

Michaela Novotná

2006



**Mikrobiologický ústav AV ČR
Laboratoř Biotransformací
Praha**



**ZAVEDENÍ DVOJNÉ VAZBY
DO MOLEKULY DIHYDROLYSERGOLU**

ÚVOD

Námelové alkaloidy patří mezi farmakologicky významné přírodní látky. Tyto látky jsou nejčastěji obsaženy v tzv. námelu, což je zvláštní morfologický útvar vytvářený houbou paličkovicí nachovou (*Claviceps purpurea*), která parazituje na žitu. Průmyslově se získávají právě izolací z uměle pěstovaného námele.

V námelu jsou tyto alkaloidy obsaženy nejčastěji ve formě tzv. ergopeptidů (amidy kyseliny lysergové s cyklickým peptidem, tvořeným čtyřmi aminokyselinami).

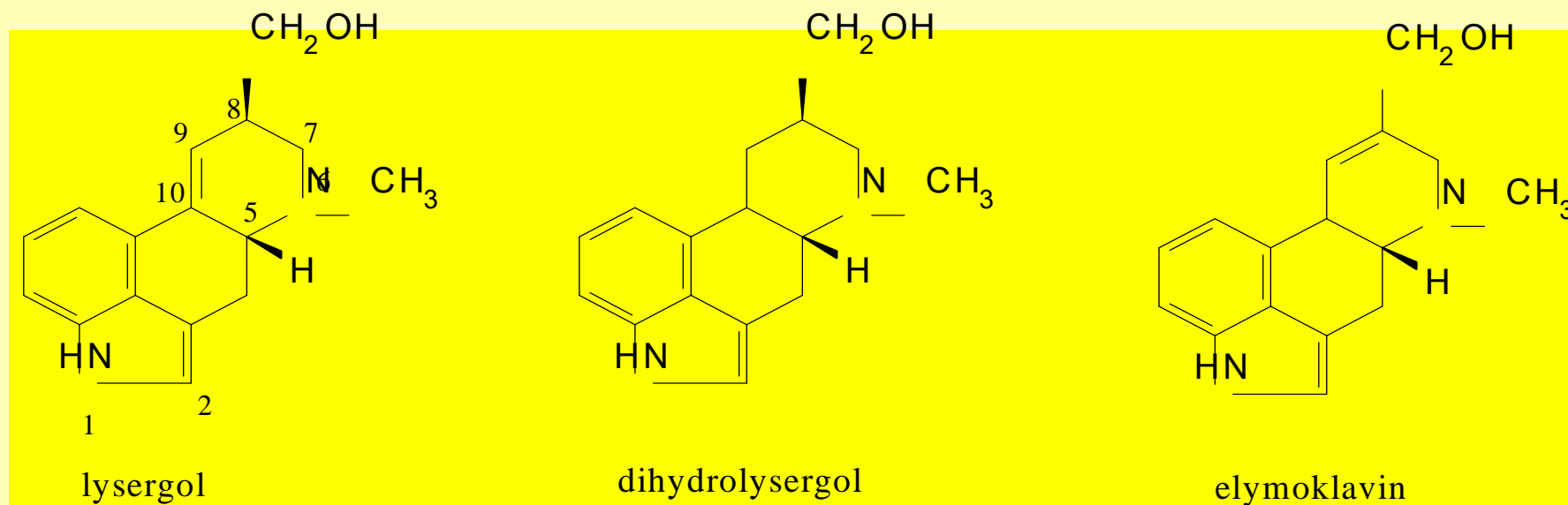


Obilí napadené paličkovicí nachovou a detail sklerocia.

Jiným zdrojem těchto alkaloidů jsou svlačce rodu *Ipomoea* (např. *I. purpurea* - povíjnice nachová), které obsahují hlavně alkoholy námelových alkaloidů, jako např. lysergol, dihydrolysergol a elymoklavin (viz obr. 1), jež se zde vyskytují ve volné formě (nejsou vázány s aminokyselinami).

