzi-Schöneich, C. Schöneich, *J. Phys. Chem. B.*, 2001, **105**, 1250.
- [173] P.H. Evans, J. Klinowski, E. Yano, N. Urano, *Free Radic. Res. Commun.*, 1989, **6**, 317.
- [174] P.H. Evans, E. Yano, J. Klinowski, E. Peterhans, *EXS*, 1992, **62**, 178.
- [175] J. Savory, C. Eixley, W.F. Forbes, Y. Huang, J.G. Joshi, T. Kruck, D.R. McLachlan, I. Wakayama, *J. Toxicol. Environ. Health*, 1996, **48**, 615.
- [176] P. Evans, C. Harrington, *Biochem. Soc. Trans.*, 1998, **26**, S251.
- [177] R.A. Yokel, *Neurotoxicology*, 2000, **21**, 813.
- [178] A. Rauk, D. Yu, D.A. Armstrong, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**, 4185.
- [179] A.R. White, R. Reyes, J.F. Mercer, J. Camakaris, H. Zheng, A.I. Bush, G. Multhaup, K. Beyreuther, C.L. Masters, R. Cappai, *Brain Res.*, 1999, **842**, 439.
- [180] J.H. Viles, F.E. Cohen, S.B. Prusiner, D.B. Goodin, P.E. Wright, H.J. Dyson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1999, **96**, 2042.
- [181] D.R. Brown, B. Schmidt, H.A. Kretschmar, *J. Neurochem.*, 1998, **70**, 1686.

**WYBRANE METODY UTLENIANIA TERMINALNEJ
GRUPY HYDROKSYMETYLOWEJ
W POCHODNYCH CUKRÓW**

**SELECTED METHODS OF OXIDATION OF
SUGAR DERIVATIVES TERMINAL
HYDROXYMETHYL GROUP**

Janusz Madaj, Magdalena Jankowska

*Wydział Chemii Uniwersytetu Gdańskiego,
ul. J. Sobieskiego 18, 80-952 Gdańsk*

Abstract

Wprowadzenie

1. Wykaz stosowanych skrótów
2. Utlenianie związkami chromu(VI)
3. Utlenianie metodą Swerna
4. Utlenianie w obecności TEMPO

Piśmiennictwo cytowane



Dr Janusz Madaj urodził się w 1965 roku w Pucku. W 1989 roku ukończył studia chemiczne na Wydziale Matematyki, Fizyki i Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Od tego roku jest związany zawodowo z tą uczelnią. Pracę doktorską pt. *O reakcjach przegrupowania per-O-acetylowych pochodnych 1,5-anhydro-2-deoksy-1-enitoli* obronił w 1995 roku. W r. 1998 odbył roczny staż naukowy w Case Western Reserve University, Cleveland (USA). Obecnie jest adiunktem na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego i pracuje w Zakładzie Chemii Cukrów. Jest współautorem kilkunastu prac z dziedziny chemii

cukrów, Główne kierunki działalności badawczej to: badania procesu degradacji witaminy C, synteza oligosacharydów zawierających jednostki kwasów uronowych i *N*-acetylo-D-glukozaminę. Dodatkowe informacje można znaleźć na stronie domowej Zakładu Chemii Cukrów UG:

http://chemik.chem.univ.gda.pl:8000/info/ZCHC/z_ch_cukr.htm.



Mgr Magdalena Jankowska urodziła się w Gdańsku. W 1999 r. ukończyła studia – kierunek chemia – na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Od 2000 roku jest słuchaczką Studium Doktoranckiego na tym Wydziale. Przygotowuje pracę doktorską na temat syntezy oligosacharydów zawierających jednostki kwasów uronowych i *N*-acetylo-D-glukozaminę.

ABSTRACT

Uronic acid are widely encountered in many important biopolymers of plant and animal origin in the form of glycosiduronic acids. Because degradation takes place during the hydrolyses of the polymers only chemical synthesis can afford the great variety of pure oligosaccharides, needed to explore the structure-activity relationship or to mimic the biological properties of these domains. Due to a low reactivity of uronic acids towards glycosidation an alternative methods of synthesis of oligosaccharides containing uronic acid units are used.

The selective oxidation of carbohydrates derivatives has been intensively studied in the last decades and continues to be an area of timely interest. This holds especially for the conversion to uronic acid. Some common oxidation method for sugar hydroxymethyl group are collected in this brief review.

Perhaps the most common transition metal in oxidation reagents is chromium. Chromic acid (Jones oxidation) is already so common that the classic version does not deserve any further comments. The development of milder version of the Jones oxidation began with the introduction of the Collins oxidation protocol. It has gained very wide use because of its simplicity (CrO_3 is added into a dichloromethane solution of pyridine, and then the alcohol to be oxidized is added). Pyridinium chlorochromate (PCC) is a useful oxidant for the conversion of alcohols to carbonyls. The reagent is slightly acidic in character and the yields are usually better than with Collins' oxidation. The use of aprotic solvents led to the development of pyridinium dichromate (PDC) as a neutral counterpart to the Collins oxidation. The advantages of this reagent include that only a small excess is needed (large excess of reagents makes large scale work difficult). Some examples of use of chromic oxidants in sugar chemistry are described in this paper.

In the oxidation of very sensitive molecules, the use of dimethyl sulfoxide together with a suitable electrophilic compound has proven to be very profitable. A synthetically important and often used method is the Swern oxidation, where DMSO is activated with oxalyl chloride. The reaction is performed at low temperature in dichloromethane solution. The low temperature is essential, since at higher temperature the $\text{DMSO}-(\text{COCl})_2$ complex decompose explosively. In order to tie up the HCl formed during the reaction and to liberate the alcohol complex, one commonly uses triethylamine as the base. The additional carbonyl group formed in the oxidation of sugar derivatives is particularly useful functionality in sugar synthesis. It can function as an electrophilic site or it can be induced to behave as a nucleophile. Its subsequent over-oxidation with NaClO_2 leads to uronic acid. These aspects of use of Swern oxidation are described.

Recently catalytic methods using stable organic nitroxyl radicals like 2,2,6,6-tetramethyl(piperidin-1-yloxy) [TEMPO] as mediator have been developed. Reaction with TEMPO and its derivatives are of industrial interest. Substituted nitroxyl radicals are prepared in large amounts in high yield starting from the inexpensive basic chemicals. Additionally the mediator TEMPO can be easily recovered in quantitative yield after the oxidation of saccarides.

WPROWADZENIE

Liczba publikacji ukazujących się w ostatnich latach dotyczących kwasów uronowych ciągle rośnie, co niezbiecnie świadczy o rosnącym nimi zainteresowaniu. Wśród nich szczególne miejsce zajmują prace dotyczące di- i oligosacharydów zawierających jednostki kwasów uronowych. Niestety uzyskanie takich fragmentów na drodze hydrolizy naturalnie występujących polisacharydów jest bardzo trudne ze względu na zachodzące w warunkach reakcji procesy uboczne. Jedyną alternatywą jest więc synteza chemiczna. Ze względu na małą reaktywność kwasów uronowych jako dawców glikozyli [1a, b] coraz częściej stosuje się syntezę pośrednią, polegającą na otrzymaniu odpowiedniego oligosacharydu, a następnie selektywnym utlenieniu terminalnej grupy hydroksymetylowej do karboksylowej. Metoda ta legła u podstaw naszych zainteresowań i zaowocowała, między innymi niniejszą pracą.

Kwasy uronowe można traktować jako pochodne monosacharydów, w których utleniona została terminalna grupa hydroksymetylowa bez naruszenia grupy karbonylowej. Aby przeprowadzić taki zabieg należy wcześniej zabezpieczyć grupę karbonylową przeprowadzając ją w odpowiedni acetal, czyli glikozyd. Uzyskany glikozyd, w zależności od metody, można poddać utlenieniu bezpośrednio lub po odpowiednim przygotowaniu (czasami konieczne jest wprowadzenie osłon drugorzędowych grup hydroksylowych). Spośród wielu metod utleniania zdecydowaliśmy się wybrać trzy najczęściej wykorzystywane i przedstawić je w kolejności chronologicznej.

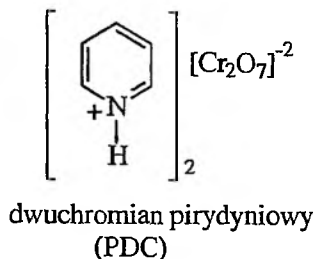
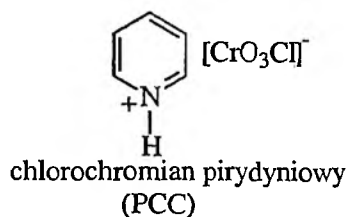
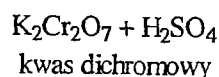
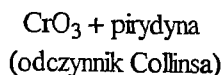
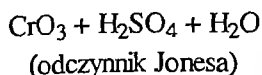
1. WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

Ac	– acetyl
DMSO	– dimetylosulfotlenek
OAll	– grupa <i>O</i> -allilowa
OBn	– grupa <i>O</i> -benzylowa
OLev	– grupa <i>O</i> -lewulinowa
OMOM	– grupa <i>O</i> -metoksymetylowa
OTr	– grupa <i>O</i> -tritylowa (<i>O</i> -trifenylometylowa)
PCC	– chlorochromian pirydyniowy
PDC	– dichromian pirydyniowy
TBS, TBDMS	– grupa <i>t</i> -butylodimetylosililowa
TEMPO	– 2,2,6,6-tetrametylo(piperidyn-1-yl)oksyd

2. UTLENIANIE ZWIĄZKAMI CHROMU(VI)

Utlenianie związkami chromu na szóstym stopniu utlenienia, ze względu na swoją prostotę i niezawodność, należy do często stosowanych metod. Niestety po-

siada ona również wady. Wszystkie odczynniki utleniające muszą być użyte w dużym nadmiarze, co szczególnie w reakcjach na dużą skalę stanowi istotne utrudnienie. Nie sposób też nie wspomnieć o wysokiej toksyczności związków chromu. Mimo to, wiele z nich znalazło zastosowanie w chemii węglowodanów.

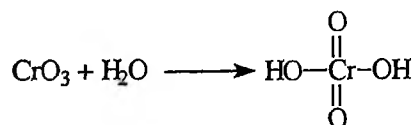


Rysunek 1

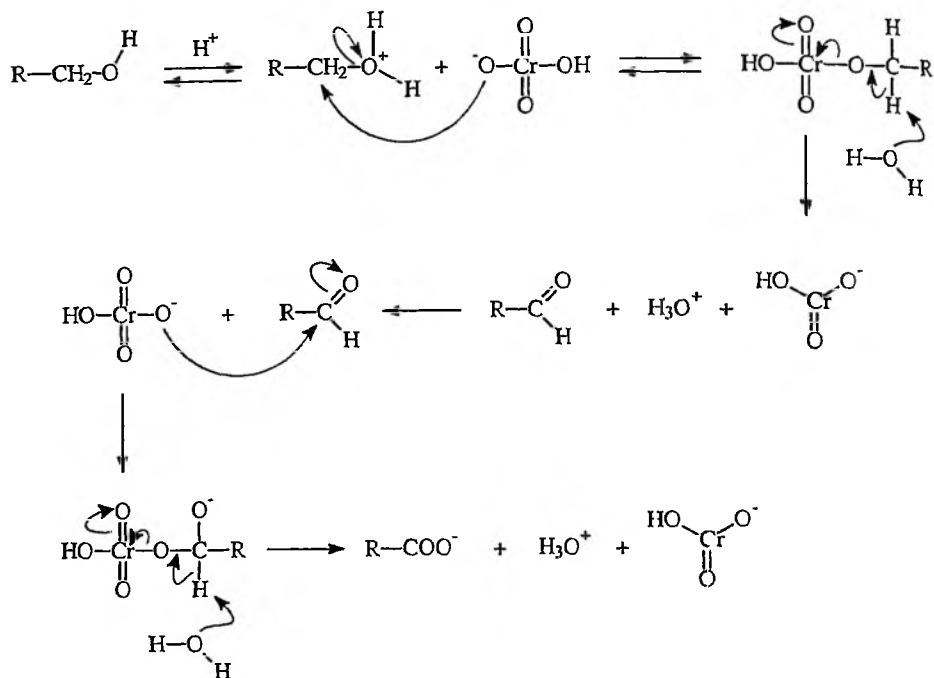
rodzaj utleniania		odczynnik
R-CH ₂ -OH	R-CHO	PCC, Collinsa, PDC (w CH ₂ Cl ₂)
R-CH ₂ -OH	R-COOH	Jonesa, kwas dichromowy, PDC (w DMF)

Przykłady reakcji utleniania terminalnej grupy hydroksymetylowej z wykorzystaniem niektórych z nich zostaną przedstawione poniżej.

Metoda Jonesa [2–5] należy do jednych z najstarszych metod utleniania alkoholi do kwasów karboksylowych. W metodzie tej środkiem utleniającym jest tzw. odczynnik Jonesa, który stanowi mieszanina tlenku chromu(VI) i wodnego roztworu kwasu siarkowego. Reakcję najczęściej prowadzi się w acetonie. Właściwym czynnikiem utleniającym jest kwas chromowy tworzący się zgodnie z reakcją:



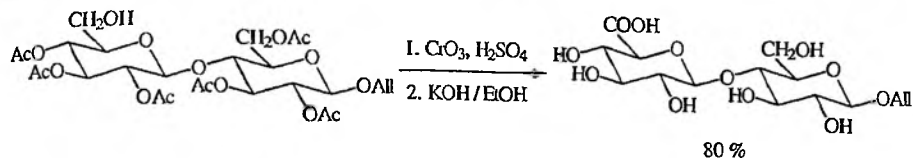
Mechanizm reakcji utleniania przedstawia poniższy schemat:



Schemat 1

Identyfikacja produktów analizy oligo- i polisacharydów zawierających jednostki kwasów uronowych wymaga posiadania odpowiednich związków wzorcowych. Takimi wzorcami są częściowo *O*-metylowane glikopiranouonozydy metylu. Bezpośrednie *O*-metylowanie pochodnych kwasów uronowych ze względu na zachodzącą w czasie reakcji β -eliminację dają niezadowalające rezultaty [6, 7]. Bardzo dobre wyniki udało się uzyskać poddając utlenieniu metodą Jonesa odpowiednie mieszane pochodne *O*-benzylo-*O*-metylowe *D*-glukopiranozydu metylu z wolną grupą C-6-OH. Tak uzyskane związki po usunięciu osłon benzylowych poprzez wodorolizę stanowiły idealny materiał porównawczy. W ten sposób udało się otrzymać: 2-, 3-, 4-mono-, 2,3-di-, 2,4-di- i 3,4-di-*O*-metylo- α -*D*-glukopiranouonozydy metylu [8].

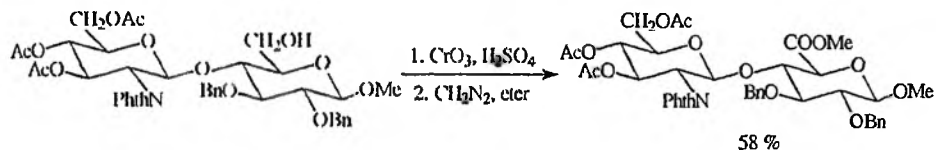
Utlenianie tlenkiem chromu(VI) nie należy do reakcji selektywnych i wymaga, przed przystąpieniem do jego wykonania, wcześniejszego zablokowania pozostałych grup hydroksylowych. Ponieważ utlenianie tą metodą przebiega w obecności wodnego roztworu kwasu siarkowego przyjęła się opinia, że nie można używać osłon labilnych w środowisku kwaśnym. Opinia ta nie jest jednak w pełni uzasadniona. Przykładem może być synteza przedstawiona poniżej. Kwas cellobiouronowy [jednostki monosacharydowe połączone wiązaniem β -(1 \rightarrow 3)] stanowi istotny fragment polisacharydowej otoczki *Streptococcus pneumoniae* typu 3. Jego prostą syntezę z odpowiednio otrzymanego 2,3,6,2',3'-penta-*O*-acetylo- β -*D*-cellobiozydu allilu zaproponował Chernyak i jego współpracownicy [9].



Schemat 2

Jak widać reakcja przebiega z bardzo wysoką wydajnością. Warto również zwrócić uwagę na użyty przez autorów aglikon. Grupa *O*-allilowa, obok cennej właściwości umożliwiającej usunięcie tej osłony, często stanowi tzw. linker, za pomocą którego, po reakcji z cysteaminą, przeznaczone do badań biologicznych związki przyłączone są do BSA lub HSA (ang. *Bovine Serum Albumin*, *Human Serum Albumin*) [10]. Co bardzo ważne w warunkach utleniania metodą Jonesa grupa ta nie ulega zmianie.

W wielu naturalnych polisacharydach, obok jednostek kwasu uronowego, występują również fragmenty 2-acetamido-2-deoksy-D-glikopiranozy. Przykład może stanowić hialouronian, będący polisacharydem wchodzącym w skład ścian komórkowych wielu ssaków. Jest on polimerem zbudowanym z powtarzającego się fragmentu disacharydu GlcNAc-(β ,1 \rightarrow 4)-GlcA. Synteza takich fragmentów stawia, obok wyboru odpowiednich osłon grup hydroksylowych, również konieczność właściwego sfunkcjonalizowania grupy aminowej. Syntezę takiego fragmentu zawierającego aglikon *O*-metylowy przedstawili Carter i wsp. [11].



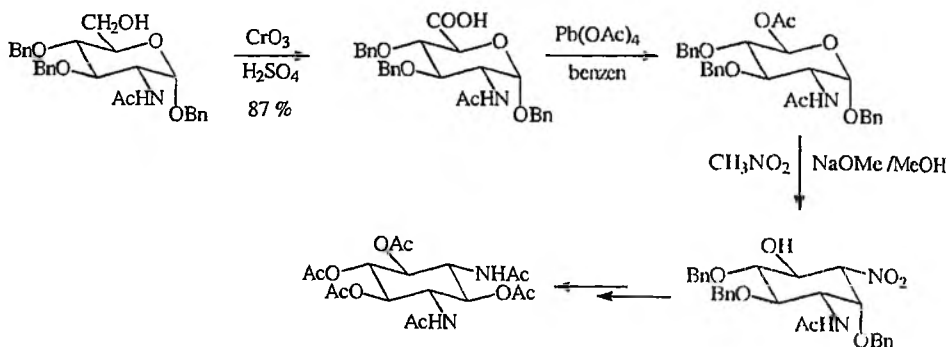
Schemat 3

Ponieważ docelowy związek zawierać miał grupę *N*-acetamidową wydawałoby się, że najprościej byłoby użyć substrat zawierający taką właśnie grupę. Niestety nie zawsze najkrótsza droga jest najlepsza. Związki zawierające acetylową osłonę grupy aminowej obok obniżonej reaktywności, wykazują zmniejszoną rozpuszczalność w powszechnie stosowanych w syntezie wiązania *O*-glikozydowego rozpuszczalnikach. Dlatego też w projektowanych syntezach disacharydów zawierających jednostkę glikozaminy wybiera się inne niż *N*-acetylowe osłony. Podobnie było w przypadku omawianej pracy. Początkowo autorzy wybrali osłonę *N*-sulfonylową, niestety próby jej usunięcia prowadziły do degradacji disacharydu. Ostatecznie udało się otrzymać docelowy disacharyd stosując osłonę *N*-ftaloilową. Podobnie jak we wcześniej omawianym przykładzie, również i tu obecność grup *O*-acetylowych nie utrudniała syntezy.

Znane są jednak przypadki, kiedy obecność grupy *O*-acetylowej powoduje znaczne zmniejszenie wydajności reakcji utleniania odczynnikami Jonesa. Przykła-

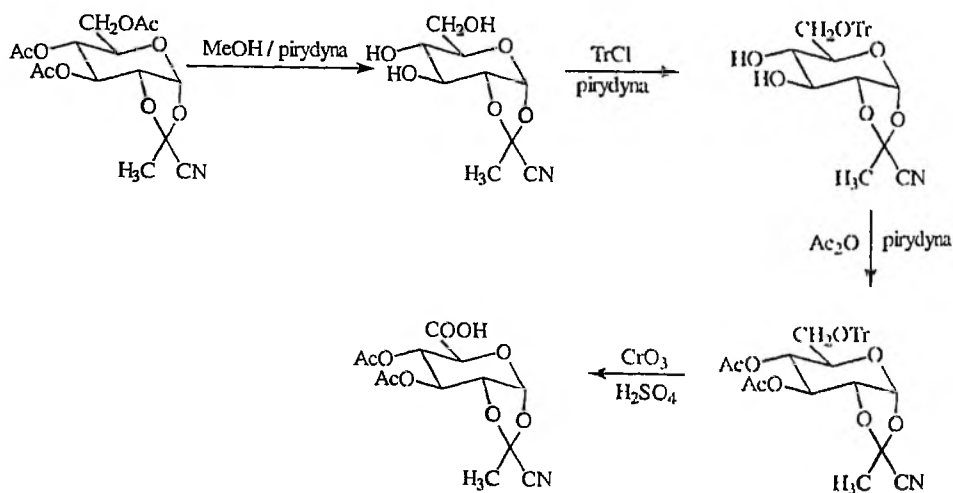
dem może być praca opublikowana przez Reja i wsp. [12]. Stwierdzili oni, że utlenianie związków zawierające taką grupę w sąsiedztwie pierwszorzędowej grupy hydroksylowej zachodzi z niską wydajnością, co spowodowane jest częściową migracją acetylu. Znacznie lepsze wyniki uzyskali stosując osłonę *O*-lewulinową grupy 5-OH (furanozy) i 4-OH (piranozy), w przypadku której nie obserwowano migracji.

Utlenianie terminalnej grupy hydroksymetylowej w aminocukrach, prowadzące do otrzymania pochodnych kwasów aminouronowych, może być wykorzystane nie tylko do syntezy oligosacharydów. Kitagawa i wsp. [13] przedstawili przykład bardzo ciekawej syntezy heksaacetylo-streptaminy z *D*-glukozaminy.



Schemat 4

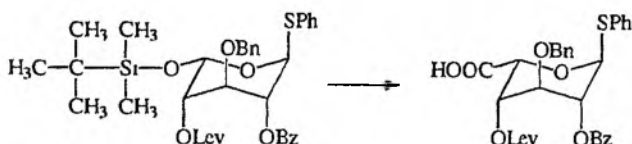
1,2-*O*-Cyanoetylidenowe pochodne kwasów uronowych znajdują zastosowanie w syntezie oligosacharydów zawierających jednostki takich kwasów. Syntezę takich pochodnych o konfiguracji *D*-gluko, *D*-galakto i *D*-manno zaproponowali Betaneli i wsp. [14].



Schemat 5

Na schemacie przedstawiono przykładową syntezę pochodnych kwasu uronowego o konfiguracji *D*-gluko. Godny podkreślenia w tej syntezie jest fakt, że autorzy poddali utlenieniu bezpośrednio pochodne 6-*O*-tritylowe. Wymagało to jednak zastosowania nietypowych warunków. Po pierwsze trzeba było użyć znacznie większego niż zazwyczaj nadmiaru tlenku chromu(VI). Istotną trudność stanowiła nienajlepsza rozpuszczalność używanych pochodnych *O*-tritylowych w acetonie, co powodowało znaczne obniżenie wydajności. Dużo lepsze rezultaty udało się uzyskać stosując mieszaninę rozpuszczalników aceton–dichlorometan. Ostatecznie utlenianie w zależności od konfiguracji związku przebiegało z wydajnością od 55 do 77%.

Z podobnego pomysłu, a więc próby utlenienia terminalnej grupy bez wcześniejszego usunięcia tym razem osłony silylowej, próbowali skorzystać Tabeur i wsp. [15].

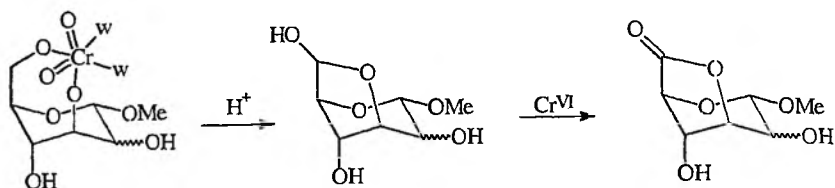


Schemat 6

Niestety, utlenianie metodą Jonesa nie przyniosło spodziewanych efektów. Co prawda utlenianie terminalnej grupy przebiegało pomyślnie, to jednak zachodzące ubocznie utlenianie aglikonu powodowało, że oczekiwaną pochodną kwasu udało się wyizolować tylko z 26% wydajnością. Skłoniło to autorów powyższego eksperymentu do uprzedniego usunięcia grupy osłonowej, a następnie użycia łagodniejszego środka utleniającego (dichromian pirydyniowy, PDC) co w efekcie pozwoliło otrzymać pochodną kwasu *L*-idouronowego z 52% wydajnością.

Wydaje się, że rozwiązanie problemu utleniania 1-tioglikozydów do odpowiednich kwasów uronowych bez naruszenia aglikonu stanowi praca opublikowana przez Allansona i wsp. [16]. Poddali oni utlenianiu w warunkach opracowanych przez Jonesa 1-tioglikozydy zawierające selektywnie odblokowaną grupę terminalną lub takie, które obok tej grupy posiadały jeszcze wolne grupy drugorzędowe. Innowacją stanowiło wykorzystanie ultradźwięków. Pozwoliło to na skrócenie czasu reakcji oraz użycie mniejszego nadmiaru szkodliwego dla środowiska CrO_3 . W trakcie tej przemiany utleniane były selektywnie pierwszorzędowe grupy hydroksylowe, a tiofenylowy aglikon pozostał nienaruszony.

Za bardzo podobne do metody Jonesa uznać można utlenianie dwuchromianem sodu lub potasu w obecności kwasu siarkowego. Obie metody są bardzo skuteczne ale mało selektywne. W obu przypadkach stosuje się nadmiar środka utleniającego. Ciekawą pracę dotyczącą selektywnego utleniania przedstawili Signorella i wsp. [17]. Utleniali oni dichromianem potasu α -*D*-gluko- i α -*D*-mannopiranozydy metylu. Reakcje prowadzili przy niedomiarze środka utleniającego.



Schemat 7

Produktem powstającym w wyniku reakcji był odpowiedni (α -D-gluko- i α -D-mannopiranozyd metylu)urono-6,3-lakton. Mechanizm tworzenia się tego produktu przedstawia powyższy schemat. W pierwszym etapie tworzy się powoli odpowiedni ester cykliczny (litera „w” oznacza cząsteczkę wody), z którego tworzy się α -D-gliko-heksodialdo-6,3-furanoza-1,5-piranozyd metylu. Pochodna ta następnie ulega szybkiemu utlenieniu do właściwego laktonu.

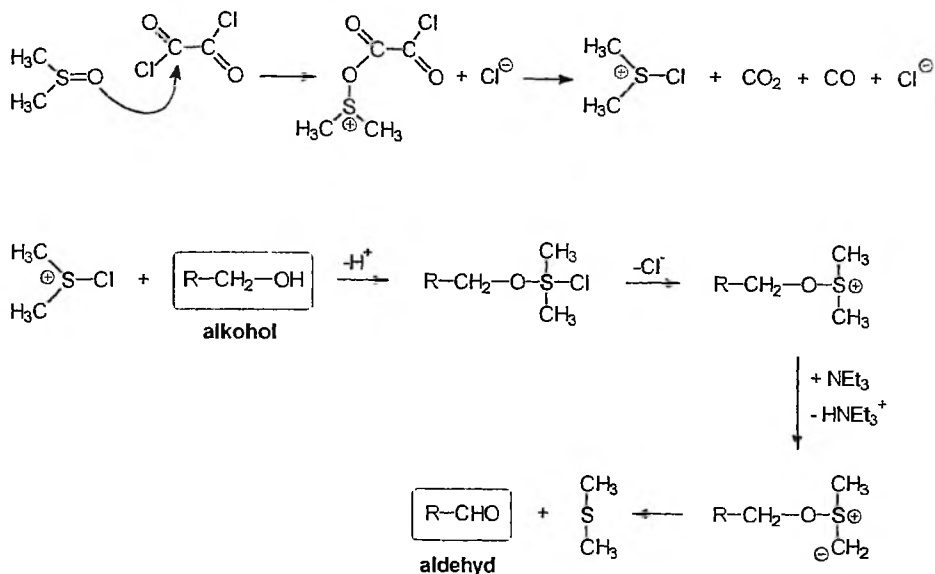
Łagodniejszym środkiem utleniającym jest już wcześniej wspomniany PDC [15]. Jest on czynnikiem bardziej zasadowym niż odczynnik Jonesa (bardziej zasadowy również niż PCC, a mniej niż odczynnik Collinsa). Najczęściej reakcje utleniania za pomocą PDC prowadzi się w dichlorometanie. Wiadomo, że dodatek do mieszaniny reagującej bezwodnika kwasu octowego znacznie przyspiesza jego działanie [18] (przyspiesza też działanie PCC [19]). Metoda jest bardzo korzystna w przypadku kiedy dalsza synteza wymaga zabezpieczenia powstającej w wyniku utlenienia grupy karboksylowej. Dodatek do mieszaniny reakcyjnej wcześniej wspomnianego bezwodnika i alkoholu (najczęściej *tert*-butylowego) powoduje utworzenie estru jako produktu utleniania [20, 21].

3. UTLENIANIE METODĄ SWERNA

Mimo, że właściwości utleniające aktywowanego (najczęściej chlorkiem oksalilu) dimetylosulfotlenku znane były już wcześniej, to metoda wykorzystująca je nazywana jest metodą Swerna od nazwiska amerykańskiego chemika (urodzonego w Nowym Jorku w 1916 roku). To on w roku 1978 opublikował pracę [22], w której zaproponował mechanizm reakcji utleniania alkoholi do aldehydów za pomocą aktywowanego DMSO.

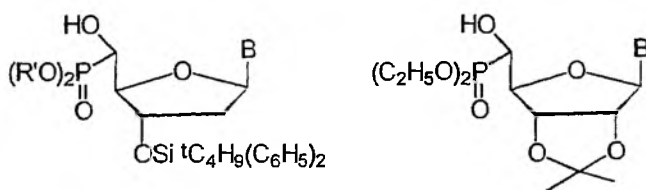
Przedstawiony schemat, zgodnie z tematem artykułu, zawężiliśmy do utleniania alkoholi pierwszorzędowych. Oczywiście jest jednak, że również alkohole drugorzędowe ulegają utlenieniu w omawianych warunkach.

Metoda Swerna wykorzystywana jest w chemii węglowodanów w dwojaki sposób. Po pierwsze, do otrzymywania dodatkowej grupy karbonylowej (najczęściej wykorzystywanej do przyłączenia innych związków), po drugie w połączeniu z chlorem(III) sodu do otrzymywania kwasów uronowych. W związku z tym przykłady jej wykorzystania zostaną również omówione w dwóch grupach.



Schemat 8

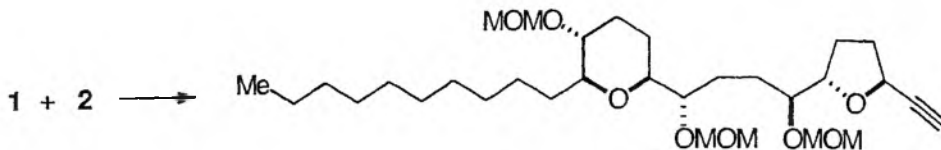
Reakcje addycji do grupy karbonylowej są powszechnie znane. Wykorzystuje się je również w preparatyce pochodnych cukrów. Od pewnego czasu zainteresowanie chemików zwróciło się w kierunku otrzymywania analogów nukleotydów, które z jednej strony opierałyby się działaniu enzymów, a z drugiej strony posiadałyby właściwości antywirusowe i przeciwrakowe. Przykładami takich związków mogą być analogi nukleotydów, w których przy atomie węgla C-5 znajdują się grupy fosforanowe połączone nie tradycyjnie wiązaniem P–O–C ale wiązaniem P–C.



Rysunek 2

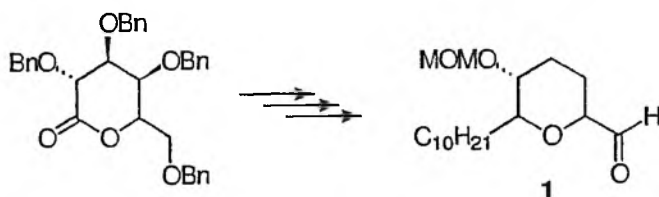
Związki takie zostały otrzymane z odpowiednio chronionych nukleozydów zawierających wolne terminalne grupy hydroksylowe, które poddano utlenieniu metodą Swerna a następnie nukleofilowej addycji szeregu estrów kwasu fosforowego otrzymując pożądane produkty [23].

Ciekawym przykładem wykorzystania grupy aldehydowej, otrzymanej w wyniku utleniania metodą Swerna, jest synteza jednego z fragmentów mukocyny.



