

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza

Wydział Chemii



Chemia alkaloidów

Opracowanie: Maria Chrzanowska, Beata Jasiewicz i Anna K. Przybył

Poznań 2010

Skrypt przeznaczony jest dla studentów studiów stacjonarnych II stopnia specjalności chemia biologiczna Wydziału Chemii UAM

Spis treści

	<i>strona</i>
1. Wprowadzenie	4
2. Alkaloidy izochinolinowe	5
2.1. Synteza prostych alkaloidów izochinolinowych	6
2.1.1. Formylowanie 3,4-dimetoksyfenyloetyloaminy	8
2.1.2. Cyklizacja <i>N</i> -formylohomoweratryloaminy	9
2.1.3. Metylojodek 6,7-dimetoksy-3,4-dihydroizochinoliny	10
2.1.4. Synteza karneginy	11
2.1.5. Synteza <i>N</i> -metyloheliaminy	12
2.1.6. Literatura	12
3. Alkaloidy chinolizydynowe	13
3.1. Ekstrakcja alkaloidów łubinowych	13
3.1.1. Przygotowanie nasion do odtłuszczenia	16
3.1.1.1. Analiza mieszaniny alkaloidów	16
3.1.2. Maceracja odtłuszczonej mączki łubinowej i wmywanie alkaloidów	17
3.1.3. Rozdział surowej frakcji alkaloidów chinolizydynowych	17
3.1.4. Otrzymywanie (±)-lupaniny i nadchloranu (+)-lupaniny	18
3.1.5. Literatura	19
3.2. Reakcje utleniania alkaloidów chinolizydynowych	19
3.2.1. Utlenianie sparteiny do 17-oksosparteiny	20
3.2.1.1. Przygotowanie „alkalicznego” roztworu żelazicyjanku potasu	20
3.2.1.2. Otrzymywanie wolnej zasady sparteiny z siarczanu sparteiny	20
3.2.1.3. Utlenianie wolnej zasady sparteiny żelazicyjankiem potasu w stosunku molowym 1:5	21

3.2.2. Reakcje utleniania lupaniny	21
3.2.2.1. Otrzymywanie wolnej zasady lupaniny z nadchloranu lupaniny	21
3.2.2.2. Utlenianie lupaniny nadmanganianem potasu	21
3.2.2.3. Utlenianie lupaniny przy użyciu NBS	22
3.2.2.4. Utlenianie lupaniny kwasem <i>m</i> -chloronadbenzoesowym	23
3.2.3. Literatura	23
3.3. Ekstrakcja cytyzyny i synteza pochodnych cytyzyny	24
3.3.1. Izolacja (–)–cytyzyny z materiału roślinnego	25
3.3.1.1. Ekstrakcja alkaloidów	26
3.3.1.2. Odłuszczenie i ekstrakcja alkaloidów	26
3.3.1.3. Oczyszczanie na kolumnie z Al ₂ O ₃	26
3.3.2. Synteza pochodnych cytyzyny	27
3.3.2.1. Synteza <i>N</i> -BOC–cytyzyny	27
3.3.2.2. Odblokowanie <i>N</i> -BOC–cytyzyny do cytyzyny	29
3.3.2.3. Otrzymywanie 3,5–dibromo– <i>N</i> -BOC–cytyzyny	32
3.3.2.4. Otrzymywanie 3–bromo– <i>N</i> -BOC–cytyzyny i 5–bromo– <i>N</i> -BOC–cytyzyny	33
3.3.2.5. Otrzymywanie 3,5–dijodo– <i>N</i> -BOC–cytyzyny	34
3.3.2.6. Otrzymywanie 3–jodo– <i>N</i> -BOC–cytyzyny i 5–jodo– <i>N</i> -BOC–cytyzyny	35
3.3.2.7. Synteza <i>N</i> -metylocytyzyny (metoda I)	36
3.3.2.8. Synteza <i>N</i> -metylocytyzyny (metoda II)	37
3.3.2.9. Synteza <i>N</i> -propionocytyzyny	38
3.3.2.10. Synteza <i>N</i> -tiopropionocytyzyny	39
3.3.2.11. Synteza <i>N</i> -benzylocytyzyny	40
3.3.3. Literatura	41

1. Wprowadzenie

Mianem alkaloidów oznacza się szereg związków organicznych, głównie pochodzenia roślinnego, odznaczających się dwiema zasadniczymi cechami: zawierają w cząsteczce atom (lub atomy) azotu nadający im charakter zasadowy (obecnie znane są też alkaloidy o charakterze obojętnym lub lekko kwaśnym) i wykazują silne działanie fizjologiczne na organizmy ludzkie i zwierzęce.

Pierwszą z takich zasad odkrył w 1817 r. aptekarz Serturmer, wyodrębniając morfinę z opium. Zapoczątkowało to poszukiwania podobnych substancji w innych surowcach roślinnych. Kolejne wyizolowane związki to: emetyna (Pelletier, 1817 r.), strychnina (Pelletier i Caventou, 1818 r.), brucyna (Pelletier i Caventou, 1819 r.), chinina i cinchonina (Pelletier i Caventou, 1820 r.), koniina (Giesecke, 1827 r.), atropina (Mein, 1831 r.). Wszystkie te substancje, podobnie jak morfina, okazały się zasadami, które zawierają atom azotu i tworzą sole z kwasami. Stąd też pochodzi nazwa „alkaloid” oznaczająca „podobny do alkaliów”.

Alkaloidy występują w całym świecie roślinnym, są jednak bardzo nierównomiernie rozdzielone na poszczególne klasy i rodziny roślin. Największa liczba roślin, w których stwierdzono obecność alkaloidów należy do roślin dwuliściennych; pomiędzy jednoliściennymi wyróżnia się pod tym względem rodzina *Liliaceae*. Jedna roślina może zawierać od kilku do kilkudziesięciu różnych alkaloidów, które zazwyczaj są ze sobą spokrewnione, zarówno pod względem chemicznym, jak i fizjologicznym. Zawartość alkaloidów w roślinach waha się w bardzo szerokich granicach – od ilości śladowych do 10% wagi wysuszonych części roślinnych. Zawartość ta nie jest jednak stała. Zależy od okresu rozwojowego rośliny, od pory roku, warunków zewnętrznych np. alkaloidy mogą występować we wszystkich częściach roślin ale tworzą się przeważnie w asymilujących częściach roślin i stąd przenoszą się do innych części, gdzie zostają zmagazynowane. Alkaloidy występują najczęściej w liściach, owocach i nasionach, nieraz też w kwiatach i korzeniach lub bulwach, a w przypadku drzew także w korze.

W świecie zwierzęcym związki typu alkaloidów znaleziono u salamander i niektórych gatunków owadów, np. u biedronek i motyli. Niektóre z alkaloidów obecne są w organizmach ssaków, np. u ludzi dotkniętych alkoholizmem lub chorobą Parkinsona.

Prekursorami alkaloidów są naturalne aminokwasy: L-ornityna, L-lizyna, L-tyrozyna i L-tryptofan.

Wiele spośród alkaloidów wykazuje charakterystyczną czynność fizjologiczną. Począwszy od czasów starożytnych używano surowe wyciągi z różnych roślin, a nawet zwierząt, wykorzystując ich działanie lecznicze bądź też trujące. Stąd też zwrócono już wcześniej uwagę na wyodrębnienie i scharakteryzowanie tych zasad. W alkaloidach występują niemal wszystkie układy pierścieniowe zawierające azot. Nazwy alkaloidów pochodzą często od nazw roślin, w których te związki występują. Często też nazwa wiąże się z działaniem danego alkaloidu, jak np.: morfina (od greckiego boga snu Morfeusza).

Rzadko zdarza się, aby w roślinie występował tylko jeden alkaloid, zazwyczaj zasadowe składniki danej rośliny wykazują ściśle wzajemne pokrewieństwo. Chociaż alkaloidy stanowią jedną z największych grup produktów naturalnych, to z około 20 000 znanych obecnie związków kilkaset z nich (2-5%) zostało zanalizowanych pod względem ich właściwości biochemicznych, a jeszcze mniej w celu określenia ich farmakologicznego działania.

Alkaloidy izochinolinowe i chinolizydynowe od wielu lat są przedmiotem zainteresowań grup badawczych pracujących na Wydziale Chemii UAM i dlatego tematyka ćwiczeń laboratoryjnych dotyczy przede wszystkim tych dwóch grup alkaloidów. Z uwagi na ograniczony czas ćwiczeń laboratoryjnych (30 h) studenci mają do wyboru pracę nad syntezą prostych alkaloidów izochinolinowych lub nad ekstrakcją alkaloidów chinolizydynowych i ich przekształceniami chemicznymi.

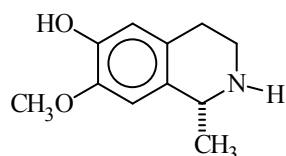
2. Alkaloidy izochinolinowe

Jedną z najliczniejszych klas naturalnych zasad azotowych stanowią alkaloidy izochinolinowe (ponad 2500 związków), które zawierają w swojej strukturze pierścień izochinolinowy lub tetrahydroizochinolinowy. Z uwagi na dużą różnorodność budowy, w ramach tej klasy wyodrębniono kilkadziesiąt grup alkaloidów biorąc za podstawę cechy strukturalne i/lub biogenezę. Jedną z takich grup stanowią proste alkaloidy izochinolinowe, do których m. in. zalicza się: salsolinę, salsolidynę, kalikotominę, hydrohydrastyninę, *N*-metyloheliaminę, karneginę.

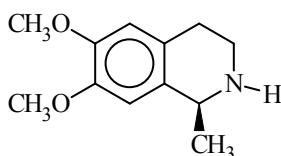
Karnegina została wyizolowana po raz pierwszy przez Heyl'a w 1901 roku z kaktusa meksykańskiego *Pachycereus pecten-aboriginum* (Engelm.) i w 1928 roku z kaktusa amerykańskiego *Carnegia gigantea* (Britton and Rose). Obecność karneginy stwierdzono również w roślinach z rodziny *Chenopodiaceae*: *Haloxylon articulatum*. Naturalnie występujący alkaloid jest związkiem optycznie czynnym, wykazuje skręcalność właściwą

$[\alpha]_D -24,9$ ($c=4.45$, EtOH), a jego konfigurację absolutną określono jako (*S*).

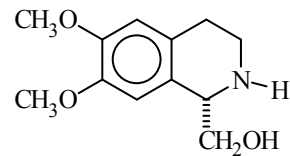
N-Metyloheliamina (*O*-metylokorypallina) występuje również w roślinach kaktusowatych *Cactaceae*: *Backebergia militaris*, *Pachycereus weberi*, *Pilosocereus guerreronis*, jak również w rodzinach: *Nymphaeaceae*, *Papaveraceae*, *Ranunculaceae*.



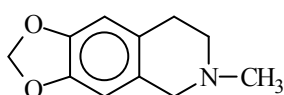
(+)-Salsolina



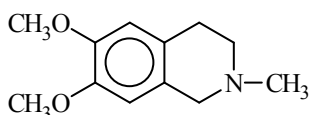
(-)-Salsolidyna



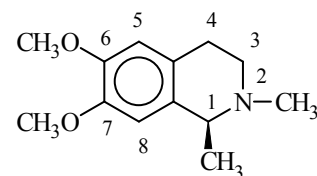
(+)-Kalikotomina



Hydrohydrastynina



N-Metyloheliamina



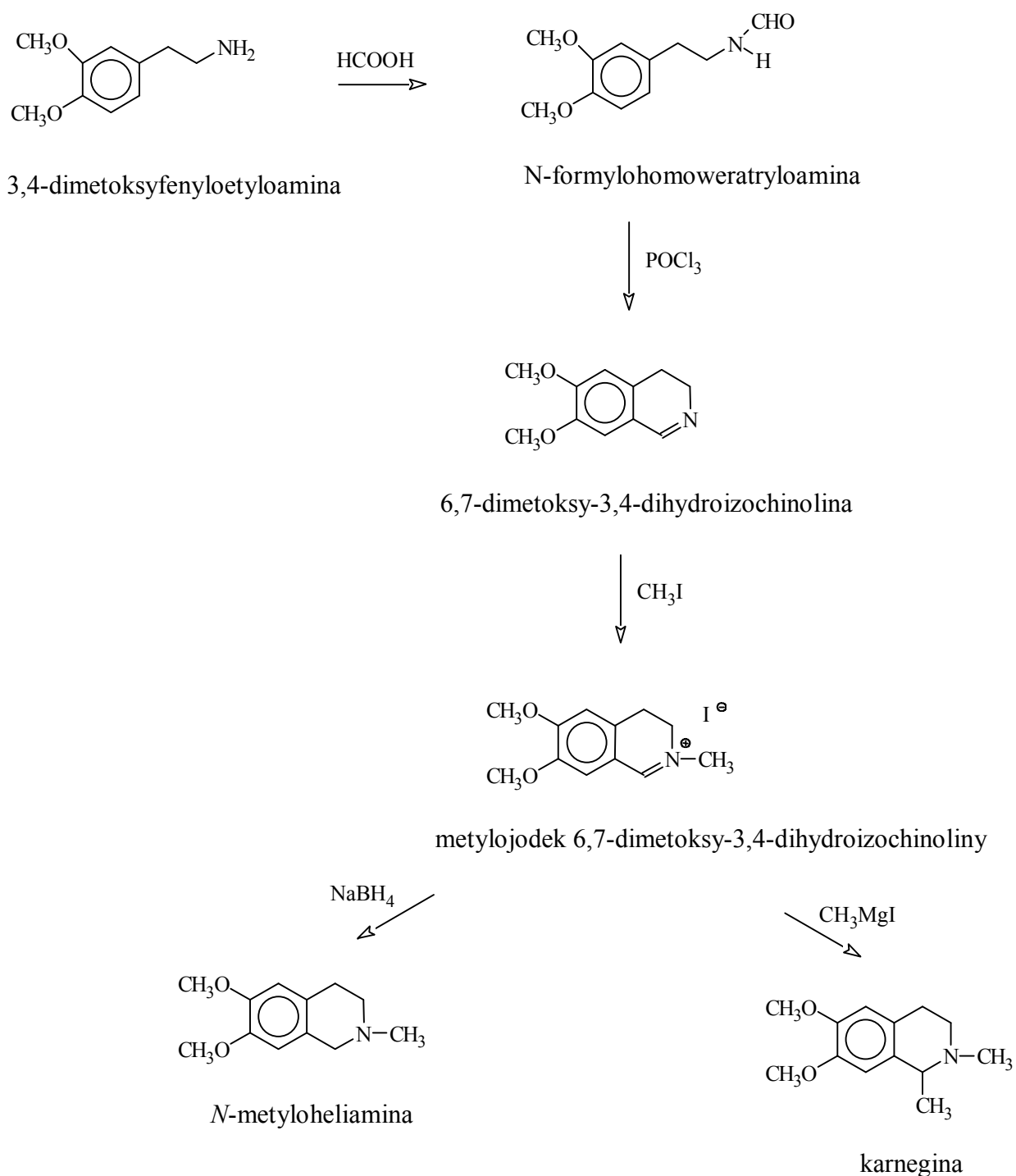
(-)-Karnegina

Większość z prostych alkaloidów izochinolinowych wykazuje znaczącą aktywność biologiczną. Oddziałują one na centralny układ nerwowy, obniżają ciśnienie krwi. Spotykane są jako wtórne metabolity otrzymywane z *L*-tyrozyny w czasie jej przemiany przez mózgową hydroksylazę tyrozynową u osób cierpiących na chorobę Parkinsona, jak również u alkoholików. Salsolidyna, karnegina i *N*-metyloheliamina znane są jako inhibitory mitochondrialnej oksydazy monoaminowej typu A. Chlorek 2-metylo-6,7-dimetoksy-3,4-dihydroizochinoliniowy stosowany jest jako środek ściągający tkankę i od 1933 roku występuje pod nazwą zastrzeżoną *Lodal*[®].