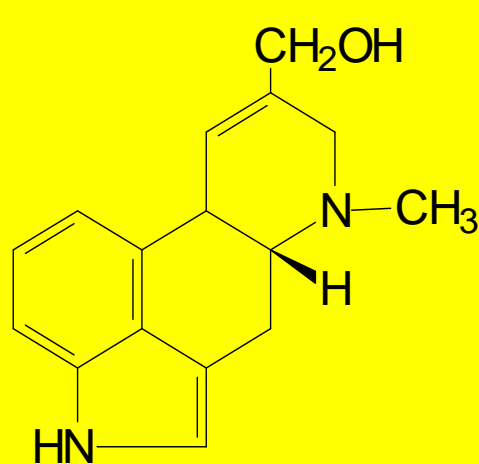


Ipomoea purpurea

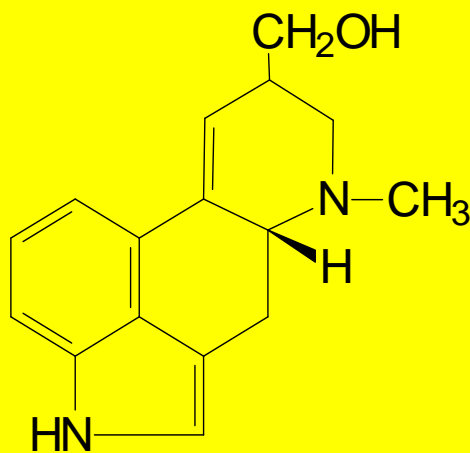


Obr. 1. Námelové alkaloidy obsažené v rostlinách rodu *Ipomoea*

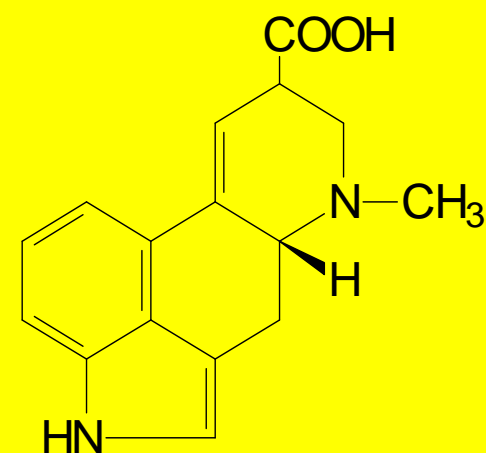
Námelové alkaloidy, vyskytující se v přírodě, mohou obsahovat v kruhu D dvojnou vazbu v poloze 8 (např. elymoklavin) nebo v poloze 9 (lysergol, kyselina lysergová). Doposud však není znám v přírodě se vyskytující námelový alkaloid s dvojnou vazbou v poloze 7.