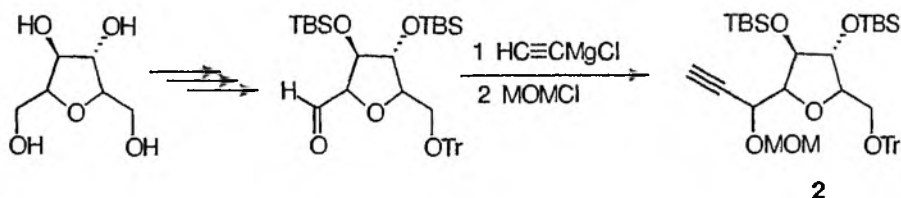
Schemat 9

Ten niecukrowy związek, zgodnie ze schematem, otrzymano [24] z dwóch odpowiednio przygotowanych substratów. W obu przypadkach substratami były pochodne cukrów. Związek 1 otrzymano na drodze szeregu przemian 2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-*D*-galaktono-1,5-laktonu.



Schemat 10

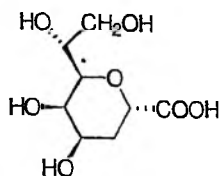
Drugi z substratów 2 otrzymano z 2,5-anhydro-*D*-mannitolu.



Schemat 11

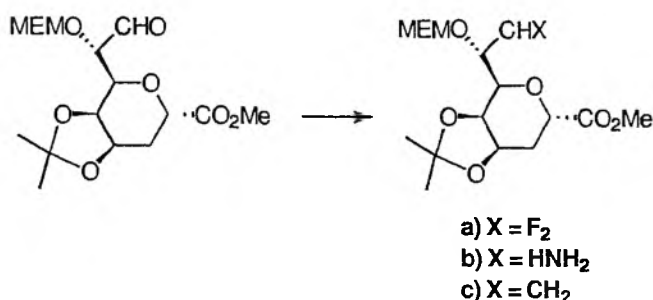
Połączenie obu otrzymanych substratów jest przykładem addycji do grupy karbonylowej. Związek 2 w obecności butylolitu (*n*-BuLi) staje się silnym nukleofilem i w wyniku jego ataku na karbonyłowy atom węgla powstaje związek, który po kilku przemianach daje oczekiwany produkt. Obie wspomniane tu reakcje są bardzo dobrym przykładem wykorzystania metody Swerna do utleniania pierwszorzędowych grup alkoholowych po to aby wykorzystać tak otrzymane grupy aldehydowe do przyłączenia kolejnych fragmentów syntezowanego związku.

Otrzymywanie i badanie aktywności analogów związków czynnych biologicznie często prowadzi do uzyskania związków o silniejszym działaniu inhibującym lub przeciwbakteryjnym. Związkiem inhibującym syntazę CMP-K do jest m.in. kwas 2,6-anhydro-3-deoksy-*D*-glicero-*D*-talo-oktonowy (Kdo).



Rysunek 3

Poddając utlenieniu metodą Swerna jego odpowiednio zabezpieczoną pochodną udało się, wykorzystując właściwości grupy karbonylowej, otrzymać kilka C-8 analogów Kdo [25].



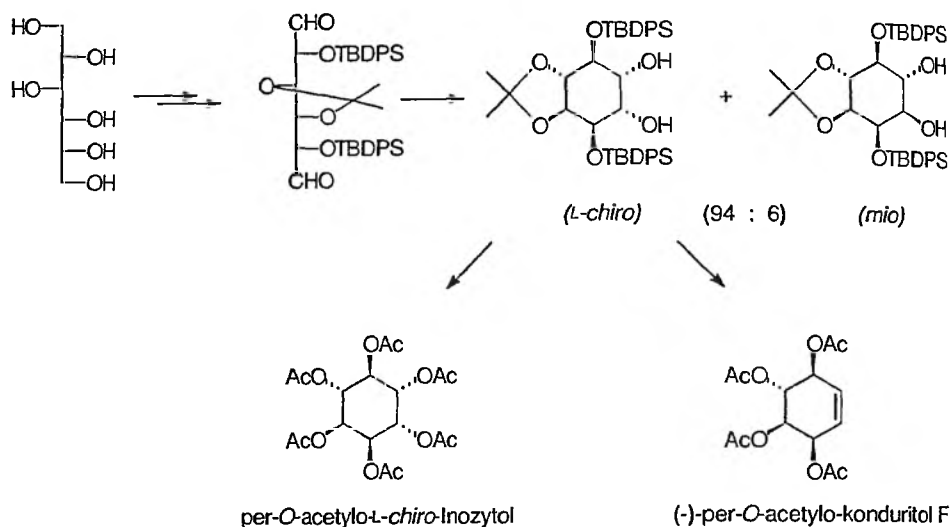
Schemat 12

W pierwszym przypadku działając na grupę karbonylową DAST-em udało się otrzymać związek (a na schemacie 12) zawierający przy atomie węgla C-8 dwa atomy fluoru. Aminowanie redukcyjne pozwoliło otrzymać odpowiednią aminę, a reakcja Wittiga prowadziła do powstania związku z wiązaniem podwójnym, który posłużył do dalszych modyfikacji.

Grupy karbonylowe i karboksylowe powstające w cząsteczkach celulozy w procesie produkcji papieru (podczas wybielania) odpowiedzialne są za mniejszą wytrzymałość włókien celulozy oraz za szybsze żółknięcie papieru. Największym problemem z jakim borykają się laboratoria określające ilościowy udział utlenionych fragmentów jest powtarzalność wyników pomiarów. Na nowy sposób podejścia wpadł Röhrling ze współpracownikami [26] używając znacznika fluorescencyjnego grup karbonylowych. Na związki modelowe, mające imitować celulozę, wybrali 4-*O*-metylo- β -D-glukopiranozyd metylu oraz 4-*O*-metylo- β -D-glukopiranozylo-(1 \rightarrow 4)- β -D-glukopiranozyd metylu. Związki te po przeprowadzeniu w odpowiednic pochodne poddali utlenianiu metodą Swerna. Otrzymali pochodne zawierające grupy 6-aldehydo, 3-keto i 2,3-diketo, które po funkcjonalizowali tak aby mogły stanowić punkt odniesienia w pomiarach.

Od pewnego czasu dużym zainteresowaniem cieszą się związki karbocykliczne. Ciekawy sposób ich otrzymywania ze związków cukrowych poprzez utlenianie metodą Swerna i sprzęganie redukcyjne prezentują dwie kolejne prace.

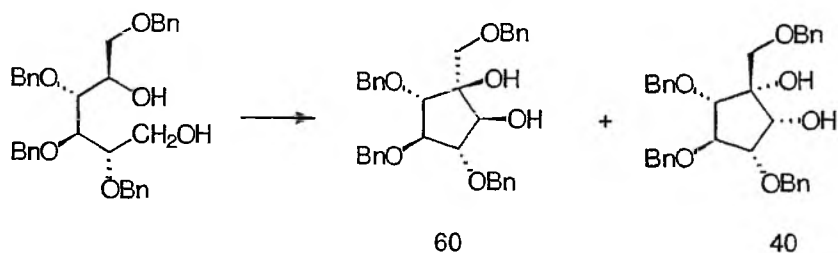
Chiara i Valle [27] opublikowali prace, w której przedstawili metodę otrzymywania *l-chiro*-inozytolu i (-)-konduritolu F z powszechnie dostępnego D-glukitolu.



Schemat 13

Odpowiednio osłoniętą pochodną D-glukitolu, z wolnymi terminalnymi grupami hydroksylowymi, poddali oni utlenianiu metodą Swerna, uzyskując odpowiedni dialdehyd. Tak otrzymany związek poddali wewnątrzcząsteczkowemu sprzężeniu redukcyjnemu w obecności SmI_2 , otrzymując mieszaninę cyklitolu z dużą przewagą produktu o konfiguracji *l-chiro*. Jego acetylowanie prowadziło do *per-O*-acetylowanej pochodnej. Stanowił też on substrat do otrzymania odpowiedniej pochodnej konduritolu F.

Analogiczne podejście, tym razem do otrzymywania cyklitolu o pierścieniu pięciocłonowym, zaprezentowali w swojej pracy Andinolfi wraz ze wsp. [28].

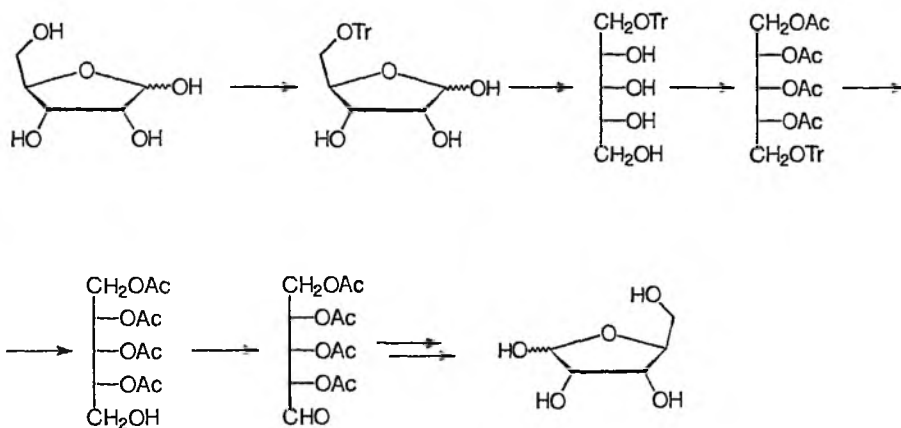


Schemat 14

W syntezie użyto pochodnych alditoli, które autorzy otrzymywali poprzez redukcję odpowiednich pochodnych monosacharydów. Reakcję przeprowadzili dla związków

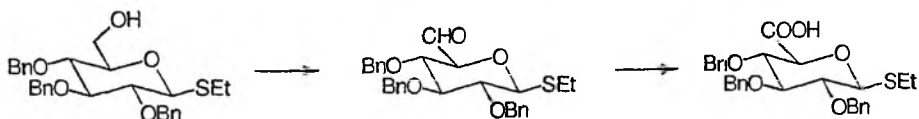
ków o konfiguracji *D*-gluko, *D*-galakto i *D*-manno uzyskując w dwóch pierwszych przypadkach mieszaninę *cis*-cyklitoli w stosunku 3 : 2 i 4 : 1, a w trzecim wyłącznie pojedynczy produkt. Analizując konfigurację otrzymanych produktów stwierdzili, że decydujący wpływ na budowę powstających dioli ma czynnik steryczny – grupy hydroksylowe lokują się po tej stronie gdzie mniej jest dużych podstawników.

Ciekawym przykładem wykorzystania utleniania metodą Swerna jest praca Junga i Xu [29]. Od pewnego czasu zainteresowanie biologów i biochemików skierowało się ku *L*-analogom powszechnie występujących związków (w miejsce cukru o konfiguracji *D* występuje jego enancjomer), w szczególności *L*-nukleozydom oraz *L*-DNA i *L*-RNA. Jak wiadomo cukry o konfiguracji *L* są niezwykle rzadkie w naturze i trzeba je najczęściej otrzymywać syntetycznie. Przykład takiej syntezy stanowi wcześniej wspomniana praca.



Schemat 15

Ponieważ utlenianie metodą Swerna przebiega w łagodnych warunkach wykorzystywana jest ona również w połączeniu z chloranem(III) sodu do otrzymywania kwasów uronowych. Niektóre aglikony, szczególnie w tioglikozydach, są wrażliwe na utlenianie w drastycznych warunkach. W takich przypadkach dobrym utleniaczem okazuje się być DMSO [30].

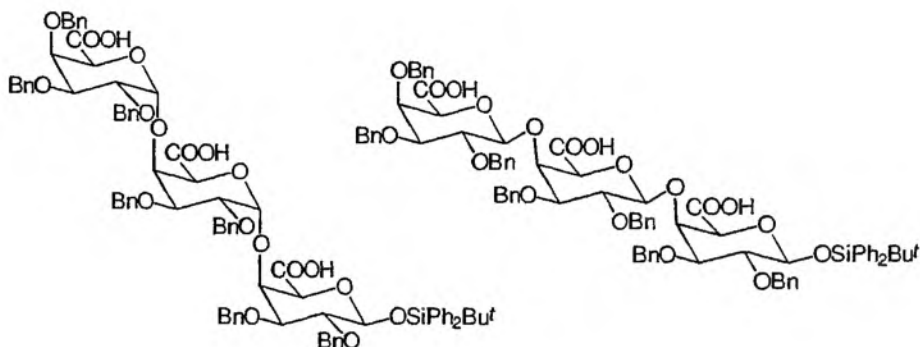


Schemat 16

Mistra i Roy poddali utlenieniu 2,3,4-tri-*O*-benzylo-1-tio- β -*D*-glukopiranozyd etylu mieszaniną DMSO i bezwodnika kwasu octowego, a uzyskany w ten sposób aldehyd bez dalszego oczyszczania przeprowadzili w pochodną kwasu uronowego

działając chloranem(III) sodu. W tej samej pracy opisany jest inny przykład utlenienia, w analogicznych warunkach, grupy C-2-OH do ketonowej w związku, który przy atomie węgla C-3 posiadał podstawnik *O*-allilowy nie ulegający zmianie w warunkach prowadzonej reakcji.

Na przełomie lat osiemdziesiątych i dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku Nakahara i Ogawa opublikowali szereg interesujących prac dotyczących homooligosacharydowych połączeń kwasu D-galaktouronowego. Początkowo otrzymali dekasacharyd zbudowany z cząsteczek D-galaktozy z wolnymi terminalnymi grupami hydroksylowymi [31]. Tak otrzymany związek poddali oni utlenianiu za pomocą DMSO w obecności chlorku oksalilu a następnie zastosowali NaClO_2 , uzyskując oczekiwany polimer. Na końcu redukującym zawierał on grupę *O*-allilową. Próby jej usunięcia przy użyciu katalizatora Wilkinsona $[(\text{Ph}_3\text{P})_3\text{RhCl}]$ niestety zakończyły się niepowodzeniem, prowadząc do powstania ugrupowania 2-oksopropylowego. Taki wynik skłonił autorów do zmiany zabezpieczenia. Tym razem wybrali grupę *t*-butylodifenylosililową jako łatwą do usunięcia. Jako związki modelowe, przed przystąpieniem do syntezy dłuższych fragmentów, użyli dwa trisacharydy zbudowane z jednostek kwasu D-galaktouronowego połączonych wiązaniem α lub β -(1→4) glikozydowym [32].

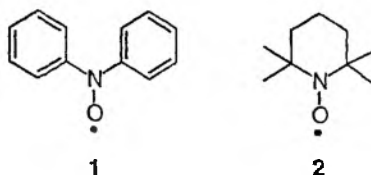


Rysunek 4

Oba te związki otrzymali poprzez utlenianie odpowiednich trisacharydowych substratów z wolnymi terminalnymi grupami OH. Tym razem usunięcie osłon, włącznie z grupą sililową na redukującym końcu, przebiegło bez trudności. Wykorzystali w ten sposób zdobyte doświadczenie w syntezie dodekasacharydu zbudowanego z jednostek kwasu D-galaktouronowego połączonych wiązaniem (1→4) o konfiguracji α . Na podstawie przedstawionych przykładów można uznać, że metoda Swerna i dalsze utlenianie za pomocą NaClO_2 przebiega w łagodnych warunkach nie naruszając wrażliwych osłon (*O*-Ac, *O*-All czy *O*-sililowej) i jest na tyle skuteczne, że nadaje się do utleniania układów o znacznej masie cząsteczkowej.

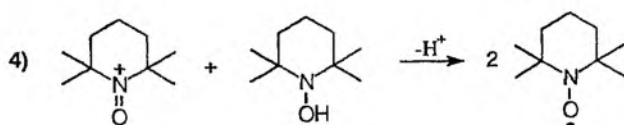
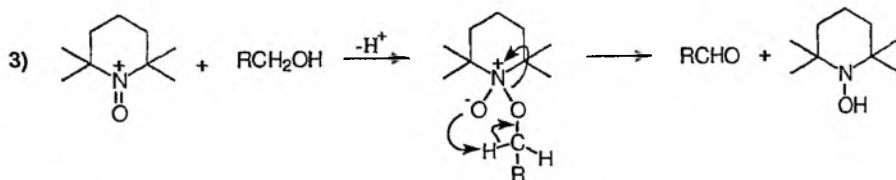
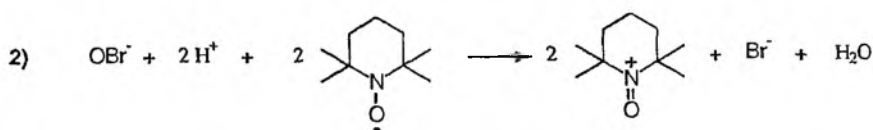
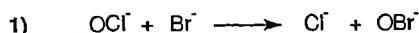
4. UTLENIANIE W OBECNOŚCI TEMPO

Stabilne rodniki nitroksylowe znane są już od początku ubiegłego wieku. Ich trwałość wynikała ze stabilizacji poprzez efekt mezomeryczny (związek **1**).



Rysunek 5

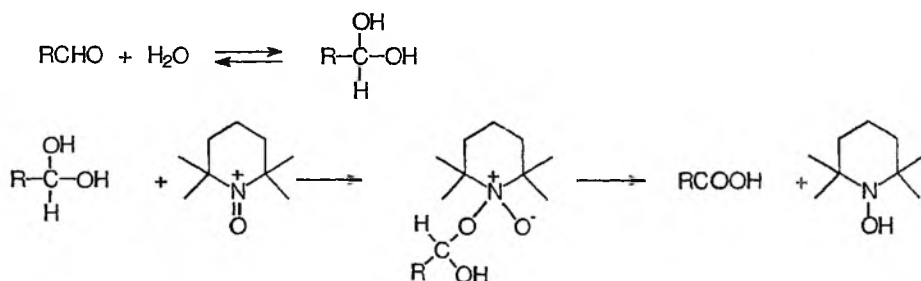
Pierwszy stabilny rodnik nitroksylowy, w którym niesparowany elektron zde-lokalizowany był wyłącznie na wiązanie azot-tlen (**2**) otrzymali w roku 1960 Lebedev i Kazarnovskii [33]. Związek ten [2,2,6,6,-tetrametylo(piperydyn-1-yloksyl), TEMPO] doczekał się wielu analogów, z których szersze zastosowanie znalazły jego modyfikacje w pozycji C-4. Istotnym warunkiem stabilności tego typu rodników jest brak atomu wodoru w położeniu α w stosunku do atomu azotu. Łatwość z jaką ulegają one zarówno utlenieniu jak i redukcji spowodowała, że znalazły szerokie zastosowanie, w tym również do utleniania alkoholi. Najbardziej praktyczną i użyteczną metodę utleniania alkoholi pierwszo- i drugorzędowych opracował Anelli ze współpracownikami [34–36]. Reakcja prowadzona jest w dwóch niemieszających się rozpuszczalnikach (dichlorometan-woda).



Schemat 17

Związkiem regenerującym czynnikiem utleniającym (jon oksoamoniowy) jest w tej metodzie chloran(I) sodu. Wartość pH w granicach 8,5–9,5 zapewnia obecność wodorowęglanu lub wodorotlenku sodu. Mechanizm tej reakcji nie jest jednoznaczny ale najczęściej przyjmowana jest wersja prezentowana poniżej.

Zgodnie z przedstawionym mechanizmem reagują zarówno alkohole pierwszo- jak i drugorzędowe, przy czym te drugie znacznie wolniej, co czyni z tej metody selektywne narzędzie utleniania pierwszorzędowych grup hydroksylowych. Rola jaką odgrywa w reakcji TEMPO określana jest nie jako katalizator lecz mediator. Utlenianie utworzonych z alkoholi aldehydów przebiega w jego obecności wolno, co pozwala zatrzymać je na etapie związków karbonylowych. Warto tutaj zwrócić uwagę na wkład Polaków w poznanie mechanizmu tej reakcji. R. Siedlecka wraz ze wsp. [37] jako jedni z pierwszych badali wykorzystanie rodników nitroksylowych do utleniania alkoholi pierwszo- i drugorzędowych oraz dioli. Stwierdzili oni wpływ podstawnika przy C-4 mediatora. Zauważyli, że użycie TEMPO w miejsce wcześniej używanego 4-okso-TEMPO powoduje w znacznej mierze zatrzymanie reakcji na etapie aldehydu. Dalsze jego utlenienie do kwasu wymaga obecności katalizatora przeniesienia fazowego (najczęściej są to czwartorzędowe sole amoniowe dlatego, że przebiega ono w wodzie).



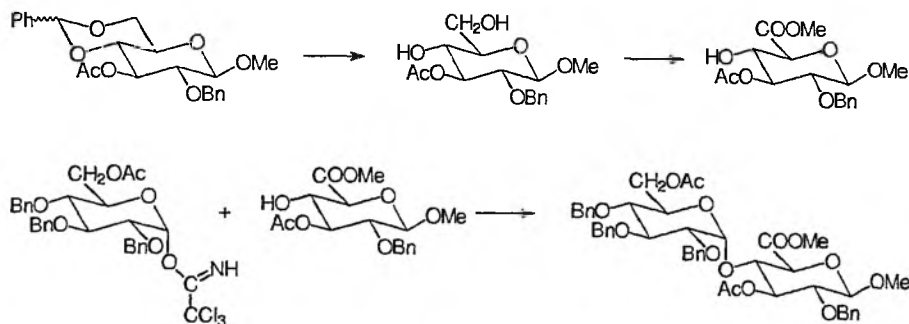
Schemat 18

Jak poprzednio utlenieniu ulega grupa hydroksylowa *gem*-diolu, znajdującą się w równowadze z formą aldehydową, co przedstawiono na schemacie 18. Na przebieg tego ostatecznego etapu, jak wskazuje mechanizm, istotny wpływ ma hydrofilowość związku. Im łatwiej rozpuszcza się on w wodzie tym łatwiej ulega utlenieniu do kwasu. Dlatego też znacznie łatwiej utlenić tą metodą nie w pełni osłonięte cukry (zawierające wolne grupy hydroksylowe) niż te w pełni zablokowane, szczególnie z osłonami zmniejszającymi rozpuszczalność w wodzie.

Historia wykorzystania metody opracowanej przez Ancilliego w preparatyce węglowodanów jest bardzo krótka. Do utleniania cukrów TEMPO/NaClO jako pierwsi użyli Davis i Flitsch [38]. Poddali oni reakcji częściowo osłonięte lub wolne glikozydy uzyskując odpowiednie kwasy uronowe. Stwierdzili przy tym, że w warunkach prowadzonej reakcji drugorzędowe grupy hydroksylowe ulegały utlenieniu

tylko w nieznacznym stopniu, a grupy OAc, OBn i *O*-izopropylidenowe nie ulegały naruszeniu. Porównując utlenianie glikozydów metylu i *n*-oktylu nie stwierdzili wpływu wielkości aglikonu na przebieg reakcji.

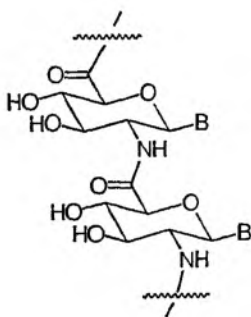
Wspomniana wyżej praca stanowiła wstęp do badania możliwości wykorzystania tej techniki w syntezie bardziej złożonych układów. Ci sami autorzy rok później [39] opublikowali pracę, w której otrzymywali disacharydy zawierające jednostki kwasów uronowych.



Schemat 19

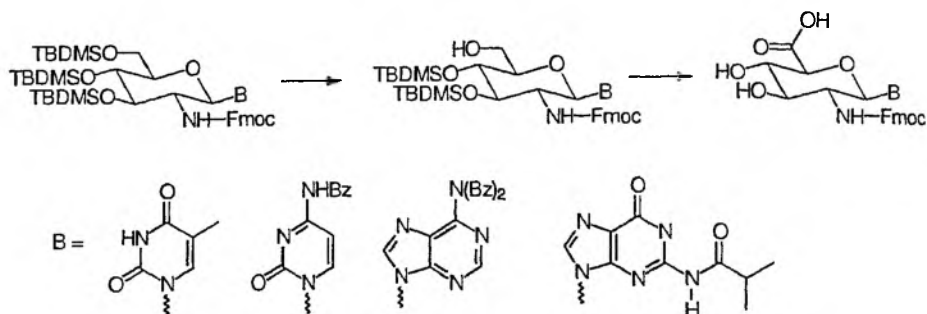
W tak otrzymanym disacharydzie usuwali oni grupy osłonowe a powstałe grupy hydroksylowe poddawali *O*-siarczanowaniu. Analogiczne pochodne otrzymali utleniając pochodne L-idpiranozydu metylu. Otrzymane siarczanowe pochodne stanowiły analogi występujące w disacharydowych fragmentach heparynu.

Szczególnym zainteresowaniem chemików i biochemików cieszą się analogi naturalnie występujących związków. Wśród nich poczesne miejsce zajmują analogi kwasów nukleinowych. Ciekawą pracę dotyczącą tej tematyki opublikował Goodnow wraz ze współpracownikami [40]. Zajmowali się oni syntezą liniowego polimeru zbudowanego z jednostek D-glukozaminy zawierających zasady purynowe i pirymidynowe związane z glikozydowym atomem węgla.



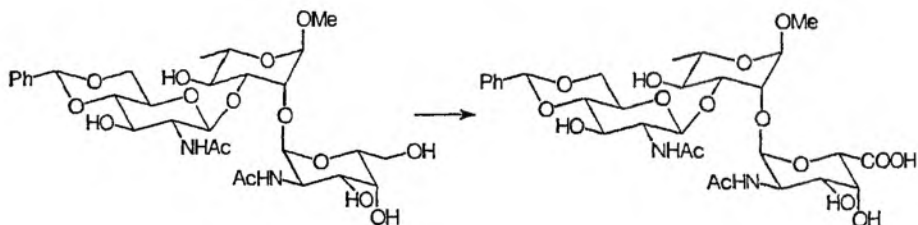
Rysunek 6

Otrzymanie odpowiedniego polimeru wymagało uprzedniego zsyntezowania poszczególnych monomerów. Ich synteza składała się z czterech etapów: a) otrzymania odpowiednich glikozylowanych zasad nukleinowych, b) wymiany grup osłonowych, c) selektywnego uwolnienia terminalnej grupy hydroksylowej i d) jej utlenienia. Fragment syntezy przedstawia poniższy schemat.



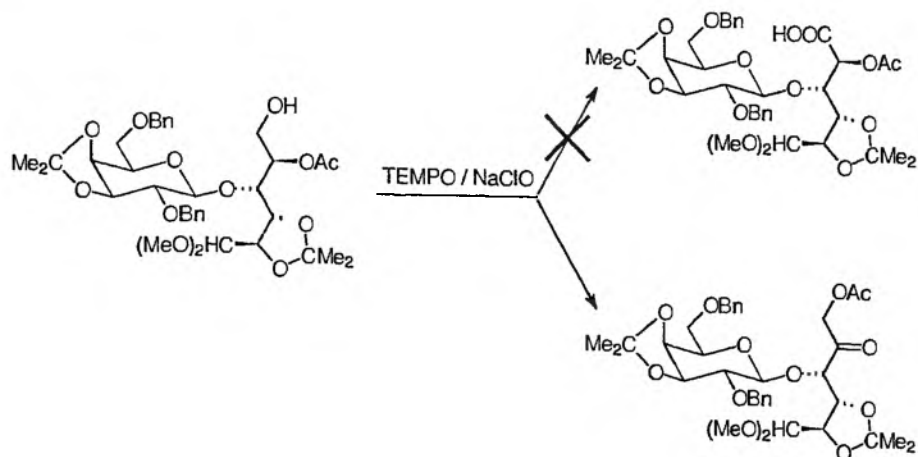
Utlenianie glikozylowanych zasad azotowych (w tym także nukleinowych) wymaga stosowania łagodnych warunków. W pierwszej fazie przebiegało ono w obecności TEMPO/NaClO, a następnie użyto NaClO₂.

Dotychczas przedstawione przykłady dotyczyły wykorzystania TEMPO do utleniania prostych układów. W omawianych warunkach Söderman i Widmalm podali utlenieniu trisacharyd [41].



Sprawą, na którą warto zwrócić uwagę w tej syntezie jest fakt utleniania terminalnej grupy hydroksylowej dopiero po usunięciu większości osłon. Zgodnie z przedstawionym wcześniej mechanizmem, aby zaszło utlenianie do kwasu uronowego, związek musi być wystarczająco dobrze rozpuszczalny w wodzie. Im wyższa jego rozpuszczalność tym większa wydajność procesu utleniania.

Mimo tego, że utlenianie w obecności TEMPO zachodzi w łagodnych warunkach także i w tym przypadku można natrafić na procesy uboczne. Przykładem może być nieoczekiwany wynik eksperymentu na jaki natknął się Attolino ze wsp. Podali oni utlenieniu odpowiednio przygotowaną pochodną laktozy [42].



Schemat 22

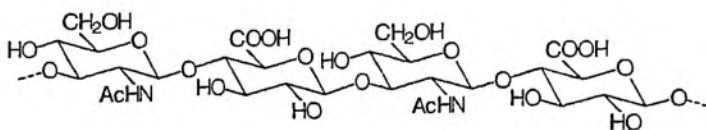
Niestety podczas jej utleniania zamiast oczekiwanego kwasu uronowego otrzymywali pochodną 5-uloży. Okazało się, że w warunkach tej reakcji szybciej niż utlenianie zachodzi migracja grupy acetylowej z drugorzędowego atomu węgla do pierwszorzędowego. Autorom udało się rozwiązać ten problem stosując wstępne utlenianie związkami rutenu do odpowiedniego aldehydu, a następnie TEMPO/NaClO do kwasu.

Analiza możliwości wykorzystania TEMPO w procesach utleniania węglowodanów wskazuje, że odczynnik ten znajduje szczególnie zastosowanie do utleniania naturalnie występujących oligo- i polisacharydów. Związki te bez uprzedniego przeprowadzania w pochodne można poddawać reakcji utleniania pierwszorzędowych grup hydroksylowych wykorzystując znaczną selektywność tej metody. Przykładem może być praca Frachiniego i Vignona dotycząca utleniania β -cyklodekstryn [43]. Udało się im otrzymać i udowodnić budowę szeregu pochodnych cyklicznych oligosacharydów zawierających od jednej do siedmiu grup karboksylowych.

Alginyiany są naturalnie występującymi nierozgałęzionymi koopolimerami kwasów β -D-mannouronowego i α -L-gulouronowego połączonych wiązaniem 1 \rightarrow 4. Naturalnie jest on syntezowany w ten sposób, że najpierw powstaje polimer kwasu β -D-mannouronowego, w którym pod wpływem C-5-epimerazy część jednostek sacharydowych ulega izomeryzacji do kwasu α -L-gulouronowego (zmiana konfiguracji atomu węgla C-5 w nomenklaturze węglowodanów wyraża się zmianą nazwy i konfiguracji z D na L, a także konsekwentnie zmianą oznaczenia anomeru). Zawartość kwasu β -L-gulouronowego w alganach może się wahać w zakresie od 33 do 66% co ma konsekwencje w ich właściwościach fizykochemicznych (m.in. zdolność do tworzenia żeli). Podobnej do tej naturalnej przemiany dokonali Chang i wsp. [44] na 11 wybranych polisacharydach. Poddali utlenieniu m.in. skrobię z ziaren pszenicy, amylozę i amylopektynę z ziemniaka przy użyciu TEMPO/NaClO. Tak uzyskane polimery poddali działaniu C-5-epimerazy. Zawartość powsta-

łego w ten sposób kwasu L-idouronowego sięgała od 33 do 87%, co znalazło swoje odbicie w łatwości tworzenia żeli oraz szybkości hydrolizy (wiązania β -O-glikozydowe hydrolizują znacznie wolniej).

W czasie utleniania polisacharydów omawianą metodą mogą też jednak zachodzić niekorzystne procesy. Nie wynika to jednak z samej metody ale, jak wykazali Jiang i wsp., z natury powstającego produktu [45]. Badali skutki utleniania hialuronianu czyli naturalnie występującego polimeru zbudowanego z cząsteczek *N*-acetylo-D-glukozaminy i kwasu D-glukouronowego połączonych wiązaniem β -(1 \rightarrow 4). Te powtarzające się disacharydowe fragmenty połączone są wiązaniem β -(1 \rightarrow 3).