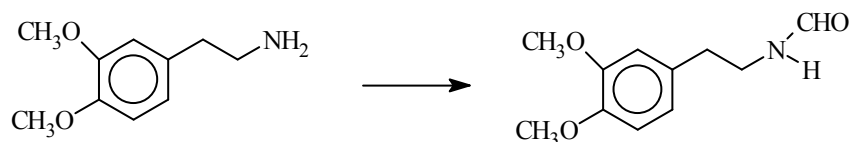
2.1. Synteza prostych alkaloidów izochinolinowych

Opracowany cykl ćwiczeń ma na celu zapoznanie z syntezą układu 3,4-dihydroizochinolinowego metodą Bischlera-Napieralskiego i następnie przekształcenie go w układ 1,2,3,4-tetrahydroizochinolinowy, który stanowi podstawę budowy strukturalnej prostych alkaloidów izochinolinowych. Na schemacie 1 przedstawiono syntezę karneginy i *N*-metyloheliaminy z handlowo dostępnej 3,4-dimetoksyfenyloetyloaminy.

Schemat 1. Synteza prostych alkaloidów izochinolinowych



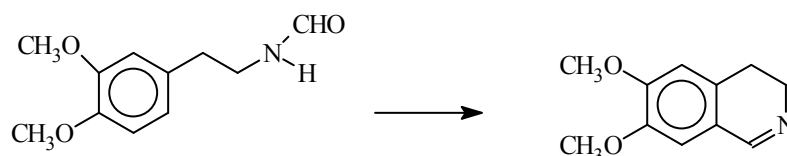
2.1.1. Formylowanie 3,4-dimetoksyfenyloetyloaminy



W kolbie okrągłodennej o poj. 250 ml umieszczono 3,4-dimetoksyfenyloetyloaminę (2.7 g, 2.5 ml, 15 mmol), toluen (90 ml) i kwas mrówkowy (3.0 g, 2.5 ml). Mieszaninę ogrzewano do wrzenia z nasadką do azeotropowego usuwania wody przez około 2 h. Postęp reakcji kontrolowano za pomocą TLC. W przypadku stwierdzenia obecności w mieszaninie reakcyjnej nieprzereagowanej aminy dodano 1 ml kwasu mrówkowego i kontynuowano ogrzewanie do wrzenia przez następne 30 min. Po ostygnięciu roztworu toluen odparowano na wyparce próżniowej, a pozostałość rozpuszczono w chlorku metylenu (około 100 ml) i przemyto 1% wodnym roztworem NaOH, a następnie wodą (pH~7). Roztwór organiczny osuszono nad bezw. siarczanem sodu i odparowano przy pomocy wyparki próżniowej. Otrzymano 2.9 g oleju, który zakrzepł.

Analiza TLC. Eluent: CHCl₃-MeOH-NH₄OH 90:9:1

2.1.2. Cyklizacja *N*-formylohomowatryloaminy (synteza 6,7-dimetoksy-3,4-dihydroizochinoliny)



UWAGA – reakcję przeprowadza się pod wyciągiem.

Układ reakcyjny: kolba okrągłodenna o poj. 250 ml, chłodnica zwrotna z odprowadzeniem do pochłaniania chlorowodoru.

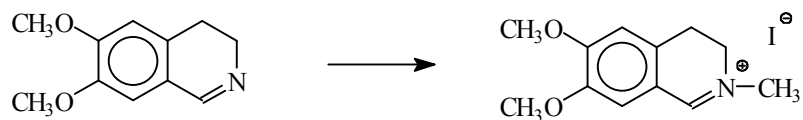
Do roztworu *N*-formylohomowatryloaminy (2.9 g, 14 mmol) w acetonitrylu (70 ml) dodano porcjami z wkraplacza POCl₃ (8 ml) przy intensywnym mieszaniu na mieszadle magnetycznym. Następnie mieszaninę ogrzewano do wrzenia w łaźni olejowej przez 2 h. Pobrano próbkę do analizy TLC, w której nadmiar POCl₃ rozłożono 20% NaOH i ekstrahowano eterem dietylowym. Jeśli analiza TLC wykazała brak amidu (wyjściowy amid nie daje reakcji barwnej z odczynnikiem Dragendorffa), to mieszaninę reakcyjną pozostawiono do ostygnięcia. Uzyskany roztwór odparowano „do sucha” na wyparce próżniowej. Do pozostałości dodano 14 ml wody i ogrzewano do wrzenia w łaźni wodnej pod chłodnicą zwrotną przez 1 h.

Warstwę wodną silnie zalkalizowano (20% NaOH) i rozcieńczono wodą do objętości ~150 ml i ekstrahowano eterem dietylowym (7x) do zaniku reakcji barwnej z odczynnikiem Dragendorffa. Połączone ekstrakty eterowe suszono nad bezw. siarczanem sodu i odparowano na wyparce próżniowej. Uzyskano 2.3 g oleju, który zakrzepł.

Substancję oczyszczono poprzez destylację z kolbki do kolbki pod zmniejszonym ciśnieniem (destylacja kugłowa), produkt zbierano w przedziale temperatur 120-150°C. Otrzymano 2.1 g czystej 6,7-dimetoksy-3,4-dihydroizochinoliny.

Analiza TLC. Eluent: CHCl₃-MeOH-NH₄OH 90:9:1

2.1.3. Metylojodek 6,7-dimetoksy-3,4-dihydroizochinoliny



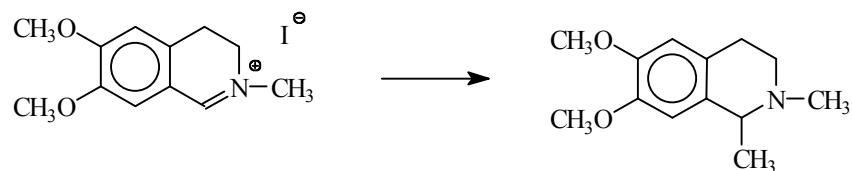
6,7-Dimetoksy-3,4-dihydroizochinolinę (1.0 g, 5.2 mmol) rozpuszczono w eterze dietylowym (20 ml) w kolbie okrągłodennej o poj. 100 ml i przy intensywnym mieszaniu dodano jodku metylu (1 ml, 16 mmol). Pozostawiono z mieszaniem na 24 h.

Następnego dnia reakcję sprawdzono za pomocą TLC. Odsączono żółte kryształy i przemyto eterem dietylowym; t.t. 212-214°C. W razie potrzeby metylojodek 6,7-dimetoksy-3,4-dihydroizochinoliny można rekrytalizować z metanolu. Czyste kryształy wysuszono w tzw. *pistolecie do suszenia* pod zmniejszonym ciśnieniem.

Analiza TLC. Eluent: CHCl₃-MeOH-NH₄OH 80:18:2

2.1.4. Synteza karneginy

Addycja jodku metylomagnezowego do metylojodku 6,7-dimetoksy-3,4-dihydroizochinoliny



Przygotowanie związku Grignarda:

W kolbie okrągłodennej o poj. 50 ml umieszczono opiłki Mg (250 mg, 10 mmol) w 5 ml bezwodnego eteru dietylowego i kryształek jodu. Do mieszaniny wdroplono z wkraplacza (z rurką do wyrównywania ciśnień) jodek metylu (0.63 ml, 10 mmol) w 3 ml eteru dietylowego. (Uwaga: po wdropleniu około 1/3 objętości roztworu, jeśli reakcja tworzenia związku magnezoorganicznego nie rozpoczęła się samorzutnie, mieszaninę należy lekko ogrzać). Następnie mieszanie kontynuowano przy lekkim wrzeniu roztworu aż do całkowitego rozpuszczenia magnezu (około 1 h).

Addycja związku Grignarda:

Związek magnezoorganiczny przesączono (szybko!) przez lejek z watką do wkraplacza i wdroplono w temp. 0°C do roztworu metylojodku 6,7-dimetoksy-3,4-dihydroizochinoliny (333 mg, 1 mmol) w 20 ml bezwodnego THF. Łażnię woda-lód usunięto i po 30 min. mieszania w temperaturze pokojowej kontrolowano postęp reakcji przy pomocy TLC (pobraną próbkę mieszaniny reakcyjnej rozłożono 20% NH₄Cl i wyekstrahowano eterem dietylowym). Mieszanie kontynuowano do zaniku żółtej barwy mieszaniny reakcyjnej. Po zakończeniu reakcji do mieszaniny reakcyjnej dodano 20% chlorku amonu i ekstrahowano eterem dietylowym. Ekstrakty eterowe suszono nad bezw. siarczanem sodu i odparowano rozpuszczalniki pod zmniejszonym ciśnieniem. Karneginę uzyskano w postaci oleju (131 mg), który przeprowadzono w chlorowoderek. Olej (131 mg) rozpuszczono w jak najmniejszej ilości metanolu, a następnie dodano kroplami 3.5% metanolowy roztwór HCl aż do uzyskania odczynu kwaśnego. Roztwór pozostawiono do krystalizacji.

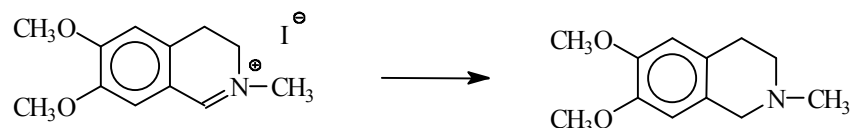
Chlorowoderek karneginy: t.t. 210°C.

Z ługów wodnych można odzyskać nieprzereagowaną pochodną dihydroizochinoliny po zakwaszeniu stęż. HCl i ekstrakcji chlorkiem metylenu.

Analiza TLC. Eluent: CHCl₃-MeOH-NH₄OH 90:9:1

2.1.5. Synteza *N*-metyloheliaminy

Redukcja metylojodku 6,7-dimetoksy-3,4-dihydroizochinoliny



Metylojodek 6,7-dimetoksy-3,4-dihydroizochinoliny (333 mg, 1 mmol) rozpuszczono w uwodnionym metanolu (10ml MeOH i 1 ml H₂O) w temperaturze pokojowej i umieszczono w łaźni z lodem. Do mieszanego na mieszadle magnetycznym roztworu dodawano porcjami wodorek borowo-sodowy (100 mg). Przebieg redukcji kontrolowano przy pomocy TLC. Po zakończeniu reakcji całość odparowano "do sucha" przy pomocy wyparki próżniowej, dodano 2 ml H₂O i 20% NaOH do pH~13 i ekstrahowano eterem dietylowym. Połączone ekstrakty eterowe osuszono nad bezw. Na₂SO₄ i odparowano eter. Uzyskano 173 mg białego osadu, który rekrytalizowano z eteru dietylowego. *N*-Metyloheliamina: t.t. 69-70°C.

Analiza TLC. Eluent: CHCl₃-MeOH-NH₄OH 90:9:1

2.1.6. Literatura

Whaley W. M. , Meadow M., *J.Chem. Soc.*, **1953**, 23, 1067-1070.

Bracca A. B. J., Kaufman T., *Tetrahedron*, **2004**, 60, 10575-10610.

3. Alkaloidy chinolizydynowe



Dieta człowieka powinna być bogata zarówno w produkty pochodzenia zwierzęcego, jak i roślinnego. Szczególną uwagę poświęca się białkom znajdującym się w nasionach roślin strączkowych, gdyż zawierają one prawie wszystkie aminokwasy egzogenne w ilościach zbliżonych do tych w pełnowartościowych produktach zwierzęcych. Nasiona łubinu zawierają ok. 44% białka, 13% tłuszczu oraz składniki biologicznie aktywne. Przeprowadzono szerokie badania nad właściwościami odżywczymi łubinów, ich potencjalnym działaniem alergennym, mutagennym i karcynogennym.