elymoklavin

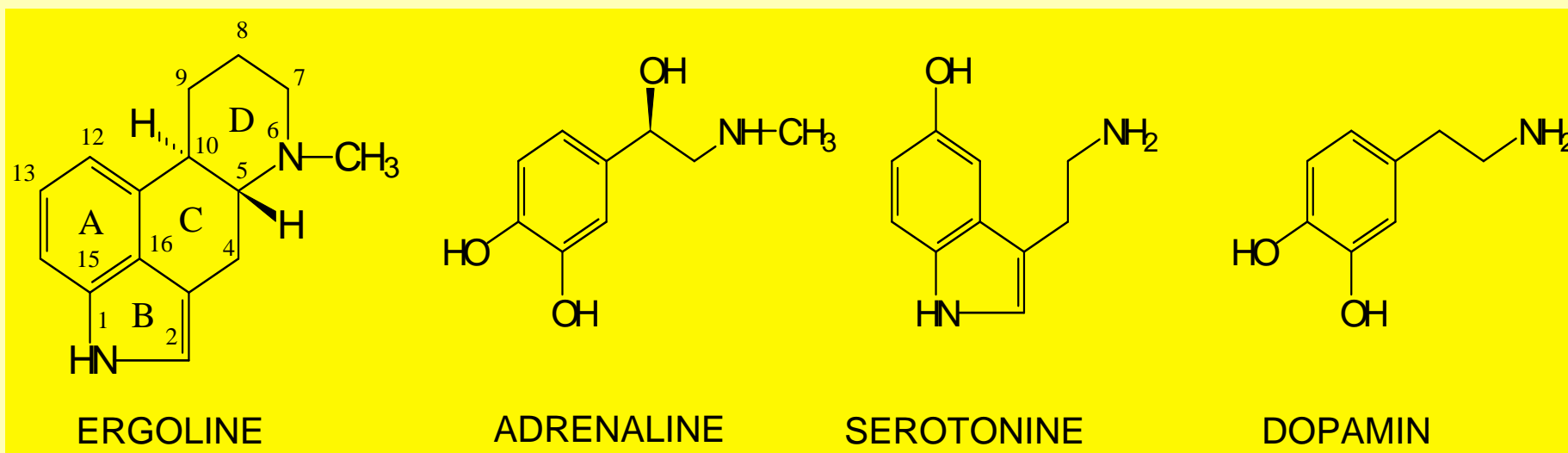


lysergol



kyselina lysergová

Tyto látky patří mezi fyziologicky zajímavé sloučeniny, neboť působí na různé buněčné receptory. Tato skutečnost je vysvětlována přítomností několika strukturních motivů v jejich molekule – lze u nich nalézt např. strukturní analogii s adrenalinem, serotoninem nebo dopaminem (endogenní neurotransmitery, zodpovědné za řízení mnoha fyziologických pochodů, např. reakce na stres, regulace spánku, přenos nervových vzruchů, atd.).



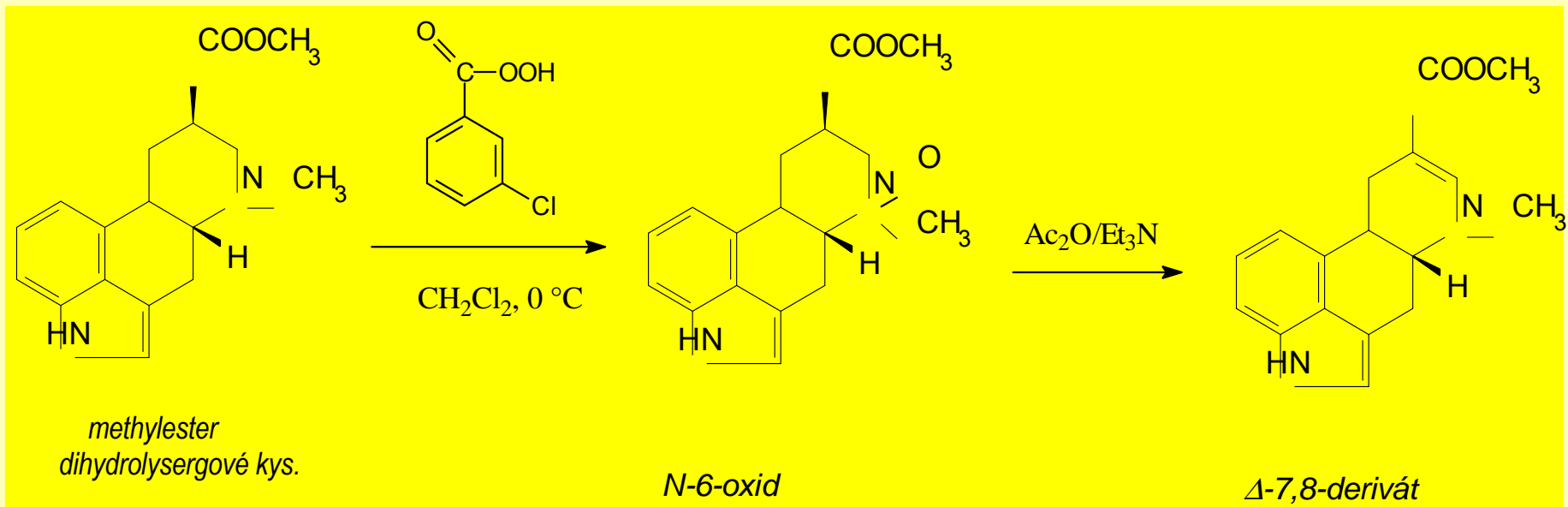
Zavedení dvojné vazby do polohy 7 molekuly dihydrolysergolu, popř. jeho jednoduchého derivátu (aldehydu, esteru), by mohlo pozměnit selektivitu tohoto derivátu k buněčným receptorům, popř. i zlepšit jeho biologickou aktivitu v porovnání s přirozeně se vyskytujícími námelovými alkaloidy.

CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo vyvinout metodiku pro zavedení nové dvojně vazby právě do polohy 7 molekuly dihydrolysergolu.

Schůdnost tohoto úkolu byla prokázána v 1973 (Stütz P., Stadler P.A.

Tetrahedron Lett. 51, 5095, 1973) reakcí naznačenou ve Schématu:

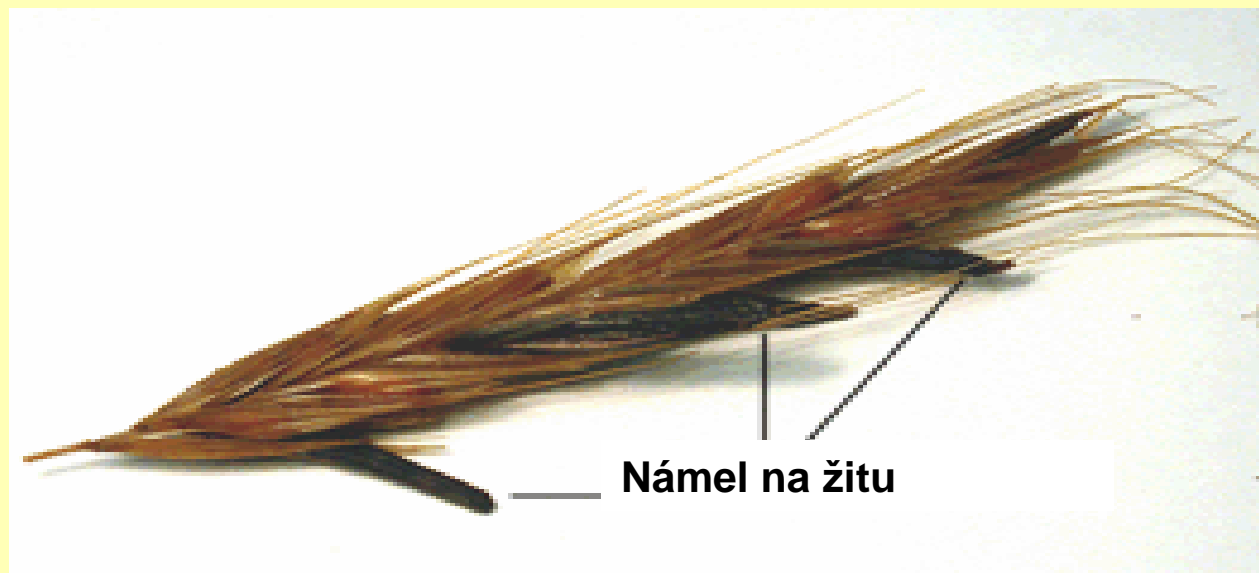


Nicméně, analogické reakce s jinými námelovými alkaloidy byly neúspěšné. Bylo prokázáno (Křen V., Gažák R. – nepublikované výsledky), že tato reakce neprobíhá ani s dihydrolysergolem (Obr. 1), ani s jeho *O*-acetátem.