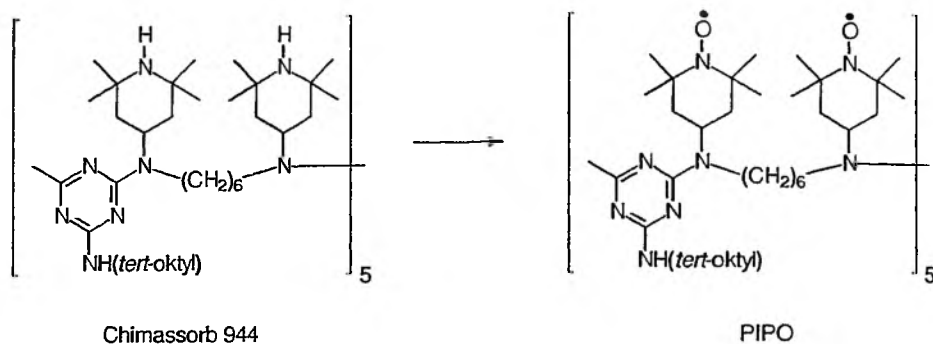


Schemat 23

Aby uniknąć reakcji ubocznych wybrali łagodne warunki utleniania, za jakie niewątpliwie należy uznać utlenianie w obecności TEMPO/NaClO. Analizując produkty reakcji utleniania stwierdzili, że w powstałych związkach utlenieniu uległy wyłącznie grupy hydroksymetylowe. Autorów zaskoczył wynik eksperymentu ponieważ masa cząsteczkowa powstających produktów była prawie dwukrotnie niższa niż substratu. Wskazywało to na zachodzące w czasie utleniania procesy degradacji. Ponieważ zmiany stężenia NaClO nie wpływały na przebieg reakcji doszli oni do wniosku, że proces degradacji wydaje się mieć podłoże we własnościach powstającego produktu utleniania. Stwierdzili natomiast wpływ grup karboksylowych substratu i powstającego produktu na przebieg reakcji. Oddziaływanie anionów karboksylanowych z aktywnym w procesie utleniania kationem oksoamoniowym powoduje najprawdopodobniej zmianę stężenia czynnika utleniającego, a co za tym idzie ma wpływ na szybkość reakcji.

Możliwość selektywnego utleniania grup hydroksymetylowych w cukrach może w przyszłości znaleźć zastosowanie do otrzymywania pochodnych kwasu D-glukouronowego ze skrobi. Przykład otrzymywania takich pochodnych z trudnodostępnych α - i β -glukopiranozylo-1-fosforanów oraz fluorków α -D-glukopiranozylu przedstawili Heeres wraz ze wsp. [46]. Odpowiednio otrzymane na drodze enzymatycznej fosforany oraz fluorki glukopiranozylu, otrzymane poprzez hydrolizę skrobi za pomocą HF, poddali oni utlenianiu TEMPO/NaClO uzyskując dobre rezultaty. Za istotny, szczególnie w przypadku syntezy na dużą skalę, uznali oni problem odzyskiwania ze środowiska reakcji mediatora jakim jest TEMPO. Powodowałoby to z jednej strony możliwość jego powtórnego użycia, co zmniejszyłoby koszty, z drugiej strony usuwałoby najprawdopodobniej toksyczny rodnik. Stwierdzili oni, że TEMPO można odzyskiwać poprzez azcotropowe oddestylowanie. Jed-

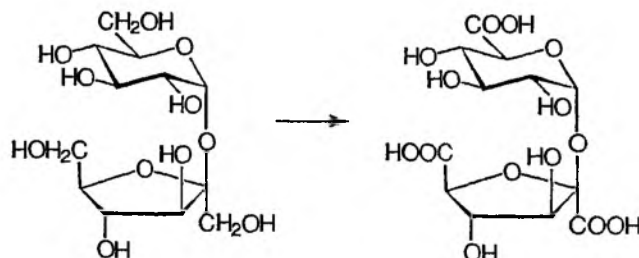
Obok matryc krzemionkowych także inne polimery znalazły zastosowanie przy osadzaniu TEMPO. Przykład może stanowić mediator zwany PIPO. Otrzymano go z handlowo dostępnego polimeru Chimassorb 944 na drodze utleniania nadtlenkiem wodoru w obecności $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.



Schemat 26

Użycie tego mediatora zaprezentowali Dijksman, Arends i Sheldon [48]. Z dobrymi rezultatami utleniali oni alkohole mono- i poliwdorotlenowe (w tym α -D-glukopiranozyd metylu) stwierdzając selektywność porównywalną do wyników z zastosowaniem nie osadzonego na nośniku TEMPO oraz mniejszą niż 5% utratę wydajności odzyskanego mediatora (związaną raczej z mechanicznym odzyskiwaniem PIPO niż z utratą jego właściwości).

Zauważono, że ultradźwięki powodują przyspieszenie reakcji z odczynnikiem TEMPO/ NaClO [49, 50], podobnie jak w analogicznej przemianie metodą Jonesa. Poddając utlenianiu α -D-glukopiranozyd metylu oraz sacharozę w łaźni ultradźwiękowej udało się otrzymać odpowiednie kwasy. W przypadku utleniania sacharozy otrzymano związek zawierający trzy grupy karboksylowe.

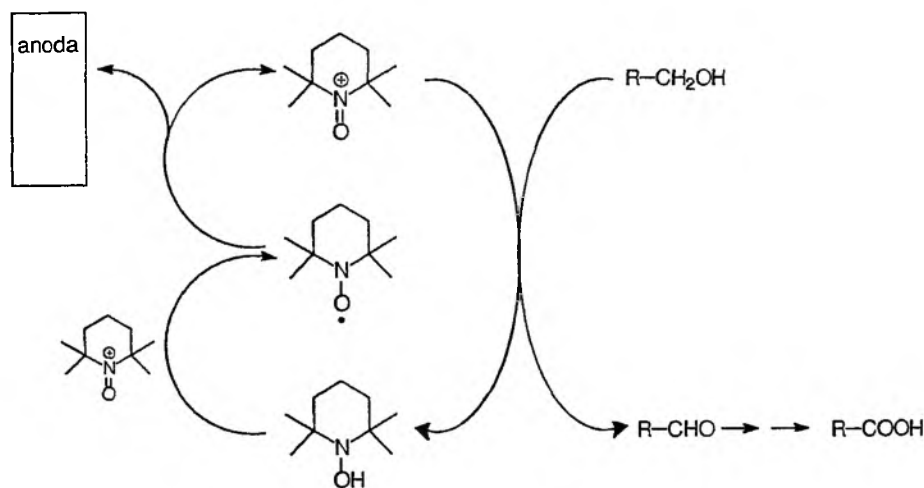


Schemat 27

Warto odnotować, że stopniowe dodawanie NaClO do mieszaniny reagującej zawierającej sacharozę powodowało jej selektywne utlenianie zgodnie ze schematem

27 i proces zachodził z dobrą wydajnością. Natomiast jednorazowe wprowadzenie środka utleniającego powodowało utlenianie drugorzędowych grup hydroksylowych w jednostce fruktozy obniżając tym samym wydajność procesu. Obserwowany wynik reakcji potwierdza wcześniejsze spostrzeżenia [51, 52] o łatwiejszym utlenianiu drugorzędowych grup OH w pierścieniu furanozowym niż piranozowym. Jednak ultradźwięki nie tylko przyspieszały proces utleniania (tak było w przypadku standardowej procedury kiedy dodawano KBr). Powszechnie uważa się, że dodatek soli bromkowej jest niezbędny, co wynika z wcześniej prezentowanego mechanizmu (schemat 17). Jednak w przypadku mieszaniny poddawanej działaniu TEMPO/NaClO i ultradźwięków stwierdzono, że reakcja zachodzi nawet przy braku KBr. Zdaniem autorów rzuca to nowe światło na rolę KBr w tym procesie i powoduje, że staje się ona nie tak jednoznaczna jak to się wcześniej wydawało.

Użycie TEMPO w reakcjach utleniania wymaga użycia czynnika utleniającego powodującego tworzenie się jonu oksoamoniowego (najczęściej jest nim NaOCl). Utlenianie tej klasy związków może również zachodzić na drodze elektrochemicznej. Przykładem takiego podejścia jest praca Schnatbauma i Schäfera [53].



Schemat 28

Anodowe utlenianie szeregu cukrów (w tym również disacharydów i polisacharydów) w obecności TEMPO daje często lepsze rezultaty niż utlenianie chemiczne. Prostota tej metody, zdaniem autorów, rokuje nadzieję jej przemysłowego zastosowania.

PODZIĘKOWANIE

Chcielibyśmy wyrazić podziękowanie Panu profesorowi Andrzejowi Wiśniewskiemu za pomoc przy pisaniu tej pracy oraz za cenne wskazówki, a szczególnie za te związane z nomenklaturą związków cukrowych.

PIŚMIENICTWO CYTOWANE

- [1] a) P. Fugedi, *J. Carbohydr. Chem.*, 1987, 6, 377; b) Y. Nakahara, T. Ogawa, *Tetrahedron Lett.*, 1987, 28, 2731.
- [2] K. Bowden, I.M. Heilbron, E.R.H. Jones, *J. Chem. Soc.*, 1946, 39.
- [3] I.M. Heilbron, E.R.H. Jones, F. Sondheimer, *J. Chem. Soc.*, 1949, 604.
- [4] L.J. Haynes, I.M. Heilbron, E.R.H. Jones, F. Sondheimer, *J. Chem. Soc.* 1947, 1583.
- [5] I.M. Heilbron, E.R.H. Jones, F. Sondheimer, *J. Chem. Soc.*, 1947, 1586.
- [6] G.O. Aspinall, R.E. Barron, *Can. J. Chem.*, 1972, 50, 2203.
- [7] P. Kovač, *Carbohydr. Res.*, 1972, 22, 464.
- [8] P. Kovač, *Carbohydr. Res.*, 1973, 31, 323.
- [9] A. Ya. Chernyak, K.V. Antonov, N.K. Kochetkov, L.N. Padyukov, N.V. Tsvetkova, *Carbohydr. Res.*, 1985, 141, 199.
- [10] O. Holst, L. Brade, P. Kosma, H. Brade, *J. Bacteriol.*, 1991, 173, 1862.
- [11] M.B. Carter, P.A. Petillo, L. Anderson, L.E. Lerner, *Carbohydr. Res.*, 1994, 258, 299.
- [12] R.N. Rej, J.N. Glushka, W. Chew, A.S. Perlin, *Carbohydr. Res.*, 1989, 189, 135.
- [13] I. Kitagawa, A. Kadota, M. Yoshikawa, *Chem. Pharm. Bull.*, 1978, 26, 3825.
- [14] V.I. Betaneli, A. Ya. Ott, O.V. Brukhanova, N. Kotchetkov, *Carbohydr. Res.*, 1988, 179, 37.
- [15] Ch. Tabeur, F. Machetto, J.M. Mallet, P. Duchaussoy, M. Petit, P. Sinay, *Carbohydr. Res.*, 1996, 281, 253.
- [16] N.M. Allanson, D. Liu, F. Chi, R.K. Jain, A. Chen, M. Ghosh, I. Hong, M.J. Sofia, *Tetrahedron Lett.*, 1998, 39, 1889.
- [17] S. Signorella, M.I. Frascaroli, S. Garcia, M. Santoro, J.C. Gonzales, C. Palopoli, V. Daier, N. Casado, L.F. Sala, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 2000, 1617.
- [18] K.M. Halkes, T.M. Slaghek, T.K. Hyppönen, P.H. Kruiskamp, T. Ogawa, J.P. Kamerling, J.F.G. Vliegthart, *Carbohydr. Res.*, 1998, 309, 161.
- [19] P.J. Garegg, B. Samuelsson, *Carbohydr. Res.*, 1978, 67, 267.
- [20] E.J. Corey, B. Samuelsson, *J. Org. Chem.*, 1984, 49, 4735.
- [21] M. Nilsson, C.M. Svahn, J. Westman, *Carbohydr. Res.*, 1993, 246, 161.
- [22] K. Omura, D. Swern, *Tetrahedron*, 1978, 34, 1651.
- [23] Š. Králiková, M. Budešínský, M. Masojdková, I. Rosenberg, *Tetrahedron Lett.*, 2000, 41, 955.
- [24] S. Takahashi, T. Nakata, *Tetrahedron Lett.*, 1999, 40, 723.
- [25] J. Tadanier, C. Lee, D. Whittern, N. Wideburg, *Carbohydr. Res.* 1990, 201, 185.
- [26] J. Röhring, A. Pothast, T. Lange, T. Rosenau, I. Adorjan, A. Hofinger, P. Kosma, *Carbohydr. Res.*, 2002, 337, 691.
- [27] J.L. Chiara, N. Valle, *Tetrahedron: Asymmetry*, 1995, 6, 1895.
- [28] M. Adinolfi, G. Barone, A. Iadonisi, L. Mangoni, *Tetrahedron Lett.*, 1998, 39, 2021.
- [29] M.E. Jung, Y. Xu, *Tetrahedron Lett.*, 1997, 38, 4199.
- [30] A.K. Mishra, N. Roy, *Carbohydr. Res.*, 1995, 278, 103.
- [31] Y. Nakahara, T. Ogawa, *Carbohydr. Res.*, 1989, 194, 95.

- [32] Y. Nakahara, T. Ogawa, *Carbohydr. Res.*, 1990, **200**, 363.
- [33] O.L. Lebedev, S.N. Kazamovskii, *Zhur., Obshch. Khim.*, 1960, **30**, 1631; *Chem. Abstr.*, 1961, **55**, 1473a.
- [34] P.L. Anelli, C. Biffi, F. Montanari, S. Quici, *J. Org. Chem.*, 1987, **52**, 2559.
- [35] P.L. Anelli, S. Banfi, F. Montanari, S. Quici, *J. Org. Chem.*, 1989, **54**, 2970.
- [36] P.L. Anelli, F. Montanari, S. Quici, *Org. Synth.*, 1990, **69**, 212.
- [37] R. Siedlecka, J. Skarżewski, J. Młochowski, *Tetrahedron Lett.*, 1990, **31**, 2177.
- [38] N.J. Davis, S.L. Flitsch, *Tetrahedron Lett.*, 1993, **34**, 1181.
- [39] N.J. Davis, S.L. Flitsch, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 1, 1994, 359.
- [40] R.A. Goodnow Jr., A.R. Richou, S. Tam, *Tetrahedron Lett.*, 1997, **38**, 3195.
- [41] P. Söderman, G. Widmalm, *Eur. J. Org. Chem.*, 2001, 3453.
- [42] E. Atolino, G. Catelani, F. D'Andrea, L. Puccioni, *Carbohydr. Res.*, 2002, **337**, 991.
- [43] C. Fraschini, M.R. Vignon, *Carbohydr. Res.*, 2000, **328**, 585.
- [44] P.S. Chang, R. Mukerjia, D.B. Fulton, J.F. Robyt, *Carbohydr. Res.*, 2000, **329**, 913.
- [45] B. Jiang, E. Drouet, M. Milas, M. Rinaudo, *Carbohydr. Res.*, 2000, **327**, 455.
- [46] A. Heeres, H.A. van Doren, K.F. Gotlieb, I.P. Blecker, *Carbohydr. Res.*, 1997, **299**, 221.
- [47] R. Ciriminna, J. Blum, D. Avinr, M. Pagliaro, *Chem. Commun.*, 2000, 1441.
- [48] A. Dijkman, I.W.C.E. Arends, R.A. Sheldon, *Chem. Commun.*, 2000, 271.
- [49] S. Lemoine, C. Thomazeau, D. Joannard, S. Trombotto, G. Descotes, A. Bouchu, Y. Queneau, *Carbohydr. Res.*, 2000, **326**, 176.
- [50] S. Brochette-Lemoine, S. Trombotto, D. Joannard, G. Descotes, A. Bouchu, Y. Queneau, *Ultrasonics Sonochemistry*, 2000, **7**, 157.
- [51] A.E.J. de Nooy, A.C. Besemer, H. van Bekkum, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, 1994, **113**, 165.
- [52] A.E.J. de Nooy, A.C. Besemer, H. van Bekkum, *Carbohydr. Res.*, 1995, **269**, 89.
- [53] K. Schnatbaum, H.J. Schäfer, *Synthesis*, 1999, **5**, 864.

Praca wpłynęła do Redakcji 22 października 2002

NATURALNE I SYNTETYCZNE NIECUKROWE SUBSTANCJE SŁODKIE

NATURAL AND SYNTHETIC NON-SACCHARIDE SWEETENERS

Michał Uher^a, Halina Wójtowicz^b

^a *Katedra Chemii Organicznej,*

*Wydział Technologii Chemicznej Słowackiego Uniwersytetu Technicznego,
Radlinskeho 9, 81237 Bratislava, Słowacja*

^b *Instytut Chemii Organicznej, Biochemii i Biotechnologii, Politechnika Wroclawska,
Wybrzeże Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław*

Abstract

Wstęp

1. Substancje słodkie pochodzenia naturalnego

1.1. Białka (taumatyna, monelina, mabinlina, pentadyna i brazcina)

1.2. Terpenoidy

1.2.1. Monoterpenoidy (aldehyd perilowy, perilartyna)

1.2.2. Seskwiterpenoidy (hernandulcyna, (+)-4 β -hydroksyhermandulcyna)

1.2.3. Diterpenoidy (stewiozyd, rubuzozyd, bajnozyd, gaudichaudiozyd A)

1.2.4. Triterpenoidy (glicyryzyna, apioglicyryzyna i araboglicyryzyna, periandryny, mogrozydy, karnozyflozydy, brujodulkozyd, abruzozydy)

1.3. Steroidowe saponiny (osładyna, polipodozyd A, pterokariozydy A i B)

1.4. Dihydroizokumaryny (filodulcyna)

1.5. Flawanoidy, chalkony, dihydrochalkony i dihydroflawanole

1.6. Inne substancje słodkie pochodzenia naturalnego (hematoksylina, telosmozydy, monatyna)

2. Syntetyczne niskokaloryczne środki słodzące (sacharyna, cyklaminiany, acesulfam-K, aspartam, alitam, neotam, sukraloza)

Podsumowanie

Piśmiennictwo cytowane



Prof. dr Michał Uher, urodzony w 1936 roku, jest profesorem w Słowackim Uniwersytecie Technicznym w Bratysławie. W roku 1960 ukończył Wydział Chemiczny Słowackiego Uniwersytetu Technicznego, gdzie uzyskiwał kolejne stopnie naukowe i tytuły: dr w 1968, docenta w 1985, stanowisko profesora w 1998 i tytuł profesora w roku 1999. Pracuje w Katedrze Chemii Organicznej Słowackiego Uniwersytetu Technicznego w Bratysławie jako profesor chemii bioorganicznej. Do roku 1983 zajmował się chemią izotiocyjnianów, potem chemią tlenowych związków heterocyklicznych (4-pirano-

ny) oraz naturalnymi i syntetycznymi substancjami słodkimi. Jest autorem 11 monografii, 150 oryginalnych prac naukowych i 40 patentów. Odbył staże naukowe w Hawanie (Kuba), Krakowie, Wrocławiu i Toruniu (Polska). Współpracuje z Akademią Rolniczą w Krakowie i Politechniką Wrocławską. Jest redaktorem naczelnym „Biuletynu SCHS” – czasopisma Słowackiego Towarzystwa Chemicznego.



Dr inż. Halina Wójtowicz, w 1972 roku ukończyła Wydział Chemiczny Politechniki Wrocławskiej, a później studia doktoranckie. Od roku 1977 jest adiunktem w Instytucie Chemii Organicznej, Biochemii i Biotechnologii Politechniki Wrocławskiej. W latach 1996–2002 pełniła funkcję zastępcy dyrektora Instytutu. Zajmuje się syntezą w obszarze chemii związków fosforu i selenu oraz badaniem reakcji z przeniesieniem tlenu. Jest współautorem kilkunastu prac z tej dziedziny. W 1993 roku odbyła staż naukowy na Uniwersytecie w Antwerpii (Belgia).

ABSTRACT

Sweet tasting food-stuffs have been always, in all probability, an integral part of human diet. This problem concentrate scientific interest of dietetics but also chemists and biologists. In the article actual knowledge on the natural and synthetic non-saccharide sweeteners is reviewed. The sweeteners presented here are divided, depending of their origins, on the compounds isolated from natural sources and compounds synthesized from simple organic precursors.

One of the most important groups of naturally devided sweeteners are peptides [6, 7, 11, 15]. Some of them, particularly thaumatins find practical application as additives to a tooth-paste, food, drinks and drugs [5-7] The majority of intensely sweet naturally occurring compounds belong to the family of terpenoids comprise monoterpenoids [1, 19, 20], sesquiterpenoids [21] as well as di- and triterpenoids [20, 23-25, 29, 30]. Their most prominent representatives such as perillartine, stevioside and glycyrrhizin are presented more detaily. Other groups of sweet tasting naturally occurring substances, mentioned in this paper are steroidal saponins [39, 41], dihydroisocumarins [43, 44], flavanoids and related compounds [47-49, 51-53] and less common species such as haematoxylin [56, 57], telosmosides [58] and monatin [59, 60].

The second part of the article is devoted to synthetic sweeteners [1-3]. The well known representatives such as saccharin [61], cyclamates [62], Acesulfame-K [66], aspartame [1, 2], alitame [71, 72], neotame [73, 74] and sucralose [65, 75] are presented more detaily and methods of their synthesis are briefly reported.

Organoleptic properties of the most compounds are characterized and related to the molecular structure of sweetener is discussed. New trends and perspectives of application non-saccharide sweeteners are formulated.

WSTĘP

Odczuwanie smaku jest procesem złożonym i wciąż nie do końca zbadanym. Pojawia się w wyniku oddziaływania cząsteczek substancji wywołującej smak, z odpowiednim receptorem. Układ sensoryczny u człowieka zawiera kilka rodzajów receptorów smakowych, znajdujących się w różnych strefach języka. Działanie odpowiednich substancji na te receptory wywołuje cztery podstawowe smaki: kwaśny, słony, gorzki i słodki. Receptory znajdują się w grzybkowatych pęcherzykach zwanych kubkami smakowymi, a informacje o ich roli w odczuwaniu różnych smaków są wciąż fragmentaryczne. Receptory powodujące pojawianie się słodkiego smaku znajdują się w przedniej części języka i wiedza dotycząca właśnie tych receptorów jest najobszerniejsza [1]. Związane jest to z faktem, że substancje słodkie są jednymi z podstawowych składników, stosowanych od dawna przez człowieka, do polepszania walorów smakowych wielu produktów spożywczych i leków.

Ze względu na dużą różnorodność występowania, budowy i składu substancji słodkich, przez długi czas, naukowcy nie potrafili znaleźć wspólnych cech wywołujących reakcję receptora. Dopiero w 1963 roku, hipoteza Shallenbergera, poszerzona o spostrzeżenia Kiera, Temussiego oraz Jasieczaka i Zalewskiego [1-3], pozwoliła na wytłumaczenie wzajemnych oddziaływań między substancją, a receptorem. Fundamentalne znaczenie miało zdefiniowanie przez Shallenbergera, podstawowego warunku jaki powinna spełniać substancja oraz centrum aktywne receptora. Przyjął on, że przyczyną słodkiego smaku we wszystkich substancjach z tej grupy, jest występowanie układu AH₂B, zarówno w cząsteczce substancji jak i w centrum aktywnym receptora. Według tej hipotezy, A i B są atomami elektroujemnymi, znajdującymi się blisko siebie w cząsteczce, AH jest grupą kwasową, natomiast B jest akceptorem protonu, oddziałującym jak zasada. Układ AH₂B substancji słodkiej może się wiązać wiązaniem wodorowym, z innym znajdującym się w pobliżu układem AH₂B receptorowego białka. Powstający dwurdzeniowy kompleks wodorowy wywołuje wrażenie słodkiego smaku, a trwałość wiązania wodorowego decyduje o intensywności odpowiedzi.

Rozpoczęte w latach sześćdziesiątych XX wieku i prowadzone do chwili obecnej, próby ilościowego powiązania zaliczności struktura-smak, prowadzone między innymi metodą QSAR (*Quantitative Structure-Activity Relationship*), wciąż nie dają pełnej odpowiedzi na pytanie, jakie funkcje w strukturze związków organicznych są odpowiedzialne za ich smak.

Słodki smak uważa się za jedną z najważniejszych cech wielu węglowodanów, które są podstawowymi, wysokocenergetycznymi składnikami budulcowymi organizmów żywych, zarówno zwierzęcych jak i roślinnych. Właśnie ze względu na ich przyjemny, słodki smak stały się wszechobecnymi dodatkami stosowanymi w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym i w codziennej diecie człowieka. Jednak nadmierne spożycie produktów zawierających węglowodany, powoduje otyłość, rozwój arteriosklerozy, próchnicę zębów, wzrastającą liczbę zachorowań na cukrzycę. Z tego powodu coraz więcej uwagi poświęca się potrawom niskokalorycznym i die-

tetycznym, a to pociąga za sobą potrzebę poszukiwania niskokalorycznych substancji słodkich, o strukturze całkowicie odmiennej od węglowodanów.

Pomimo, obszernej literatury źródłowej dotyczącej nowych słodkich substancji organicznych, zarówno izolowanych z produktów naturalnych, jak i otrzymanych syntetycznie, do chwili obecnej ukazało się zaledwie kilka opracowań o charakterze przeglądowym [1–3], przy czym straciły już one na aktualności.

W niniejszym artykule, będącym rozszerzeniem i uzupełnieniem wcześniejszych opracowań, prezentujemy wyniki badań ostatnich kilkunastu lat, dotyczące poszukiwania nowych naturalnych oraz syntetycznych substancji organicznych, wywołujących bądź posiadających słodki smak.

Spośród opisanych związków organicznych, nie będących węglowodanami i charakteryzujących się bardzo dobrymi walorami smakowymi, tylko niewielka liczba znalazła praktyczne zastosowanie jako zastępcze środki słodzące. Większość z nich charakteryzuje się nietrwałym słodkim smakiem, albo ma niską zdolność słodzącą, bądź jest toksyczna. Te cechy dyskwalifikują je jako substytuty węglowodanów.

Wyjaśnienia wymaga jeszcze sposób pomiaru intensywności słodkiego smaku. Dotychczas nie istnieje żadna metoda instrumentalna do pomiaru słodkości. Względna intensywność słodkiego smaku ocenia się przez odniesienie smaku rozcieńczonego roztworu substancji słodkiej do smaku wzorcowego roztworu sacharozy o ustalonym stężeniu [4]. Oceniona w ten sposób zdolność słodząca, zarówno naturalnych jak i syntetycznych niecukrowych substancji słodkich, jest od 100 do 8000 razy większa od zdolności słodzącej sacharozy.

1. SUBSTANCJE SŁODKIE POCHODZENIA NATURALNEGO

W połowie zeszłego stulecia zainteresowanie substancjami słodkimi pochodzenia naturalnego wyniknęło z potrzeby wprowadzenia na rynek niskokalorycznej, bardzo słodkiej, a zarazem bezpiecznej dla człowieka, substancji, mogącej zastąpić wysokokaloryczny cukier. Wcześniej używane syntetyczne substytuty cukru typu sacharyna, dulcyna, cyklaminy czy P-4000, zostały wycofane z rynku spożywczego i medycznego jako substancje podejrzane o kancerogenność. Powrót do natury wydawał się rozwiązaniem najbardziej właściwym ze względu na to, że wiele roślin, drzew, ziół i owoców zawiera słodkie substancje organiczne pochodzenia naturalnego, nie będąc cukrami. Problemem podstawowym stało się więc izolowanie tych substancji oraz zbadanie ich własności fizycznych, chemicznych i organoleptycznych. Do chwili obecnej znanych jest kilka grup związków organicznych pochodzenia naturalnego, posiadających słodki smak, a zarazem nie wykazujących właściwości toksycznych i kancerogennych. Należą do nich słodkie białka, terpenoidy, steroidy, dihydroizokumaryny czy flawanoidy, różniące się zasadniczo strukturą, jak również posiadające walory smakowe o różnej intensywności słodczy. Glicyryzyna, stewiozyd, taumatyna i filodulcyna to związki, które są aktualnie sto-

sowane jako środki słodzące w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym oraz w codziennej diecie człowieka.

1.1. BIAŁKA

W latach sześćdziesiątych dwudziestego wieku nastąpił przełom w poszukiwaniu zastępczych środków słodzących, będących naturalnymi białkami. Nasuwa się pytanie – „Dlaczego białka?” Odpowiedź jest prosta. Ze względu na ich niską wartość energetyczną oraz dlatego, że mogą być metabolizowane w organizmie człowieka w wyniku enzymatycznej hydrolizy. Większość białek o wysokiej masie molekularnej, stanowiących podstawowy budulec organizmów żywych, nie posiada walorów smakowych i nie wpływa na smak. Istnieje jednak niewielka liczba białek charakteryzujących się dobrymi walorami smakowymi. Do grupy białek wywołujących słodki smak należą: taumatyna, monelina, mabinlina oraz brazcina. Inną grupę białek mogących wywołać słodki smak, stanowią glikoproteiny, zawierające, dodatkowo, w swojej budowie jednostkę cukrową. Należą do niej mirakulina i kurkulina. Wszystkie te białka są wielokrotnie słodsze od cukru, w większości nieszkodliwe dla człowieka i mogą być stosowane jako niskokaloryczne koncentraty słodzące, dodawane do żywności i leków. Ich użycie znacznie obniża ilość spożywanego cukru.

Taumatyna

Taumatyna – bardzo słodkie białko, o posmaku lukrecji, jest najlepiej poznany białkiem w tej klasie związków. Znajduje się w roślinie o nazwie *Thaumatococcus daniellii* Benth z rodziny Maranthaceae. Roślina ta rośnie na obszarze Zachodniej Afryki, od Zairu po Sierra Leone. Hodowana jest również w szklarniach Wielkiej Brytanii. Mieszkańcy Afryki nazywają ją *katemfe* i wykorzystują jej owoce do maskowania kwaśnego smaku wina palmowego oraz napojów owocowych. Taumatyna zawarta jest w mięsistej osłonce, otaczającej nasiona owoców tej rośliny. Po raz pierwszy izolowali jej dwie formy, taumatynę I i II, van der Wel i Loeve [5] w 1972 roku. W siedem lat później Iyengar i wsp. [6] ustalili sekwencję aminokwasów, które wchodzi w skład taumatyn I i II i określili ciężar cząsteczkowy (ok. 22 kDa) tych białek. Łańcuchy polipeptydowe taumatyn zbudowane są z 207 reszt aminokwasowych i różnią się między sobą w pięciu miejscach. Każdy z nich posiada osiem wewnątrzcząsteczkowych mostków disulfidowych. Badania ostatnich lat wykazały, że taumatyna jest 1600 razy słodsza od cukru [7] i ogrzewana do temperatury 75°C nie traci swoich słodkich właściwości.

Jeszcze bardziej słodką substancją jest jonowy addukt taumatyny i soli glinu, wprowadzony na rynek przez Tate & Lyle Ltd pod nazwą Talin, jako dodatek do past do zębów [1]. Addukt ten jest 3000 razy słodszy od 10% roztworu sacharozy.

Talin bardzo dobrze rozpuszcza się w wodzie, jest rozpuszczalny w etanolu, 2-propanolu, glicerynie i glikolu propylenowym. Nie rozpuszcza się w acetonie, eterze i toluenie. Wodny roztwór Talinu jest stabilny w zakresie od 2 do 10 jednostek pH.

Intensywna słodycz, brak właściwości powodujących próchnicę zębów oraz brak przeciwwskazań w używaniu taumatyn w okresie ciąży, stawia je w grupie nowych, oryginalnych dodatków do żywności, past do zębów i innych środków leczniczych [1].

Monelina

Monelina, drugie poznane słodkie białko, znajduje się w mięszu czerwonych jagód rośliny *Dioscoreophyllum cumimnsii* z rodziny Menispermaceae, rosnącej w Zachodniej Afryce. Po raz pierwszy Morris i Cagan [8, 9] oraz van der Wel [10] izolowali i oczyścili to białko oraz nadali mu nazwę monelina. Białko jest 2000–2500 razy słodsze od sacharozy [7]. Zbudowane jest z dwóch łańcuchów, z których każdy zawiera odpowiednio 44 i 50 reszt aminokwasowych, a jego masa molowa wynosi 11 kDa [11]. Dłuższy łańcuch zawiera tylko jedną jednostkę cysteiny, natomiast w sekwencji łańcucha krótszego nie ma w ogóle tego aminokwasu. Wynika z tego, że w strukturze obu łańcuchów nie ma wewnątrzcząsteczkowych wiązań disulfidowych. Na podstawie analizy rentgenograficznej, Kim i wsp. [12] opisali strukturę trzeciorzędową tego białka. W 1991 roku Kohmura i wsp. [13] zsyntezowali oba łańcuchy krystalicznej moneliny metodą wielostopniowego przedłużania łańcucha białka na podłożu stałym. Kurihara [14] ustalił, że odpowiednia kombinacja obu łańcuchów nadaje monelinie intensywnie słodki smak. Jednak podwyższona temperatura, enzymatyczna hydroliza czy denaturacja, powodują zanikanie słodkiego smaku białka. Monelina nie jest toksyczna, jednak uciążliwa uprawa *Dioscoreophyllum cumimnsii* oraz niewielka trwałość walorów smakowych moneliny, czyni mało prawdopodobnym wprowadzenie jej na rynek spożywczy.

Mabinlina

Trzecie słodkie białko mabinlinę ekstrahowano z nasion rośliny *Capparis msaikai* Lev., z rodziny Capparidaceae, rosnącej na południu prowincji Yunnan w Chinach [7]. Mabinlina występuje w postaci pięciu homologów, z których każdy jest 10 razy słodszy niż sacharoza. Kohmura i Ariyoshi [15], wydzielili i scharakteryzowali jeden z homologów – mabinlinę II. Jej ciężar cząsteczkowy oszacowali na ok. 12,4 kDa. Udowodnili, że zbudowana jest ona z dwóch łańcuchów polipeptydowych A i B, z których każdy zawiera odpowiednio 33 i 72 reszty aminokwasowe. Ustalili, że łańcuch B zawiera dwa wewnątrzcząsteczkowe wiązania disulfidowe i jest połączony z łańcuchem A poprzez dwa mostki disulfidowe. Mabinlina II ogrzewana do 80°C, nie traci swoich walorów smakowych. Przypuszcza się, że łączniki

disulfidowe stabilizują własności smakowe białka i mają wpływ na jego odporność cieplną [15]. Jego własności chemiczne i termiczne wskazują, że może być ono wykorzystywane w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym.