W 1996 roku opracowano wymagania dotyczące składu chemicznego, wartości odżywczej i bezpieczeństwa produktów dla łubinu certyfikowanego (słodkiego). Na podstawie tych dokumentów zaczęto polecać produkty łubinowe jako składniki produktów żywnościowych. Spośród wszystkich roślin strączkowych największą zawartością białka charakteryzują się nasiona łubinu żółtego. Łubin biały ma podobną koncentrację białka co soja. Cechuje go ponadto wysoka zawartość cystyny, aminokwasu siarkowego, którego w nasionach innych roślin strączkowych jest znacznie mniej.

3.1. Ekstrakcja alkaloidów łubinowych

W celu zwiększenia wykorzystania białka łubinowego dąży się do usunięcia alkaloidów przez odgoryczanie metodami technologicznymi np.: ekstrakcja 48% EtOH lub też hodowlę tzw. łubinów słodkich o niskiej zawartości alkaloidów. Proces odgoryczania nie prowadzi do całkowitego usunięcia alkaloidów.

Kilkanaście lat temu opracowano metodę ekstrakcji alkaloidów z nasion łubinu, umożliwiającą maksymalne wymycie alkaloidów w ich niezmiennych naturalnych formach, co umożliwia wykorzystanie ich do dalszych badań. Metoda ta polega na unikaniu czynników

hydrolizujących (stężonych kwasów i zasad) grupy funkcyjne m.in. estrowe i laktamowe. Hydroliza układu laktamowego w laktamach sparteiny prowadzi do tworzenia się soli kwasów, które nie są rozpuszczalne w rozpuszczalnikach organicznych i nie przechodzą do warstw organicznych w trakcie ekstrakcji. W ten sposób obniża się zawartość alkaloidów w ekstraktach.

Ćwiczenia zostaną przeprowadzone na nasionach różnych gatunków łubinów. Przykładowo podano skład alkaloidów **łubinu białego odmiany BAC**:

Lupanina – $C_{15}H_{24}N_2O$ (1)

13-Hydroksylupanina – $C_{15}H_{24}N_2O_2$ (2)

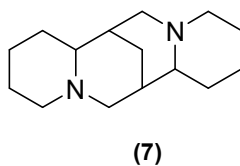
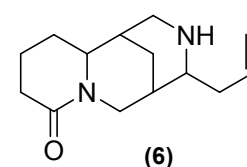
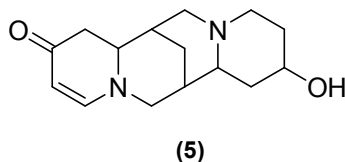
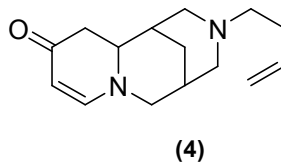
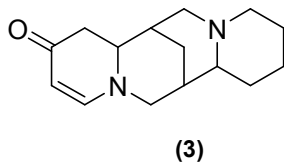
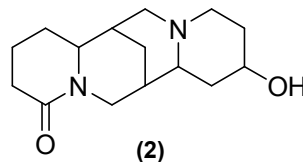
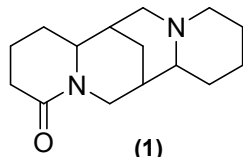
Multiflorina – $C_{15}H_{22}N_2O$ (3)

Seco(11,12)-12-didehydromultiflorina – $C_{15}H_{22}N_2O$ (4)

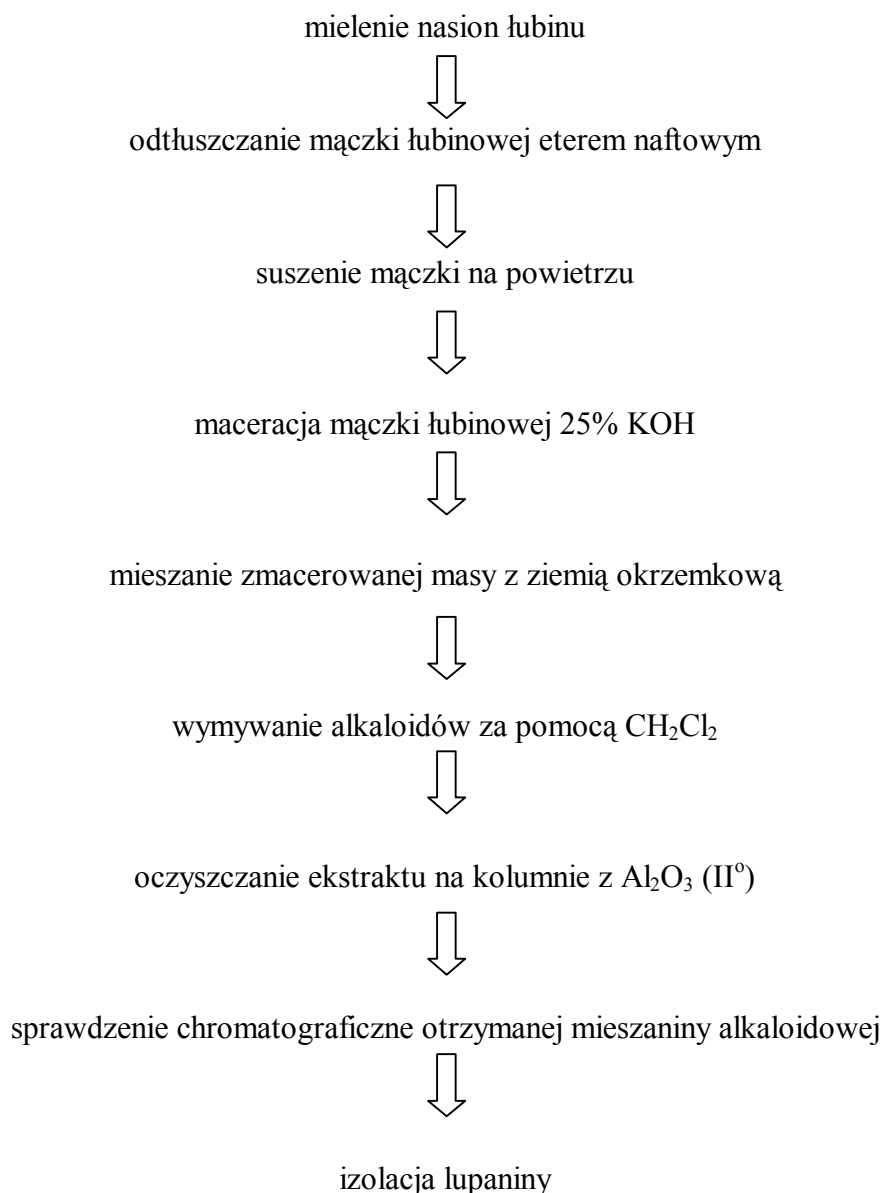
13-Hydroksymultiflorina – $C_{15}H_{22}N_2O_2$ (5)

Angustyfolina – $C_{15}H_{26}N_2O$ (6)

Sparteina – $C_{15}H_{26}N_2$ (7)



Ogólny schemat ekstrakcji alkaloidów



Analizę chromatograficzną TLC przeprowadza się wykorzystując jako fazy rozwijające:

- A) chloroform : etanol – 3 : 2
- B) aceton : metanol : amoniak – 5 : 5 : 0.5

3.1.1. Przygotowanie nasion do odtłuszczenia

Tok postępowania:

1. Zmleć 100 g nasion łubinu na mączkę
2. Przygotować Soxhlet z kolbą okrągłodenną o pojemności 500 ml i napęlić ją 370 ml eteru naftowego (t.wrz. 48-53°C). Mączkę przenieść do gilzy, umieścić w aparacie Soxhleta i utrzymywać eter w stanie wrzenia przez ok. 8 h (dwa kolejne ćwiczenia) – proces ten ma na celu usunięcie tłuszczów oraz innych zbędnych balastów.
3. Odtłuszczone mączkę suszyć na powietrzu.

Przygotować do dalszych ćwiczeń: roztwór 25% KOH oraz alkaliczną ziemię krzemkową (160 g ziemi krzemkowej zalane 100 ml 20% KOH).

3.1.1.1. Analiza mieszaniny alkaloidów

Tok postępowania:

1. Zważyć otrzymaną próbkę (mieszanina alkaloidów).
2. Mieszaninę alkaloidów zmieszać z ziemią krzemkową.
3. Przygotować kolumnę: na dnie kolumny umieścić kawałek waty, przygotowaną masę alkaloidów z ziemią krzemkową, kawałek waty.
4. Kolumnę wymywać chlorkiem metylenu (porcje po ok. 15 ml). Pasek bibuły nasycony kroplą końcowego wycieku z kolumny po zanurzeniu w odczynniku Dragendorffa nie powinien zabarwiać się na pomarańczowo.
5. Wykonać chromatografię TLC z kolejnych frakcji. Frakcje podobne połączyć, zatężyć na wyparce, zważyć.
6. Przeprowadzić krystalizację alkaloidów obecnych w mieszaninie.

3.1.2. Maceracja odtłuszczonej mączki łubinowej i wymywanie alkaloidów

Tok postępowania:

1. W celu roztworzenia ścianek komórek roślinnych na każde 10 g odtłuszczonej i wysuszonej mączki dodać 7.5 ml 25% KOH. Całość wymieszać i pozostawić na 1.5 godziny.
2. Zmacerowaną masę wymieszać z ok. 45 g ziemi okrzemkowej (~1:1 w stosunku do suchej odtłuszczonej mączki łubinowej) w celu powiększenia powierzchni penetracji rozpuszczalnika oraz zaabsorbowania nadmiaru wody.
3. Przygotowanie kolumny: na dnie kolumny umieścić kawałek waty, następnie uprzednio przygotowane 10 g alkalicznej ziemi okrzemkowej oraz przygotowaną masę alkaloidów z ziemią okrzemkową.
4. Kolumnę wymywać chlorkiem metylenu do zaniku alkaloidów w wycieku – test Dragendorffa. Ekstrakt suszyć nad bezw. $MgSO_4$, zateńczyć pod zmniejszonym ciśnieniem na wyparce i zważyć.

3.1.3. Rozdział surowej frakcji alkaloidów chinolizydynowych

Tok postępowania:

1. Przygotować kolumnę z Al_2O_3 : w kolumnie umieścić watę i tlenek glinu (20-krotny nadmiar wagowy w stosunku do masy alkaloidowej). Frakcję alkaloidową rozpuścić w niewielkiej ilości CH_2Cl_2 , wymieszać z piaskiem, podsuszyć aby była sypka i umieścić na tlenku glinu.
2. Kolumnę wymywać kolejno:
 - a. eterem dietylowym
 - b. chlorkiem metylenu
 - c. chloroformem
 - d. metanolemaż do zaniku alkaloidów w wycieku (test Dragendorffa)
3. Zagęszczone roztwory zważyć.

3.1.4. Otrzymywanie (\pm)-lupaniny i nadchloranu (+)-lupaniny

Głównym składnikiem frakcji eterowej obok (+)-lupaniny jest racemiczna lupanina, którą można łatwo oddzielić od towarzyszących jej pozostałych alkaloidów poprzez krystalizację z eteru dietylowego, a (+)-lupaninę - przeprowadzając ługi pokrystaliczne w nadchloran.

Tok postępowania:

1. Frakcję uzyskaną w wyniku odparowania eteru rozpuścić na gorąco w niewielkiej ilości eteru dietylowego.
2. Odstawić do pojawienia się kryształów racemicznej lupaniny.
3. Kryształki odsączyć i przemyć eterem naftowym.
4. Uzyskany osad przekrystalizować ponownie z eteru dietylowego.
5. Osad odsączyć, przemyć eterem naftowym, suszyć na powietrzu, a następnie oznaczyć temperaturę topnienia.
6. Ługi pokrystalizacyjne zawierające (+)-lupaninę zlać do jednego naczynka i ostrożnie zakwasić roztworem HClO_4 w metanolu (1:4 v/v) do $\text{pH} \sim 5$, pozostawić do krystalizacji nadchloranu lupaniny.
7. Wytrącony osad odsączyć, przemyć eterem dietylowym, wysuszyć, a następnie oznaczyć temperaturę topnienia.

Stałe fizyczne dla lupaniny:

(\pm)-Lupanina $[\alpha]_D = 0$

Temperatura topnienia 98-99°C

(+)-Lupanina $[\alpha]_D = +61.4$

W temperaturze pokojowej występuje w postaci oleju

Nadchloran lupaniny t.t. 199-201°C

3.1.5. Literatura

Wink M., *The Alkaloids*, 43, Academic Press, Inc. **1993**, 1.

Czarnecka E., Kolińska-Marzec A., Szadowska A., *Acta Pol. Pharm.*, **1967**, 24, 543-548.

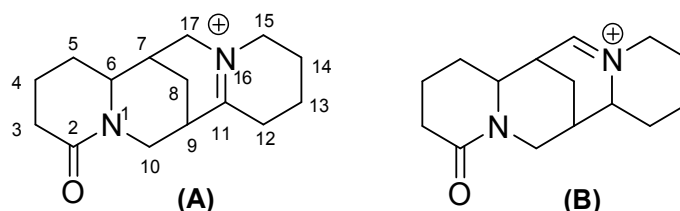
Riyad A., Salam A., Mohamed S., *Planta Med.*, **1998**, 54, 286-290.

Wink M., Twardowski T., *Alleopathy: Basic and Aspects*, **1992**, 129-149.

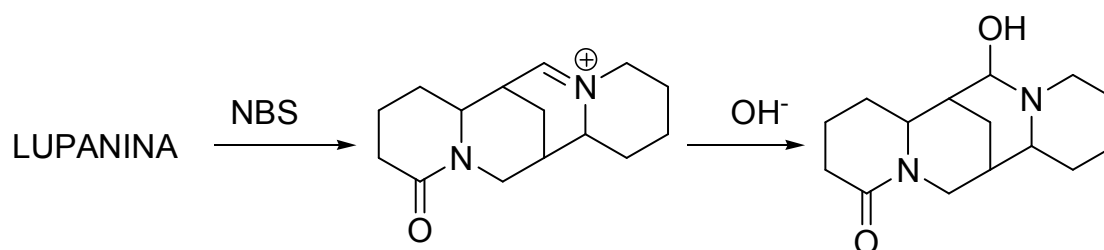
Wysocka W., Przybył A., *Sci. Legumes*, **1994**, 1, 37-50.