MOŽNÉ ŘEŠENÍ

Možná cesta, jak zlepšit reaktivitu dihydrolysergolu pro tuto reakci, spočívá v oxidaci jeho primární alkoholické skupiny v poloze 8 na skupinu aldehydickou. Takto se získá sloučenina, která by měla mít podobné chemické vlastnosti jako již dříve publikovaný methylester kyseliny dihydrolysergové (aldehydická skupina má elektronakceptorové vlastnosti, stejně jako skupina esterová).



Problémem aldehydické skupiny v této reakci je však její velká citlivost k oxidaci.

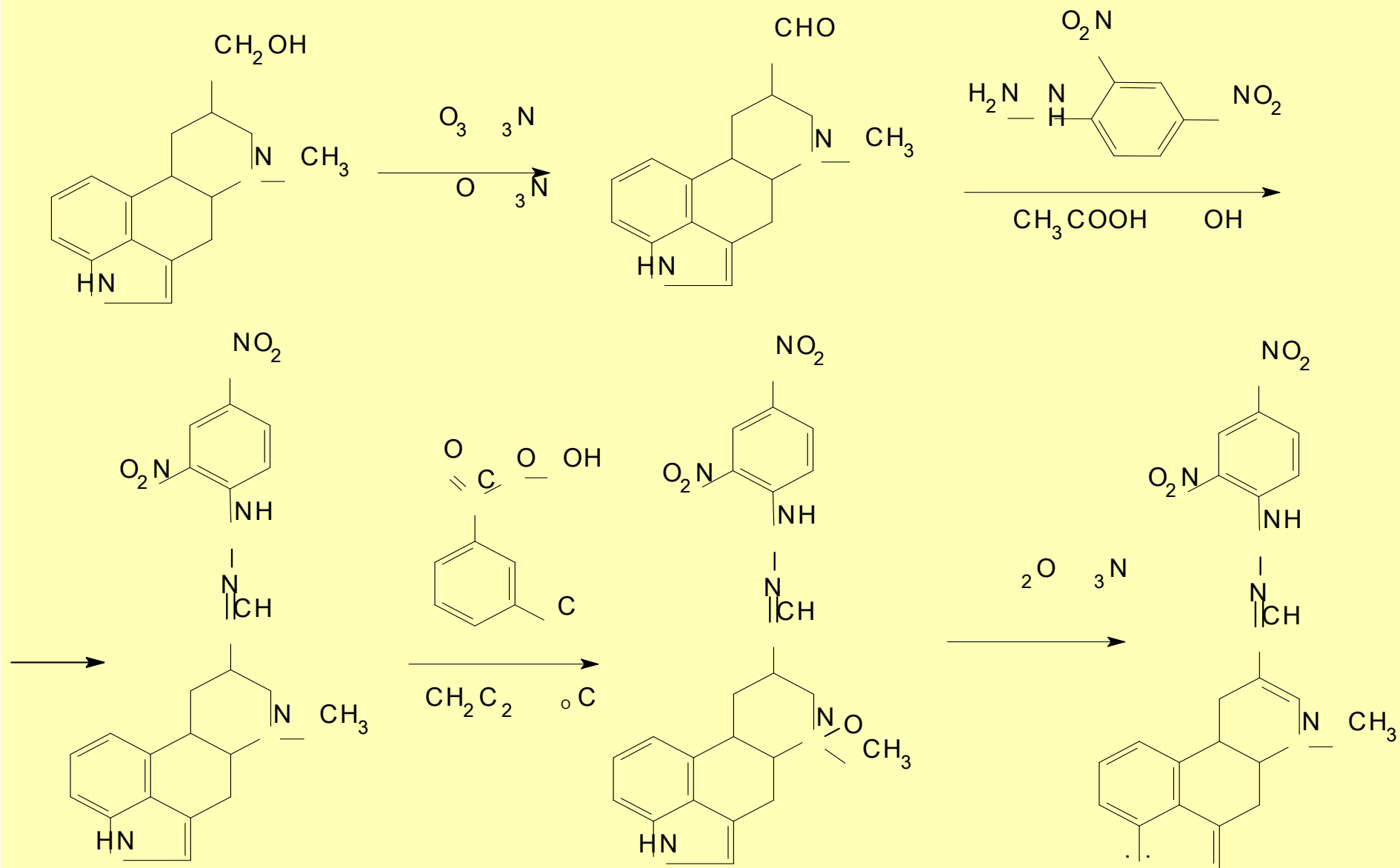
Použitá *m*-chloroperoxybenzoová kyselina by způsobila její nežádoucí oxidaci na skupinu karboxylovou. Je proto nutné aldehydickou skupinu vhodným způsobem chránit proti této nežádoucí oxidaci. To je možno provést tak, že se aldehydická skupina převede na skupinu, která si zachová její elektron-akceptorové vlastnosti, ale nebude již náchylná k oxidaci.