Pentadyna i brazeina

W ostatnim dziesięcioleciu izolowano dwa inne, słodkie białka, pentadynę i brazeinę, z owoców afrykańskiej rośliny *Pentadiplandra brazzeana* B. należącej do rodziny Pentadiplandraceae [16, 17]. Oba białka są odpowiednio 500 i 2000 razy słodsze niż sacharoza. Smak tych białek jest bardziej zbliżony do sacharozy niż smak taumatyny. Smak brazeiny, ogrzewanej w temperaturze 80°C, nie ulega zmianie nawet po 4 godzinach. Brazeina stanowi kompozycję 54 reszt aminokwasowych i zawiera cztery wewnątrzcząsteczkowe wiązania disulfidowe, a jej ciężar cząsteczkowy wynosi 6 kDa. Ponieważ oba białka mają w przybliżeniu podobny skład aminokwasowy, nasuwa się przypuszczenie, że pentadyna jest indukowaną ciepłem pochodną brazeiny [18]. Do chwili obecnej nie ukazały się doniesienia na temat praktycznego wykorzystania brazeiny.

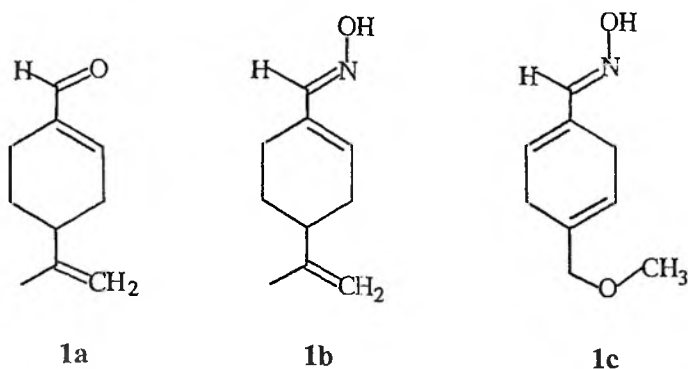
Porównanie trwałości walorów smakowych przedstawionych powyżej białek, nasuwa przypuszczenie, że obecność mostków disulfidowych w ich strukturze ma zasadniczy wpływ na trwałość ich słodkiego smaku. Taumatyna, mabinlina i brazeina posiadają wewnątrzcząsteczkowe wiązania oraz mostki disulfidowe i odznaczają się znaczną trwałością walorów smakowych. Słodycz moneliny, która nie posiada takich wiązań, zanika zarówno ze wzrostem temperatury, jak i podczas hydrolizy enzymatycznej.

1.2. TERPENOIDY

Większość występujących w naturze intensywnie słodkich substancji, należy do rodziny terpenoidów. Wiele z nich to glikozydy zawierające jedną lub więcej jednostek cukrowych, polepszających rozpuszczalność tych związków w wodzie. Do występujących w przyrodzie terpenoidów należą mono-, seskwi-, di- oraz triterpenoidy.

1.2.1. Monoterpenoidy

Aldehyd perilowy (1a) – jest jednym ze składników olejku eterycznego, wydzielonego w 1920 roku z rośliny *Perilla nankinesis* należącej do rodziny Labiateae. Jest jedynym znanym naturalnym monoterpenem posiadającym słodki smak, którego intensywność jest 12 razy większa niż cukru.



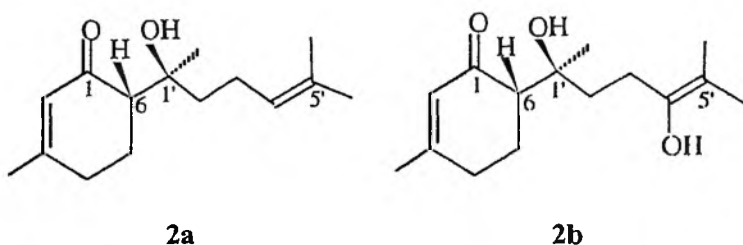
Perilartyna (1b) – (*E*)-oksym aldehydu perilowego, nazywany perilartyną, należy do chemicznie modyfikowanych naturalnych substancji słodkich i jest 350–370 razy słodszy od sacharozy, jednak zawiera lekki posmak goryczy. Jej strukturę ustalono na podstawie analizy widm ^1H NMR. Prosta budowa perilartyny oraz tak znaczne polepszenie jej walorów smakowych przez wprowadzenie oksymu w miejsce grupy aldehydowej, a także perspektywa znalezienia analogów lepiej rozpuszczalnych w wodzie oraz wyceliminowanie gorzkiego posmaku, zachęciły badaczy do dalszych modyfikacji tej cząsteczki. W tym celu zsyntezowano 80 różnych analogów perilartyny. Najlepszym okazał się (*E*)-4-(metoksymetylo)-1,4-cykloheksadieno-1-karbaldoksym (**1c**), który jest 450 razy słodszy i lepszy smakowo od sacharozy. Słodki smak tego związku jest trwały w środowisku kwaśnym ($\text{pH}=3$), w większości produktów spożywczych oraz słodkich koncentratów. Po raz pierwszy jego syntezę opatentowano w 1975 roku, a wieloetapowy schemat syntezy z izoprenu, jako substratu, opublikowano w 1985 roku [1]. Badania wykazały, że większą intensywność słodkiego smaku mają związki, w których występuje ułożenie *E*- α,β -aldoksymu **1c**. Cykliczny fragment cząsteczki również zwiększa aktywność glukoforyczną, natomiast układy bicykliczne czy aromatyczne oraz łańcuchy proste zmniejszają intensywność słodkiego smaku bądź potęgują gorycz. Obecność tlenu grupy metoksylowej przy węglu C-4 powoduje zwiększenie rozpuszczalności związku, kosztem obniżenia jego słodkości. Zależność własności smakowych od struktury, dalszych 49 analogów perilartyny, ustalił jedenaście lat później Iwamura [19] stosując analizę QSAR. Testy Amesa wykonane na szczurach wykazały, że perilartyna nie powoduje zmian mutagennych bakterii, po jednorazowym doustnym jej podaniu.

W Japonii perilartyna jest używana do polepszania smaku tytoniu, była również stosowana w zastępstwie syropu klonowego oraz syropu z lukrecji [20].

1.2.2. Seskwiterpenoidy

Hernandulcyna (2a)

W roku 1985 Kinghorn i współpracownicy izolowali z *Lippia dulcis* Trev. z rodziny Verbenaceae, zioła używanego od wieków przez Indian z plemienia Azteków, silnie słodki seskwiterpenoid – hernandulcynę (2a). Roślina ta rośnie w okolicach miasta Meksyk i jest nazywana przez Indian *tzonpelic xihuitl* czyli „słodkie zioło”. Po raz pierwszy opisał ją w swojej książce, w latach 1570–1576, hiszpański lekarz Francisco Hernandez. Słodką substancję izolowano metodą ekstrakcyjną z liści i kwiatów *Lippia dulcis* Trev. i oczyszczono metodą chromatograficzną. Dla uhonorowania Francisco Hernandeza, wydzielony słodki związek nazwano hernandulcyną. Jest to bezbarwny olej, którego strukturę potwierdzono przy pomocy analizy widm IR, UV, MS oraz ^1H i ^{13}C NMR. Jest ona seskwiterpenoidem, 6-(1',5'-dimetylo-1'-hydroksy-4'-heksenylo)-3-metylo-2-cykloheksenonem (2a, bisabolan) [21].



Ustalona absolutna konfiguracja naturalnie występującej hernandulcyny to 6*S*, 1'*S* [1, 22]. (6*S*, 1'*S*)-(+)-Hernandulcyna (2a) jest aż 1200 razy słodsza od sacharozy, jednak po pewnym czasie traci przyjemny i czysty smak i staje się wręcz gorzka, podobnie jak pozostałe jej izomery, z których żaden nie odznacza się słodkim smakiem. Rozpuszczalność hernandulcyny w etanolu jest słaba i wynosi zaledwie 0,11g/100 ml. Pomimo, że wykazuje ona niską toksyczność ($\text{LD}_{50} = 1\text{g/kg}$ masy ciała myszy), to nie znalazła większego zastosowania jako substancja poprawiająca smak żywności, ze względu na nietrwałość słodczy, która zanika po pewnym czasie, nabierając nieprzyjemnego posmaku i naturalnej goryczy oraz ze względu na jej słabą rozpuszczalność.

(+)-4β-Hydroksyhernandulcyna

W 1995 roku Kinghorn i Konnelly [23] izolowali w śladowych ilościach, z liści i kwiatów tej samej rośliny *Lippia dulcis* Trev., ale rosnącej w Panamie, drugą słodką substancję (+)-4β-hydroksyhernandulcynę (2b). Pomimo małych ilości, zwią-

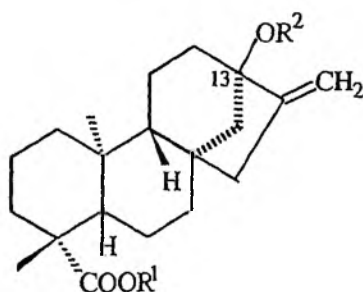
zek ten jest godny uwagi z dwóch powodów: po pierwsze, jest on drugim izolowanym, naturalnym słodkim seskwiterpenoidem, a ponadto jego struktura wskazuje, że obecność grupy metylenowej przy węglu C-4 nie jest konieczna do uzyskania słodkiego smaku.

1.2.3. Diterpenoidy

Stewiozyd i jego pochodne

W roślinie o nazwie *Stevia rebaudiana* Bertoni, należącej do rodziny Asteraceae, znajduje się kilka diterpenoglikozydów **3a-i**, należących do grupy *ent*-kaurenoglikozydów. Roślina ta jest słodkim ziołem rosnącym w górzystych terenach północno-wschodniej części Paragwaju i sąsiedniej Brazylii oraz w Japonii, Chinach i Korei. Lokalnie nazywana jest *yerba dulce*. Najbogatsze w słodkie glikozydy są jej liście oraz ekstrakty, natomiast kwiaty zawierają ich o wiele mniej. Zawartość *ent*-kaurenoglikozydów jest w dużej mierze zależna od miejsca, w którym rośnie zioło oraz od metody wydziałania.

Z suszonych liści rośliny pochodzącej z Paragwaju izolowano metodą ekstrakcyjną mieszaninę słodkich glikozydów z wydajnością 10%, w odniesieniu do suchej masy liści. Głównym składnikiem tej mieszaniny był stewiozyd (**3a**). Z lepszą wydajnością izolowano diterpenoglikozydy z suchych liści *Stevia rebaudiana* pochodzących z Chin. Rozdzielono je metodą wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej (HPLC), uzyskując odpowiednio: 6,6% stewiozydu (**3a**), 3,7% rebaudiozydu A (**3d**), 2,1% rebaudiozydu C (**3f**) oraz 0,53% dulkozydu A (**3i**).



3

Związek	Nazwa zwyczajowa	R ¹	R ²
3a	Stewiozyd	β -Glc	β -Glc ² - β -Glc
3b	Stewiolbiozyd	H	β -Glc ² - β -Glc
3c	Stewiol	H	H
3d	Rebaudiozyd A	β -Glc	β -Glc ² - β -Glc 3 β -Glc
3e	Rebaudiozyd B	H	jak A
3f	Rebaudiozyd C	β -Glc	β -Glc ² - α -Rha 3 β -Glc
3g	Rebaudiozyd D	β -Glc ² - β -Glc	jak A
3h	Rebaudiozyd E	β -Glc ² - β -Glc	β -Glc ² - β -Glc
3i	Dulkozyd A	β -Glc	β -Glc ² - α -Rha
3k	Rubuzozyd	H	β -Glc

Glc = D-glukopiranozyl- ; Rha = L-ramnopiranozyl-

Nie powiodły się próby wydzielenia, metodą chromatografii nadciśnieniowej (OPLC), pozostałych dwóch rebaudiozydów D i E (**3g** i **3h**). Natomiast opatentowana w 1987 roku przez japońskich uczonych metoda izolowania stewiozydu i rebaudiozydu A, pozwala na uzyskanie wydajności nawet do 17,5% (76,4% stewiozydu, 1,4% rebaudiozydu A) [1].

Stewiozyd **3a**, główny składnik mieszaniny glikozydów, jest białym, krystalicznym, higroskopijnym proszkiem o temperaturze topnienia 196-198°C, jest bardzo dobrze rozpuszczalny w wodzie, rozpuszcza się również w etanolu i glikolu propylenowym. Stewiozyd jest słodszy od sacharozy, jego mała ilość umieszczona na języku ma przyjemny słodki smak, natomiast większa ilość najpierw smakuje słodko, by po pewnym czasie uzyskać żrąco-gorzki smak [24]. Jest on związkiem całkowicie nietoksycznym, wodne roztwory stewiozydu nie zmieniają swoich właściwości smakowych w zakresie pH od 3 do 9, oraz podczas ogrzewania do wrzenia przez 1 godzinę. Dopiero w silnie zasadowym środowisku (pH > 10) traci on 50% wartości smakowych. Ostatnie badania Brandle i wsp. [25], dotyczące między innymi właściwości organoleptycznych stewiozydu wykazały, że różnice w intensywności jego słodkiego smaku (może być od 30 do 80 razy słodszy od sacharozy), związane są zarówno z metodą pomiaru organoleptycznego, jak i zależą od stężenia wzorcowych roztworów sacharozy. W wyniku enzymatycznej hydrolizy stewiozydu, uwolnione zostają 3 mole glukozy i 1 mol stewiolu (**3c**), który jest aglikonem stewiozydu i nie posiada żadnych walorów smakowych [1].

Spśród zaprezentowanych diterpenoglikozydów, jedynie stewiozyd używany jest w Japonii jako słodki dodatek do przypraw, stosowanych do zaprawy pikli oraz

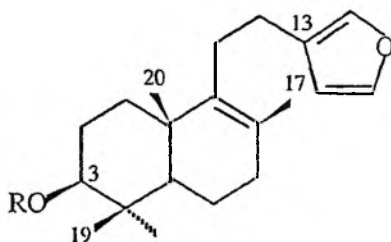
solonych potraw [24]. Pozostałe *ent*-kaurenoglikozydy, ze względu na niewielkie ilości w jakich się je izoluje, nie znalazły praktycznego zastosowania.

Innym intensywnie słodkim *ent*-kaurenoglikozydem jest rubuzozyd, pochodna stewiolu (**3k**), który w znacznych ilościach (5%) znajduje się w liściach rośliny *Rubus snavissimus* z rodziny Rosaceae, uprawianej w Chinach i używanej przez miejscową ludność, jako tradycyjny ludowy lek. Rubuzozyd jest 114 razy słodszy od sacharozy, jednak posiada nieco goryczy [20].

Bajnozyd

W korzeniu chińskiego zicia *Phlomis betonicoides* Diels, z rodziny Labiateae, zwanego *bai-yun-shen*, znajduje się aktywna substancja – bajnozyd (**4**), stosowana od dawna w ludowej medycynie do leczenia chorób kobiecych. W roku 1985 bajnozyd został wydzielony w czystej postaci przez Tanaka i wsp. [26], którzy stwierdzili, że jest on 250 razy słodszy od cukru. Dziesięć lat później zsyntezowano racemiczną formę aglikonu bajnozydu – bajunol [27].

Na podstawie widm ^1H NMR i MS, aglikonom przypisuje się strukturę monohydroksyditerpenoidów z rodziny labdanolidów, posiadających przy węglu C-13 β -podstawiony pierścień furanowy [1].



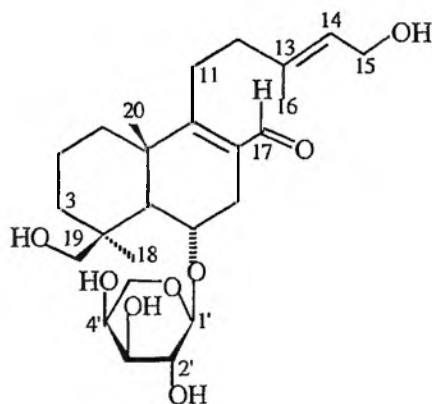
4

R = 2-O- β -ksylopiranozylo-D-glukopiranozyl-

Gaudichaudiozyd A

W ostatnich kilku latach izolowano jeszcze jeden słodki diterpenoglikozyd o nazwie gaudichaudiozyd A (**5**), z leczniczej rośliny *Baccharis gaudichaudiana* DC., należącej do rodziny Compositae, rosnącej na terenach Paragwaju [23].

Strukturę tego związku ustalono na podstawie analizy widm ^1H oraz ^{13}C NMR. Gaudichaudiozyd A jest doskonale rozpuszczalny w wodzie oraz 55 razy słodszy od sacharozy. Jego wodne roztwory posiadają przyjemny słodki smak, z lekkim odcieniem goryczy.



5

W aktualnej literaturze źródłowej, poza informacjami o właściwościach leczniczych, nie ma informacji o wykorzystaniu walorów smakowych ostatnich trzech diterpenoglikozydów w przemyśle spożywczym czy farmaceutycznym.

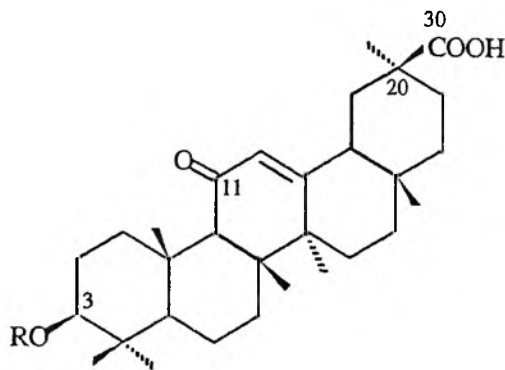
1.2.4. Triterpenoidy

Glicyryzyna (6a, kwas glicyryzynowy) – jeden z lepiej poznanych oleanopodobnych triterpenoglikozydów, znajduje się w korzeniu i pędach lukrecji gładkiej, zwanej *Glycyrrhiza glabra* L. Z rodziny Leguminosae, małego krzewu rosnącego na terenach Chin, Rosji, środkowowschodniej i południowej Europy. Jej lecznicze właściwości były dobrze znane już w starożytnej medycynie i farmacji [20]. Stosowana jest w leczeniu nieżytu dróg oddechowych.

Glicyryzyna – substancja o słodkim smaku, jest diglukuronidem kwasu glicyretynowego (**6b**, R=H), który sam w sobie nie posiada słodkiego smaku. Po raz pierwszy została wydzielona w czystej postaci w 1907 roku [29]. W korzeniach lukrecji znajduje się od 6 do 14% glicyryzyny, natomiast pędy zawierają jej aż 23%. Glicyryzyna znajduje się w nich w postaci soli wapniowo-potasowej wraz z innymi składnikami, takimi jak skrobia, cukry, białka, flawanoidy, asparagina i żywice.

Związek	Nazwa zwyczajowa	R
6a	Glicyryzyna (Kwas glicyryzynowy)	β -GlcCOOH- β -GlcCOOH(2 \leftarrow 1)
6b	Kwas glicyretynowy	H
6c	Apioglicyryzyna	β -apioFur(2 \leftarrow 1)- β -GlcCOOH
6d	Araboglicyryzyna	α -L-Ara(2 \leftarrow 1)- β -GlcCOOH

β -GlcCOOH = β -D-glukuronopiranozyl-; β -apioFur = β -D-apiofuranozyl-;
 α -L-Ara = α -L-arabinopiranozyl-



6

Czysta glicyryzyna jest bezbarwną krystaliczną substancją, bardzo słabo rozpuszczalną w zimnej wodzie, natomiast dobrze rozpuszcza się w niej na gorąco. Równie dobrze rozpuszcza się w etanolu. Wolny kwas glicyryzynowy (**6a**) i jego sole wapniowe tworzą, po oziębieniu gorących wodnych roztworów żele, które krystalizują z lodowatego kwasu octowego i etanolu jako hydraty. Hydroliza soli potasowej przy użyciu rozcieńczonego kwasu siarkowego daje krystaliczny kwas glicyretynowy **6b** – aglikon glicyryzyny, całkowicie nierozpuszczalny w wodzie i bez smaku. Badania struktury kwasu **6b**, prowadzone przez wiele grup badawczych, potwierdziły, że należy on do grupy oleanopodobnych triterpenoidów [1].

Najbardziej przydatną w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym pochodną kwasu glicyretynowego jest sól amonowa, która w postaci krystalicznej jest 100 razy słodsza od sacharozy, natomiast w roztworach, intensywność jej słodczy zależy od stężenia wzorcowego roztworu sacharozy. I tak w odniesieniu do roztworu sacharozy o stężeniu 20 mg/100 ml, jest ona 70 razy słodsza, natomiast w stosunku do roztworu sacharozy o stężeniu 10 mg/100 ml, jej słodczy jest 93 razy silniejsza [20].

Sól amonową kwasu glicyretynowego łatwo otrzymuje się z ciekłych ekstraktów, pozyskiwanych przez ekstrakcję przeciwwprądową korzeni lukrecji. Jest ona trwała w temperaturach normalnych, rozpuszczalna na zimno i na gorąco w wodzie i w glikolu propylenowym. Znajduje wiele użytecznych zastosowań jako dodatek poprawiający smak oraz zapach żywności i leków, przy produkcji wyrobów cukierniczych, do nadawania słodkiego smaku papierosom i tytoniom fajkowym oraz jako środek pieniący [20].

W Stanach Zjednoczonych Ameryki, sól amonowa glicyryzyny uzyskała status bezpiecznej substancji, stosowanej do celów spożywczych [23].

Natomiast w Japonii, jako spożywczy środek słodzący, stosowany jest od kilku lat ekstrakt lukrecji (EHLE), uzyskany przez enzymatyczną hydrolizę z użyciem β -glukuronidazy [24]. W 2001 roku Lin i wsp. [30] izolowali główne składniki ekstraktu EHLE i określili ich strukturę. Ekstrakt EHLE nie jest toksyczny i nie powo-

duje mutageny flory bakteryjnej, co daje mu status bezpiecznego dodatku do żywności.

Prosta metoda otrzymywania soli amonowej oraz jej dobre walory smakowe zachęciły badaczy do modyfikacji cząsteczki kwasu glicyretynowego. W ciągu ostatnich kilku lat zsyntezowano różne 3-*O*-glikozydy kwasu glicyretynowego i przebadano ich własności smakowe. Mizutani i wsp. [31] otrzymali szereg glikozydów zawierających różne jednostki cukrowe. Badania walorów smakowych tych związków wykazały, że monoglikozydy są słodsze niż diglikozydy, a spośród nich monoglukuronid kwasu glicyretynowego okazał się najśladniejszy (941 razy słodszy od sacharozy) [24, 31].

Apioglicyryzyna i araboglicyryzyna

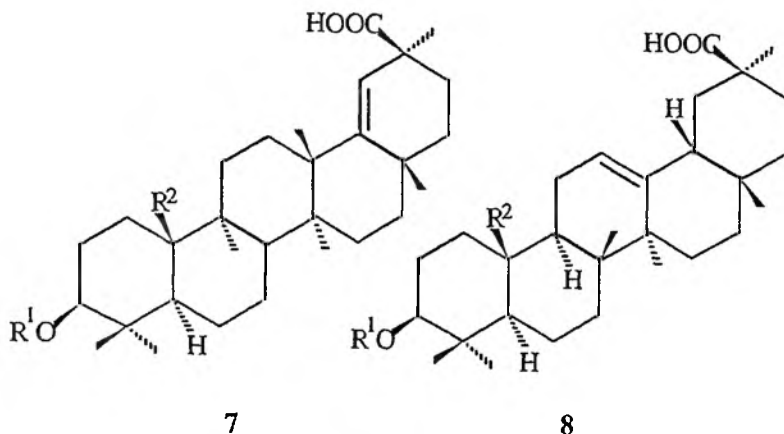
Z metanolowych ekstraktów suszonych na powietrzu korzeni innej rośliny, *Glycyrrhiza punctata* BATAL, należącej także do rodziny Leguminosac, Kitagawa i wsp. [32] wydzielili oprócz znanych flawanoglikozydów, niewielkie ilości glicyryzyny (1,5%) oraz dwa nowe słodkie triterpenooligoglikozydy – apioglicyryzynę (**6c**, 0,32%) oraz araboglicyryzynę (**6d**, 0,14%). W wyniku całkowitej metanolizy ekstraktów otrzymali jeszcze aglikon – kwas glicyretynowy (**6b**).

Na podstawie danych fizykochemicznych i reaktywności chemicznej ustalono, że apioglicyryzyna (**6c**) jest triterpenooligoglikozydem o strukturze kwasu 3-*O*-[β -D-apiofuranozylo(1 \rightarrow 2)- β -D-glukuronozylo]glicyretynowego, a araboglicyryzyna (**6d**) została zidentyfikowana jako kwas 3-*O*-[α -L-ara-binopiranozylo(1 \rightarrow 2))- β -D-glukuronozylo]glicyretynowy.

Badania walorów smakowych tych glikozydów wykazały, że apioglicyryzyna jest dwa razy słodsza od glicyryzyny, natomiast słodkość araboglicyryzyny jest porównywalna ze słodyczą glicyryzyny.

Periandryny

Glicyryzynę izolowano też w niewielkich ilościach (0,38%) z korzeni słodkiego drzewa *Periandra dulcis* Mart., brazylijskiej rośliny należącej do rodziny Leguminosae [33]. Jednak szczegółowa analiza wykazała, że zasadniczym źródłem słodyczy, w pozyskiwanym ekstrakcie, była mieszanina czterech oleanopodobnych triterpenoglikozydów nazwanych periandrynami I, II, III i IV (**7**, **8**). Znajdują się one w niewielkich ilościach, w korzeniach tego słodkiego drzewa. Z 30 kg suchych korzeni *Periandra dulcis* izolowano zaledwie 300 mg periandryny I (**7a**), 170 mg periandryny II (**8a**), 23 mg periandryny III (**7b**) oraz 9 mg periandryny IV (**8b**). Są one 90–100 razy słodsze od sacharozy, ich słodycz jest porównywalna z glicyryzyną, jednak w przeciwieństwie do niej wrażenie słodyczy pojawia się o wiele szybciej.



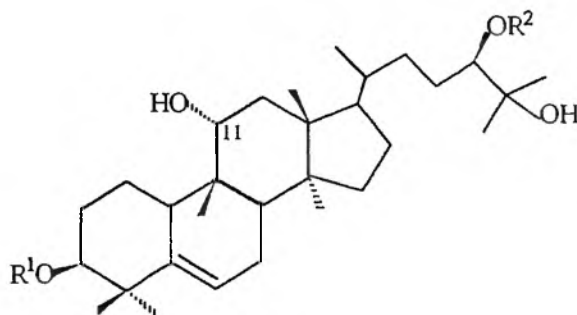
Związek	Nazwa zwyczajowa	R ¹	R ²
7a	Periandryna I	β -GlcCOOH- β -GlcCOOH(2 \leftarrow 1)	CH=O
8a	Periandryna II	β -GlcCOOH- β -GlcCOOH(2 \leftarrow 1)	CH=O
7b	Periandryna III	β -GlcCOOH- β -GlcCOOH(2 \leftarrow 1)	CH ₂ OH
8b	Periandryna IV	β -GlcCOOH- β -GlcCOOH(2 \leftarrow 1)	CH ₂ OH

β -GlcCOOH = β -D-glukuronopiranozyl-

Periandryny nie są mutagenne, a ich współczynnik toksyczności LD₅₀ wynosi 2 g/kg masy ciała myszy [20]. Strukturę periandryny I (7a) ustalono na podstawie analizy widm rentgenowskich.

Mogrozydy (słodkie kukurbitanoglikozydy)

Lo han kuo jest owocem rośliny *Thladiantha grosvenori* (Swingle) C. Jeffrey, z rodziny Cucurbitaceae, uprawianej w południowych Chinach, zawierającym słodką substancję, o smaku podobnym do stewiozydu i glicyryzyny. W medycynie ludowej używa się suszonych owoców tej rośliny do leczenia przeziębień, chorób gardła i w zaburzeniach trawiennych. Słodką substancję z owocu *lo han kuo* otrzymuje się przez ekstrakcję wnętrza, bądź łupiny owocu wodą albo 50%-owym roztworem etanolu, przy czym w łupinie jest jej więcej. Po raz pierwszy słodką substancję z owocu *lo han kuo* oczyścił Lec w 1975 roku [34]. Kilka lat później, Tekamoto i wsp. [35] opisali struktury trzech izolowanych z tej substancji triterpenoglikozydów – najbardziej słodkiego i występującego najobficiej mogrozydu V (9) oraz mogrozydów IV i VI. Z suchych owoców wyizolowano i oczyszczono przez zastosowanie wysokociśnieniowej chromatografii ciekłej (HPLC) 0,81–1,29% czystego mogrozydu V.



9

Mogrozyd V: $R^1 = \beta\text{-Glc-}\beta\text{-Glc (6\leftarrow 1)}$; $R^2 = \beta\text{-Glc-}\beta\text{-Glc (6\leftarrow 1)-}\beta\text{-Glc-}\beta\text{-Glc (2\leftarrow 1)}$
 Glc = D-glukopiranozyl-

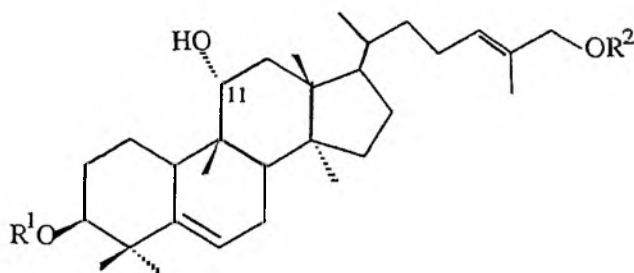
Najczystsza postać tego glikozydu jest 400 razy słodsza od sacharozy, natomiast w odniesieniu do wzorcowego wodnego roztworu sacharozy, o stężeniu 20 mg/100 ml, słodycz mogrozydów V i VI jest odpowiednio 256 i 125 razy intensywniejsza. Czyste mogrozydy mają o wiele przyjemniejszy smak niż nieoczyszczony ekstrakt. Mogrozyd V jest dobrze rozpuszczalny w wodzie, a w wodnych roztworach, ogrzewanych nawet do wrzenia, nie ulega rozkładowi i nie traci swoich walorów smakowych [36].

Poza właściwościami leczniczymi, nie ma do tej pory w literaturze doniesień o wykorzystaniu tego glikozydu do celów spożywczych.

Karnozyflozydy (słodkie kukurbitanoglikozydy)

Chińskie tubylcze ziele *Hemsleya carnosiflora*, należąca do rodziny Cucurbitaceae, zawiera również słodkie substancje, które oczyszczono i zidentyfikowano jako triterpenoglikozydy, nadając im nazwy karnozyflozydy V i VI (10) [37]. Różnią się one jedynie jednostką cukrową R^2 .

W doniesieniach literaturowych nie ma jeszcze informacji na temat ich właściwości oraz intensywności i charakteru ich słodkiego smaku.



10

Związek	Nazwa zwyczajowa	R ¹	R ²
10a	Karnozyflozyd V	β -Glc	β -Glc- β -Glc(2? 1)
10b	Karnozyflozyd VI	β -Glc	β -Glc- β -Glc(6? 1)

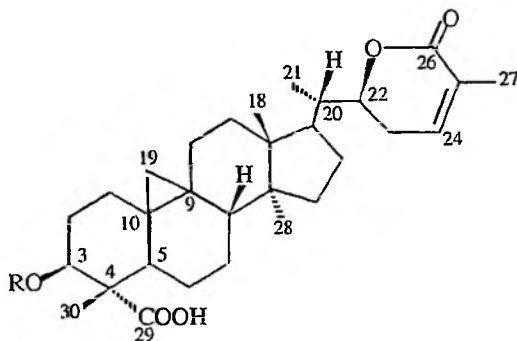
Glc = D-glukopiranozyl-

Brujodulkozyd

W korzeniach rośliny *Bryonia dioica* Jacq., należącej do rodziny Cucurbitaceae, znajduje się także słodka substancja o nie poznanej jeszcze strukturze, nazwana brujodulkozydem [20]. Przypuszcza się, że jest ona nowym triterpenoglikozydem z rodziny kukurbitanów.

Abruzozydy (11, słodkie cykloartanoglikozydy)

Z *n*-butanolowego ekstraktu uzyskanego z liści rośliny *Abrus precatorius*, należącej do rodziny Fabaceae rosnącej na Florydzie, Kinghorn i wsp. [23, 38] wydzielili słodką substancję, która okazała się mieszaniną czterech nowych cykloartanopodobnych triterpenoglikozydów, które nazwali odpowiednio abruzozydami A, B, C i D (11).