3.2. Reakcje utleniania alkaloidów chinolizydynowych

Oryginalna definicja Lavoisiera mówi, że większość reakcji utleniania w chemii organicznej wiąże się z przyłączeniem atomu tlenu i (lub) utratą atomu wodoru. Widoczne jest to w szeregu reakcji m.in. w prowadzonych od lat próbach utleniania cząsteczki sparteiny i jej pochodnych. W przypadku utlenienia cząsteczki lupaniny działaniem $\text{Hg}(\text{OAc})_2$ eliminacji ulega atom wodoru przy atomie węgla C-11, dając kation 11,16-dehydrolupaniniowy (**A**), stosując natomiast jako utleniacz kompleks $\text{Hg}^{\text{II}}/\text{EDTA}$, eliminacji ulega atom wodoru przy atomie węgla C-17 rezultatem czego jest kation 16,17-dehydrolupaniniowy (**B**).



Niektóre z alkaloidów łubinowych (lupaninę, afylinę, 13-hydroksysparteinę) poddano utleniającemu działaniu N-bromoimidu kwasu bursztynowego (**NBS**). Także i w tych przypadkach tworzy się wiązanie podwójne. Lupanina w reakcji z NBS daje układ imoniowy, po zalkalizowaniu którego otrzymujemy hydroksyzwiązek: 17-hydroksylupaninę.



O. E. Edwards, F. H. Clarc i B. Douglas przebadali zachowanie się niektórych alkaloidów typu sparteiny wobec Ag_2O . Okazało się, że w temperaturze pokojowej sparteina

nie reaguje z Ag_2O , natomiast w temperaturze 60°C otrzymano produkty utleniania, których nie charakteryzowano. Podobnie zachowywała się lupanina, która utleniana Ag_2O w temp. pokojowej pozostawała nienaruszona, natomiast w temperaturze powyżej 60°C (w uwodnionym metanolu) wynikiem utlenienia była mieszanina produktów. Z mieszaniny tej autorzy wyizolowali produkt będący w przewodzie, przeprowadzili go w sól nadchloranową i przypisali jemu strukturę nadchloranu "dehydrolupaniny", czyli nadchloranu 17-hydroksylupaniny. W obydwu przypadkach wydajność reakcji była niska.

Kolejnym stosowanym czynnikiem utleniającym był trójtlenek chromu CrO_3 . Działaniu tego utleniacza na cząsteczkę lupaniny, multifloriny oraz matryny poświęcone były doświadczenia H. R. Schüttego i wsp., natomiast M. Wink i K. Grabowski wykorzystali CrO_3 do utlenienia sparteiny.

Alkaloidy bis-chinolizydynowe, jako aminy trzeciorzędowe, w reakcji z H_2O_2 lub z **nadkwasami** dają aminotlenki.

3.2.1. Utlenianie sparteiny do 17-oksosparteiny

3.2.1.1. Przygotowanie „alkalicznego” roztworu żelazicyjanku potasu

W celu otrzymania roztworu należy zmieszać 10 ml 1M wodnego roztworu $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ z 4 ml 20% wodnego roztworu KOH, 1 ml takiego roztworu zawiera 0.7 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$.

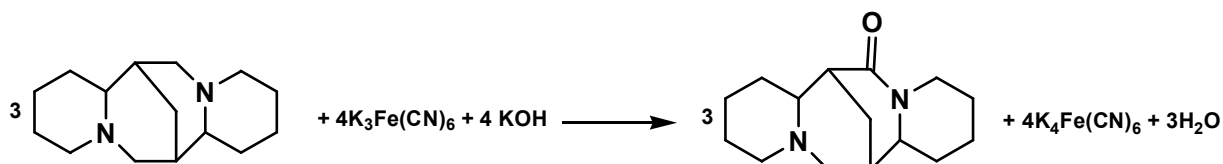
3.2.1.2. Otrzymywanie wolnej zasady sparteiny z siarczanu sparteiny

2 g Siarczanu sparteiny rozpuścić w ~25 ml 1N HCl, a następnie dodać 50% KOH do odczynu silnie zasadowego. Całość przenieść do rozdzielacza i wytrząsać z eterem dietylowym do zaniku testu Dragendorffa. Ekstrakty eterowe osuszyć nad stałym KOH i odparować pod zmniejszonym ciśnieniem. Wolna zasada sparteiny ma postać jasnożółtego oleju (przechowywać w lodówce!). Otrzymujemy ok. 1 g oleju. Wydajność reakcji: 98%.

3.2.1.3. Utlenianie wolnej zasady sparteiny żelazicyjankiem potasu w stosunku molowym 1:5

W moździerzu umieścić 1 g sparteiny, 5 ml wody, 10 ml dioksanu i „alkaliczny” roztwór $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (w stosunku molowym 1:5). Całość ucierać przez 10 minut. Gdy nie

stwierdza się obecności sparteiny (TLC) mieszaninę reakcyjną dodatkowo alkalizuje się 50% KOH (do odczynu silnie zasadowego), miesza z ziemią krzemkową i wprowadza do kolumny. Kolumnę eluować eterem dietylowym do zaniku pozytywnej próby na alkaloidy (test Dragendorffa). Eluat osuszyć nad stałym KOH i zagęścić pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymuje się jasnożółty olej, który krystalizuje. Otrzymane kryształy 17-oksosparteiny należy rekrystalizować z eteru naftowego (t.t. 86-88°C). Wydajność reakcji: 75%.



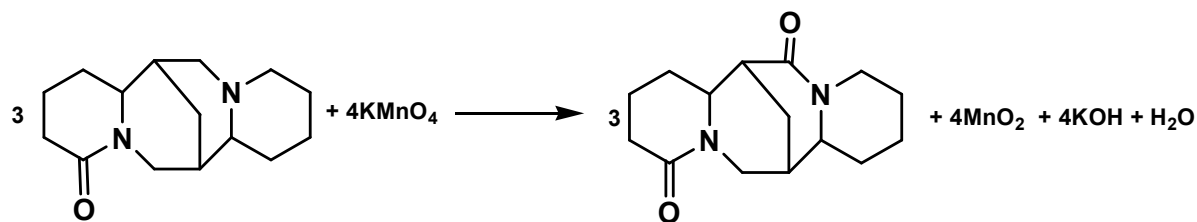
3.2.2. Reakcje utleniania lupaniny

3.2.2.1. Otrzymywanie wolnej zasady lupaniny z nadchloranu lupaniny

1.5 g Nadchloranu lupaniny rozpuścić w ~15 ml 1N HCl, a następnie dodać 50% KOH do odczynu silnie zasadowego. Całość przenieść do rozdzielacza i wytrząsać z eterem dietylowym do zaniku reakcji barwnej z odczynnikiem Dragendorffa. Eter osuszyć nad stałym KOH i odparować pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymane kryształy lupaniny rekrystalizować z eteru naftowego (t.t. 90-92°C). Wydajność reakcji: 85%.

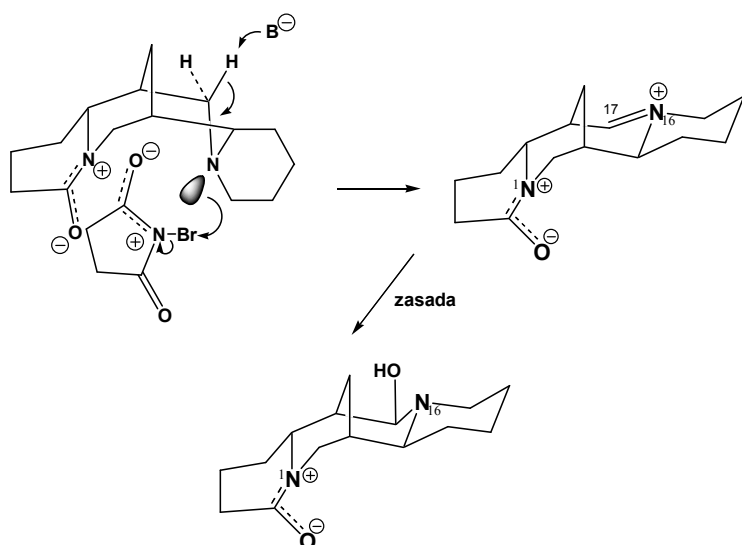
3.2.2.2. Utlenianie lupaniny nadmanganianem potasu

Otrzymaną lupaninę rozpuścić w 15 ml wody. Kolbkę umieścić na mieszadle magnetycznym i w ciągu 60 minut wkraplać KMnO_4 (40% nadmiar) rozpuszczony w 20 ml wody. Mieszanie kontynuować jeszcze przez następne 30 minut. Po następnych 30 minutach słabo alkaliczny roztwór zakwasić przy pomocy 15 ml wodnego roztworu kwasu siarkowego (1:1 v/v), przenieść do rozdzielacza i ekstrahować chlorkiem metylenu do zaniku reakcji barwnej z odczynnikiem Dragendorffa. Z ekstraktu tego po osuszeniu (stały bezw. Na_2SO_4) i odparowaniu rozpuszczalnika pod zmniejszonym ciśnieniem otrzymujemy kryształy 17-oksolupaniny (t.t. 152-153°C). Wydajność reakcji: 65%.



3.2.2.3. Utlenianie lupaniny przy użyciu NBS

Otrzymaną lupaninę rozpuścić w 10 ml metanolu. Przygotować (na zimno) roztwór 712 g NBS w 30 ml metanolu – barwa roztworu zielonkawa. Obydwa roztwory połączyć. W chwili wlewania roztwór żółknie, by po kilku sekundach stać się bezbarwnym. Roztwory wytrząsać kilka minut, a następnie odparować do sucha. Pozostałość rozpuścić w kilku ml wody, zalkalizować 50% KOH, przenieść do rozdzielacza i wyczerpująco ekstrahować eterem dietylowym. Z ekstraktu tego po osuszeniu (stały KOH) i odparowaniu rozpuszczalnika pod zmniejszonym ciśnieniem otrzymujemy 17-hydroksylupaninę. Wydajność reakcji: 85 %.

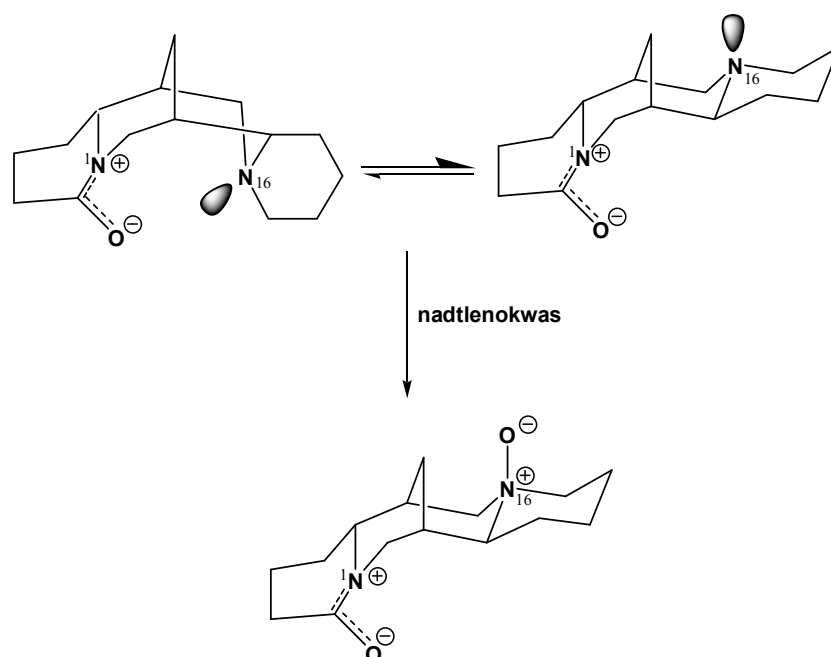


Otrzymywanie nadchloranu 17-hydroksylupaniny

Otrzymany olej rozpuścić w metanolu i zakwasić $\text{HClO}_4/\text{MeOH}$ (1:4 v/v). Wytrącają się kryształy nadchloranu 17-hydroksylupaniny, które krystalizuje się z metanolu (t.t. 251-253°C).

3.2.2.4. Utlenianie lupaniny kwasem *m*-chloronadbenzoesowym

Otrzymaną lupaninę rozpuścić w 10 ml chlorku metylenu i dodać kwas *m*-chloronadbenzoesowy rozpuszczony w kilku ml chlorku metylenu (stosunek molowy lupaniny do kwasu 1:1.2). Przebieg reakcji kontrolować chromatograficznie. Po zakończeniu utleniania odparować rozpuszczalnik, a do pozostałości dodać 1.5 ml 2N HCl. Nadmiar utleniacza usunąć przez ekstrakcję eterem dietylowym. Kwaśną warstwę wodną silnie zalkalizować 50% KOH i ekstrahować chlorkiem metylenu. Ekstrakt osuszyć nad bezwodnym Na₂SO₄ i odparować rozpuszczalnik. Otrzymany *N*-tlenek lupaniny krystalizować z toluenu (t.t. 76-78°C). Wydajność reakcji: 75%.



3.2.3. Literatura

- O. E. Edwards, F. H. Clarke, B. Douglas, *Can. J. Chem.* 32 (1954) 235.
L. Marion, N. J. Leonard, *Can. J. Chem.* 29 (1951) 355.
J. Thiel, Wł. Boczoń, W. Wysocka, *Monatsch. Chem.* 131 (2000) 1073.
M. Wink, K. Grabowski, *Arch. Pharm.* 289 (1956) 695.
W. M. Gołębiewski, I. Spencer, *Can. J. Chem.* 63 (1985) 716.
B. Jasiewicz, Wł. Boczoń, *Lett. Org. Chem.* 4 (2007) 27.