Vhodnou skupinou pro tento účel je např. 2,4-dinitrofenylhydrazon, který byl také použit v této práci. Mezi jeho velké výhody patří hlavně jeho stabilita v kyselém prostředí, stabilita vůči mírné oxidaci a také skutečnost, že látky ve formě 2,4-dinitrofenylhydrazonů velmi snadno krystalizují, což usnadňuje jejich izolaci z reakční směsi.



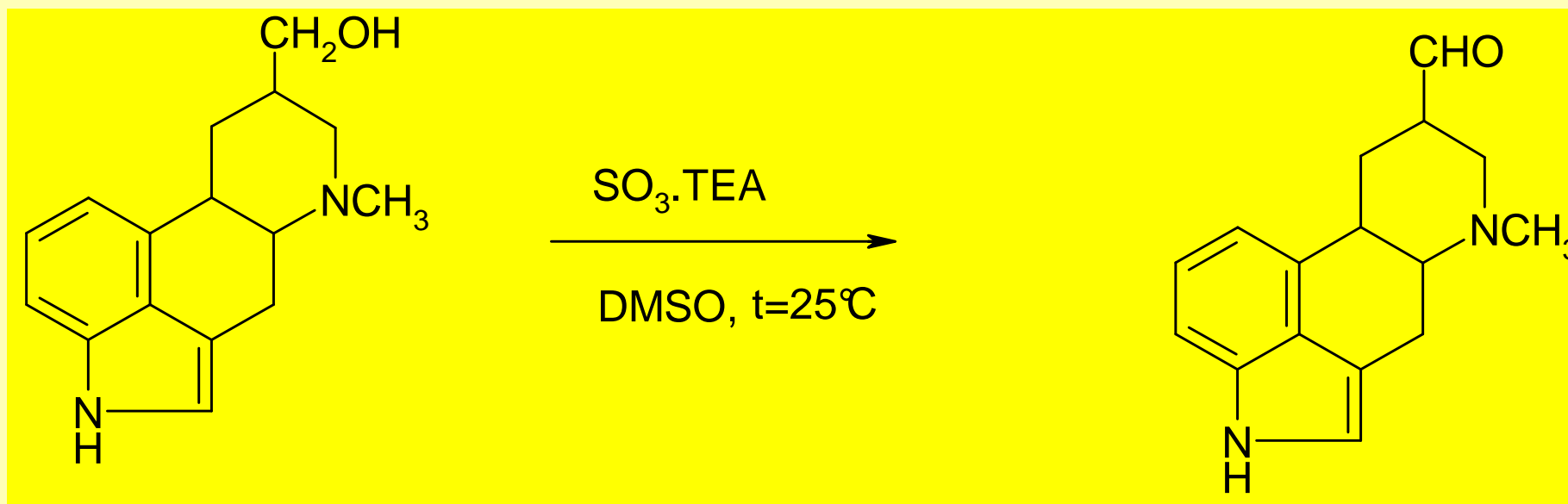
REAKČNÍ SCHÉMA VEDOUcí K DERIVÁTU DIHYDROLYSERGOLU S DVOJNOU VAZBOU V POLOZE 7 (Δ -7,8-derivát)