11

Związek	Nazwa zwyczajowa	R
11a	Abruzozyd A	β -D-Glc
11b	Abruzozyd B	β -D-GlcCOOH-6-CH ₃ ² - β -D-Glc
11c	Abruzozyd C	β -D-Glc ² - β -D-Glc
11d	Abruzozyd D	β -D-GlcCOOH- β -D-Glc

Glc = glukopiranozyl-; GlcCOOH = glukuronopiranozyl-

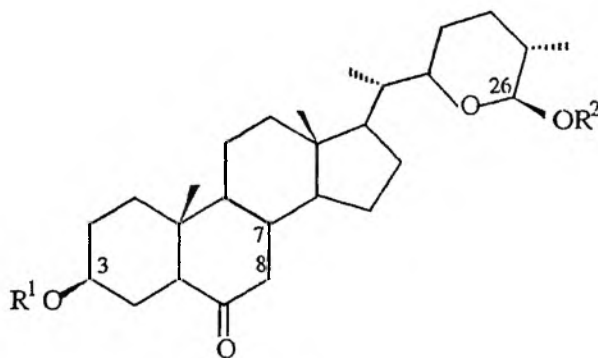
Wodne roztwory soli amonowych tych glikozydów są 30–100 razy słodsze od wzorcowego roztworu sacharozy. Są one odporne termicznie, nie są mutagenne w stosunku do bakterii i nietoksyczne w stosunku do myszy.

1.3. STEROIDOWE SAPONINY

Osladyna (12a)

Kłącze paproci *Polypodium vulgare*, należącej do rodziny Polypodiaceae, popularnie zwanej paprotką zwyczajną, paprocią leśną, słodyczką czy lukrecją cygańską, rosnącej wraz z mchami w zacienionych lasach i skałach Europy, Azji i Ameryki, zawiera jest słodka substancja, będąca od dawna w centrum zainteresowania zarówno farmaceutów jak i chemików [1]. W latach siedemdziesiątych zeszłego stulecia przez ekstrakcję suchych kłączy tej paproci otrzymano w niewielkich ilościach (0,03%) nowego typu steroidową saponinę, nazwaną osładyną (12a).

Przed kilku laty Nishizawa i Yamada [39, 40] opisali metodę wydzielenia czystej osładyny z kłączy *Polypodium vulgare* oraz ustalili jej strukturę, na podstawie analizy widm rentgenograficznych.



12

Związek	Nazwa zwyczajowa	R ¹	R ²	Inne
12a	Osladyna	β -Glc ² - α -Rha	α -Rha	–
12b	Polipodosyd A	β -Glc- α -Rha (2 \leftarrow 1)	α -Rha	$\Delta^{7,8}$

Glc = glukopiranozyl-;

Rha = L-ramnopiranozyl-

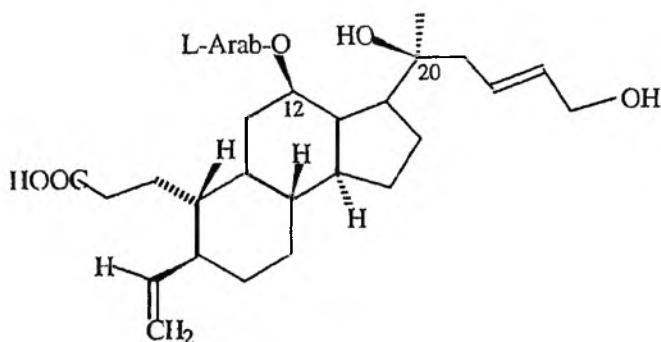
Ponadto zsyntezowali osładynę wychodząc ze steroidowego aldehydu [40]. Czysta osładyna jest aż 500 razy słodsza od sacharozy, co wskazując, że jest ona rzeczywistym źródłem słodczy paproci zwyczajnej.

Polipodozyd A

Inna odmiana paproci *Polypodium glycerhiza* DC., Eaton, należąca do rodziny Polypodiaceae, rosnąca w Północnej Ameryce, była obiektem zainteresowania Kinghorna i wsp. [41]. Izolowali oni z ekstraktu suszonych na powietrzu kłaczy, z niewielką wydajnością (0,29%), czystą postać nowej saponiny nazwanej polipodozydem A (12b). Strukturę tego związku ustalono na podstawie analizy widm ^1H i ^{13}C NMR [27]. Badania własności organoleptycznych wykazały, że jest on aż 600 razy słodszy od sacharozy, nie jest mutagenny w stosunku do szczepu bakterii *Salmonella typhimurium* TM 677 i nie jest toksyczny w odniesieniu do myszy.

Pterokariozydy A i B (13)

Z liści oraz pnia chińskiego drzewa *Pterocarya palinrus* z rodziny Juglandaceae, zwanego przez miejscową ludność *tian ye shu*, co znaczy drzewo o słodkich liściach, izolowano jeszcze inny rodzaj saponin – 3,4-secodamaranoidosaponiny, które nazwano pterokariozydami A i B (13).



13

Pterokariozyd B: L-Arab = L-arabinozyl-

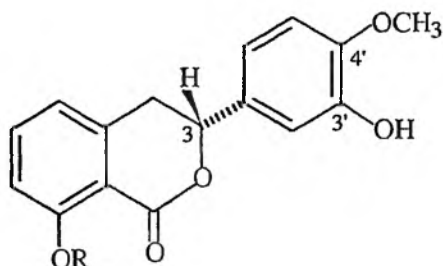
Wodne roztwory tych saponin są 50–100 razy słodsze od sacharozy. Pterokariozydy A i B nie są toksyczne w stosunku do myszy i nie wywołują mutagenyzy bakterii [42].

1.4. DIHYDROIZOKUMARYNY (1*H*-2-BENZOPIRAN-1-ONY)

Filodulcyna

Filodulcyna (14a) jest naturalną pochodną dihydroizokumaryny, po raz pierwszy wydzielonej w czystej postaci w 1916 roku, z liści roślin *Hydrangea macro-*

phylla SERINGE, var. *Thunbergii* (Siebold) Makinr, należącej do rodziny Saxifragaceae, znanej jako herbata *amacha*. W 1929 roku Asahino i Asano [43] ustalili strukturę filodulcyny, a 30 lat później Arakawa i Nakazaki [44], przez identyfikację kwasu 2-hydroksybutanodiowego, otrzymanego z ozonowanej filodulcyny, przypisali asymetrycznemu centrum C-3 absolutną konfigurację 3R. W późniejszych latach różne grupy badaczy podejmowały próby syntezy tej naturalnej izokumaryny. Racemiczne formy filodulcyny zsyntezowano stosując jako materiał wyjściowy, albo *trans*-3-(3-benzylkso-4-metoksy-fenyl)-2-propenal, bądź kwas [2-(3-hydroksy-2-karboksyfenyl)]-3-metoksy-4-hydroksyfenylopropenowy [1].



14

Związek	Nazwa zwyczajowa	R
14a	Filodulcyna	H
14b	8-O-β-D-glukozyd filodulcyny	β-D-Glc

Glc = glukopiranozyl-

Pierwszą enancjoselektywną syntezę filodulcyny przeprowadzili w 1996 roku Ramacciotti, Fiaschi i Napolitano [45]. Kluczowym jej etapem było wygenerowanie centrum asymetrii przez zastosowanie asymetrycznej dihydroksylacji metodą Sharplessa, oraz wprowadzenie grupy alkilowej w pozycję β pierścienia aromatycznego metodą litowania. Natomiast pierwszą biosyntezę filodulcyny z kwasu szikimowego, przeprowadzili Takeuchi i wsp. w 1980 roku [46]. Enzymatyczna hydroliza glikozydu filodulcyny (14b), również powoduje uwolnienie związku 14a [1].

Pomimo, że filodulcyna jest 400 razy słodsza od sacharozy, to jej zastosowanie jako substancji słodzącej, jest ograniczone (używana tylko w Japonii), ze względu na słabą rozpuszczalność w wodzie oraz fakt, że słodki smak rozcieńczonych roztworów ustala się bardzo powoli, by uzyskać ostatecznie nieprzyjemny posmak [20].

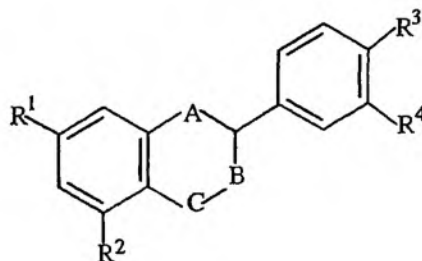
W celu ustalenia zależności pomiędzy strukturą cząsteczki, a występowaniem i intensywnością słodkiego smaku, zsyntezowano szereg dihydroizokumaryn 15 – pochodnych filodulcyny. Na podstawie przeprowadzonych badań organoleptycznych tych związków stwierdzono, że między innymi, obecność grupy 3'-hydroksy-4'-metoksyfenylowej potęguje słodki smak związku (Tabela 1).

Tabela 1. Zależność intensywności słodkiego smaku od struktury pochodnych filodulcyny 15

Związek	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	A	B	C	Słodkość ^a
15a	OH	H	OCH ₃	OH	CH ₂	O	C=O	400
15b	H	H	OCH ₃	OH	CH ₂	O	C=O	100
15c	OH	H	OCH ₃	OH	CH ₂	NH	C=O	1-10
15d	H	H	OCH ₃	OH	CH ₂	NH	C=O	0
15e	H	H	OCH ₃	OH	CH ₂	O	CH ₂	350
15f	H	H	OCH ₃	OH	O	CH ₂	CH ₂	350
15g	H	OH	OCH ₃	OH	O	CH ₂	CH ₂	350
15h	H	H	OCH ₃	OH	O	O	CH ₂	3000
15i	H	H	OCH ₃	OH	O	O	C=O	100
15j	H	H	OCH ₃	OH	S	O	C=O	250
15k	H	H	OCH ₃	OH	O	CH ₂	O	450
15l	H	H	OCH ₃	OH	O	CH ₂	C=O	0

^a w odniesieniu do sacharozy, której słodkość = 1

Spośród wszystkich syntetycznych analogów filodulcyny, najśłodszy okazał się 2-(3-hydroksy-4-metoksyfenylo-1,3-benzodioxan (**15h**) [46]. Jest on aż 3000 razy słodszy od sacharozy, posiada słaby posmak lukrecji i jest odczuwalny już po 2–3 sekundach (Tabela 1). Jest on jednak nieprzydatny jako środek słodzący, ze względu na nietrwałość walorów smakowych. W roztworze wodnym związek ten ulega powolnej hydrolizie i w ciągu 7 dni, w temperaturze pokojowej traci całkowicie swój słodki smak. Zmiana położenia atomu tlenu w pierścieniu heterocyklicznym (**15k**; 1,4-benzodioxan), powoduje znaczne osłabienie intensywności słodkiego smaku. Analog ten jest tylko 450 razy słodszy od sacharozy i również posiada słaby posmak lukrecji [1]. Natomiast słodki smak tego związku jest odczuwalny już po 2–3 sekundach i jest bardzo trwały, utrzymuje się nawet po 1 miesiącu. Jego wadą jest jednak słaba rozpuszczalność w wodzie.



Benzodioksanowe pochodne **15h** i **15k** mają konformację podobną do filodulcyny i ich oddziaływanie z receptorami smaku też jest podobne.

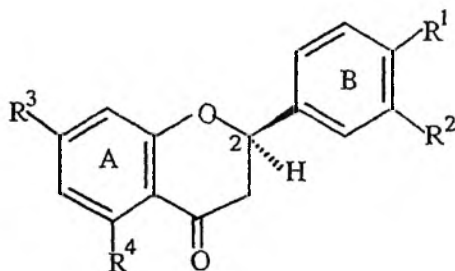
Czysta filodulcyna nie wywołuje mutagenozy flory bakteryjnej oraz jest nie-toksyczna w stosunku do myszy.

1.5. FLAWANOIDY, CHALKONY, DIHYDROCHALKONY I DIHYDROFLAWANOLE

Flawanono-7-glikozydy

Gorzkie i gorzko-słodkie substancje, nadające charakterystyczny orzeźwiający smak różnym owocom cytrusowym, izolowano po raz pierwszy ponad sto lat temu. Znaczną grupę tych substancji stanowią flawanono-7-glikozydy (**16**).

Poszczególne związki z tej grupy, różnią się albo podstawnikami (R^1 i R^2) w pozycjach 3' i 4' cząsteczki flawanonu, albo jednostkami cukrowymi w pozycji 7 (R^3 , tabela 2).



16

Te ostatnie są dwucukrami: β -rutynozą (6-*O*- α -L-ramnopiranozylo- β -D-glukopiranozą) bądź β -neohesperydozą (2-*O*- α -L-ramnopiranozylo- β -D-glukopiranozą). Szczegółowe badania flawanoidów **16** wykazały, że za gorzki smak związku odpowiedzialny jest fragment sacharydowy. I tak, flawanono-7 β -rutynozydy nie mają smaku (**16b,d,f,h**), natomiast grupa flawanono-7 β -neohesperydozydów (**16a,c,e,g**) charakteryzuje się gorzkim smakiem (Tabela 2).

Flawanony i flawanoglikozydy są szeroko rozpowszechnione w świecie roślinnym, w postaci pigmentów obecnych w liściach, kwiatach i owocach. Stanowią one ważny i łatwy do izolowania surowiec, znajdujący się w dużych stężeniach w skórkach pomarańczy, cytryn i grejpfrutów, stosowany w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym i kosmetycznym.

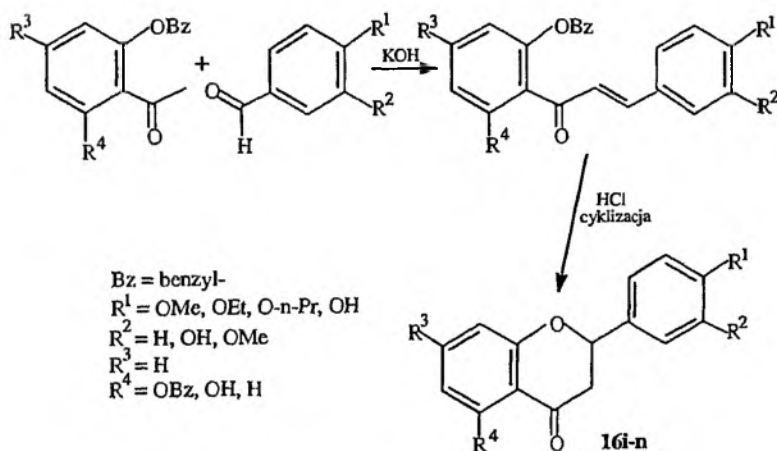
Tabela 2. Zależność smaku od struktury cząsteczki naturalnych flawanono-7-glikozydów 16

Związek	Nazwa zwyczajowa	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	Smak ^a
16a	Neohesperydyna	OCH ₃	OH	O-β-neohesperozydyl	OH	gorzki
16b	Hesperydyna	OCH ₃	OH	O-β-rutynozyl	OH	brak
16c	Naringina	OH	H	O-β-neohesperozydyl	OH	gorzki
16d	Naringinorutynozyd	OH	H	O-β-rutynozyl	OH	brak
16e	Poncyryna	OCH ₃	H	O-β-neohesperozydyl	OH	gorzki
16f	Izosakuranotynorutynozyd	OCH ₃	H	O-β-rutynozyl	OH	brak
16g	Ncoericytryna	OH	OH	O-β-neohesperozydyl	OH	gorzki
16h	Eriocytryna	OH	OH	O-β-rutynozyl	OH	brak

^a w odniesieniu do sacharozy, której słodkość = 1

Hesperydyna (16b) stanowi główny składnik flawanoidowy pomarańczy (*Citrus sinensis*) i cytryn (*Citrus limon*), podczas gdy naringina (16c) występuje głównie w grejpfrutach (*Citrus paradisi Macfad*). Neohesperydyna (16a) znajduje się w pomarańczach hiszpańskich (*Citrus aurantilum* L.) a poncyryna (16e) w cytrynach (*Poncirus trifoliata*) [47].

Gaffield i wsp. [1] udowodnili, że naringina (16c), izolowana ze skórek grejpfruta, występuje w dwóch enancjomerycznych formach 2*R* i 2*S*. Wykazali, że chiralność naringiny jest niejako funkcją dojrzałości owocu, ponieważ stosunek izomerów 2*S* do 2*R* w naringinie izolowanej z niedojrzałego owocu grejpfruta wynosi 9 : 1, natomiast w owocu dojrzałym zmienia się on na 2 : 3, przy czym izomer 2*R* charakteryzuje się bardziej gorzkim smakiem niż izomer 2*S*.



Schemat 1

Przy okazji badania wpływu struktury flawanoidów **16** na ich smak, zsyntezowano szereg pochodnych **16i-n** (Tabela 3), stosując metodę kondensacji 2,6-dihydroksyacetofenonu bądź 2-hydroksyacetofenonu z izowaniliną i jej pochodnymi w środowisku zasadowym (Schemat 1) [49]. Badania własności organoleptycznych tych związków wykazały, że są one słodkie bądź nie posiadają smaku. Natomiast nie obserwowano związków o smaku gorzkim, co można kojarzyć z faktem, że wszystkie pozbawione były reszt glikozydowych w pozycji 7 pierścienia A ($R^3 = H$; Tabela 2).

Zastąpienie grupy OMe (R^1) grupą OEt lub O-*n*-Pr, wpływało na obniżenie intensywności słodkiego smaku (**16j-k**), natomiast brak funkcji hydroksylowych w pozycjach 5 i 3' (R^2 i R^4) powodował całkowity zanik smaku (**16l,m,n**).

Tabela 3. Wpływ struktury cząsteczki na smak pochodnych flawanonu **16**

Związek	R^1	R^2	R^3	R^4	Słodkość ^a
16i	OMe	OH	H	OH	350
16j	OEt	OH	H	OH	150
16k	O- <i>n</i> -Pr	OH	H	OH	150
16l	OMe	OH	H	H	0
16m	OH	OMe	H	OH	0
16n	OH	H	H	OH	0

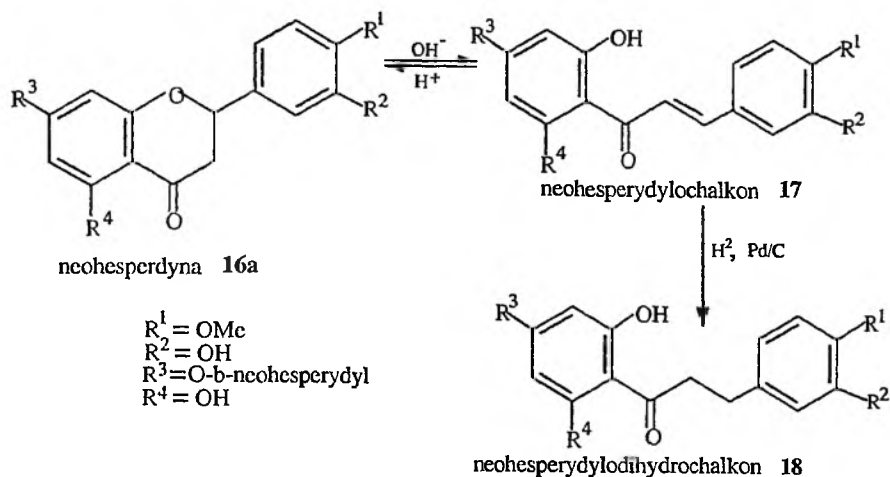
^a w odniesieniu do sacharozy, której słodkość = 1

Półsyntetyczne dihydrochalkony

Horowitz i Gentili [48] w 1963 roku, zaobserwowali ciekawą zależność. Stwierdzili oni, że naturalne flawanoidy owoców cytrusowych **16**, poddane katalitycznemu uwodornieniu w środowisku zasadowym, tworzą związki posiadające mniej lub bardziej słodki smak. Są to chalkony **17** i dihydrochalkony **18** – otwarto-pierścieniowe pochodne flawanonów **16** (Schemat 2).

Materiałem wyjściowym do produkcji najładniejszego dihydrochalkonu – neohe-sperydylodihydrochalkonu jest neohesperydyna (**16a**) uzyskiwana przez ekstrakcję niedojrzałych skórek pomarańczy *Sevilla oranges*.

Do chwili obecnej znane są jedynie dwa występujące w naturze dihydrochalkony: floryzyna i floretyna – glikozydy izolowane z korzeni drzew jabłoni, śliw i wiśni.



Schemat 2

Badania walorów smakowych otrzymanych dihydrochalkonów pozwoliły ustalić następujące zależności: słodkimi dihydrochalkonami okazały się te, otrzymane z gorzkich flawanoidów: naringiny i neohesperdiny (**16c** i **16a**) – mają one intensywnie słodki smak i są odpowiednio 300 i 1800 razy słodsze od sacharozy. Dihydrochalkon otrzymany z gorzkiej neocriocytryny (**16g**) charakteryzuje się lekko słodkim smakiem. Natomiast uzyskany z poncyryny (**16e**) ma gorzki smak, podobnie jak wyjściowy flawanoid [1, 48].

W następnych latach, w celu znalezienia zależności między budową cząsteczki a jej smakiem [1, 50], zsyntezowano jeszcze wiele pochodnych dihydrochalkonów. Przec analogię do wcześniej opisanych glikozydów, stewiozydu (**3a**) i glicyryzyny (**6a**), które zawierają dwie jednostki glikozydowe, zsyntezowano szereg pochodnych dihydrochalkonów **18**, w których podstawnikiem R były różne bis(glikozydy) [51]. Intensywność słodkiego smaku tych związków była różna, od 400 razy słodszych od sacharozy, przez słabo słodkie i niesłodkie do pochodnych o smaku gorzkim. Zaobserwowano następujące zależności: intensywność smaku słodkiego wzrastała jeśli cząsteczka dihydrochalkonu zawierała jedną lub dwie jednostki monosacharydowe. Wprowadzenie do cząsteczki dihydrochalkonu różnych L-cukrów, w miejsce grupy α -L-ramnopiranozylowej, nie obniżało słodkości, natomiast zastąpienie reszt L-monosacharydowych D-cukrami, zdecydowanie osłabiało uczucie słodkiego smaku.

Dihydrochalkony są słabo rozpuszczalne w wodzie. W temperaturze pokojowej, rozpuszczalność naringinylohydrochalkonu wynosi zaledwie 0,94 g/l, a neohesperdylohydrochalkonu – 0,5 g/l. Wodne roztwory dihydrochalkonów zawierających fragmenty cukrowe, są stabilne w środowisku kwaśnym i nie ulegają hydrolizie nawet przy pH poniżej 2. Buforowane roztwory są w temperaturze 10°C stabilne przez 8 godzin w szerokim zakresie pH [1, 52]. Badania farmakologiczne

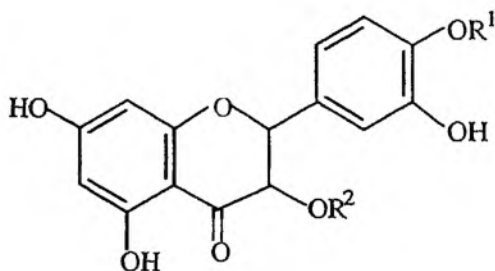
tych związków wykazały, że są one całkowicie nietoksyczne w dawkach 0,2–1,0 g/kg masy ciała myszy i psów i nie powodują zmian żadnych parametrów biochemicznych w organizmie. Nie są one mutagenne, kancerogenne oraz kariogenne. Te właściwości stawiają je w rzędzie bardzo bezpiecznych, środków słodzących.

Półsyntetyczne dihydrochalkony charakteryzują się świeżym mentolowo-słodkim smakiem. Przy ich smakowaniu, wrażenie smaku słodkiego utrzymuje się znacznie dłużej (ponad 10 minut), niż w przypadku sacharozy, dlatego maskują one skutecznie nieprzyjemny gorzki smak wielu leków i napojów. Ich walory smakowe są wielokrotnie silniejsze od niektórych syntetycznych substancji słodzących, i tak dihydrochalkony są 2,5 do 7 razy słodsze od sacharyny i 25 do 40 razy słodsze od cyklaminianu sodu.

Neohesperydylodihydrochalkon – jeden z najśłodszych dihydrochalkonów (1800 razy słodszy od sacharozy), został dopuszczony, w wielu krajach, do stosowania w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym, jako bezpieczny środek słodzący. Jego podstawową zaletą jest to, że używa się go w bardzo małych dawkach rzędu 20–50 ppm, jako dodatek do żywności, napojów bezalkoholowych, gum do żucia, słodaczy oraz leków.

Dihydroflawanole (19, 2,3-dihydro-2-(3-hydroksy-4-metoksyfenylo)-3,5,7-tri-hydroksy-4H-1-benzopiran-4-ony)

Z pąków lekarskiego zioła *Tessaria dodoneifolia* należącego do rodziny Asteraceae, rosnącego w Paragwaju i nazywanego przez miejscową ludność *hierba dulce* czyli „słodkim ziołem”, Kinghorn i wsp. [53] izolowali w 1988 roku nową słodką substancję – octan 3-dihydrokwercetyny (**19a**), który okazał się 400 razy słodszy od sacharozy. W tym samym roku Kasai i wsp. [54] izolowali z bardzo małą wydajnością (0,01%), z suchych liści chińskiego lekarskiego zioła *Engelhardtia chrosolepis*, zwanego *huang-qi*, słodką substancję, która była pierwszym słodkim dihydroflawanoglikozydem 3-O- α -L-ramnozylo-(2S,3S)taksyfoliną (**19b**).



Związek	Nazwa zwyczajowa	R ¹	R ²
19a	Octan 3-dihydrokwericytyny	H	CH ₃ C=O
19b	3-O- α -L-ramnozylotaksyfolina	H	α -L-Rha
19c	octan 4'-metoksy-3-dihydrokwericytyny	CH ₃	CH ₃ C=O

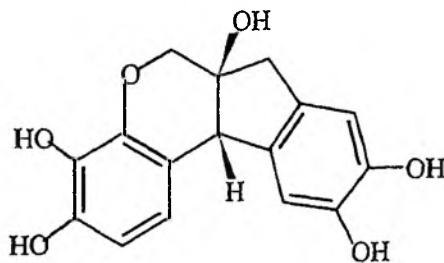
W rok później, Kinghorn i Soejarto [55] zsyntezowali, z łatwo dostępnego 2,4,6-trihydroksyacctofenonu i izowaniliny, octan 4'-metoksy-3-dihydrokwericytyny (19c) oraz scharakteryzowali jego walory smakowe. Czysta słodycz tego związku, nie zabarwiona posmakiem gorczy, jest porównywalna ze słodyczą naturalnego związku 19a. Jednak generowanie uczucia słodkiego smaku odbywa się bardzo powoli. Prawdopodobnie grupa hydroksylowa w pozycji 4' dihydroflawanolu 19, jest niezbędna do szybkiego wiązania substancji z receptorem słodkiego smaku. Zastąpienie jej grupą metoksyową utrudnia tworzenie kompleksu receptor-substancja słodka i powoduje dłuższe w czasie, uwalnianie wrażenia słodczy.

Wyniki badań toksykologicznych dihydroflawanoli nie zostały dotychczas opublikowane.

1.6. INNE SUBSTANCJE SŁODKIE POCHODZENIA NATURALNEGO

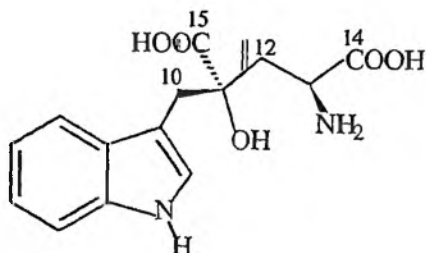
Hematoksylina

W znanej od dawna roślinie, *Haematoxylon campechianum*, należącej do rodziny Leguminosae, rosnącej w Meksyku, Południowej Ameryce i Zachodnich Indiach, zawarta jest słodka substancja – hematoksylina (20).



20

W 1991 roku Masuda i wsp. [56] badali walory smakowe ekstraktów tej rośliny. Stwierdzili oni, że słodki smak ekstraktów jest 120 razy silniejszy od sacharozy. Naturalny enancjomer (+)-hematoksylina (pentahydroksydihydrobenzopyran) (20), w którym pierścienie, cyklopentanowy i piranowy zajmują względem siebie



22

Na podstawie analizy widm ^1H oraz ^{13}C NMR przypisano monatynie strukturę kwasu 4-hydroksy-4-(indol-3-metylo)glutaminowego. Jej słodycz jest 1200–1400 razy silniejsza od sacharozy [59]. W roku 2001 Oliveira i Coelho [60] opisali diastereoselektywną metodę tworzenia czwartorzędowego centrum w piroglutaminowej pochodnej monatyny oraz syntezę *N*-Boc-*N'*-Boc monatyny, którą można łatwo przekształcić w czystą monatynę.

2. SYNTETYCZNE NISKOKALORYCZNE ŚRODKI SŁODZĄCE

Badania syntetycznych środków słodzących rozpoczęto w roku 1879, kiedy to Fahlberg stwierdził, że sacharyna ma intensywnie słodki smak. W 1883 roku opisano 4-ctoksyfenylomocznik, a do dnia dzisiejszego zsyntezowano już setki organicznych związków o słodkim smaku. Zapotrzebowanie na substancje smakowe o ściśle wymaganych własnościach gwałtownie wzrosło wraz z rozwojem przemysłu spożywczego. Względy ekonomiczne (wzrastające zapotrzebowanie na cukier) oraz zdrowotne (wzrastająca liczba diabetyków, ludzi otyłych, próchnica zębów), zwróciły uwagę naukowców na poszukiwanie i syntezę coraz lepszych środków słodzących, o przewidzianych właściwościach. Badania ostatnich czterdziestu lat, bardzo wzbogaciły wiedzę na temat chemorecepcji, zwłaszcza słodkiego smaku [1, 3]. Opublikowane teorie i informacje o wzajemnych oddziaływaniach między receptorem smaku a substancją wywołującą smak, pozwoliły naukowcom na projektowanie nowych struktur związków chemicznych, dla których są w stanie przewidzieć własności smakowe.

O ile cukry służą jako pożywienie, o tyle syntetyczne środki słodzące są jedynie niskokalorycznymi dodatkami, działającymi sensorycznie, używanymi do nadawania smaku żywności i lekom, do przygotowywania żywności dietetycznej i dla diabetyków. Dlatego substancjom syntetycznym, wprowadzanym na rynek jako środki słodzące, tak zwane „słodziki”, stawiane są bardzo wysokie wymagania, związane z ich właściwościami, zarówno sensorycznymi, fizycznymi jak i chemicznymi.

Ich właściwości sensoryczne, decydujące o stosowaniu ich w żywności, napojach i lekach muszą ujawniać się w ciągu 1 do 2 sekund, ponieważ wtedy nadają się

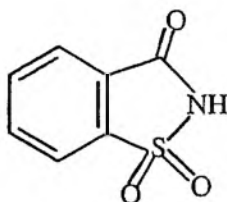
do maskowania gorzkiego i nieprzyjemnego posmaku. Środki te muszą być chemicznie biernie wobec wszelkich naturalnych składników i innych chemicznych dodatków, znajdujących się w produktach, w których mają być użyte. Muszą być termicznie odporne, ponieważ podczas przygotowania żywności, stosuje się wiele procesów technologicznych, jak ogrzewanie, zamrożenie czy liofilizacja. Dlatego powinny być one trwałe w zakresie temperatur od -30 do $+260^{\circ}\text{C}$. Syntetyczne środki słodzące powinny być również trwałe w roztworach wodnych, w szerokim zakresie wartości pH, ponieważ pH żywności zmienia się od 2,5 do 8 jednostek. Najważniejszym jednak wymogiem, stawianym tym związkom, jest ich nieszkodliwość dla zdrowia, muszą być one nietoksyczne, niekancerogenne, niemutagenne, itp.

Z ogromnej liczby zsyntezowanych związków, posiadających słodki smak, tylko nieliczne spełniają te wymogi. I tak stosowanie sacharyny w żywności i napojach jest ograniczone ze względu na jej gorzki posmak. Kilka innych środków słodzących, używanych w przeszłości, zostało wycofanych z użycia ze względu na ich toksyczne działanie (dulcyna, P-4000, perilaldoksym).

W świetle aktualnej wiedzy o substancjach słodkich, interesującym wydaje się fakt, że pierwsze syntetycznie otrzymane środki słodzące (sacharyna, cyklammat, aspartam), zostały odkryte przez przypadek.

Sacharyna

Sacharyna [1,1-ditlenek 1,2-benzoizotiazol-3(2*H*)-onu] (**23**) jest najwcześniej poznany syntetycznym środkiem słodzącym, 300–500 razy słodszy od sacharozy.



23

Jej słodkie właściwości odkrył przez przypadek, niemiecki chemik Constantin Fahlberg w 1878 roku. Po utlenieniu *o*-toluenosulfonamidu, przeniósł on produkt reakcji na bibułę, na której chciał go zważyć. Niewielka ilość białego proszku pozostała na jego palcach. Uczony polizał palec i zaskoczony stwierdził, że jest on słodki [1, 3]. W roku 1879 synteza sacharyny została opatentowana, a rok później opublikowana w czasopismach naukowych. W roku 1884 sacharynę zaczęto produkować na skalę przemysłową.