3.3. Ekstrakcja cytyzyny i synteza pochodnych cytyzyny

3.3.1. Ekstrakcja i właściwości cytyzyny

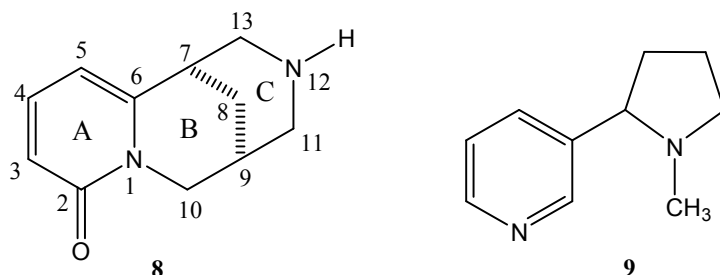


Fot. A. K Przybył

Charakterystyka cytyzyny.

Cytyzyna należy do głównych przedstawicieli trójpierścieniowych alkaloidów chinolizydynowych. Występuje głównie w roślinach z rodziny motylkowych (*Leguminosae*) m. in. w złotokapie (*Laburnum anagyroides*). W Europie cytyzyna (**8**) może być izolowana z dwóch gatunków nasion złotokapu: zwyczajnego (*Laburnum anagyroides*) oraz alpejskiego (*Laburnum alpinum*). Oba te gatunki są uprawiane w całej Europie ze względu na ich kwiaty, które pojawiają się wczesną wiosną w postaci bujnych, wiszących żółtych kiści.

Jednak większość drzew złotokapu jest mieszaniną dwóch gatunków (określanych *Laburnum x wetereri*), co wpływa na niską produkcję toksycznych alkaloidów w nasionach, które wywołują zatrucia, objawiające się wzmożoną sennością, wymiotami oraz drgawkami. Znane są przypadki śmierci w wyniku niedotlenienia.



Cytyzyna została wyizolowana w 1863 roku przez Husemman'a i Marne'a, jako jeden z trujących alkaloidów znajdujących się w nasionach złotokapu zwyczajnego, a jej struktura została ustalona na początku lat trzydziestych XX wieku przez H. R. Ing'a. Cytyzyna (**8**) - (7*R*,9*S*)-1,2,3,4,5,6-heksahydro-1,5-metano-8*H*-pirydo[1,2-*a*][1,5]diazocin-8-on, posiada

quasi aromatyczny pierścień A, oraz wolne pary elektronowe na drugorzędowym atomie azotu w pierścieniu C, co powoduje jej dużą aktywność biologiczną.

Aktywność biologiczna cytyzyny

(-)-Cytyzyna (**8**) wykazuje aktywność biologiczną podobną do aktywności nikotyny (**9**). Oba te alkaloidy wykazują powinowactwo do specyficznych receptorów neuronalnych *N*-cholinergicznych (nikotynowych), czyli nAChR. Właściwości tego alkaloidu zostały wykorzystane w klinicznych badaniach związanych z leczeniem chorób związanych z układem nerwowym: Alzheimer'a i Parkinson'a. Jednakże terapeutyczne stosowanie związków wzajemnie oddziałujących z głównymi receptorami nAChR (czyli $\alpha 4\beta 2$ i $\alpha 7$) jest często powiązane z występowaniem niepożądanych skutków ubocznych w obwodowym układzie nerwowym.

Nikotynowe receptory acetylocholinylne zostały dokładnie zbadane. Ligandy receptorów nAChR, w tym również (-)-cytyzyna (**8**), oraz ich pochodne zostały opisane w literaturze dotyczącej zwalczania chorób takich jak: choroba Alzheimer'a, choroba Parkinson'a, choroba Huntington'a, syndromu Tourette'a, depresji, stanów lękowych, jaskry. Aktualnie (-)-cytyzyna (**8**) oraz jej pochodne znalazły zastosowanie głównie w farmakologicznym leczeniu osób uzależnionych od nikotyny (Tabex[®]).

3.3.1. Izolacja (-)-cytyzyny z materiału roślinnego

Izolacja (-)-cytyzyny z nasion złotokapu zwyczajnego obejmuje następujące etapy:

- mielenie ziaren,
- ekstrakcję alkaloidów z tłuszczami z alkalicznego roztworu (NH₄OH) chlorkiem metylenu,
- zakwaszenie masy alkaloidowej (HCl) i usunięcie tłuszczu eterem naftowym,
- zalkalizowanie warstwy wodnej za pomocą KOH, ekstrakcja alkaloidów chlorkiem metylenu,
- oczyszczanie na kolumnie chromatograficznej z Al₂O₃,
- krystalizację cytyzyny (**8**) z heksanu z dodatkiem chlorku metylenu.



3.3.1.1. Ekstrakcja alkaloidów

W kolbie Erlenmayera o pojemności 1 l umieścić 200 g zmielonych nasion złotokapu zwyczajnego, 30 ml amoniaku, 80 ml metanolu i 300 ml chlorku metylenu. Pozostawić kolbę na tydzień.

Po upływie tego czasu, przygotować dużą kolumnę: wata - warstwa piasku (ok. 2 cm) - macerowana mączka złotokapu. Mieszaninę przemywać chlorkiem metylenu, aż do wymycia alkaloidów (do zaniku reakcji barwnej z odczynnikiem Dragendorffa) wraz z pozostałymi tłuszczami. Otrzymany ekstrakt zagęścić na wyparce w celu usunięcia rozpuszczalników.

3.3.1.2. Odtłuszczenie i ekstrakcja alkaloidów

Otrzymany krystalizujący olej zadać wodą (40 ml) i zakwasić 2M HCl (około 5 ml). Następnie tłuszcze wyizolować eterem naftowym (3 x po 150 ml). Warstwę wodną zalkalizować 25% wodnym roztworem wodorotlenku potasu i wyekstrahować alkaloidy za pomocą chlorku metylenu (ok. 5 x 100 ml), aż do zaniku alkaloidów w roztworze organicznym (do zaniku reakcji barwnej z odczynnikiem Dragendorffa). Roztwór suszyć nad bezwodnym $MgSO_4$, a po przesączeniu przez lejek z watą zagęścić na wyparce w kolbie o znanej tarze. Czystość otrzymanego ekstraktu sprawdzić za pomocą analizy TLC (eluent: CH_2Cl_2 -MeOH- NH_4OH 10:1:0.1). Uzyskuje się ok. 4 g kremowo-białego osadu (procent zawartości cytyzyny w nasionach *Laburnum anagyroides* zależy od roku zbioru, klimatu, stanu gleby).

3.3.1.3. Oczyszczanie na kolumnie z Al_2O_3

Otrzymany surowy ekstrakt z cytyzyną (8) nanieść na kolumnę chromatograficzną z Al_2O_3 i wymywać eluentem: CH_2Cl_2 - eter dietylowy (8:2), aż do zaniku alkaloidów w wycieku (do zaniku reakcji barwnej z odczynnikiem Dragendorffa). Sprawdzić czystość otrzymanego

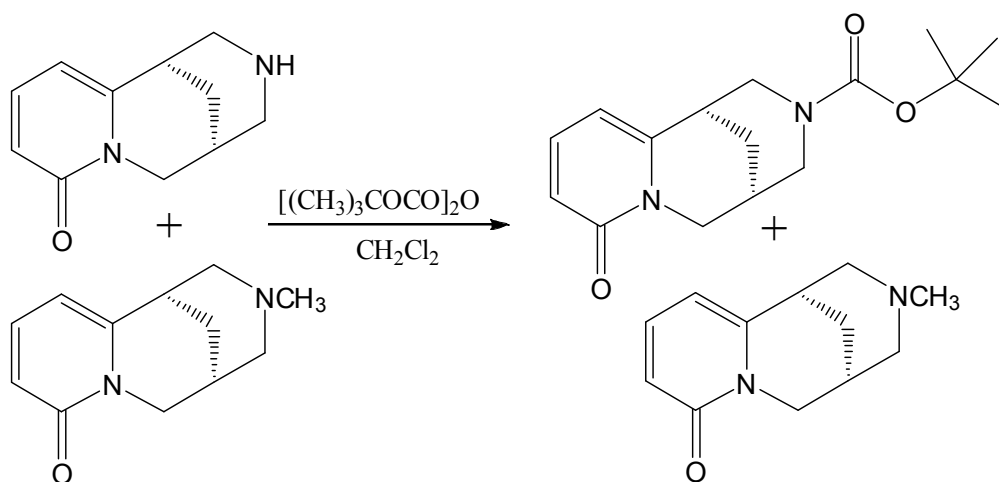
związku na TLC. Odparować rozpuszczalnik na wyparce pod zmniejszonym ciśnieniem i zważyć. Na koniec kolumnę przemyć MeOH, roztwory odparować i przenieść do osobnych zważonych fiolek.

(-)-Cytyzynę krystalizuje się z mieszaniny chlorku metylenu z dodatkiem eteru naftowego (1:1 v/v). Wypadają jasnożółte kryształy (t.t. 153°C).

Analiza TLC. Eluent: CH₂Cl₂-MeOH-NH₄OH 10:1:0.1

3.3.2. Synteza pochodnych cytyzyny

3.3.2.1. Synteza *N*-BOC-cytyzyny



Cytyzyna (+ <i>N</i> -metylocytyzyna)	1 g (5.26 mmol)
Diwęglan di- <i>tert</i> -butylu	1.37 g (6.3 mmol, 1.2 equiv)
Na ₂ CO ₃	0.67 mg (6.3 mmol, 1.2 equiv)
CH ₂ Cl ₂	60 ml
NaCl nasyc. roztwór	30 ml
MgSO ₄ bezwodny	

Cytyzynę (zawierającą domieszkę *N*-metylocytyzyny) rozpuścić w 40 ml CH₂Cl₂ i dodać do tego roztworu diwęglanu di-*tert*-butylu. (UWAGA! Związek żący o niskiej

temperaturze topnienia i samozapłonu! Praca w rękawicach ochronnych). Następnie wlać wodny roztwór Na_2CO_3 . (Podaną ilość węgla sodu rozpuścić w 2 ml wody).

Przygotowaną mieszaninę cytyzyny i diwęglanu di-*tert*-butylu mieszać za pomocą mieszadła magnetycznego w temperaturze 60°C przez 1-2 godziny. Przebieg reakcji sprawdzić za pomocą TLC. Jeśli cytyzyna całkowicie przereagowała, to pozostawić mieszaninę reakcyjną do schłodzenia do temperatury pokojowej.

Następnie do roztworu dodać 30 ml nasyconego roztworu NaCl i sprawdzić pH. Jeśli roztwór będzie wykazywać odczyn lekko zasadowy, zakwasić roztworem 10% kwasu cytrynowego do $\text{pH}\sim 4$ i w rozdzielaczu rozdzielić frakcję organiczną od nieorganicznej.

Frakcję wodną przemyć 3x po 20 ml CH_2Cl_2 i ekstrakty połączyć i osuszyć nad bezwodnym MgSO_4 , następnie odsączyć środek suszący i roztwór przenieść do wytarowanej kolby. Rozpuszczalnik odparować na wyparce pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymuje się ***N*-BOC-cytyzynę**.

Do surowego produktu ***N*-BOC-cytyzyny** dodać eteru naftowego i przesączyć przez mały lejek Büchnera. Przesącz pozostawić do krystalizacji. Otrzymuje się białe kryształy z wydajnością 90% (ok. 1.4 g).

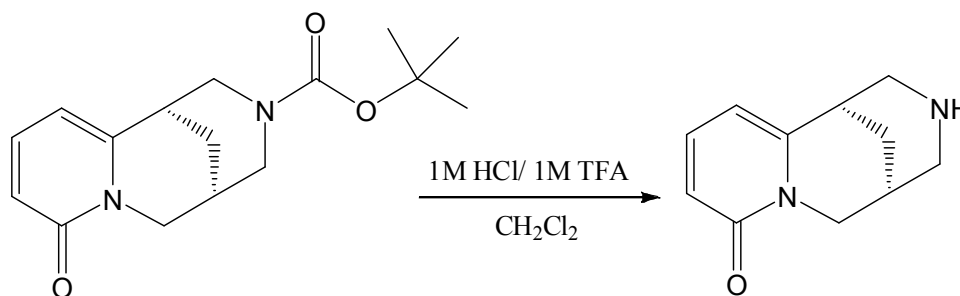
Pozostałą frakcję **wodną zalkalizować** i 3 porcjami po 20 ml CH_2Cl_2 wyekstrahować ***N*-metylocytyzynę** (do zaniku reakcji barwnej z odczynnikiem Dragendorffa), która nie reaguje z diwęglanem di-*tert*-butylu. (Jest to sposób na rozdział tych dwóch alkaloidów izolowanych z nasion złotokapu). Ekstrakty połączyć i osuszyć nad bezwodnym MgSO_4 , następnie odsączyć środek suszący, rozpuszczalnik odparować na wyparce pod zmniejszonym ciśnieniem.

Analiza TLC. Eluent: CH_2Cl_2 -MeOH- NH_4OH 10:1:0.1

^{13}C -NMR ***N*-BOC-cytyzyny** (CDCl_3 , 300 MHz)

δ (ppm): 163.4; 154.5; 148.7; 138.9; 117.1; 105.8; 80.3; 51.6; 50.5; 48.9; 34.8; 28.0; 27.5; 26.1.