JEDNOTLIVÉ FÁZE PŘÍPRAVY
2,4-dinitrofenylhydrazonu 6- methyl-8β-formyl-Δ-7,8-ergolinu

1) Oxidace 6-methyl-8β-hydroxymethyl-ergolinu

PRINCIP :



POSTUP:

Dihydrolysergol (1, 95mmol) byl převeden do roztoku DMSO a TEA. K tomuto roztoku byl po kapkách přidáván roztok $\text{SO}_3 \cdot \text{TEA}$ (4, 87mmol) / DMSO. Po 10 min stálého míchání byl roztok převeden do předem ochlazené 10% kyseliny octové, vzniklý roztok se nechal míchat 30 min. Roztok byl neutralizován 5M NaOH do vzniku sraženiny. Sraženina byla odfiltrována a filtrát byl extrahován CH_2Cl_2 . Sraženina na filtru byla promyta vodou a rozpuštěna v CH_2Cl_2 . Spojené extrakty byly promyty nasyceným roztokem NaCl, vysušeny bezvodým Na_2SO_4 a odpařeny na vakuové odparce. Zbytky vody byly odstraněny azeotropní destilací s toluenem.

Dihydrolysergol.....	6-methyl-8 β -hydroxylmethyl-ergolin
TEA.....	triethylamin
MeOH.....	methanol
DMSO.....	dimethylsulfoxid

2. Chromatografie

Byly provedeny 2 následné separace 6-methyl-8- β -formyl-ergolinu s následnými gradienty

1. mobilní fáze: a) $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH} = 95/5/1$
b) $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH} = 90/10/1$

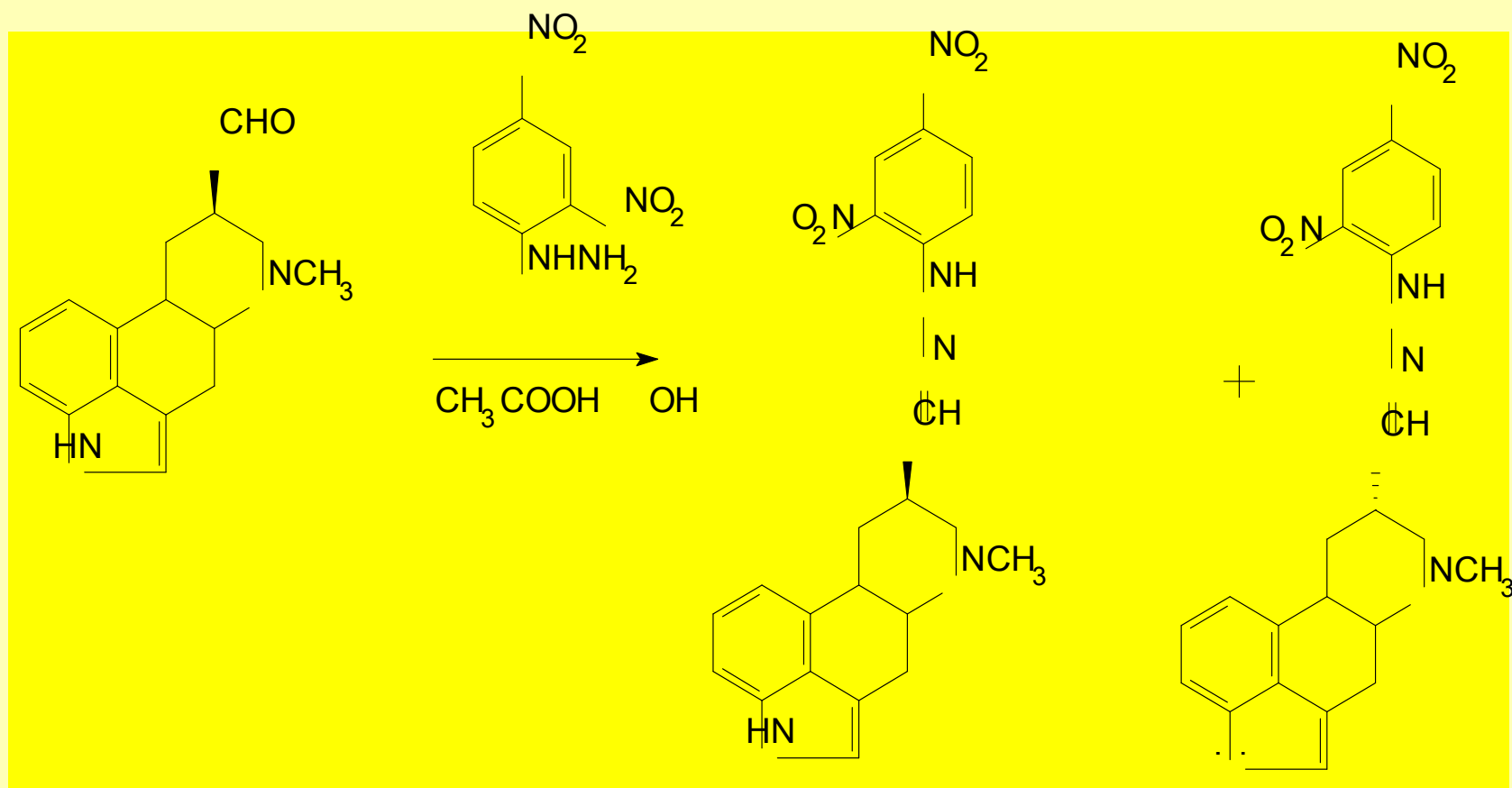
2. mobilní fáze: a) $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{TEA} = 94,5/5/0,5$
b) $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{TEA} = 92/7,5/0,5$