Chemiczna stabilność sacharyny oraz niski koszt jej produkcji spowodowały, że do chwili obecnej znajduje ona wszechstronne zastosowanie jako dodatek do żywności, napojów i leków. Sacharyna posiada słodki smak z odrobiną goryczy, czasami jest wyczuwalny słaby metaliczny posmak. Jest słabo rozpuszczalna w wodzie. Najczęściej używana w postaci soli sodowej lub wapniowej. Dość szybko przechodzi przez układ trawienny i jest wydalana z moczem aż w 98%. Sacharyna jest jedynym syntetycznym środkiem słodzącym, który został dopuszczony do produkcji, przed zbadaniem jego właściwości toksycznych i kancerogennych. Jedynym testem sprawdzającym, wykonanym pod koniec XIX stulecia, było skosmowanie przez Fahlberga 10 g sacharyny, przed dopuszczeniem jej do produkcji. Dopiero 100 lat później, w wyniku szczegółowych badań, stwierdzono, że istnieje związek między systematycznym stosowaniem sacharyny, a powstawaniem raka pęcherza moczowego u szczurów [1]. W ostatnich 20 latach stosowanie sacharyny zostało ograniczone do bardzo małych dawek (od 5 do 15 mg/kg produktu spożywczego). Nic zaleca się obecnie używania sacharyny w codziennej diecie przez dłuższy okres czasu.

Aktualnie są stosowane dwie metody syntezy sacharyny: metoda Fahlberga wykorzystująca utlenianie *o*-toluenosulfonamidu oraz metoda Maumee, która polega na podstawieniu grupy aminowej w kwasie antranilowym, przez resztę sulfonamidową [1].

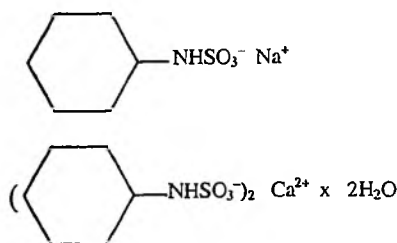
Do chwili obecnej zsyntezowano i przebadano własności smakowe ponad 80 pochodnych sacharyny [1, 3]. Wyniki tych badań pozwoliły na sformułowanie kilku, mających znaczenie ogólne, wniosków, które pozwoliły Rossy'emu i wsp. [61], w 1980 roku, zaplanować strukturę i zsyntezować tiofenową pochodną sacharyny. Pochodna ta jest 1000 razy słodsza od sacharozy i nie posiada nieprzyjemnego gorzkiego posmaku.

Całkowity zanik słodkiego smaku obserwowano, kiedy w miejsce protonu grupy imidowej wprowadzono podstawniki alkilowe, cykloalkilowe i heterocykliczne oraz gdy zastąpiono atom siarki grupy sulfonowej, w pierścieniu benzoizotiazolowym podstawnikiem dimetylosililowym $\text{Si}(\text{CH}_3)_2$ lub atomem selenu. Obniżenie intensywności słodkiego smaku obserwowano też, kiedy proton grupy imidowej zastępowany był kationami innymi niż Na^+ , NH_4^+ , Ca^{2+} . Zwiększenie intensywności słodkiego smaku powodowały podstawniki elektronodonorowe w pierścieniu benzenowym oraz zamiana pierścienia benzenowego na pierścień tiofenowy (znaczny wzrost intensywności smaku słodkiego). Natomiast wprowadzenie podstawników elektronoakceptorowych do pierścienia benzenowego powodowało uwalnianie gorzkiego smaku.

Cyklaminiany

Cyklaminiany (**24**) są solami kwasu cykloheksyloaminosulfonowego. Słodkie właściwości cyklaminianów zostały odkryte przypadkowo, podobnie jak sachary-

ny. W 1937 roku, jeden z naukowców Stanowego Uniwersytetu w Illinois, M. Sveda, badając przeciwgorączkowe własności organicznych pochodnych kwasu aminosulfonowego, stwierdził, że jego papieros, zanieczyszczony jedną z nich – kwasem cyklaminowym, smakuje słodko. W 1940 roku kwas cyklaminowy i jego sole zostały opatentowane jako syntetyczne niskokaloryczne środki słodzące [1, 3]. Pierwszy artykuł na ten temat ukazał się dopiero w 1944 roku [62].



23

Sól sodowa kwasu cyklaminowego, nazywana często cyklamatem, jest najbardziej rozpowszechnionym w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym słodzikiem. Jest ona 30 razy słodsza od sacharozy. Jest białym krystalicznym, bezwonnym proszkiem i ma przyjemny słodki smak. Sól wapniowa jest stosowana jako dodatek smakowy szczególnie w dietach, które wymagają niskiej zawartości Na^+ . Cyklaminy są dobrze rozpuszczalne w wodzie, są stabilne w szerokim zakresie pH (2–10) i temperatury ($t_{\text{rozkł}} = 260^\circ\text{C}$).

Największymi producentami cyklaminianów są Stany Zjednoczone Ameryki, Kanada i Japonia. Używane są one głównie do słodzenia napojów, soków owocowych, kompotów, produktów spożywczych, takich jak pieczywo i słodycze oraz do polepszania smaku leków.

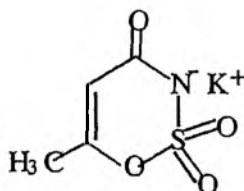
Badania toksykologiczne i kancerogenne cyklaminianów, podobnie jak sacharyny, rozpoczęto dopiero na przełomie lat siedemdziesiątych i osiemdziesiątych XX wieku. Początkowo nie obserwowano żadnych szkodliwych oddziaływań cyklaminianów na wątrobę, nerki i inne narządy. Duże dawki cyklaminianów podawane w żywności nie wywoływały u szczurów działania kancerogennego. Metabolity były w krótkim czasie wydalane z organizmu, głównie z moczem [1]. Stwierdzono jednak, że niewielka ich ilość (0,1–0,9%) jest metabolizowana do wyjściowej cykloheksyloaminy, która jest silnie toksyczna, a także do dicykloheksyloaminy, która jest kancerogenna [63]. Obserwowano również powstawanie raka pęcherza moczowego u szczurów, którym wcześniej podawano niekancerogenną, podprogową dawkę *N*-metylonitrozomocznika [64]. Wyniki tych badań, były powodem, że na jakiś czas zakazano używania cyklaminianów w produktach spożywczych. Od kilkunastu lat trwa spór wokół rakotwórczego działania cyklaminianów i pomimo że większość przeprowadzonych badań potwierdza opinię o ich nieszkodliwości [1, 3], jednak nie zaleca się ich spożywania przez małe dzieci i kobiety

ciężarne. Aktualnie, firmy spożywcze i farmaceutyczne, które stosują cyklaminiany jako dodatki do żywności i leków, są zobowiązane do umieszczania na opakowaniu informacji, że produkty zawierają właśnie te związki. Na skalę techniczną otrzymuje się cyklaminiany na drodze *N*-sulfonowania cykloheksyloaminy, przy użyciu kwasu sulfaminowego, bądź tritlenku siarki [1, 65].

W ciągu ostatnich trzydziestu lat zsyntezowano wiele pochodnych cyklaminianów, różnie modyfikowanych. Niewiele z nich charakteryzowało się słodkim smakiem, a nieliczne miały intensywność słodkiego smaku porównywalną bądź wyższą od cyklamatu [1, 3].

Acesulfam-K

W 1973 roku Clauss i Jensen [66] opisali nową grupę związków o słodkim smaku, będących podobnie jak sacharyna i cyklaminiany, pochodnymi sulfamidowymi. Są to podstawione 2,2-ditlenki 3,4-dihydro-1,2,3-oksotiazyno-4-onu. Wyraźnie słodkim smakiem odznaczają się w tej grupie sole sodowe i potasowe 6-metylopo pochodnych tych ditlenków. Najwięcej uwagi poświęcono soli potasowej nazwanej acesulfamem-K (25). Ma ona bardzo przyjemny słodki smak, jest 130 razy słodsza od sacharozy, dobrze rozpuszcza się w wodzie, jest odporna na hydrolizę w szerokim zakresie pH (3–7), nie zmienia smaku nawet w kwaśnych napojach orzeźwiających i jest trwała do temperatury 120°C.



25

Na skalę przemysłową otrzymuje się acesulfam-K z chloro- lub fluorosulfonyloizocyanianu i estru *tert*-butylowego kwasu 3-ketobutanowego. Uzyskany *N*-chloro- lub *N*-(fluorosulfonylo)acetamid cyklizuje następnie, w metanolowym roztworze wodorotlenku potasu do końcowego produktu [66].

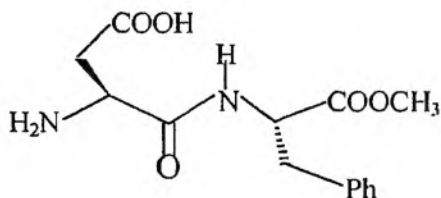
Acesulfam-K jest nietoksyczny, nie posiada właściwości kancerogennych i nie stwierdzono jego działania mutagennego i teratogenego [1]. W organizmie człowieka, jest szybko rozkładany. W pierwszej kolejności następuje rozerwanie pierścienia i powstanie acetamidu kwasu *N*-sulfonowego, który w wyniku dalszej degradacji rozkłada się do substancji fizjologicznie nieszkodliwych [65].

Z względu na przyjemny słodki smak acesulfamu-K, jest on wszechstronnie wykorzystywany jako dodatek do napojów i soków, do galaretek owocowych, do

polepszania smaku napojów alkoholowych takich jak piwo, wina i mocne trunki. W kompozycji z cukrami kształtuje typowy aromat i smak różnych wyrobów cukierniczych, może być dodawany do gum do żucia. Jest również używany w przemyśle kosmetycznym do produkcji pomadek do ust i past do zębów. Jego słodki smak maskuje nieprzyjemny smak różnych komponentów w tych kosmetykach. Podobną maskującą funkcję spełnia acesulfam-K w przemyśle farmaceutycznym, szczególnie w lekach dla diabetyków.

Aspartam

Odkrycie słodkiego smaku aspartamu – estru metylowego *L*- α -aspartylo-*L*-fenyloalaniny (**26**), było tak samo przypadkowe jak odkrycie słodkiego smaku sacharyny i cyklaminianów. W grudniu 1965 roku, J. Schlatter, pracownik laboratorium firmy G.D. Searle & Company (Skokie, Illinois), krystalizował ester metylowy dipeptydu *L*- α -aspartylo-*L*-fenyloalaniny, który był produktem przejściowym w syntezie C-terminalnego tetrapeptydu Trp-Met-Asp-Phe-NH₂, będącego składnikiem hormonu gastryny. Podczas ogrzewania Schlatter oblał sobie rękę metanolem z roztworem tego dipeptydu. Nie umył rąk, wiedząc, że aminokwasy nie są szkodliwe. Po jakimś czasie polizał palec i stwierdził, że ma on bardzo przyjemny, intensywnie słodki smak. I to właśnie firma G.D. Searle & Company, była pierwszą, która wyprodukowała słodki dipeptyd – aspartam na skalę przemysłową.



26

Od tego czasu ukazało się bardzo wiele prac poświęconych syntezie i poszukiwaniu zależności pomiędzy strukturą analogów aspartamu, a ich właściwościami smakowymi. Cząsteczka aspartamu posłużyła Temusiemu i wsp. [1, 2], jako modelowa forma molekularna, do opracowania wstępnej wersji kształtu (mapy) receptora słodkiego smaku. W latach późniejszych otrzymano wiele dipeptydów, pochodnych aspartamu i badano ich walory smakowe oraz toksyczność. Wśród nich na szczególną uwagę zasługują bardzo stabilne amidy [67] oraz estry [68, 69].

Aspartam jest 160–180 razy słodszy od sacharozy i wykazuje takie właściwości, jakie powinien posiadać doskonały środek słodzący: charakteryzuje się czystym intensywnie słodkim smakiem, jest nietoksyczny i niskokaloryczny, nie powoduje próchnicy zębów, posiada umiarkowaną stabilność, nie działa przeciwsz-

czająco, łatwo jest metabolizowany w organizmie człowieka. No i rzeczą najbardziej istotną jest fakt, że jest on łatwo dostępny i stosunkowo tani. Pod nazwą Nutra Sweet, opanował przemysł spożywczy i farmaceutyczny na całym świecie [1].

Większość opisanych w literaturze syntez aspartamu wykorzystywała do łączenia dwóch reszt aminokwasowych, które miały odpowiednio chronione grupy funkcyjne, tradycyjne metody otrzymywania peptydów [70].

Na skalę przemysłową aspartam otrzymuje się poprzez dehydratację kwasu asparaginowego do jego bezwodnika, który reaguje następnie z fenyloalaniną lub jej estrem metylowym, dając końcowy produkt. W zależności od rodzaju używanego odczynnika, służącego do ochrony grupy aminowej kwasu asparaginowego, stosowane są dwie metody przemysłowe, Z i F, syntezy aspartamu.

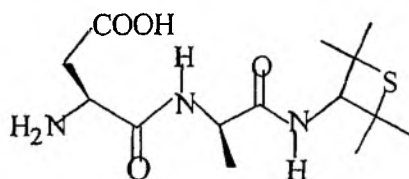
W pierwszej zwanej metodą Z, grupą osłaniającą jest grupa benzyloksykarbonylowa, którą usuwa się w ostatnim etapie procesu, przez katalityczne uwodornienie, w obecności katalizatora Pd/C.

W drugiej metodzie F, udogodnieniem jest jednoetapowe *one pot* odwodnienie i osłanianie grupy aminowej przez grupę formylową, w wyniku jednoczesnego traktowania kwasu asparaginowego bezwodnikiem kwasu octowego w obecności kwasu mrówkowego. W końcowym etapie, grupa formylowa usuwana jest w sposób prosty przez kwasową hydrolizę [65].

W ostatnich latach trwały intensywne poszukiwania biotechnologicznych metod syntezy aspartamu z zastosowaniem biokatalizatorów. Opracowano metody enzymatycznego usuwania grupy osłaniającej, enzymatycznej estryfikacji L- α -aspartylo-L-fenyloalaniny, czy enzymatycznej hydrolizy syntetycznego polipeptydu – (Asp-Phe)_n [65].

Alitam

Wynikiem poszukiwań słodkich peptydów, jest pochodna aspartamu – alitam, otrzymany przez Pfizera w 1983 roku tradycyjnymi metodami, używanymi do syntezy peptydów [71, 72]. Alitam jest N-tetrametylo-tietanoimidem L-aspartylo-D-alaniny (27).

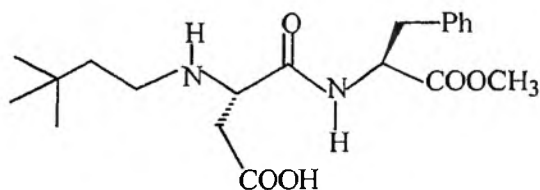


27

Ma przyjemny słodki smak i jest 2000 razy słodszy od sacharozy. Wyniki badań ostatnich lat potwierdzają, że alitam, podobnie jak aspartam, wykazuje synergizm z sacharyną, cyklamatem i acesulfamem-K [73].

Neotam

Ogromna teoretyczna wiedza, poparta wieloletnimi doświadczeniami, związanymi z poszukiwaniem zależności między strukturą związku, a jego smakiem, pozwoliły na zaprojektowanie struktury, i zsyntezowanie w 1999 roku, nowego słodkiego dipeptydu – *N*-(3,3-dimetylobutylo) pochodnej estru metylowego *L*- α -aspartylo-*L*-fenyloalaniny (**28**) – nazwanej neotamem [74].



28

Neotam jest syntetycznym środkiem słodzącym nowej generacji. Posiada czysty słodki smak i jest aż 8000 razy słodszy od sacharozy.

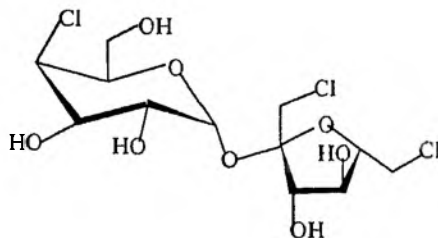
Został otrzymany przez redukcyjne alkirowanie aspartamu przy użyciu metanolowego roztworu 3,3-dimetylobutyroaldehydu, w obecności katalizatora (Pd lub Pt).

Neotam jest rozpuszczalny w wodzie, bardzo dobrze rozpuszczalny w alkoholach oraz polarnych rozpuszczalnikach organicznych. Podobnie jak aspartam, jest stabilny w różnych warunkach, nie jest toksyczny i kancerogeny.

Ze względu na doskonałe własności smakowe, jak i łatwy sposób produkcji, neotam jest aktualnie najlepszym kandydatem, jako syntetyczny środek słodzący nowej generacji [73].

Sukraloza

Odpowiednio modyfikowane cukry, stanowią jeszcze jedną grupę syntetycznych środków słodzących, które znalazły zastosowanie w przemyśle spożywczym.



29

Sukraloza ma przyjemny słodki smak, jest 600 razy słodsza od sacharozy i wykazuje słaby synergizm z cyklamatem, acesulfamem-K oraz neohesperidylochalkonem [73].

Jest bardzo dobrze rozpuszczalna w wodzie i stabilna w szerokim zakresie pH i temperatury.

Synteza sukralozy wymaga serii przejść, mających na celu selektywne blokowanie i odblokowanie, w taki sposób żeby grupa hydroksylowa, znajdująca się w pozycji 4, mogła być podstawiona atomem chloru z inwersją konfiguracji [76]. Do otrzymywania produktów pośrednich, potrzebnych do syntezy sukralozy, używano również innych metod, takich jak: regioselektywne acylowanie i deacylowanie, czy biokatalityczne transformacje [65].

PODSUMOWANIE

Podsumowując stan aktualnej wiedzy o możliwościach izolowania i wykorzystania naturalnych substancji słodkich oraz o projektowaniu i syntezie słodkich związków na drodze chemicznej, bez wątplenia można stwierdzić, że projektowanie i synteza nowych struktur substancji słodkich, niekalorycznych, a zarazem bezpiecznych dla człowieka, są w pełni realne. Jest to możliwe dzięki ogromnej liczbie informacji, których dostarczają badania korelujące strukturę związku chemicznego z jego własnościami smakowymi.

Spośród naturalnych substancji słodkich, zastosowanie, jako zastępcze środki słodzące w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym oraz w codziennej diecie człowieka, znalazły nieliczne. Należą do nich: słodkie białko – taumatyna (3000 razy słodsza od sacharozy), substancje z grupy terpenoidów (perilartyna, stewiozyd, glicyryzyna), osładyna wśród steroidów, oraz filodulcyna, flawanoidy i półsyntetyczne dihydrochalkony.

W grupie syntetycznie otrzymanych substancji słodkich na szczególną uwagę zasługują słodkie dipcptydy, a wśród nich aspartam, alitam, czy najnowszy neotam – aż 8000 razy słodszy od sacharozy.

Przegląd najnowszej literatury, dotyczącej omawianego problemu, dowodzi, że nadal prowadzone są intensywne badania, ukierunkowane zwłaszcza, na poszukiwanie nowych syntetycznych substancji słodkich, które posiadałyby cechy idealnego środka słodzącego, tzn. dobrze rozpuszczalnego, trwałego termicznie i chemicznie, niskokalorycznego, nietoksycznego i nie powodującego próchnicy zębów.

Można się spodziewać, iż w najbliższym czasie dostępne będą, produkowane przemysłowo, nowe syntetyczne środki słodzące o nieujawnionych dotychczas strukturach.

PIŚMIENICTWO CYTOWANE

- [1] A. Krutosikova, M. Uher, *Natural and synthetic sweet substances*, Ellis Horwood Lim. (Ed.), Chichester, England, 1992.
- [2] J. Jasiczak, R.I. Zalewski, *Wiad. Chem.*, 1994, **48**, 277.
- [3] K. Jarzembek, *Wiad. Chem.*, 2001, **55**, 317.
- [4] G.G. Birch, C.K. Lee, *Dev. Sweeteners*, 1979, **1**, 165.
- [5] H. van der Wel, K. Loeve, *Eur. J. Biochem.*, 1972, **31**, 221.
- [6] R.B. Iyengar, P. Smits, F.J.G van der Ouderaa, H. van der Wel, J. van Brouwershaven, P. Ravenstein, G. Richters, P.D. van Wassenaar, *Eur. J. Biochem.*, 1979, **96**, 193.
- [7] J. Caldwell, J.L. Markley, *Chem. Soc., Pak.*, 1999, **21**, 268.
- [8] J.A. Morris, R.H. Cagan, *Biochem. Biophys. Acta*, 1972, **261**, 14.
- [9] J.A. Morris, R. Martenson, G.J. Deibler, R.H. Cagan, *Biol. Chem.*, 1973, **248**, 534.
- [10] H. van der Wel, *FEBS Lett.*, 1972, **21**, 88.
- [11] G. Frank, H. Zuber, *Z. Physiol. Chem.*, 1976, **357**, 586.
- [12] S.H. Kim, A. de Vos, C. Ogata, *Trends Biochem.Sci*, 1988, **13**, 13.
- [13] M. Kohmura, N. Nio, Y. Ariyoshi, *Agric. Biol. Chem.*, 1991, **55**, 539.
- [14] Y. Kurihara, *Crit. Revs Food Sci. Nutrition*, 1992, **32**, 231.
- [15] M. Kohmura, Y. Ariyoshi, *Biopolymers*, 1998, **46**, 215.
- [16] H. van der Wel, G. Larson, A. Hladik, C.M. Hladik, G. Hellekant, D. Glaser, *Chem. Senses*, 1989, **14**, 75.
- [17] D. Ming, G. Hellekant, *FEBS Lett.*, 1994, **355**, 106.
- [18] H. Izawa, M. Ota, M. Kohmura, Y. Ariyoshi, *Biopolymers*, 1996, **39**, 95.
- [19] H. Iwamura, *J. Med. Chem*, 1980, **23**, 308.
- [20] A.D. Kinghorn, D.D. Soejarto, *CRC Critical Reviews in Plant Sciences*, Vol.4. CRC press, Boca Raton, Fl., 1986, 79.
- [21] C.M. Compadre, J.M. Pezzutto, A.D. Kinghorn, S.K. Kamath, *Science*, 1985, **227**, 417.
- [22] K. Mori, M. Kato, *Tetrahedron*, 1986, **42**, 5895.
- [23] A.D. Kinghorn, E.J. Kennelly, *J. Chem. Educ.*, 1995, **72**, 676.
- [24] O. Tanaka, *Pure and Appl. Chem.*, 1997, **69**, 675.
- [25] J.E. Brandle, A.N. Starratt, M. Gijzen, *Can. J. Plant. Sci.*, 1998, **78**, 527.
- [26] T. Tanaka, O. Tanaka, Z.N. Lin, J. Zohn, H. Agcte, *Chem Pharm.Bull.*, 1983, **31**, 780.
- [27] M. Nishizawa, H. Yamada, *Synlett.*, 1995, 785.
- [28] F. Fullas, P.A. Hussain, E. Bordas, J.M. Pezzutto, D.D. Soejarto, A.D. Kinghorn, *Tetrahedron*, 1991, **47**, 8515.
- [29] A. Tschirch, H. Cederberg, *Arch. Pharm.*, 1907, **245**, 97.
- [30] H.M. Lin, T Akiyama, N. Sugimoto, T. Maitani, *Food Additives and Contaminants*, 2001, **18**, 281.
- [31] K. Mizutani, T. Kuramoto, Y. Tamua, N. Ohtake, S. Doi, M. Nakaura, O. Tanaka, *Biosci. Biotech. Biochem*, 1994, **58**, 554.
- [32] I. Kitagawa, M. Sakagami, F. Hashiuchi, J.L. Zhou, M. Yoshikawa, *J. Ren, Chem. Pharm. Bull.* 1983, **23**, 259.
- [33] Y. Hashimoto, H. Ishizone, M. Sukanuma, K. Nakatsu, H. Yoshioka, M. Ogura, *Phytochemistry*, 1983, **23**, 259.
- [34] C.H. Lee, *Experientia*, 1975, **31**, 533.
- [35] T. Tekamoto, S. Arihara, T. Nakajima, M. Okuhira, *Yakugaku Zassi*, 1983, **103**, 1115, 1155, 1167.
- [36] H.C. Makapugay, N.P.D. Nanayakkara, D.D. Soejarto, A.D. Kinghorn, *J. Agric. Food Chem.*, 1975, **33**, 348.

- [37] R. Kasai, K. Matsumoto, M.R.L. Nic, U. Awazu, J. Zhou, O. Tanaka, *Phytochemistry*, 1987, **26**, 1371.
- [38] Y.H. Choi, A.D. Kinghorn, X. Shi, H. Zhang, B.K. Thco, *Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1988, 887.
- [39] M. Nishizawa, K. Yamada, *J. Indian Inst. Sci.*, 1994, **74**, 169.
- [40] H. Yamada, M. Nishizawa, *J. Org. Chem.*, 1995, **60**, 388.
- [41] J. Kim, J.M. Pezzutto, D.D. Soejarto, F.A. Land, A.D. Kinghorn, *J. Nat. Prod.*, 1998, **51**, 1166.
- [42] E.J. Kennelly, L. Cai, L. Long, L. Shamon, K. Zaw, B.N. Zhou, J.M. Pezzutto, A.D. Kinghorn, *J. Agric. Food Chem.*, 1995, **43**, 2602.
- [43] Y. Asahino, *J. Asanr, Ber.*, 1929, **62**, 171.
- [44] H. Arakawa, M. Nakazaki, *Chem. Ind. (London)*, 1959, 671.
- [45] A. Ramacciotti, R. Fiaschi, E. Napolitano, *J. Org. Chem.* 1996, **61**, 5371.
- [46] N. Takeuchi, M. Murase, K. Ochi, S. Tonibaga, *Chem. Pharm. Bull.*, 1980, **28**, 3613.
- [47] W.W.J. Dick, J.E. Hodge, *J. Agric. Food Chem.*, 1978, **26**, 723.
- [48] R.M. Horowitz, B. Gentili, (Ed.) G.E. Inglet, *Symposium Sweeteners*. Avi Publishing Company, Inc. Westport, Conn., Chapter 16, 1974.
- [49] M. Yamoto, K. Hashigaki, K. Mito, T. Koyama, *Chem. Pharm. Bull.*, 1978, **26**, 2321.
- [50] S. Esaki, K. Nishiyama, N. Sugiyama, R. Nakajima, Y. Takao, S. Kamiya, *Biosci, Biotech. Biochem.*, 1994, **58**, 1479.
- [51] F. Konishi, S. Esaki, S. Kamiya, *Agric. Biol. Chem.*, 1983, **47**, 1419.
- [52] A. Bär, F. Borrego, O. Benavente, J. Castilio, J.A. del Rio, *Lebensm.-Wiss. u. Technol.*, 1990, **23**, 371.
- [53] N.P.D. Nanayakkara, R.A. Hussain, J.M. Pezzutto, D.D. Soejarto, A.D. Kinghorn, *J. Med. Chem.*, 1988, **31**, 1250.
- [54] R. Kasai, S. Hirono, W.H. Chou, O. Tanaka, F.H. Chem, *Chem. Pharm. Bull.*, 1988, **36**, 4167.
- [55] A.D. Kinghorn, D.D. Soejarto, *Med. Res. Revs.*, 1989, **9**, 91.
- [56] H. Masuda, K. Ohtani, K. Mizutani, S. Ogawa, R. Kasai, O. Tanaka, *Chem. Pharm. Bull.*, 1991, **39**, 1382.
- [57] A. Arnoldi, A. Bassoli, G. Borgonovo, L. Merlini, *J. Chem. Soc. Perkin Trans I*, 1995, 2447.
- [58] Vo Duy Huan, K. Ohtani, R. Kasai, Y. Yamasaki, Nguyen Viet Tun, *Chem. Pharm. Bull.*, 2001, **49**, 453.
- [59] R. Vleggaar, L.G.J. Ackerman, P.S. Steyn, *J. Chem. Soc. Perkin Trans I*, 1992, 3095.
- [60] D.J. Oliveira, F. Coelho, *Tetrahedron Lett.*, 2001, **42**, 6793.
- [61] P.A. Rossy, W. Hoffmann, N. Mueller, *J. Org. Chem.*, 1980, **45**, 617.
- [62] L.F. Audrieth, M. Sveda, *J. Org. Chem.*, 1944, **9**, 89.
- [63] R. Ferrando, *Ann. Fals. Exp. Chim.*, 1981, **74**, 285.
- [64] J. Sula, *Chem. Listy*, 1982, **76**, 962.
- [65] D.J. Ager, D.P. Pantalone, S.A. Henderson, A.R. Katrizky, I. Parkash, D.E. Walters, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1998, **37**, 1802.
- [66] K. Clauss, H. Jensen, *Angev. Chem.*, 1973, **85**, 965.
- [67] R.H. Mazur, A.H. Goldkamp, P.A. James, J.M. Schlatter, *J. Med. Chem.*, 1970, **13**, 1217.
- [68] R.H. Mazur, J.A. Reuter, K.A. Swiatek, J.M. Schlatter, *J. Med. Chem.*, 1973, **16**, 1284.
- [69] J.M. Janusz, [in:] *Progress in Sweeteners*, T.H. Grenby (Ed.), Elsevier, London, 1989, 1-46.
- [70] *Eur. Pat. Appl.* 130464, 1985, *Chem. Abstr.*, 1985, **103**, 37737.
- [71] *US Pat.* 4,411,925, 1983, *Chem. Abstr.*, 1984, **101**, 22238.
- [72] *US Pat.* 4,375,430, 1983, *Chem. Abstr.*, 1983, **99**, 6056.
- [73] M.B.A. Gloria, *Intense Sweeteners and Synthetic Colorants in Food Analysis by HPLC*, L.M.L. Nollet (Ed.), Marcel Dekker Inc., New York, 2000, 523.

- [74] I. Parkash, I. Bisay, S. Schroeder, *Synth. Commun.*, 1999, **29**, 4461.
- [75] I. Knight, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 1994, **72**, 435.
- [76] M.R. Jenner, *Sucralose, In Sweeteners: Discovery, Molecular Design and Chemoreception*, Chapter 6, D.E. Walters F.T. Orthoefer, G.E. Du Bois (Eds.), Acs, Washington, DC 1991, 68–87.

Praca wpłynęła do Redakcji 5 października 2002

FELIETON NAUKOWY



**NOTATKI CHAOTYCZNE
XLVI. W KRĘGU ANALOGII CHEMICZNYCH**

Ignacy Z. Siemion

*Wydział Chemii, Uniwersytet Wrocławski,
ul. F. Joliot-Curie 14, 50-383 Wrocław*



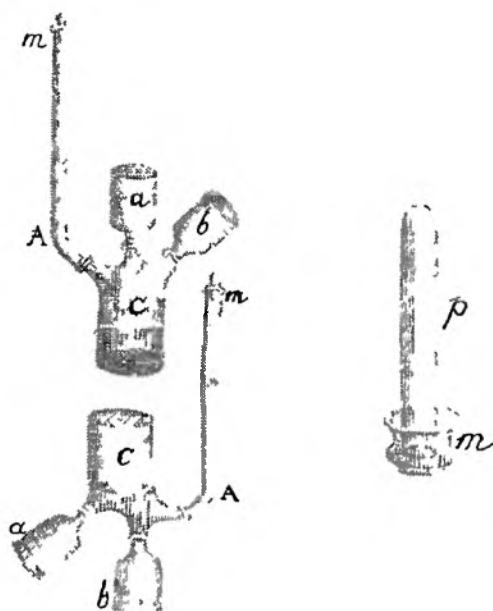
Ignacy Z. Siemion, urodzony w 1932 r., ukończył studia chemiczne na Uniwersytecie Moskiewskim w 1955 r. Doktorat nauk technicznych na Politechnice Wrocławskiej – 1964. Doktor habilitowany nauk chemicznych – 1968. Profesor nadzwyczajny – 1974, profesor zwyczajny – 1981. Był kierownikiem Zakładu Chemii Organicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. Własne zainteresowania badawcze: chemia i stereochemia peptydów i białek. Wypromował 22 doktorów chemii, z których trzech się habilitowało. Autor 7 książek, 250 prac oryginalnych i ponad 80 artykułów przeglądowych oraz dotyczących historii nauki. W latach 1983–1994 Redaktor Naczelny „Wiadomości Chemicznych”.

Pisałem już kiedyś w tych notatkach o ważkiej roli, jaką ma konstruowanie analogii w procesie poznawania świata. Ale dopiero niedawno sięgnąłem do mądrej pracy Władysława Biegańskiego, sławnego niegdyś metodologa nauki, pracy noszącej tytuł: *Wnioskowanie z analogii*. „Gdybyśmy – czytamy tam – nie posługiwali się analogią, postęp nauki, oparty na samej tylko indukcji i obserwacji, byłby względnie bardzo ograniczony. Nauka w takich warunkach dochodziłaby co najwyżej do uogólnień w postaci praw empirycznych i co najważniejsze, byłaby rozbita na działy zupełnie odosobnione, niczem ze sobą nie powiązane. Dopiero z analogii pomiędzy rozmaitymi uogólnieniami empirycznymi jesteśmy w stanie wyprowadzić wyższe, ogólniejsze prawa naukowe” [1]. I nicco dalej: „Całe znaczenie heurystyczne analogii polega na tem, że analogia stosunki ogólne, prawa, znane nam w pewnym zakresie zdarzeń, przenosi na zdarzenia inne, odrębne od nich, gdzie stosunki pomiędzy zjawiskami są nam dotychczas nieznane” [2].