3.3.2.2. Odblokowanie *N*-BOC-cytyzyny do cytyzyny



<i>N</i> -BOC-cytyzyna	4 g
1M HCl	5.5 ml
kwas trifluorooctowy(TFA)	5.5 ml

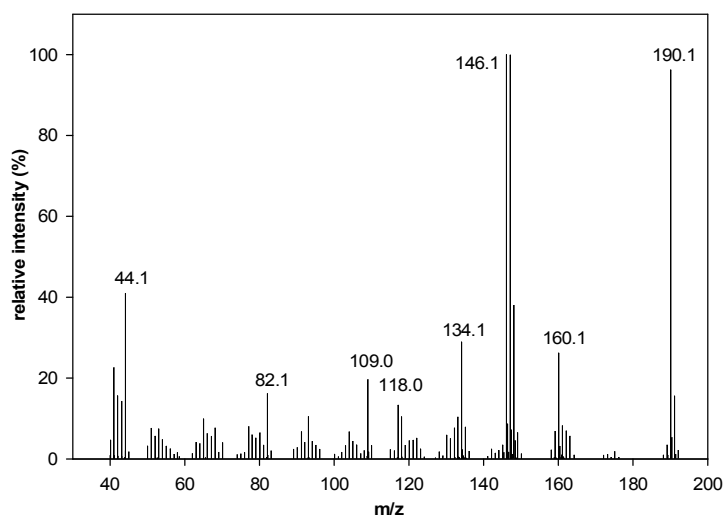
Rozpuścić *N*-BOC-cytyzynę w 20 ml H₂O w kolbie okrągłodennej. Dodać 5.5 ml TFA a następnie 5.5 ml 1M HCl. Ogrzewać pod chłodnicą zwrotną przez 30 min. Po tym czasie sprawdzić wynik reakcji za pomocą TLC.

Jeśli *N*-BOC-cytyzyna całkowicie przereaguje ochłodzić roztwór do temperatury pokojowej, a następnie ostrożnie zalkalizować do pH~14 za pomocą KOH i w rozdzielniku rozdzielić frakcję organiczną od nieorganicznej. Frakcję wodną ekstrahować CH₂Cl₂ aż do zaniku alkaloidów w roztworze (do zaniku reakcji barwnej z odczynnikami Dragendorffa). Ekstrakty połączyć i osuszyć nad bezwodnym MgSO₄, następnie środek suszący odsączyć i przesącz przenieść do wytarowanej kolby. Rozpuszczalnik odparować na wyparce pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymuje się biało-żółte kryształki cytyzyny z wydajnością 94%.

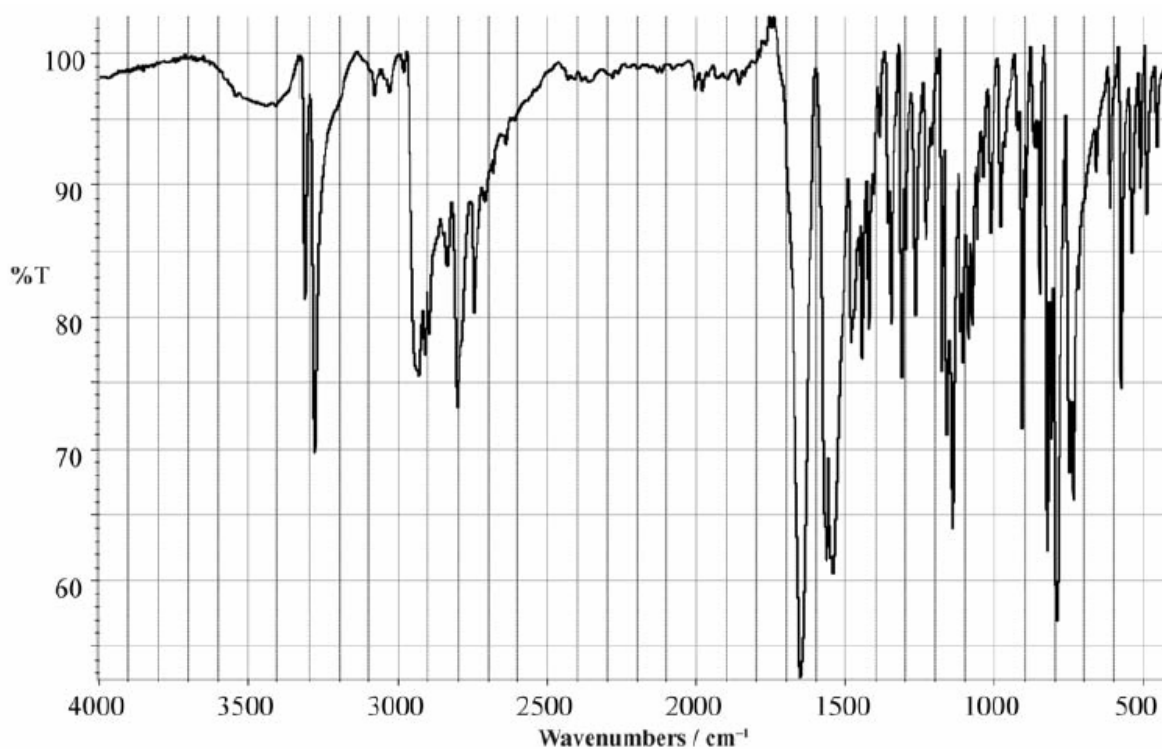
Analiza TLC. Eluent: CH₂Cl₂-MeOH-NH₄OH 10:1:0.1

(-)-Cytyzynę krystalizuje się z mieszaniny chlorku metylenu z dodatkiem eteru naftowego (1:1 v/v). Wypadają jasnożółte kryształy (t.t. 153°C). C₁₄H₁₈N₂O, masa cząsteczkowa 190 g/mol.

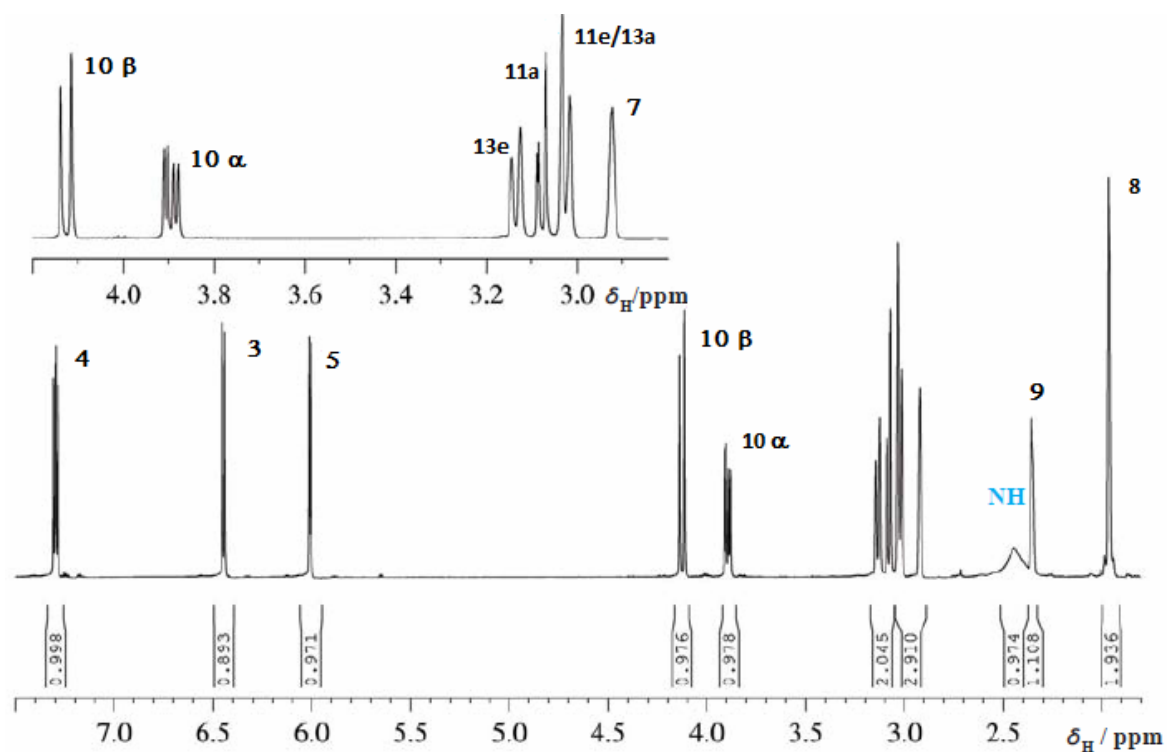
MS m/z (%): 190 (M⁺, 96), 160 (26), 147 (99), 146 (100), 134 (28), 44 (40).



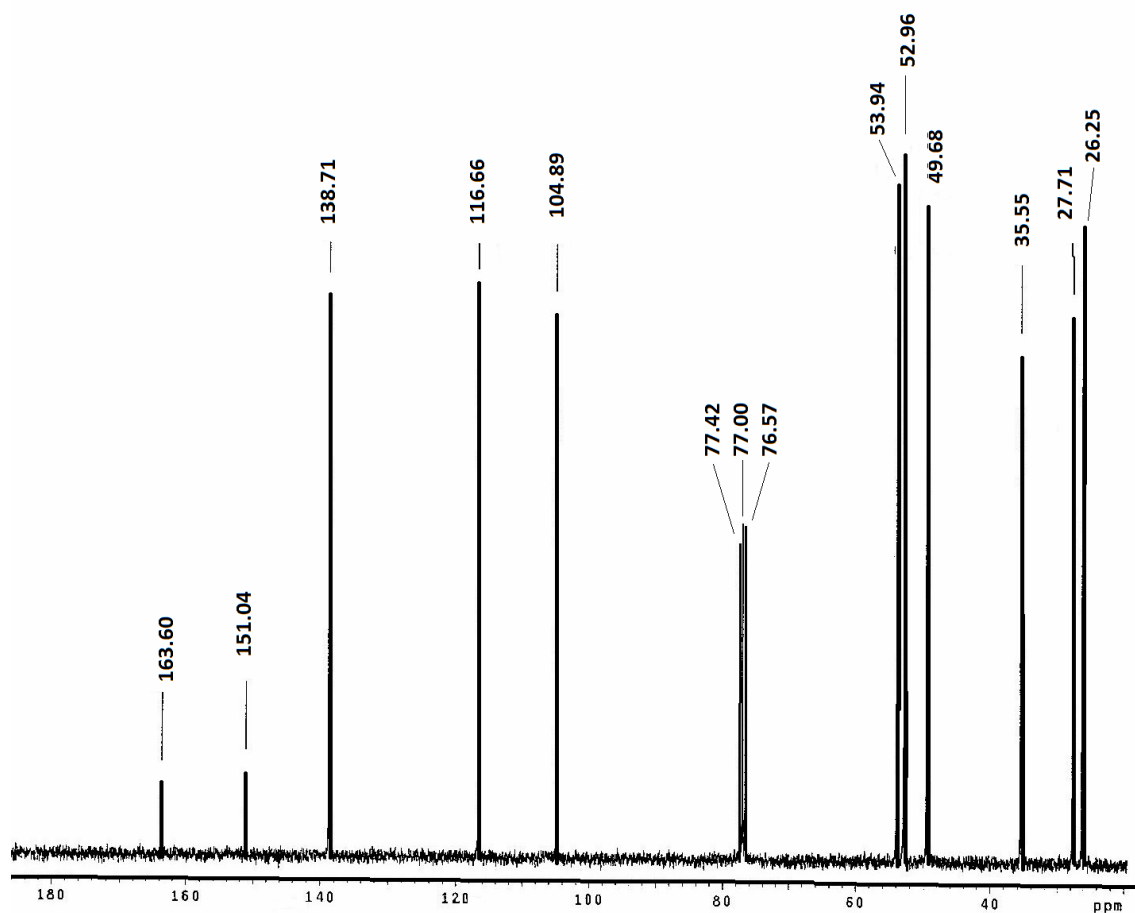
IR w KBr: pasmo przy 1649 cm⁻¹ odpowiadające absorpcji grupy karbonylowej (>C=O), pasmo przy 3438 cm⁻¹ – absorpcja grupy -NH i pasmo przy 1140 cm⁻¹ absorpcja grupy -CN.



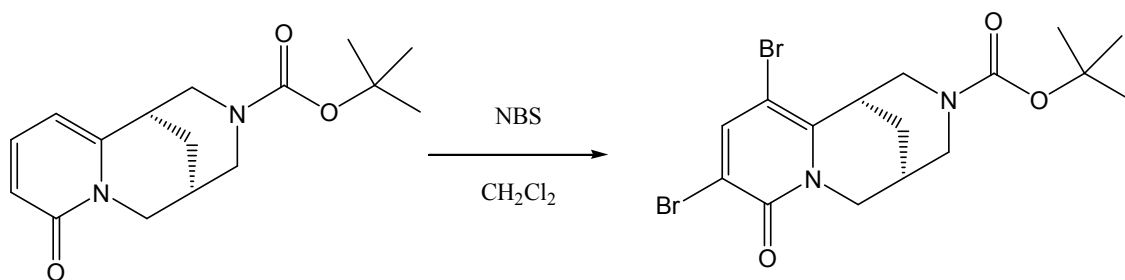
$^1\text{H-NMR}$ w CDCl_3 (700 MHz):



$^{13}\text{C-NMR}$ w CDCl_3 (500 MHz). Przypisz sygnały poszczególnym atomom węgla:



3.3.2.3. Otrzymywanie 3,5-dibromo-*N*-BOC-cytyzyny



<i>N</i> -BOC-cytyzyna	0.58 g (2 mmol)
NBS	0.712 g (4 mmol, 2 equiv)
CH ₂ Cl ₂	30 ml

Rozpuścić *N*-BOC-cytyzynę w chlorku metylenu i stopniowo dodawać NBS (dwukrotny nadmiar molowy). Całość utrzymywać w temperaturze 60°C i mieszać na mieszadle magnetycznym pod chłodnicą zwrotną przez 2 godziny. Po tym czasie zbadać przebieg reakcji chemicznej za pomocą TLC. Jeśli nie stwierdzono obecności substratu, pozostawić roztwór do ostygnięcia, a następnie rozpuszczalnik odparować na wyparce obrotowej pod zmniejszonym ciśnieniem.

Otrzymany olej rozpuścić w roztworze 10% Na₂CO₃ i ekstrahować CH₂Cl₂. Roztwór organiczny osuszyć nad bezwodnym MgSO₄ i usunąć rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem.

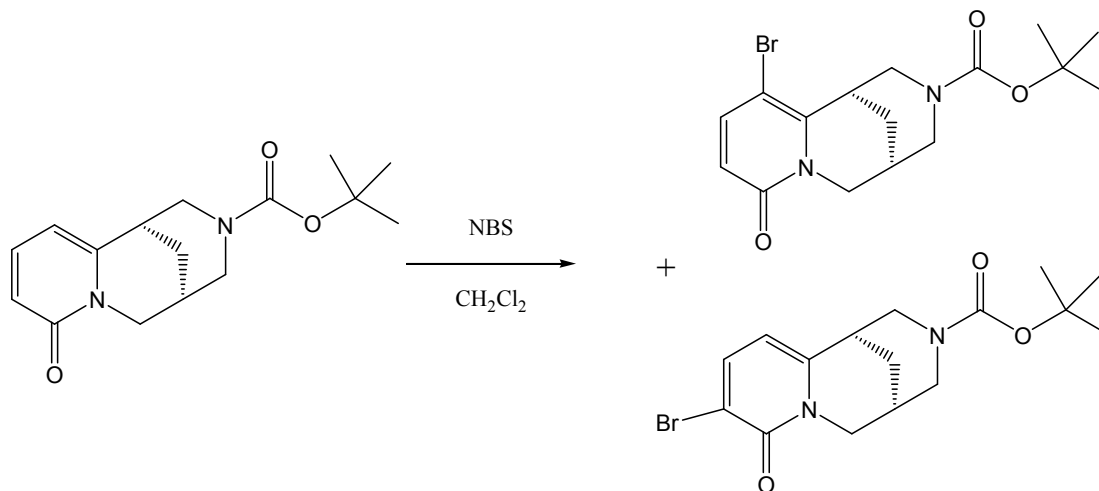
Surowy produkt oczyścić na kolumnie chromatograficznej z Al₂O₃ przemywając kolejno eterem naftowym, eterem dietylowym i chlorkiem metylenu. Roztwory porównać za pomocą analizy TLC, połączyć te zawierające produkt i odparować na wyparce. Otrzymuje się 376 mg oleju z wydajnością 42%.

Analiza TLC. Eluent: CH₂Cl₂-MeOH-NH₄OH 10:1:0.1

¹³C-NMR (CDCl₃, 300 MHz):

δ (ppm): 158.6; 154.2; 145.5; 143.8; 113.2; 98.3; 80.7; 51.4; 48.9; 47.9; 34.2; 28.0; 27.3; 26.2.

3.3.2.4. Otrzymywanie 3-bromo-*N*-BOC-cytyzyny i 5-bromo-*N*-BOC-cytyzyny



<i>N</i> -BOC-cytyzyna	0.58 g (2 mmol)
<i>N</i> -bromoimid kwasu bursztynowego (NBS)	0.356 g (2 mmol, 1 equiv)
CH ₂ Cl ₂	30 ml

N-BOC-cytyzynę (0.58 g, 2 mmol) i NBS (356 mg, 2 mmol) mieszać w 30 ml CH₂Cl₂ w temperaturze 60°C przez 2 godziny. Po tym czasie sprawdzić wynik reakcji za pomocą TLC. Jeśli nie stwierdzono obecności substratu, ochłodzić roztwór do temperatury pokojowej, a następnie rozpuszczalnik odparować na wyparce obrotowej pod zmniejszonym ciśnieniem.

Olej rozpuścić w roztworze 10% Na₂CO₃ i ekstrahować CH₂Cl₂. Roztwór organiczny osuszyć nad bezwodnym MgSO₄ i rozpuszczalnik odparować na wyparce obrotowej pod zmniejszonym ciśnieniem.

Otrzymaną mieszaninę oczyścić na kolumnie chromatograficznej z tlenkiem glinu, wymywając najpierw mieszaniną eter dietylowy:CH₂Cl₂, a następnie CH₂Cl₂. Rozdział dwóch izomerów 3-bromo- i 5-bromo-*N*-BOC-cytyzyny przeprowadzić na kolumnie chromatograficznej z SiO₂, eluent: chlorek metylenu/MeOH (10:1).

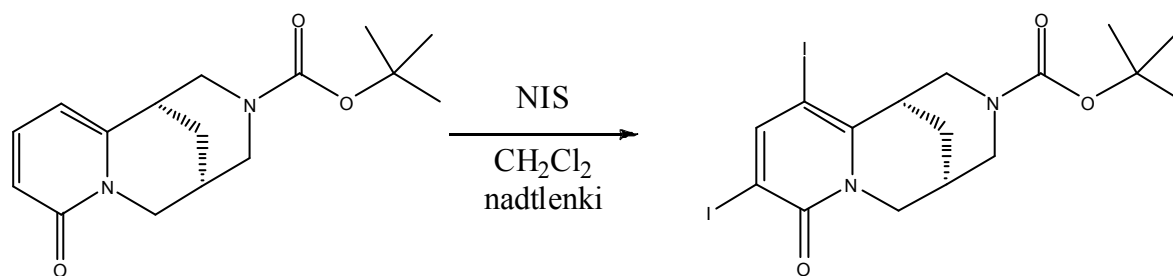
Otrzymuje się dwa izomery: 3-Br-*N*-BOC-cytyzynę i 5-Br-*N*-BOC-cytyzynę, odpowiednio, w stosunku 52% : 28%.

¹³C-NMR 3-Br-*N*-BOC-cytyzyny (CDCl₃, 300 MHz)

δ (ppm): 159.4; 154.4; 148.5; 140.8; 112.5; 105.7; 80.6; 51.4; 50.2; 49.2; 34.7; 28.0; 27.4; 26.0.

¹³C-NMR 5-Br-*N*-BOC-cytyzyny (CDCl₃, 300 MHz)

δ (ppm): 162.3; 154.4; 145.9; 142.4; 118.2; 99.3; 80.5; 50.2; 48.9; 47.2; 34.2; 28.0; 27.4; 26.3.

3.3.2.5. Otrzymywanie 3,5-dijodo-*N*-BOC-cytyzyny

<i>N</i> -BOC-cytyzyna	0.58 g (2 mmol, 1 equiv)
<i>N</i> -jodoimid kwasu bursztynowego (NIS)	(4 mmol, 2 equiv)
nadtlenek benzoilu	1 mg
CH ₂ Cl ₂	30 ml

Kolbę owinać folią aluminiową, aby odciąć dopływ światła. Rozpuścić *N*-BOC-cytyzynę w chlorku metylenu i dodać NIS (w stosunku molowym 1:2) oraz nadtlenek benzoilu (1 mg). Całość utrzymywać w temperaturze 60°C i mieszać na mieszadło magnetycznym pod chłodnicą zwrotną przez 2 godziny. Po tym czasie przeanalizować przebieg reakcji chemicznej za pomocą TLC. Jeśli nie stwierdzono obecności substratu, ochłodzić roztwór do temperatury pokojowej, a następnie rozpuszczalnik odparować na wyparce obrotowej pod zmniejszonym ciśnieniem.

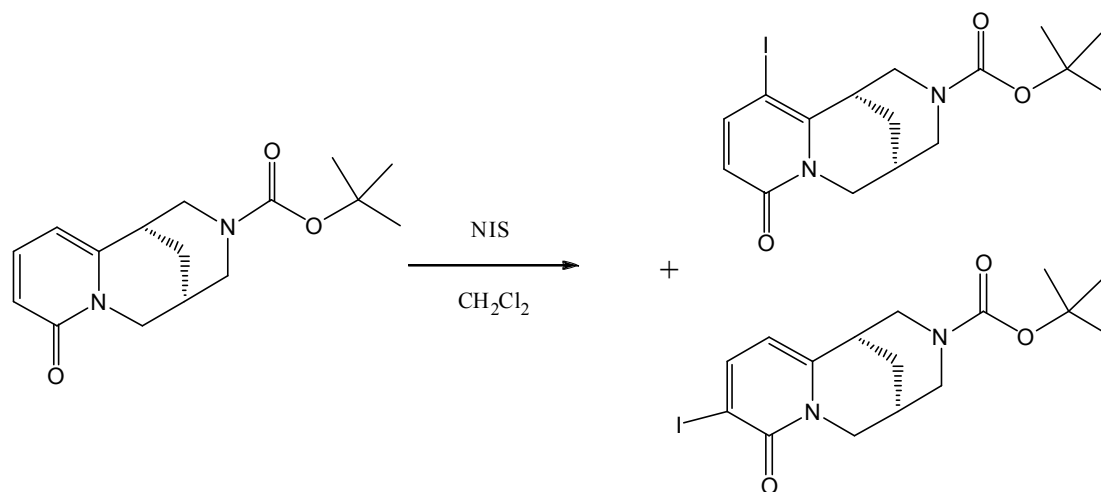
Olej rozpuścić w roztworze 10% Na₂CO₃ i ekstrahować CH₂Cl₂. Roztwór organiczny osuszyć nad bezwodnym MgSO₄ i rozpuszczalnik odparować na wyparce obrotowej pod zmniejszonym ciśnieniem.

Surowy produkt oczyścić na kolumnie chromatograficznej z Al₂O₃, przemywając kolejno eterem naftowym, eterem dietylowym i chlorkiem metylenu. Roztwory porównać za pomocą analizy TLC, połączyć te zawierające produkt i odparować rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem. Produkt otrzymuje się z wydajnością 72%.

Analiza TLC. Eluent: CH₂Cl₂-MeOH-NH₄OH 10:1:0.1

¹³C-NMR (CDCl₃, 300 MHz)

δ (ppm): 158.6; 154.2; 145.5; 143.8; 113.2; 98.3; 80.7; 51.4; 48.9; 47.9; 34.2; 28.0; 27.3; 26.2.

3.3.2.6. Otrzymywanie 3-jodo-*N*-BOC-cytyzyny i 5-jodo-*N*-BOC-cytyzyny

<i>N</i> -BOC-cytyzyna	0.58 g (2 mmol)
<i>N</i> -jodoimid kwasu bursztynowego (NIS)	(2 mmol, 1 equiv)
CH ₂ Cl ₂	30 ml

N-BOC-cytyzynę (0.58 g, 2 mmol) i NIS (2 mmol, 1 equiv) mieszać w 30 ml CH₂Cl₂ w temperaturze 60°C przez 1-2 godziny. Po tym czasie sprawdzić wynik reakcji za pomocą TLC. Jeśli *N*-BOC-cytyzyna całkowicie przereaguje, ochłodzić roztwór do temperatury pokojowej, a następnie odparować na wyparce pod zmniejszonym ciśnieniem.

Olej rozpuścić w roztworze 10% Na₂CO₃ i ekstrahować CH₂Cl₂. Roztwór organiczny osuszyć nad bezwodnym MgSO₄ i rozpuszczalnik odparować na wyparce obrotowej pod zmniejszonym ciśnieniem.

Otrzymaną mieszaninę oczyścić na kolumnie chromatograficznej z tlenkiem glinu, wymywając najpierw mieszaniną eter dietylowy:CH₂Cl₂ (1:1), a następnie CH₂Cl₂.

Otrzymuje się dwa izomery: 3-*I*-*N*-BOC-cytyzynę i 5-*I*-*N*-BOC-cytyzynę, odpowiednio, w stosunku 2:1.

Analiza TLC. Eluent: CH₂Cl₂-MeOH-NH₄OH 10:1:0.1

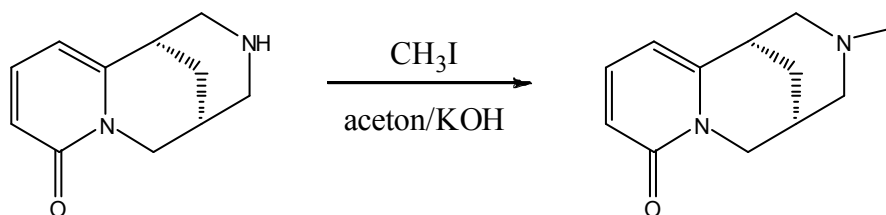
¹³C-NMR 3-*I*-*N*-BOC-cytyzyny (CDCl₃, 300 MHz)

δ (ppm): 159.4; 154.4; 148.5; 140.8; 112.5; 105.7; 80.6; 51.4; 50.2; 49.2; 34.7; 28.0; 27.4; 26.0.

¹³C-NMR 5-*I*-*N*-BOC-cytyzyny (CDCl₃, 300 MHz)

δ (ppm): 162.3; 154.4; 145.9; 142.4; 118.2; 99.3; 80.5; 50.2; 48.9; 47.2; 34.2; 28.0; 27.4; 26.3.

3.3.2.7. Synteza *N*-metylocytyzyny (metoda I)



cytyzyna	0.38 g (2 mmol)
CH ₃ I	0.25 ml (4 mmol)
aceton	16 ml
KOH	1 pastylka

Cytyzynę rozpuścić w acetonie, dodać KOH i wolno wkraplać jodek metylu, cały czas mieszając. Mieszaninę ogrzewać przez 3 godz. do wrzenia pod chłodnicą zwrotną, kontrolując przebieg reakcji za pomocą TLC. Jeśli po 2 godzinach substrat nie przereaguje całkowicie wkropić dodatkowo 2 mmol CH₃I i kontynuować ogrzewanie.

Po zakończeniu reakcji odparować aceton oraz nadmiar jodku metylu pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymany osad rozpuścić w wodzie i zalkalizować Na₂CO₃, następnie produkt ekstrahować CH₂Cl₂, aż do zaniku reakcji barwnej z odczynnikiem Dragendorffa.

N-Metylocytyzynę krystalizować z mieszaniny CH₂Cl₂ : eter naftowy, 4:1.

T.t. 135-136 °C

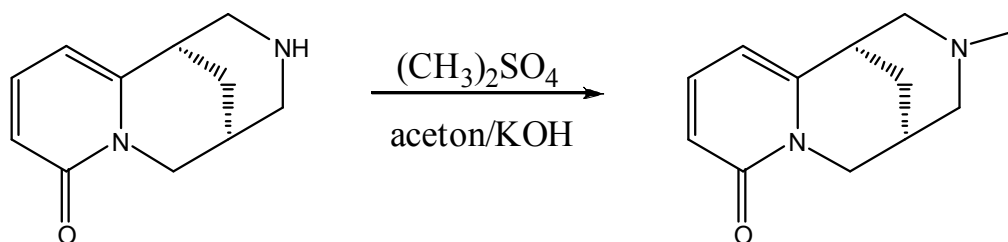
Analiza TLC. Eluent: CH₂Cl₂-MeOH-NH₄OH 10:1:0.1

MS m/z (%): 204 (M⁺); 146 (12); 118 (6), 117 (8), 58 (100).