Jako zaś przykład „wielkiej analogii” przytacza Biegański wielkie odkrycie Lavoisiera, iż procesy spalania ciał i oddychania organizmów żywych, są co do swej istoty tożsame. Bez wątpienia dla współczesnych uczonego była to konstatacja intelektualnie porażająca. Można przypuszczać, że właśnie to odkrycie wywarło tak silną presję na umysły ludzkie, iż w chemii i jej ustaleniach zaczęto szukać wyjaśnienia dla szeregu innych fenomenów przyrody. Takie próby są bowiem charakterystyczne dla przełomu XVIII i XIX wieków. Nie znaczy to, by te próby miały być zawsze udane. Analogia pełni w procesie badawczym rolę roboczej hipotezy, a hipotezy, jak wiemy, bardzo rzadko się sprawdzają. Chcę tu więc opowiedzieć o nicudanych próbach wykorzystania analogii chemicznych do wyjaśnienia rozmaitych zjawisk Przyrody.

W systemie chemii lavoisierowskiej centralne miejsce zajmował tlen, „kwasoród” albo „kwasoczyn”, wcześniej nazywany „powietrzem najzdrowszym” albo „powietrzem żywotnym”. („Powietrze najzdrowsze” – ten termin brzmi dość szczególnie dla nas, którzy wiemy już wiele o szkodliwych dla żywej tkanki postaciach tlenu i o walce, jaką prowadzi ta tkanka z nimi). Dzięki zaś odkryciom Priestleya i Ingenhousza wiedziano też, że rośliny wydzielają podczas reakcji asymilacji tlen do atmosfery i że proces ten biegnie tym intensywniej, im jest większe nasłonecznienie. Stąd był już tylko krok do hipotezy, iż mierząc zawartość tlenu w atmosferycznym powietrzu można oceniać jakość pogody. Dobra pogoda – więcej słońca – więcej tlenu w powietrzu. Na wielką więc skalę rozwinęły się badania nad zawartością tlenu w atmosferze. Do badań tych używano specjalnych przyrządów, eudiometrów (nazwę tą ukuto od greckich słów: *ευδια* – dobra pogoda i *μετρειν* – mierzyć, były to więc po prostu „mierniki dobrej pogody”). Wymyślono bardzo szybko cały szereg rozmaitych eudiometrów. Był więc eudiometr Cavendisha, udoskonalony przez Voltę, w którym to przyrządzie wodor gazowy spalano w określonej objętości powietrza, inicjując proces iskrą elektryczną. Był eudiometr Priestleya, znany szeroko w wersji opracowanej przez Magellana, w którym wykorzystywano reakcję tlenu azotu z tlenem powietrza. Był eudiometr Greny. Ten był ze wszystkich najprostszy. Tlen, zawarty w określonej objętości powietrza, był w nim pochłaniany przez biały fosfor.

Był wreszcie eudiometr Scheelego, gdzie do tego samego celu używano siarczku potasu. Dwa takie urządzenia, Magellana i Greny, przedstawia załączona tu rycina (Rys. 1), wzięta ze starego podręcznika fizyki J.H. Osińskiego, „pomnożonego” przez Jana Bystrzyckiego [3]. Jak widzimy, eudiometr Greny był rzeczywiście bardzo prosty. Bardziej skomplikowany był eudiometr Magellana. Na rysunku przedstawiony jest on w dwóch pozycjach: wyjściowej i roboczej. W dwóch pojemnikach o znanej objętości, zaznaczonych na rysunku literami a i b umieszczano powietrze i tlenek azotu. Pozostałe części aparatu wypełnione były wodą. Kiedy aparat był ustawiony w roboczej pozycji, gazy mieszały się ze sobą, następowała reakcja a ubytek objętości gazów informował o zawartości tlenu we wziętej do oznaczenia objętości powietrza.



Rysunek 1. Eudiometry Magellana (w pozycjach wyjściowej i roboczej) i Greny, według podręcznika: „Fizyka X. Józefa Osińskiego S.P. przerobiona i najnowszymi odkryciami pomnożona przez X. Jana Bystrzyckiego S.P.”, T. 1, w Warszawie 1810

Trzeba tu dodać, że książkę Bystrzycki, który w 1810 roku „pomnożył” podręcznik Osińskiego, sam był zapalonym eudiometram. „Z doświadczeń – odnotował w tekście – które robiłem w Warszawie biorąc do eudiometru powietrze z ogrodów w czasie rozmaitym, z ulic, domów, teatru, kościołów, itd. okazało się, iż zimową porą, gdy słońce świeci i wysokość barometru jest znaczna, na ten czas więcej jest powietrza żywotnego aniżeli latem, że w ogrodach latem więcej jest gdy słońce świeci, aniżeli gdy jest dzień pochmurny, że daleko więcej aniżeli na ulicach lub w domach, mniej zaś po zachodzie słońca w kilka godzin a najmniej w miejscach, gdzie się światło pali, albo wielu ludzi znajduje” [4].

Komentarz, jaki się tu nasuwa, to stwierdzenie, że Bystrzycki musiał bardzo chcieć zauważyć te różnice. Bo nadzieje „determinowania dobrej pogody” przy pomocy pomiarów eudiometrycznych szybko się skończyły. Cały ten rozdział „chemii meteorologicznej” uległ szybkiemu zamknięciu. Kiedy w 1823 roku ten sam Bystrzycki uświetnił popis publiczny uczniów konwiktu Pijarów wykładem pt. „Rzecz o meteorologii” [5] nie wspomniał już w nim ani o eudiometrach, ani o eudiometrii.

Nieco dłużej utrzymywały się natomiast sięgające zamierzchłych czasów przekonania, że przyczyną epidemii cholery i dżumy jest „zepsute powietrze”. „Niewielka, chemicznie nawet niestwierdzalna zmiana atmosferyczna – pisał sławny filozof niemiecki Artur Schopenhauer – powoduje cholere, żółtą febrę, czarną śmierć, itd., które sprzątnęły miliony ludzi; nieco większa wypleniłaby wszelkie życie” [6]. Schopenhauer był osobiście dotknięty wielkim strachem przed zarazą. W 1831 roku porzucił Uniwersytet Berliński, gdzie pracował, i uciekł przed cholera do Frankfurtu nad Menem. Można powiedzieć, że wyczuł pismo noscm. Nie mniej, a może nawet wtedy bardziej sławny Hegel pozostał w Berlinie, gdzie skosiła go zaraza. Zwróćmy jednak uwagę na sformułowanie Schopenhauera, iż zmiany powietrza w czasie zarazy są „chemicznie niestwierdzalne”. Znaczy ono, że wykonywano wówczas chemiczne na tę okoliczność próby i że ich wyniki docierały do filozofa. I tak właśnie było. W roku 1847 podjął np. takie próby Mikołaj Laskowski, Polak urodzony w Malborku, uczeń Liebiga i profesor chemii Uniwersytetu Moskiewskiego. Badania swoje prowadził w szczytowym momencie epidemii cholery, kontrolując co kilka dni zawartość tlenu i azotu w powietrzu pobieranym na podwórku uniwersyteckim. Analizy Laskowskiego nie wykazały, by powietrze „czasu zarazy” miało się różnić składem od „normalnego” powietrza [7].

Jak widzimy, chemię usiłowano wtedy zaprząć do prób wyjaśnić bardzo rozmaitych spraw. Koncypowano wiele chemicznych wyjaśnień dla zjawisk meteorologicznych i rozmaitych fenomenów napowietrznych. Jak choćby pioruny i grzmoty. Nie wystarczyły już przecież wiary Starożytnych. Bo to przecież Jowisz, u Etrusków Tin, był władcą błyskawicy. Miał ich zresztą trzy rodzaje: jedna przewiercała, druga rozrywała a trzecia spopielała ugodzony nią obiekt [8]. Na przełomie XVIII i XIX wieków zaczęto sądzić, że grzmoty i błyskawice są wynikiem zapalenia nagromadzonego w chmurach gazowego wodoru. Oto jak zjawiska te objaśniał J.C. Hautepierre, autor popularnego i tłumaczonego na język polski „Zbioru encyklopedycznego wszystkich umiejętności”: ... „gazowi wodorodnemu przypisać należy ten gatunek ognio-wych tworów; gdy ten gaz zapala się przez Elektryczną Materią, w Powietrzokregu, tworzy owe spadające gwiazdy, owe kule ogniste, owe strumienie światła, które się sprostregać daią w czasie wielkich upałów” [9].

Warszawski profesor fizyki, wspomniany już wyżej ks. Osiński, także był podobnego zdania. Rozwijając w artykule opublikowanym w „Rocznikach Towarzystwa Warszawskiego Przyjaciół Nauk” panoramę osiągnięć naukowych XVIII wieku i przedstawiając tam własności wodoru napisał: ... „zapalony od materii elektrycznej hukem swoim łoskot grzmotów powiększa, łączy się z kwasoczynem powietrza

zwyczajnego i tworzy wodę; dla tej to przyczyny po błyskawicy i grzmocie często-
kroć rześistszy deszcz padać zaczyna” [10].

Wiedziano już wtedy, że wyładowania elektryczne, zachodzące w powietrzu atmo-
sferycznym, powodują powstawanie tlenków azotu. I że tlenek azotu łącząc się z tle-
nem daje barwny ditlenek azotu. Nic dziwnego, że szybko pojawiła się myśl, iż zorza
północna to nic innego jak chmura tego właśnie połączenia chemicznego. A przecież,
według mitologii dobrze znających zjawisko zorzy polarnej Bałtów, miał to być od-
blask płomienistych mieczy walczących ze sobą duchów! [11]. Wspomniany już
wyżej Hautpierre klarował więc: „Kiedy iskra elektryczna przechodzi przez mieszaninę
Gazu saletrorodnego i Gazu kwasorodnego, dostrzegać się daje wyziew zbyt czer-
wony i nader lotny, podobny do tych, iakie w światłach północnych ku stronie pół-
nocnej pokazywać się zwykły, dostrzegamy” [12].

Jako autora tej koncepcji Osiński wymienia B. Libesa. Była ona powszechnie
uznawana na początku XIX wieku. Ale kiedy w roku 1820 wielce ceniony fizyk
francuski J.B. Biot (1774–1862) dyskutował sprawę zorzy północnej na posiedzeniu
połączonych wydziałów Instytutu Francuskiego, ten chemiczny obraz zjawiska scho-
dził już ze sceny. „Strumień elektryczności – mówił Biot – wpuszczony do przestrze-
ni próżney, albo rzadkie tylko powietrze zamykający, sprawia ciągle świeccenie i róż-
ne rzuty światła, które przybiegając wszystkie kolory tęczy przechodzą, bądźto na-
gle, bądź stopniami cale nieznacznemi, z nacyciemniejszego fioletu do najsłwiecniejszej
białości” [13]. Podobnie miały by się tworzyć „kolumny światła” zorzy polarnej. Te
„kolumny światła” miały, według Biota, powstawać przez świeccenie „ostatecznej drob-
ności cząstek metalicznych”. Polskie tłumaczenie referatu Biota, jakie zamieścił „Dzien-
nik Wileński”, nic jednak nie mówi o tym, skąd miały by się brać owe „cząstki meta-
liczne” powietrza.

Nie mniejsze od chemicznej teorii zorzy polarnej wzięcie miały chemiczne teorie
trzęsienia Ziemi i erupcji wulkanicznych. Takie „teorie” zaczęły się zresztą rodzić
jeszcze w czasach chemii flogistonowej, a francuski chemik N. Lemery (1645–1715)
zbudował nawet sztuczny wulkan chemiczny. „Nicktórzy Fizycy – pisał krakowski
profesor fizyki, Andrzej Trzciniński – wykładają wzniccanie podziemnych zapaleń
i Wolkanów przez sławne owo doświadczenie, które się winno Panu Lemcremu.
Zmieszawszy równe części siarki i opiłków żelaznych z dwoma częściami wody i za-
kopawszy w ziemi tę masę, woda powoli wpaia się w nią i wkrótce potym cała mię-
szanina zagrzewa się i wzdyma się i wydaie pary wilgotne i bardzo ciepłe, które za-
pach siarczysty uczuwać daia. Po tych waporach nastpuia inne, które się same przez
się zapalaia i oraz cała miészanina zaymuie się, ogień wzbudza i rozlewa kwaskowa-
tość siarczystą. Taka miészanina wydaie (...) w pewnym czasie widok sztucznego
trzęsienia Ziemi i także Wolkanu” [14]. Wprawdzie inny francuski chemik, Rouelle,
krytykując te poglądy wskazywał, że takiej ilości czystego żelaza nie ma we wnętrzu
Ziemi, by mogło ono być przyczyną jej trzęsień, bo występuje tam przecież „żelazo
zmineralizowane”, ale mimo to poglądy takie miały przecież duże wzięcie. Sam Trzciniń-
ski krytykował te poglądy, gdyż uważał, że „trzęsienie ziemi jest pioruncm podziem-

nym”, wzbudzonym przez wyładowania elektryczne, ale za chemicznymi przyczynami trzęsień Ziemi i zjawisk wulkanicznych opowiadali się np. bracia Śniadeccy. Przedkładając w 1806 roku Kołłątajowi uwagi do jego dzieła *O początku narodów*, Jan Śniadecki zauważał: „Życzyłbym sobie do poprawienia niektórych tylko wyrazów o wulkanach przeczytać artykuł w Teorii jestestw organicznych mego brata, gdzie ta teoria jest wyłożona przez najpewniejsze dziś początki fizyki” [15].

Spójrzmy więc co napisał na omawiany temat młodszy brat Jana, Jędrzej: „Tak wielkie – pisze on – mnóstwo ciał tłustych i zapalnych, pomiędzy warstami ziemi ukrytych, a szczególnicy piritów, które wszędzie w takowych pokładach nader są obfite, zapaleniu się niekiedy podpadać może. Ponieważ albowiem woda, wszędzie się pomiędzy takowemi pokładami sączy i zbiera, musi na koniec sama rozkładowi ze strony piritów podpaść. Tym sposobem kwasoród przechodząc do związku z siarką, opuszcza znaczną część materyi ciepła, przez co całe takowe pokłady rozgrzewają się zwolna. Wzbudzone ciepło, tym bardzicy rozpoczęty rozkład wody przyspiesza i przyspieszony tym większe i gwałtowniejsze wzbudza ogrzanie. Wszystkie te odmiany nieznacznemi wzmagaia się stopniami, aż na koniec ogromne owe istot zapalnych magazyny rozgrzewają się mocno; całą znajduiającą się przy sobie wodę albo rozkładają, albo zamieniaiają w parę wody, i iczeli na ów czas otworzą sobie komunikacyą z morzem i icziorami, lub znacznemi rzekami, rozpalenie ich, rozkład i zamiana w parę wody posuwają się nagle do naywyższego stopnia. Na ówczas uformowana niezmierna gazu wodorodnego i pary wodney ilość nie mogąc się w żadnych podziemnych wydrążeniach, rozpadlinach i iaskiniach pomieścić, nieopisanym, nieograniczonym, zaledwo poiętym gwałtem na wszystkie się strony rzuca i rozpiera... (...) Pierwsze takowe gazu wodorodnego i pary wodney do wybuchnienia usiłowania dają początek trzęsieniom ziemi, samo wybuchnienie wólkanom. Do trzęsienia zatem ziemi dosyć icst, ażeby woda, warsty piritów lub węgla ziemnego w pirit bogatego, obmywająca, rozłożyła się po części i początek gazowi wodorodnemu dała; do wólkanów i przystęp powietrza iest potrzebny. I ponieważ rzadka iest część ziemi, która by w głębszych swoich warstach piritów i węgla ziemnego nie miała, dlatego i trzęsienia ziemi wszędzie się zdarzyć mogą i wólkany albo się w każdej części ziemi znajdowały, albo pokazać się na przyszłość mogą” [16].

Trzeba tu powiedzieć, że rozwijane przez Śniadeckiego poglądy nie były oryginalne. Były raczej wówczas powszechnie akceptowane. Bardzo podobne rozważania znajdziemy np. w programowym referacie E.L.M. Patrina, jaki ów uczoney wygłosił w Instytucie Narodowym Francji 1-go Ventose’a roku 8-go (według rachuby czasu, jaki wprowadziła nie na długi Wielka Rewolucja Francuska) [17].

Chemiczne interpretacje zjawisk przyrodniczych nie dotyczyły zresztą jedynie Ziemi, sięgały nawet i Nieba. Na przykład plam na słońcu. Takie, nieoczekiwane zresztą i dla mnie samego, objaśnienia tych plam znalazłem w pamiętnikach młodszego brata Ignacego Józefa Kraszewskiego, Kajetana. Kajetan Kraszewski był dziecicem Romanowa na Podlasiu. Był też trochę literatem, jak starszy brat. Ale jako amator zajmował się też meteorologią i astronomią. W swoim dworze urządził obserwa-

torium astronomiczne, miał tam bibliotekę złożoną z 6 tys. tomów. Jego publikacje można znaleźć w paryskim czasopiśmie *Cosmos. Revue hebdomadaire de progres de Sciences*. O plamach na Słońcu, zaobserwowanych w grudniu 1872 roku, pisze: „Plam na słońcu wiele i wielkich, palą się wypływające na powierzchnię gazy, jak się przekonano ze spostrzeżeń spektroskopicznych, są to góry magnezzjum” [18].

Nie mogłem ustalić skąd zaczerpnął Kraszewski te wiadomości, musiał je potworzyć za jakimiś doniesieniami naukowymi. Ale, przynajmniej, niecodzienna to próba chemicznego wyjaśnienia wielkich zjawisk natury. Metaliczny magnez odkrył H. Davy, i wydzielił w postaci amalgamatu. „Davy – pisał w swoich *Początkach chemii* Jędrzej Śniadecki – zrobił to amalgama, puszczając parę potasu na nągwaltniey rozpalona w platynowej rurce magnezją a potem z massą tą mocno żywe srebro ogrzewając. Po wypędzeniu tego ostatniego przez ogień otrzymał cienką błonkę ciemno-popielatą, wyraźnie metaliczną, która się nie dała topić, a szkło w punkcie zetknięcia czarno farbowała. Błonka ta, za mocnym ogrzaniem paliła się płomieniem czerwonym” [19]. Wybuchową zapalność metalicznego magnezu stwierdzono nieco później. Berzelius, w swoim wydanym w 1844 roku podręczniku chemii napisze o magnezie: „W temperaturze, przy której szkło mięknie spala się z wielkim blaskiem do ziemi magnezjowej” [20].

Jak widać z przytoczonych przykładów, wielkie odkrycia chemii, jakie mały miejsce na przełomie XVIII i XIX wieków, ogromnie oddziaływały na twórczą wyobraźnię współczesnych przyrodników. Ba, oddziaływały również na uczonych z innych, nawet humanistycznych, dyscyplin. To przecież nie przypadek, że odwołania do chemii znajdziemy np. w dziełach ówczesnych filozofów. Miały one służyć lepszemu objaśnieniu rozwijanych w tych działach poglądów. Ale miały też pewnie źródło w swoistym snobizmie. Wypadało dać czytelnikowi odczuć, że znamy się na chemii. Ograniczę się tu do trzech tylko przykładów, odnoszących się do trzech kolejnych rozdziałów historii chemii. Pierwszy zaczerpnijmy z głównego dzieła A. Schopenhauera, noszącego tytuł *Świat jako wola i przedstawienie*. Jest tam tyle wzmianek o chemii i jej odkryciach, że można się zdumieć. Ale zacytuję tu tylko jedną taką wzmiankę. Schopenhauer wyróżniał dwie podstawowe władze psychiczne człowieka: umysł i wolę. I otóż, zastanawiając się nad istotą geniuszu uznał, że jest to naruszenie równowagi pomiędzy tymi władzami. „Geniusz -- zawyrokował -- polega na nienormalnym nadmiarze umysłu (...) Można by to wyjaśnić na przykładzie chemicznym: zasada i kwas różnią się w jakiejś soli tym, że podstawowy pierwiastek znajduje się w każdym z nich w przeciwnym stosunku do tlenu. W zasadzie, w alkalium mianowicie, pierwiastek podstawowy ma przewagę nad tlenem, w kwasie natomiast przewagę ma tlen. Dokładnie tak samo mają się do siebie zwykły człowiek i geniusz jeśli idzie o umysł i wolę” [21].

Już na pierwszy rzut oka każdy rozpozna tu ślady tzw. dualistycznej koncepcji budowy związków chemicznych. Dokładnie w czasie jej panowania Schopenhauer pisał swoje dzieło. Kiedy natomiast Marks pisał pierwszy tom *Kapitału* (1867) rodziły się już zręby strukturalnej teorii budowy tych związków. Ich początków należy m.in.

szukać w koncepcji szeregów homologicznych związków organicznych. I otóż, rozważając proces przerastania średniowiecznego majstra cechowego w kapitalistę, zauważa Marks, iż decyduje o nim „minimalna suma wartości, którą musi rozporządzać pojedynczy posiadacz towaru lub pieniędzy”. I wyjaśniając tę myśl w przypisach zaznacza: „Na tym właśnie oparła się teoria molekularna, mająca zastosowanie w nowoczesnej chemii, a rozwinięta po raz pierwszy w formie naukowej przez Laurenta i Gerhardta” [22]. Kiedy Engels przygotowywał trzecie wydanie *Kapitału* (1883) dodatkowo wyjaśnił w przypisach, że Marks miał tu na myśli szeregi homologiczne.

Ostatni nasz przykład będzie dotyczył schyłku XIX wieku i dzieła twórcy naukowej socjologii, Emila Durkheima. Dzieło to nosi tytuł: *Les regles de la methode sociologique*. W dziele tym Durkheim rozwinął m.in. koncepcję społecznej świadomości zbiorowej, na której oparł swoją teorię religii i moralności. Według tej koncepcji dusze indywidualne ludzi, oddziaływując na siebie, tworzą jakąś zbiorową istotę psychiczną, o pewnej nowej indywidualności. „Dzieje się to – powtórzył za Durkheimem nasz biochemik i ctyk, Augustyn Wróblewski – jak w syntezie chemicznej, gdzie z różnych pierwiastków powstaje ciało o własnościach swoistych, zmienionych. Dusza społeczna jest w stosunku do swoich elementów osobnikowych syntezą tego rodzaju” [23]. (Tak się złożyło, że nic mam pod ręką oryginału pracy Durkheima, którą kiedyś czytałem. Muszę więc zacytować jego poglądy z drugiej ręki).

Poprzestańmy na tych tylko przykładach. Wyraźne upodobanie myślicieli XIX wieku do chemicznych paraleli, którymi ubarwiają swoje wywody, dobitnie świadczy o wielkim wpływie chemii na umysłowość tego wieku. Rozmiarami społecznego i myślowego oddziaływania chemii wiek ten znacznie, jak sądzę, przewyższał nasze czasy, kiedy chemia i jej przedstawiciele podlegają nieustannemu atakowi ze strony rozwydrzonego dziennikarstwa.

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] Wł. Biegański, *Wnioskowanie z analogii*, Lwów 1909, s. 2.
- [2] Jak wyżej, s. 78.
- [3] *Fizyka X. Józefa Osińskiego S.P. przerobiona i najnowszemi odkryciami pomnożona przez X. Jana Bystrzyckiego S.P. T. 1*, w Warszawie 1810.
- [4] Jak wyżej, s. 213.
- [5] J. Bystrzycki, *Rzecz o meteorologii [w]: Popis publiczny uczniów szkoły wojewódzkiej warszawskiej Kieży Pijarów*, Warszawa 1823.
- [6] A. Schopenhauer, *Świat jako wola i przedstawienie*, T. 2, PWN, Warszawa 1995, s. 835.
- [7] N. Laskowsky, *Ueber die Zusammensetzung der atmosphärischen Luft zu Moskau während der Cholerazeit*, *Lichbigs Ann.*, 1850, 75, 176–190.
- [8] A. Niemirowski, *Etruskowie*, 1990, s. 274.
- [9] J.C. Hautpierre, *Zbiór krótki encyklopedyczny wszystkich umiejętności*, Wrocław 1804, s. 63.
- [10] J.H. Osiński, *O wzroście nauk fizycznych w drugiej połowie wieku osiemnastego*. *Roczniki Tow. Warsz. Przyjaciół Nauk*, T. 1, Warszawa 1802, s. 137.
- [11] A. Brückner, *Starożytna Litwa. Ludy i bogi*. Olsztyn 1884, s. 158.
- [12] J.C. Hautpierre, *Dz. cyt.*, s. 63.

- [13] Uwagi p. Biot o naturze i przyczynach zorzy północnej, Dziennik Wileński, 1820, T. 3, s. 447.
- [14] Opisanie przyczyn fizycznych trzęsienia ziemi na Sesy Publicznej przez Andrzeja Trzczińskiego (...) w Sali Jagiellońskiej czytane. W Krakowie 1787, s. 38.
- [15] *Korespondencja Jana Śniadeckiego. Listy z Krakowa*, T.2, Oss. Wrocław 1954, s. 451.
- [16] J. Śniadecki, *Teorya jestestw organicznych*, T. 1, Warszawa 1804, s. 122-125.
- [17] *Gedanken uber die Vulkane, nach Gründen der pneumatischen Chemie, von dem Bürger Patrin*. Annalen d. Physik, 1800, 5, 191-205.
- [18] K. Kraszewski, *Kronika domowa*, Warszawa 2000, s. 275.
- [19] J. Śniadecki, *Początki chemii*, T. 1, Wilno 1816, s. 243.
- [20] J.J. Berzelius, *Lehrbuch der Chemie*, Bd. 2, Dresden u. Leipzig, s. 154.
- [21] A. Schopenhauer, Dz. cyt., s. 542.
- [22] K. Marks, *Kapitał*, T. 1, Książka i Wiedza, Warszawa 1951, s. 332-333.
- [23] A. Wróblewski, *Przyrodniczo-naukowa teoria moralności*, Kraków 1911, s. 91.

KRONIKA ŻAŁOBNA

Wspomnienie o profesorze Józefie Władysławie Rohlederze moim nauczycielu, mistrzu i przyjacielu

Urodzony w Krakowie, w Krakowie wykształcony (dyplom magistra filozofii w zakresie chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego – 1949 r.) poświęca się pracy we Wrocławiu („na zachodzie” jak wówczas mówiono). Pod opieką Prof. Kazimierza Gumińskiego i pośród życzliwych przyjaciół Profesorów Krzysztofa Pigionia i Zdzisława Ruzwiczca, rozpoczyna się kariera naukowa mojego Mistrza.

Treścią życia Profesora Józefa Rohledera było głębokie umiłowanie nauki i pokora wobec tajemnic Natury. Szczególnie skromna osobowość Mistrza nie postrzegała, że akademicka kariera wiodła przez wiele stanowisk, jak : zastępcy asystenta, młodszego asystenta, starszego asystenta itp., oraz stopnie naukowe doktora (1958), wówczas stopień naukowy docenta (1964), potem oba tytuły profesorskie (1971, 1979). Widzę te stanowiska, stopnie i tytuły mojego Mistrza jak kamienie przy obranej drodze, napotykanec niejako przy okazji Jego podróży, a nie będące przystankami czy celem podróży.

Doktorat z tezami na temat „Własności kryształów chlorku potasu, zawierających centra talu metalicznego”, stał się początkiem poszukiwania odpowiedzi na pytanie: czy i jak można przewidywać własności ciała stałego z własności cząsteczki. Myślę, że było to *credo* naukowe Mistrza, a potem kierunek podróży w świat kryształów molekularnych.

Kariera naukowa Profesora rozpoczęła się od badania własności optycznych i magnetycznych kryształów metodami , które pozostaną już „znakiem firmowym” Profesora Rohledera: spektroskopia nadtonów (bliskiej podczerwieni) w świetle spolaryzowanym, klasyczna optyka kryształów oraz „wahadłowa” metoda badania tensora podatności diamagnetycznej (Krishana). Wtedy też rozpoczęła się moja z Nim współpraca i przyjaźń.

Mistrz był po habilitacji a metody badawcze, którymi przyjdzie się i nam posługiwać, dobrze już opanowane. Muszę z największym szacunkiem przyznać, że kiedy, po latach czyta się rozprawę habilitacyjną Profesora „Oddziaływania międzycząsteczkowe w modyfikacjach α i β kryształów *p*-nitrofenolu” – to stwierdzam, że niewiele można dodać współcześnie do opisanego tam prostego modelu reakcji fotochemicznej w ciele stałym. Profesor Józef Rohleder posiadał niezwykle talent eksperymentatorski, od pewnych inwencji pomysłów aparaturowych, po zadziwiająco zdolności manualne w czasie eksperymentów.

Podsumowaniem wielu opublikowanych prac oraz wielu niepublikowanych pomiarów i obserwacji z zakresu optyki i magnetyzmu kryształów molekularnych jest książka *Magnetism and Optics of Molecular Crystals* (J. Wiley and Sons, 1992) napisana wspólnie z R.W. Munnem. Książka jest wspaniałą ilustracją poszukiwań odpowiedzi na podstawowe pytanie o przewidywanie własności kryształów z własności cząsteczki, *credo* dociekań Mistrza. Szczególną pozycję w zainteresowaniach i osiągnięciach Profesora Józefa Rohledera stanowi spektroskopia molekularna a dokładniej spektroskopia kryształów molekularnych w świetle spolaryzowanym w bliskiej podczerwieni. Ta metoda badawcza pozwoliła na powiązanie anizotropii absorpcji kryształu (dichroizmu) z orientacją molekularnych momentów przejścia oraz rozmieszczeniem cząsteczek w komórce elementarnej. Popularnemu modelowi tzw. „gazu zorientowanego” nadano sens fizyczny poprzez uwzględnienie złożoności własności optycznych kryształu. Badania te skierowały uwagę Prof. Rohledera na wydawałoby się klasyczny problem dwójłomności kryształów, szczególnie o niskiej symetrii. Znalazł w nim źródło informacji o cząsteczkach i ich rozmieszczeniu w kryształach, dzięki postrzeganiu własności kryształu poprzez tworząc go cząsteczki. Wiele prac opublikowanych na temat molekularnych podstaw absorpcji w zakresie bliskiej podczerwieni, wraz z ilościową ich analizą oraz prace nad własnościami optycznymi i magnetycznymi zostały zebrane w monografii *Fizyka chemiczna kryształów molekularnych* wydanej przez PWN w 1989 r. Symetria kryształów, zarówno ta postrzegana makro a głównie ta postrzegana mikro, zawsze jak pamiętam, fascynowała Profesora Rohledera. Była świetnym „narzędziem” łączenia cząsteczek w kryształ, ale też zaspokajała Jego zamiłowania do estetyki. Do metod badawczych z zakresu optyki, spektroskopii, magnetochemii dochodzi rentgenografia a potem i dylatometria. Rozpoczął się okres badań nad mechanizmami molekularnymi przemian fazowych, polimorfizmem kryształów molekularnych.

Ważnym elementem pracy uczonego było w opinii Profesora Rohledera recenzowanie prac, rozpraw oraz czynny udział w życiu stowarzyszeń. Napisał dużo, ponad 60 recenzji i ważne, że uczył nas tego z taką samą pasją jak naukowego warsztatu. Uczył nas, że prawda naukowa jest najwyższą racją i według tej maksymy postępował.

Prof. Rohleder był wyśmienitym nauczycielem, nie tylko przez talent jaki w tym względzie posiadał, ale i przez swój stosunek do nauczania. Od 1962 roku do chwili przejścia na emeryturę, wykładał fizykę dla studentów Wydziału Chemicznego.

Konsekwencją wykładów był skrypt i podręcznik fizyki dla studentów Wydziału Chemicznego pt. *Fizyka Chemiczna*. W uznaniu Mistrz otrzymał prestiżową nagrodę Senatu Politechniki Wrocławskiej. Wykładał również chemię fizyczną, fizykę i chemię metali oraz prowadził seminarium z termodynamiki statystycznej i mechaniki kwantowej. W ramach szeroko rozumianych obowiązków dydaktycznych starał się przybliżyć także literaturę obcą młodym adeptom nauki. Stąd uczestniczył w tłumaczeniu dwóch monografii: F. Kaplana – *Fizyka Jądrowa* (1957) oraz A.J. Kitajgorodskiego – *Kryształy Molekularne* (1976).

Pomimo, że treścią życia Mistrza zawsze była nauka, Profesor niekiedy podejmował się pełnienia niewdzięcznych obowiązków administracyjnych. W latach 1963–64 był prodziekanem Wydziału Chemicznego, w latach 1964–71 kierownikiem i współtwórcą Centralnego Laboratorium Wydziału Chemicznego, w latach 1975–81 zastępcą a potem dyrektorem Instytutu Chemii Organicznej i Fizycznej.