¹³C-NMR (CDCl₃, 300 MHz)

δ (ppm): 163.48; 151.30; 138.47; 116.51; 104.57; 62.46; 62.13; 49.97; 46.16; 35.44; 35.44; 27.96; 25.42.

3.3.2.8. Synteza *N*-metylocytyzyny (metoda II)



cytyzyna 0.38 g (2 mmol)

$(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$ 4 mmol

10% KOH 10 ml

CH_2Cl_2

W dwuszyjnej kolbie o poj. 50 ml, wyposażonej w chłodnicę zwrotną, rozpuszcza się cytyzynę w wodzie i dodaje 10 ml 10% roztworu wodorotlenku potasu. Do tej mieszaniny wkropić siarczanu dimetylu (UWAGA!!! Związek silnie trujący! Praca w rękawicach ochronnych i pod wyciągiem). Mieszaninę miesza się przez 20 minut w temperaturze pokojowej, kontrolując przebieg reakcji za pomocą TLC. Jeśli po tym czasie substrat nie przereaguje mieszaninę ogrzewa się przez 30 min do wrzenia.

Po zakończeniu reakcji i ochłodzeniu dodaje się 20 ml chlorku metylenu i miesza ok. 10 min i przelewa do rozdzielacza. Zaalkalizowany roztwór wodny ekstrahuje się CH_2Cl_2 , aż do zaniku reakcji barwnej z odczynnikiem Dragendorffa.

Otrzymane frakcje łączy się w Erlenmayerce i suszy nad bezwodnym siarczanem magnezu. Roztwór odsączony od środka suszącego zateńczyć na wyparce obrotowej pod zmniejszonym ciśnieniem.

Obliczyć wydajność. Krystalizować z mieszaniny CH_2Cl_2 :eter naftowy, 4:1.

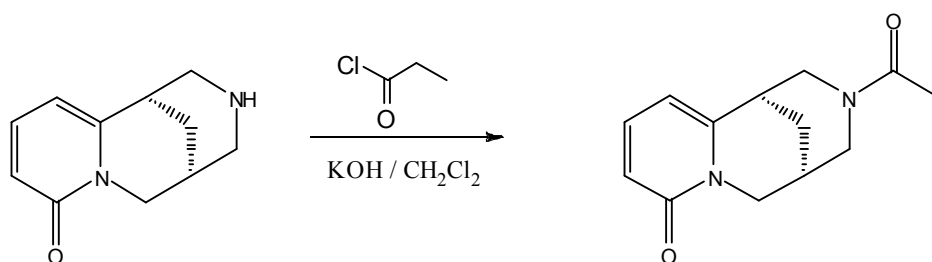
T.t. 135-136 °C

Analiza TLC. Eluent: CH_2Cl_2 -MeOH- NH_4OH 10:1:0.1

MS m/z (%): 204 (M^+); 146 (12); 118 (6), 117 (8), 58 (100).

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 300 MHz)

δ (ppm): 163.48; 151.30; 138.47; 116.51; 104.57; 62.46; 62.13; 49.97; 46.16; 35.44; 35.44; 27.96; 25.42.

3.3.2.9. Synteza *N*-propionocytyzyny

cytyzyna	1.90 g (0,01 mol)
chlerek propionylu	1.11 g (0.012 mol, d = 1.06g/cm ³)
KOH	1 pastylka
CH ₂ Cl ₂	20 ml
MeOH	1 ml

W kolbie rozpuścić 1.90 g (10 mmol) cytyzyny w 20 ml CH₂Cl₂ i mieszać na mieszadle magnetycznym. Do roztworu dodać 1 ml MeOH oraz 1 pastylkę KOH. Ochłodzić mieszaninę reakcyjną do temperatury 0°C i wdrożyć 12 mmol chlorku propionylu. Reakcja zachodzi w ciągu 12 godzin (kontrola TLC). Odparować rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem i pozostałość zadać wodą. Sprawdzić czy roztwór ma odczyn alkaliczny i ekstrahować produkt CH₂Cl₂. Ekstrakt osuszyć nad bezwodnym MgSO₄ i odsączyć środek suszący. Rozpuszczalnik odparować pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymany olej oczyścić na kolumnie chromatograficznej z tlenkiem glinu, wymywając kolejno następującymi eluentami: eterem dietylowym (400 ml), CH₂Cl₂ (350 ml) oraz MeOH (200 ml), aż do zaniku reakcji barwnej z odczynnikiem Dragendorffa .

Otrzymuje się *N*-propionocytyzynę (C₁₄H₁₈N₂O₂, m.cz. 246 g/mol) w postaci białego osadu (2 g) o temperaturze topnienia: 140°C.

Analiza TLC. Eluent: CH₂Cl₂-MeOH-NH₄OH 10:1:0.1

MS m/z (%): 246 (M⁺, 58), 190 (30), 148 (24), 147 (100), 146 (71), 82 (23%).

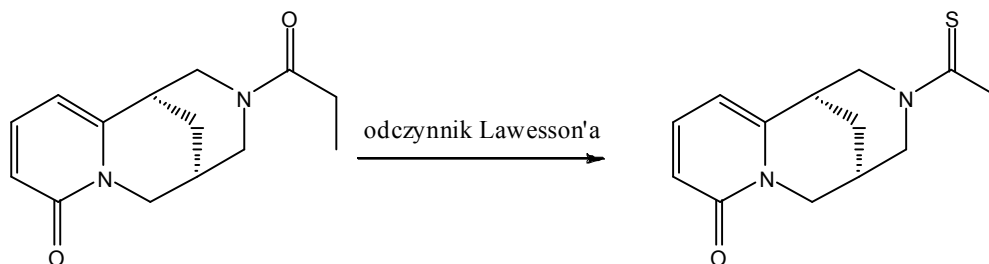
IR: pasmo przy 1624 cm⁻¹, odpowiadające absorpcji grupy amidowej z pierścienia C oraz pasmo przy 1647 cm⁻¹, odpowiadające absorpcji grupy amidowej z pierścienia A.

¹³C NMR (CDCl₃, 300 MHz)

δ (ppm): 173.1; 173.1; 163.4; 163.2; 148.6; 148.5; 138.6; 138.4; 117.7; 117.2; 105.9; 104.9; 52.7; 51.5; 48.9; 48.6; 47.6 (2 at. C); 34.9; 34.3; 27.5; 27.3; 26.2; 26.1; 26.0; 25.8; 9.12; 9.11.

¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz)

δ (ppm): 7.29, 7.28, 6.45, 6.43, 6.07, 6.06, 4.70, 4.68, 4.08, 3.99, 3.90, 3.88, 3.86, 3.83, 3.38, 3.35, 3.32, 3.08, 2.81, 2.79, 2.30, 2.28, 2.05, 2.01, 1.87 – 1.99, 0.90, 0.87.

3.3.2.10. Synteza *N*-tiopropionocytyzyny

<i>N</i> -propionocytyzyna	50 mg (0.2 mmol)
odczynnik Lawesson'a	0.8 g (0.2 mmol)
toluen	2 mL
piasek	

W kolbie okrągłodennej umieścić 50 mg (0.2 mmol) *N*-propionocytyzyny, 0.8 g (0.2 mmol) odczynnika Lawesson'a oraz 2 ml toluenu, a następnie poddać ją działaniu promieni mikrofalowych (850W) przez 21 minut (7 razy po 3 minuty). Całość wymieszać z 30 ml chloroformu i nanieść na kolumnę z tlenkiem glinu. Kolumnę wmywać kolejno: eterem naftowym (300 ml), eterem dietylowym (300 ml), chlorkiem metylenu (350 ml) oraz metanolem (200 ml). W celu dokładnego oczyszczenia związku, do frakcji metanolowej dodać piasku i odparować do sucha. Taką mieszaninę nanieść na kolumnę z SiO₂ i wmywać chlorkiem metylenu (300 ml). *N*-Tiopropionocytyzyna nie daje reakcji barwnej z odczynnikami Dragendorffa, stąd konieczność sprawdzania zawartości alkaloidu w roztworze w świetle UV (nanieść kroplę na fragment płytki TLC i włożyć pod lampę UV i odczytać wynik). Otrzymuje się *N*-tiopropionocytyzynę w postaci żółtego osadu (14 mg – 27% wydajności). C₁₄H₁₈N₂OS, m.cz. 262 g/mol. T.t. 216°C

Analiza TLC. Eluent: CH₂Cl₂-MeOH-NH₄OH 10:1:0.1

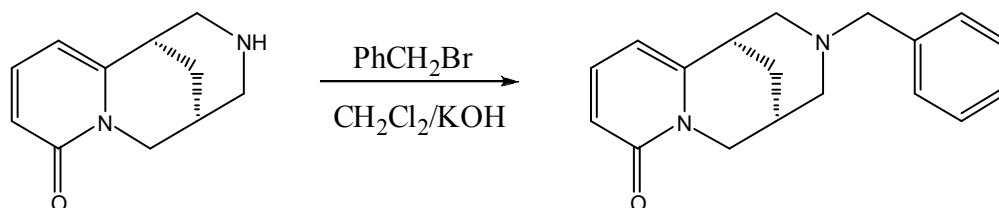
MS m/z (%): 263 (M+1, 21), 262 (M⁺, 100), 221 (19), 189 (30), 146 (28), , 73 (18).

¹³C NMR (CDCl₃, 300 MHz)

δ (ppm): 207.7; 163.2; 163.1; 147.4; 147.0; 139.0; 138.3; 118.5; 117.8; 106.3; 104.9; 55.7; 55.5; 55.0; 54.6; 48.9; 48.3; 36.7; 36.5; 35.5; 35.1; 28.6; 28.4; 26.1; 13.6; 13.20; 9.19.

¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz)

δ (ppm): 7.26, 6.16, 6.13, 4.26, 3.93, 3.82, 3.28, 3.16, 2.80, 2.73, 2.12, 2.06, 2.02, 1.65, 0.97.

3.3.2.11. Synteza *N*-benzylocytyzyny

cytyzyna	0.38 g (2 mmol, 1 equiv)
bromek benzylu	0.357 g (2.1 mmol, $d=1.43 \text{ g/cm}^3$)
10% KOH w MeOH	1 ml
CH_2Cl_2	10 ml

W kolbie na mieszadle magnetycznym rozpuścić cytyzynę w 10 ml chlorku metylenu i dodać 10% KOH w metanolu (1 ml). Ochłodzić mieszaninę reakcyjną do temperatury 0°C i wkropić bromek benzylu. Następnie stopniowo podnieść temperaturę mieszaniny reakcyjnej i po 20 minutach ogrzewać do wrzenia. Reakcja zachodzi przez 1-2 godzin (kontrola TLC). Następnie odparować roztwór pod zmniejszonym ciśnieniem, a zawartość kolby reakcyjnej rozpuścić w wodzie. Zaalkalizować KOH do $\text{pH}\sim 14$. Ekstrahować produktem chlorkiem metylenu. Osuszyć ekstrakt nad bezwodnym siarczanem magnezu i odsączyć środek suszący. Przesączyć odparować pod zmniejszonym ciśnieniem.

N-Benzylocytyzyna krystalizuje w postaci kremowych kryształów, t. t.: 133°C

$\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}$, m.cz. 280 g/mol

Analiza TLC. Eluent: CH_2Cl_2 -MeOH- NH_4OH 10:1:0.1

MS m/z (%): 280 (M^+ , 47), 147 (13), 146 (39), 134 (89), 91 (100), 65 (15).

^{13}C NMR (CDCl_3 300 MHz)

δ (ppm): 163.59, 151.37, 138.52, 128.19, 126.89, 116.53, 104.59, 77.42, 77.00, 76.57, 61.97, 60.00, 59.94, 49.94, 49.94, 35.48, 28.10, 25.92.

^1H NMR (CDCl_3 300 MHz)

δ (ppm): 7.38 – 7.28, 6.49 – 5.92, 5.90, 4.26, 4.08, 3.87 – 3.73, 2.93 – 2.83, 2.43 – 2.30, 1.92 – 1.77, 0.86.

3.3.3. Literatura

- Bhat S. V., Nagsampagi B. A., Sivakumar M., "Chemistry of Natural Products", Springer, **2005**, 237-315.
- Dewick P. M., "Medicinal Natural Products: a Biosynthetic approach", Wiley, 2nd ed., **2002**, 291-398.
- Berger S., Sicker D., "Classics in Spectroscopy. Isolation and structure elucidation of natural products", Wiley-VCH, 2009, 65-82.
- Przybył A. K., Prukała W., Kikut-Ligaj D., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2007**, *21*, 1409-1413.
- Tutka P., Zatoński W., *Pharmacol. Rep.*, **2005**, *58*, 777-798.
- Houllier N., Gouault S., Lasne M-C., Rouden J., *Tetrahedron*, **2006**, *62*, 11679-11686.
- Imming P., Klaperski P., Stubbs M. T., Seitz G., Gundisch D.; *Eur. J. Med. Chem.* **2001**, *36*, 375-388.
- Marriere E., Rouden J., Tadino V., Lasne M-C., *Org. Lett.*, **2000**, *2*, 1121-1124 with supporting information.
- Rouden J., Ragot A., Gouault S., Cahard D., Plaquevent J.-Ch., Lasne M.-C.; *Tetrahedron: Asymmetry* **2002**, *13*, 1299-1305.
- Dearden M. J., McGrath M. J., O'Brien P., *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 5789-5792.
- Przybył A. K., Kubicki M., *J. Mol. Struct.* **2011**, *985*, 157-166.