W latach 1978–81 był Rzecznikiem Dyscyplinarnym dla Uczelnianej Komisji Dyscyplinarnej ds. Pracowników Nauki. Autorytet naukowy Mistrza znalazł też uznanie w powołaniu Go na członka Rad Naukowych Instytutu Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego oraz Instytutu Fizyki Molekularnej PAN w Poznaniu, Komitetu Spektroskopii i Komisji Krystalografii PAN.

Profesor Józef Rohleder zawsze upominał się o sprawy najszerzej rozumianej nauki, a umiłowanie prawdy naukowej wiodło Go często do bezkompromisowej dbałości o godność pracownika nauki. Zdobycie uznania poza granicami kraju jest często łatwiejsze niż we własnym. Tej prawdy doświadczył nasz Mistrz gdy nie pozwolono aby objął obowiązki członka Rady Głównej Nauki i Szkolnictwa Wyższego, pomimo desygnowania przez Senat Politechniki Wrocławskiej. A przecież cieszył się już wtedy wielkim uznaniem jako uczony dzięki rozpoczętej w 1970 r. niesłychanie owocnej współpracy z Profesorem Jeanem Meinnelem. Zasługi Profesora Rohledera dla tej współpracy, Jego osiągnięcia naukowe, postawę jako Człowieka i Uczzonego dostrzegło środowisko nauki Republiki Francuskiej, czego wyrazem było wręczenie Mistrzowi w dniu 23 czerwca 1988 roku tytułu i insygniów Doktora *honoris causa* Uniwersytetu w Rennes.

Odczuliśmy radość, że odbierając godność doktora *honoris causa* Uniwersytetu w Rennes, nasz Mistrz otrzymał część tego uznania, na jakie zasłużył swym pracowitym życiem naukowym, swym bez reszty oddaniem się nauce, swą etyczną postawą Nauczyciela i Mistrza.

Tadeusz Luty

Wrocław, dnia 24 maja 2003 r.
w dzień pogrzebu Mistrza

NOWE WYDAWNICTWA



Peter W. Atkins, *Podstawy chemii fizycznej*, tłumaczenie z języka angielskiego Krzysztof Pigoń, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1999, 643 s., okładka miękką.

Nakładem Wydawnictwa Naukowego PWN ukazało się polskie tłumaczenie książki szeroko znanego autora podręczników chemii fizycznej, Petera W. Atkinsa. Wersja oryginalna została wydana przez Oxford University Press w roku 1996 (wydanie 2) pt. *The Elements of Physical Chemistry*. Podręcznik był wydany po raz pierwszy w 1992 roku.

Podstawy chemii fizycznej to mniej znana książka brytyjskiego wykładowcy Uniwersytetu Oxfordzkiego, który światowe uznanie zdobył przez swój inny, monumentalny podręcznik chemii fizycznej. Polskiemu przekładowi *Podstaw* dodatkowego smaku dodaje osoba tłumacza: profesor Krzysztof Pigoń, fizykochemik i autor szeroko znanego polskiego podręcznika chemii fizycznej. Podręcznik który powstał jest wartościowy i oryginalny, lecz wśród akademickich podręczników chemii fizycznej stanowi zjawisko raczej wyjątkowe. Bezkrytyczne korzystanie z niego mogłoby przynieść rozczarowania zarówno studentom, jak wykładowcy.

Z względu na prezentowany materiał książka obejmuje szeroki zakres zagadnień wspólnie wykładanych w kursie przedmiotu chemia fizyczna w Polsce, lecz nie reprezentuje typowej zawartości wykładu tego przedmiotu. Rozpoczyna się od teorii kinetycznej – świetnie przedstawionej, wzbogaconej o przemawiające i przeliczone przykłady, jak np. poruszanie się cząsteczek w ciepłe i zimne dni, prawo efuzji Grahama. Pominięto statystykę zderzeń cząsteczek gazu. Podstawy termodynamiki wyłożone są przystępnie w kolejnym rozdziale, z wieloma ciekawymi ilustracjami obrazującymi efekty ciepłe reakcji. Wywód prawa Kirchoffa podano bez użycia całkowania, co jest pierwszą i doskonałą ilustracją zastosowanej metody prezentacji: jak najmniej matematyki! Podejście to w zdecydowany sposób kształtuje dalszy materiał. II zasadę podano bez wyprowadzenia, lecz autor nie cofnął się przed dyskusją samorzutności procesów. Wprowadzenia stałej równowagi dokonano ryzykownie bez wcześniejszego definiowania potencjałów chemicznych.

W kolejnym rozdziale o fazach autor był jednak zmuszony potencjał chemiczny przelotnie zdefiniować. Rozdział ten jest ubogi w materiał, bardziej przypominający prezentacje zagadnienia w podręcznikach chemii ogólnej, gdzie równowagi parowania i krzepnięcia też bywają wykładane. Przy okazji omawiania równowag w roztworach nie pominięto miareczkowania oraz i roztworów buforowych. W tym samym rozdziale zamieszczona jest ciekawa dyskusja reakcji sprzężonych, choć wydawałoby się, że czytelnik jest do takiego zagadnienia zupełnie nieprzygotowany.

Kolejne rozdziały przynoszą trzy tematy wchodzące do kanonu zagadnień chemii fizycznej. Elektrochemia – osobliwością prezentacji Atkinsa jest brak odrębnego oznaczenia dla potencjałów standardowych półogniw i brak w ogóle tego pojęcia. Z tego powodu, reakcje w półogniwach nie są dyskutowane.

W przeciwieństwie do elektrochemii, rozdział poświęcony kinetyce jest wyczerpujący i sięga do tak specjalistycznych zagadnień jak reakcje łańcuchowe, opis wybuchu raz reakcje fotochemiczne. Bardzo liczne przykłady (to kolejna cecha szczególna tego wyjątkowego podręcznika) zbliżają czytelnika do materialnej rzeczywistości, której wykładany materiał ma służyć. Widoczny jest tu jednak brak oparcia równań kinetycznych na wyniku teorii zderzeniowej, przekrój czynniki na zderzenia wprowadzony jest tylko intuicyjnie, choć został szczegółowo przedyskutowany w egzotycznym mechanizmie reakcji harpunowej. Teoria kompleksu aktywnego omówiona jest tylko poglądowo i nie dostarcza właściwego oparcia dla obszernej dyskusji katalizy.

Ostatnim jest rozdział poświęcony spektroskopii molekularnej. Włączenie go do podręcznika, którego autor postanowił nie sięgać do matematyki jest zdumiewające. Tym więcej, że w rozdziale tym pominięto zupełnie opis doświadczalnych obserwacji zjawisk spektroskopowych. W rezultacie rozdział ten zawiera zdroworozsądkowe wyjaśnienie zjawisk spektroskopowych od najprostszych (prawo Lamberta-Beera) do zaawansowanych (diagramy Jabłońskiego). Dobrą ilustracją niespodzianek czekających na nieprzygotowanego czytelnika jest efekt Ramana. Brak opisu zjawiska (nietuzinkowego przecież) ale są reguły wyboru w zjawisku Ramana, nawet dla cząsteczek wieloatomowych! W podobnym duchu omówione są również specjalistyczne działy spektroskopii: fotoelektronowa, rezonanse magnetyczne, zeugmatografia.

Rozdział zatytułowany „Kohezja i struktura” (r. 10) jest najbardziej niezwykły w całej książce. Zawiera przystępne omówienie oddziaływań międzycząsteczkowych, lecz znalazło się tu miejsce również na powierzchowną dyskusję dyfuzji, lepkości, cząstek koloidalnych i podwójnej warstwy elektrycznej. Blisko połowę rozdziału (10.3) zajmuje przejrzysty wykład podstaw krystalografii i rentgenografii, zagadnienia pozostające poza typowym wykładem chemii fizycznej.

W książce zamieszczono dwa świetnie napisane rozdziały, które w chemii fizycznej można uznać za nadmiarowe: „Budowa atomu” (r. 8) oraz „Wiązania chemiczne” (r. 9). W programie studiów chemicznych te dwa ważne zagadnienia pojawiają się zazwyczaj w ramach wykładu chemii nieorganicznej, raz dlatego, że bez nich trudno postąpić dalej w studiowaniu chemii, a po wtóre ponieważ tematy te weszły już do programu licealnego w jego wersji rozszerzonej. Prezentacja Atkina jest ambitna chyba ponad miarę w zestawieniu z nie-matematyczną metodą pozostałych rozdziałów. Tu pojawia się, *deus ex machina*, wyrażenie Einsteina na pojemność cieplną kryształu, tu autor nie widzi nic zdrożnego w zaprezentowaniu, a nawet rozwiązywaniu równania Schrödingera. Mimo że w termodynamice autor oszczędzał czytelnikowi nawet znaku całkowania, tu bez wahania pokazuje całkowanie w rozwiązywaniu kwantowego zagadnienia cząstki w pudle, a na innym miejscu swobodnie dyskutuje całkę nakrywania.

Ze względu na tytuł książki, ważna jest również lista zagadnień, których w podręczniku nie zamieszczono. Najpoważniejszym brakiem są zjawiska i oddziaływania powierzchniowe, dla których w książce nie starczyło miejsca. Tylko raz, omawiając katalizę, autor wspomina o adsorpcji. Drugim nieobecnym tematem są równowagi w układach trójskładnikowych. O ile wykresy w trójkątach Gibbsa rzeczywiście mogły zostać bez szkody pominięte, to nieobecność zjawiska podziału i ekstrakcji w kursie chemii fizycznej, nawet podstawowym, jest trudne do wytłumaczenia.

Do książki dołączony jest dodatek, w którym zebrano zarówno metody matematyczne (rozwiązywanie równania kwadratowego, logarytmowanie, całkowanie), elementy elektrostatyki, ale także: promieniowanie elektromagnetyczne, teoria Lewisa wiązania walencyjnego oraz rozkład Boltzmann. Ten dobór materiału wygląda na nieporozumienie, być może wynikał z adresowania oryginalnego podręcznika dla szczególnej grupy studiujących, ponieważ we wstępie autor wspomina o studentach nauk przyrodniczych. Zagadnienia fizykochemiczne mogły z pożytkiem pojawić się we właściwym miejscu podręcznika, a przypomnienie podstaw matematycznych na żenująco niskim poziomie sugeruje, że czytelnikowi wiedza ta nie jest konieczna od początku.

Choć autor nie formułuje takiego zamiaru, jego podręcznik stał się wyjaśnianiem chemii fizycznej w prostym języku, sięga do zaawansowanych zagadnień, lecz nie żąda od czytelnika ich przyswojenia do poziomu użytkowego, raczej tylko informacyjnego. Bardzo liczne i sugestywnie proste ilustracje są wielką wartością książki; tracą nieco w stosunku do angielskiego oryginału przez czarno-biały druk i mały

format, dodatkowo rozdzielony na kolumny. Ogromna liczba zadań ćwiczeń rachunkowych pojawiających się w tekście oraz dołączona do każdego rozdziału jest świetnym polem do popisu dla studenta, sprawdzającego swoje umiejętności. Zagadnienia rachunkowe są udało się utrzymać na poziomie fizykochemicznego realizmu połączonego z prostotą opisu.

Podręcznik Atkinsa to książka nowoczesna, rzadka i wartościowa. Studiującym na kierunkach przyrodniczych lecz nie chemicznych (od biologii i medycyny do geologii i ochrony środowiska) można go polecić jako właściwą lekturę, choć niekoniecznie w przedmiocie chemia fizyczna; przedmiot ten nie zawsze występuje w programie tych studiów, częściej jest to wykład chemii ogólnej. Mogą sięgnąć po ten podręcznik również studenci chemii, jeśli potrzebują ratunku i pojęciowego wsparcia do wykładu prowadzonego w poważniejszej, zmatematyzowanej formie. Podstawy będą nieocenioną pomocą dla ambitnego nauczyciela chemii w liceum lub wykładowcy chemii ogólnej na I roku dowolnego kierunku studiów. Wydając książkę w niewielkim formacie, w miękkiej okładce, PWN nadał jej kształt podręcznika popularnego, którym rzeczywiście powinna się stać dla wielu studiujących.

Ludwik Komorowski

Peter W. Atkins, *Podstawy chemii fizycznej*, tłumaczenie z języka angielskiego przez zespół z Uniwersytetu Jagiellońskiego: Dorota Jamróz, Andrzej Kotarba, Zbigniew Sojka, Joanna Kowal oraz prof. dr hab. Jan Najbar (redaktor naukowy). Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2001, 937 s., okładka twarda, do książki dodano CD-ROM.

P.W. Atkins, C.A. Trapp, M.P. Cady, C. Giunta, *Chemia fizyczna. Zbiór zadań z rozwiązaniami*. Tłumaczenie z języka angielskiego: tematy zadań – zespół jw.; rozwiązania – Krzysztof Pigoń. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2001, 790 s., okładka miękka.

Publikacja słynnego w świecie podręcznika Atkinsa oraz towarzyszących mu zadań jest wydarzeniem na rynku wydawniczym w zakresie chemii. Obejmuje one bowiem obszar fizykochemii wykraczający poza typową zawartość przedmiotu chemia fizyczna, służebny dla studiowania wszystkich działów nowoczesnej chemii.

Podręcznik główny oraz zadania wydane zostały słusznie jako niezależne pozycje, inaczej niż w angielskim oryginale, gdzie tematy zadań pojawiały się w rozdziałach podręcznika głównego, a ich rozwiązania zebrano w odrębnej książeczce, bezużytecznej, jeśli pozbawionej towarzystwa macierzystego podręcznika. *Chemia fizyczna* oraz *Zbiór zadań* pozostają jednak i w polskiej wersji związane: dane liczbowe, często wykorzystywane w zadaniach, występują wyłącznie w tabelach zamieszczonych w podręczniku.

Peter William Atkins, wykładowca (*lecturer*) Uniwersytetu w Oxfordzie jest dziś najbardziej znanym autorem anglojęzycznym w obszarze fizykochemii. Stał się nim m.in. dzięki podręcznikowi *Physical Chemistry* po raz pierwszy wydanemu w roku 1978 i poddawanemu nieustannym modyfikacjom przez okres lat 20 (wydanie VI z roku 1997, które było podstawą tłumaczenia, w niewielkim stopniu przypomina swój pierwowzór z roku 1978). Nowatorski układ podręcznika, staranny dobór zagadnień specjalistycznych oraz szereg pomysłowych sposobów prezentacji materiału odróżniają ten podręcznik od innych, których wiele na rynku anglojęzycznym. Miarą sukcesu i rozpowszechnienia tej książki niech będzie fakt, że przyjął się on szeroko nawet na rynku amerykańskim, jako jedyny podręcznik podstawowego przedmiotu chemicznego rodem z Europy! I to pomimo, że istnieją tam co najmniej trzy poważne podręczniki chemii fizycznej od lat obecne w amerykańskich uniwersytetach (znane również w Polsce: Moora, Alberty & Silbeya oraz Berry, Rice i Rossa).

Książka zawiera trzy części pod oryginalnymi, wiele mówiącymi tytułami: „Równowaga”, „Struktura” i „Przemiana”. Autor zrywa z klasycznym podziałem materiału chemii fizycznej na termodynamikę, elektrochemię, kinetykę itd. Podział ten odkrywamy w rozdziałach książki, lecz nawet w tytułach każdego z 29 rozdziałów, szczególnie w części pierwszej, wskazana jest służebna rola chemii fizycznej w stosunku do zasadniczego celu przedmiotu chemii: zrozumienia i opisanie reakcji chemicznych. Konieczne, teoretyczne i trudne dla studenta rozdziały z termodynamiki rozdzielone są na części: osobno podstawy (*concepts*), osobno formalizm i pogłębienie (*machinery*). Zawartość książki reprezentuje ważny kompromis w selekcji materiału fizykochemicznego, przekraczającego znacznie ramy jednego przedmiotu czy podręcznika. Omówiono następujące zagadnienia, ukryte w trzech wspomnianych częściach książki: termodynamika fenomenologiczna, statystyczna oraz nawet elementy termodynamiki nierównowagowej (r. 1–5, 19–20); zarys równowag chemicznych i fazowych (r. 6–9); zarys elektrochemii. (r. 10 i 29); znakomicie przedstawiona, obszerna i nowoczesna kinetyka, w tym dynamika molekularna, reakcje oscylacyjne, chaos chemiczny oraz reakcje na powierzchni fazy stałej (r. 24–28); elementy chemii kwantowej (r. 11–15); wybór zagadnień spektroskopowych, w tym techniki fotoelektronowe oraz impulsowe techniki NMR (r. 16–18); wybór zagadnień strukturalnych, w tym rentgenografia, oddziaływania międzycząsteczkowe oraz koloidy (r. 21–23). Dobór materiału dowodzi, że książka jest przeznaczona jako podręcznik do rocznego, klasycznego wykładu przedmiotu chemia fizyczna, w programach studiów obejmujących również chemię nieorganiczną (gdzie na ogół wykładana jest np. rozpuszczalność) oraz chemię organiczną (gdzie studenci na ogół poznają interpretacje widm). Zastosowana selekcja materiału pozwala uniknąć powtórzeń i odpowiada zakresowi chemii fizycznej wykładanej w Polsce, choć tu chemia kwantowa jest wyodrębniana jako oddzielny przedmiot, a rozmiary prezentowanych działów, szczególnie tak specjalistycznych jak spektroskopia, wykładowca temperuje stosownie do wymiaru godzin i własnych zainteresowań. Atkins rozwiązał po mistrzowsku problem równowagi między tendencją do uogólniania wniosków (synteza), a rozważaniem zagadnień w najdrobniejszych szczegółach (analiza). Każda sekwencja jego tekstu zawiera sformułowane zagadnienie ogólne, jego szkieletową analizę, przykłady doświadczalne (w obrazach i wykresach) i rachunkowe (w ramkach). Istotne terminy są wytłuszczone i zostały objaśnione w oddzielnym przewodniku, który sam stanowi skarb literatury fizykochemicznej, dostępny już po polsku jako odrębna pozycja książkowa. Podręcznik Atkinsa służy równie dobrze jako pomoc w systematycznym studiowaniu przedmiotu, jak i w formie akademickiego odnośnika, dorywczo używanego dla rozpoznania zagadnień specjalistycznych. Imponująca jest lista nowoczesnych zagadnień, dotychczas obecna specjalistycznej literaturze, które dzięki podręcznikowi Atkinsa zostaną być może włączone do standardów studiowania w chemii fizycznej, np.: dyfrakcja neutronów, dyfrakcja elektronów, lasery chemiczne, spektroskopia w silnym strumieniu fotonów, mikroskopia tunelowa, reakcje fotochemiczne, techniki fourierowskie, woltamperometria i wiele innych.

Każdy z 29 rozdziałów podręcznika zaopatrzony jest w zadania zamieszczone w książce *Zbiór zadań z rozwiązaniami*. Zadania podzielone są na cztery grupy: ćwiczenia, problemy, zadania rachunkowe i zagadnienia teoretyczne. Zadania te, oryginalnie opracowane dla celów tego podręcznika przez zespół współpracowników z całego świata, są niezwykle wartościową pomocą w nauczaniu przedmiotu chemii fizycznej w warunkach polskich, gdzie poważnemu wykładowi zawsze towarzyszą ćwiczenia rachunkowe. Zadania występują w dwóch zestawach (a) – rozwiązane oraz (b) – nie rozwiązane, lecz analogiczne do poprzednich, co daje studiującemu możliwość testowania umiejętności po wykonaniu analizy metody rozwiązywania problemu. Odpowiedzi zarówno do jednych, jak drugich zebrano w końcowej części książki. Rozwiązania zostały przejrzane i skorygowane przez ich tłumacza, znanego polskiego fizykochemika, który (jak zaznacza w notce) poprawił nie tylko błędy drukarskie, lecz i pomyłki rzeczowe, a nawet całkowicie zmienił rozwiązania kilku zadań, uznając wersję oryginalną za błędną.

Wykonywanie tłumaczenia przez wiele osób w dwóch ośrodkach odbija się w tekście książek w postaci niespójności nomenklaturowych pomiędzy podręcznikiem głównym a rozwiązaniami zadań. Kilka charakterystycznych przykładów warto przytoczyć, ku przestrodze studentów i wykładowców. Zalecana i zatwierdzona do użytku w Polsce nazwa siła elektromotoryczna (patrz Wiad. Chem. 1989, 43 379), stosowana w rozwiązaniach, nie znalazła się w podręczniku głównym. Skomentowana została jako

nazwa „wcześniejsza i wciąż jeszcze powszechnie używana”. Używana w zastępstwie nazwa napięcie ogniwa jest zrozumiała i niesprzeczna choć nie znajduje oparcia w nazewnictwie zatwierdzonym do użytku w Polsce. Zamiast przyjętego powszechnie w Polsce terminu iloczyn rozpuszczalności (nazwa używana w *Zbiorze zadań*) podręcznik główny używa nazwy stała rozpuszczalności, określając iloczyn rozpuszczalności nazwą przestarzałą (bezpodstawnie). Podręcznik główny używa egzotycznej nieco nazwy diagram fazowy, taki też tytuł nosi rozdział 8 *Zbioru zadań*. Jednak w treści tego rozdziału, mowa jest wyłącznie o wykresach fazowych – ta nazwa jest w polskiej literaturze typowa, a dwoistość nazw będzie dla czytelnika kłopotliwa.

Podobnie jak w angielskim pierwowzorze, w *Zbiorze zadań* występuje różnorodność jednostek, zarówno zalecanych w układzie SI jako jednostki pochodne, jak i jednostek bardziej egzotycznych. W podręczniku stosuje się powszechnie stopnie Celsjusza [°C] obok Kelwinów [K], nawet na wykresach. Uważny czytelnik znajdzie również funty, cale i galony! Wydaje się, że stosowanie rozmaitych jednostek miało w zamyśle autorów służyć jako dodatkowe ćwiczenie praktyczne dla studiujących chemię fizyczną, dla których książka ta jest przeznaczona. Ani tłumacze, ani wydawca nie uznali za stosowne dostosować tego stanu do polskich standardów, chociaż znajomość anglosaskiego systemu miar bywa wśród polskich studentów raczej wyjątkowa. Podobnie przesadna wierność angielskiemu oryginałowi wykazali tłumacze w *Chemii fizycznej*. Literaturę cytowaną w podręczniku zachowano ściśle w wersji oryginalnej i niestety nie wzbogacono bibliografii o pozycje autorów polskich, bądź pozycje spolszczone, licznie występujące w bibliotekach polskich, które w jakimś wyborze powinny się były pojawić w podręczniku akademickim tej miary.

Podręcznikowi *Chemia fizyczna* towarzyszy CD-ROM. Obok tekstu zawiera przejrzyste wykonanie rysunki, wykresy dwu- i trójwymiarowe. Niestety cały materiał jest w języku oryginału, nie tłumaczony na język polski i jego główny walor – dydaktyczny – pozostanie nie wykorzystany. Jest przeznaczony przede wszystkim dla wykładowców, lecz ponieważ celem wykładu jest, między innymi, przekazanie słuchaczom reguł języka właściwego dla nauczanej dyscypliny, więc oparcie polskiego wykładu wyłącznie na ilustracjach z angielskim opisem byłoby metodycznym błędem. CD-ROM będzie natomiast świetną pomocą dla studiujących chemię fizyczną samodzielnie, szczególnie jeśli znają już podstawy terminologii fizykochemicznej zarówno w języku polskim jak angielskim. Do takiej grupy będą w Polsce należeli doktoranci oraz pracownicy naukowcy w obszarze nauk przyrodniczych – dla nich podręcznik Atkina powinien być lektura obowiązkowa.

Książka Atkina jest ważnym i znakomitym podręcznikiem akademickim, nieodzownym dla studentów chemii lub fizyki oraz dla doktorantów wszelkich specjalności, szukających pomocy w studiowaniu zagadnień fizykochemicznych. Książka jest również skarbnicą wiedzy dla czynnych pracowników naukowych, zawiera bogate odnośniki do współczesnych światowych pozycji literaturowych, zarówno podręczników jak prac przeglądowych i oryginalnych doniesień naukowych.

Ludwik Komorowski

REGULAMIN DLA AUTORÓW

„Wiadomości Chemiczne” publikują artykuły referatowe, nie oryginalne prace doświadczalne, dotyczące wszystkich dziedzin chemii i nie drukowane przedtem w innych czasopismach. Artykuły publikowane w „Wiadomościach Chemicznych” nie mogą być bez zgody Redakcji drukowane w innych czasopismach. Treść artykułów powinna odpowiadać stanowi wiedzy w chwili pisanania artykułu. Piśmiennictwo cytowane powinno uwzględniać najnowsze prace krajowe i zagraniczne z dziedziny, której dotyczy artykuł.

Maszynopisy (wydruki komputerowe) należy nadsyłać Redakcji w **dwóch egzemplarzach**: oryginał i kopia lub kserokopia pisana jednostronnie, z zachowaniem podwójnej interlinii i marginesu szerokości 5 cm z **prawej** strony; pierwszy wiersz akapitu należy zaznaczyć wcięciem na 5 uderzeń w klawisz.

Na pierwszej stronie pod tytułem polskim należy umieścić tytuł w języku angielskim, adres autora oraz spis rozdziałów. Praca powinna zawierać obszernie streszczenie w języku angielskim (do 1,5 strony maszynopisu z cytowaniem piśmiennictwa i odsyłaczami do tabel i rysunków w tekście). Na osobnej karcie prosimy o krótką (do 150 wyrazów) notkę z informacją o uprawianej przez Autora tematyce naukowej i przebiegu pracy. Prosimy o podanie tytułu naukowego i miejsca pracy oraz o dołączenie aktualnego zdjęcia. Przesłanie tych informacji będziemy traktować jako zgodę na ich publikację.

Artykuły należy opracowywać zwięźle i nie zamieszczać szczegółów, odsyłając czytelnika do piśmiennictwa oryginalnego. Maszynopis nie powinien przekraczać 25 stron wraz z tabelami i wykazem piśmiennictwa lub 100 stron, jeśli jest monografią przeznaczoną do druku w „Bibliotece Wiadomości Chemicznych”. Artykuły powinny być napisane za pomocą komputera. Redakcja prosi o dołączenie dyskietki z tekstem pracy i ilustracjami wraz z wyczerpującą informacją o używanym edytorze. Pożądanym edytor jest Word (co najmniej wersja 6).

Rysunki (mogą być kolorowe, ale za dopłatą do druku) należy nadsyłać w dwóch egzemplarzach (oryginały i kopie lub kserokopie). Oryginały rysunków muszą mieć taką formę graficzną, by nadawały się do reprodukcji. Na odwrotnej stronie należy podać ołówkiem nazwisko autora i numer rysunku i ten sam numer zaznaczyć w odpowiednim miejscu maszynopisu. Na osobnym arkuszu dołączyć podpisy pod rysunki. **Wzory chemiczne i schematy reakcji chemicznych**, których nie można w prosty sposób napisać na maszynie lub komputerze, powinny być wpisane ręcznie, w odpowiednich miejscach tekstu. **Niezależnie od tego do pracy należy dołączyć jeden komplet wzorów i schematów narysowanych oddzielnie w formie nadającej się do reprodukcji.**

Tabele należy ponumerować cyframi arabskimi oraz podać ich tytuły.

Piśmiennictwo zestawia się w kolejności cytowania w tekście: powinno ono zawierać kolejno inicjały imion i nazwisko, skrót tytułu czasopisma zgodny z przyjętymi normami, rok wydania, tom podkreślony i numer pierwszej strony cytowanej pracy. Wykaz skrótów ważniejszych czasopism chemicznych jest podany w „Wiadomościach Chemicznych”, 1989, 43, 979. Jeśli część piśmiennictwa zebrana jest w monografiach lub innych wydawnictwach, nie należy podawać szczegółowo wykazu tego piśmiennictwa, lecz cytować odnośne wydawnictwo.

O przyjęciu pracy do druku decyduje Komitet Redakcyjny. **Maszynopisy nie odpowiadające podanym warunkom nie będą przez Komitet rozpatrywane.** Artykuły nie zakwalifikowane do druku Redakcja zwraca, zachowując kopię maszynopisu. Autorzy przeprowadzają jedną korektę tekstu. Po zakwalifikowaniu pracy do druku nie będą uwzględniane żadne poprawki rysunków.

Honoraria za wydrukowane prace są wypłacane wyłącznie tym Autorom, których artykuły zostały zamówione przez Redakcję. Autorzy wydrukowanych prac otrzymują bezpłatnie 20 nadbitek.

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

Nomenklatura steroidów (Zalecenia 1989), tłum. J.W. Morzycki i W.J. Szczepek, cena 3 zł

J. Połtowicz, T. Młodnicka, *Metaloporfiryny jako katalizatory procesów utleniania*, cena 3 zł

Nomenklatura chemii nieorganicznej. Zalecenia 1990, red. Z. Stasicka, cena 25 zł
Z. Kluz, M. Późniczek, *Nomenklatura związków chemicznych. Poradnik dla nauczycieli*, cena 10 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 indywidualów 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

Bibliografia „Wiadomości Chemicznych” za lata 1988–1997, cena 3 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: BPH SA I O/Wrocław, Redakcja „Wiadomości Chemicznych”, NRB 83 1060 0076 0000 3200 0040 0597.

Do nabycia jest również książka Z. Ruziewicza *Ludzie i dzieła. Studia nad historią chemii na ziemiach polskich*, wyd. Instytut Chemii Fizycznej i Teoretycznej Politechniki Wrocławskiej, cena 10 zł.

DO CZYTELNIKÓW
„WIADOMOŚCI CHEMICZNYCH”

Redakcja miesięcznika PTCh „Wiadomości Chemiczne” zawiadamia, że wysokość prenumeraty rocznej „Wiadomości Chemicznych” za 2003 r. wynosi od 1 stycznia 2003 r. 96 zł dla instytucji i nie zrzeszonych prenumeratorów indywidualnych oraz 48 zł dla bibliotek szkół średnich i podstawowych. Należność za prenumeratę prosimy przekazywać na konto:

Bank Przemysłowo-Handlowy S.A.
Oddział we Wrocławiu
pl. Powstańców Śl. 9, 53-316 Wrocław
Redakcja „Wiadomości Chemicznych”
NRB 83 1060 0076 0000 3200 0040 0597

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

– prenumerata „Wiadomości Chemicznych” na rok 2003 wraz ze składką członkowską, w ramach której dostarczany jest „Orbital”, wynosi 85 zł (składka – 75 zł, prenumerata – 10 zł);

– emeryci, nauczyciele szkół średnich i podstawowych oraz studenci płacą 35 zł (składka – 25 zł, prenumerata – 10 zł);

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

PTCh Warszawa, ul. Freta 16
Millennium BIG BG SA, Nr 5711602202-0000000027202458

Redakcja „Wiadomości Chemicznych”

SPIS TREŚCI

Sławomir KAŹMIERSKI: Zastosowanie spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego w badaniach strukturalnych węglowodanów i ich pochodnych	339
Elżbieta J. TADEUSIAK: Badania układów racemat/enancjomer oraz określanie nadmiaru enancjomerycznego za pomocą wysokorozdzielczej spektroskopii MRJ w cieczy i ciele stałym	367
Robert ŁYSEK, Bartłomiej FURMAN, Katarzyna BORSUK, Marek CHMIELEWSKI: Stereokontrolowana synteza tlenowych analogów penicylin i cefalosporyn	391
Krzyszyna BOGDANOWICZ-SZWED, Artur BUDZOWSKI: Synteza wielofunkcyjnych pochodnych tiopiranu w reakcjach cykloaddycji Dielsa-Aldera	435
Dariusz POGOCKI, Katarzyna SERDIUK: Neurotoksyczność amyloidowego β -peptydu Alzheimer. Rola Met ³⁵ i miedzi kompleksowanej przez peptyd	459
Janusz MADAJ, Magdalena JANKOWSKA: Wybrane metody utleniania terminalnej grupy hydroksymetylowej w pochodnych cukrów	477
Michał UHER, Halina WÓJTOWICZ: Naturalne i syntetyczne niecukrowe substancje słodkie.	505
Felieton naukowy	
Ignacy Z. SIEMION: Notatki chaotyczne. XLVI. W kręgu analogii chemicznych	547
Kronika żałobna	557
Nowe wydawnictwa	561

W NASTĘPNYM ZESZYCIE UKAŻĄ SIĘ:

- Małgorzata SIERANT, Barbara NAWROT: Charakterystyka zjawiska interferencji RNA, podstawy strukturalne i właściwości siRNA
Ryszard ŁAŻNY, Aneta NODZEWSKA: Narzędzia chemii kombinatorycznej. Nośniki stosowane w syntezie organicznej związków nisko- i wysokocząsteczkowych
Małgorzata ULEWICZ, Władysław WALKOWIAK, Paweł MACIEJEWSKI: Hydrometalurgiczne procesy wydzielania i rozdzielania jonów cynku i kadmu
Jitka MORAVCOVÁ: Sacharoza jako surowiec przemysłowy
Przemysław MASTALERZ: Krótki kurs historii POP. Część pierwsza: DDT

Felieton naukowy

- Ignacy Z. SIEMION: Notatki chaotyczne. XLVII. Od Jędrzeja Śniadeckiego do Adolfa Windausa, czyli krótka historia witaminy D

Kronika