ZÁVĚR:

Po chromatografii byl výtěžek 6-methyl-8 β -formyl-ergolinu 1,38mmol (71%).

2) Příprava hydrazonu (2a) a přečištění vedlejšího produktu hydrazonu (2b)

PRINCIP:



a) POSTUP:

Aldehyd (**1**) (0,786mmol) byl rozpuštěn v ethanolu. Do připraveného roztoku CH_3COOH a EtOH byl předložen 2,4-dinitrofenylhydrazin (1,0 mmol). Roztok aldehydu(**1**) byl převeden do roztoku 2,4 – dinitrofenylhydrazinu a nechán 30 min reagovat za stálého míchání. Vzniklá sraženina byla zfiltrována na fritě. Filtrát byl odpařen a pak následně rozpuštěn v MeOH a v CH_2Cl_2 . Poté byl roztok zahuštěn na vodní lázni a ponechán krystalizovat při laboratorní teplotě pozvolným odpařením těkavějšího rozpouštědla CH_2Cl_2 a následného uvolnění produktu ve formě krystalů hydrazonu (**2a**), jenž byl odfiltrován na fritě.

Chromatografií matečného roztoku byl získán čistý vedlejší produkt hydrazon (**2b**).

ZÁVĚR:

Výtěžek čistého hydrazonu (**2a**) byl 0,15mmol (19%).

Aldehyd (1).....	6-methyl-8 β -formyl-ergolin (dihydrolyserg-8-al)
Hydrazon (2a)	2,4 – dinitrofenylhydrazon dihydrolyserg-8-alu
Hydrazon (2b)	2,4 –dinitrofenylhydrazon iso-dihydrolyserg- 8-alu

Chromatografie:

Mobilní fáze:

CHCl₃ / toluen / MeOH / NH₃ = 85/ 10/ 5/ 0,5

Pro zvýšení polarity byla použita mobilní fáze s následným gradientem:

CHCl₃ / toluen / MeOH / NH₃ = 90/ 5/ 5/ 0,5

b)POSTUP:

Aldehyd (**1**) (0,236mmol) byl rozpuštěn ethanolu. Do připraveného roztoku CH₃COOH a H₂O byl předložen 2,4- dinitrofenylhydrazin (0,708mmol). Aldehyd (**1**) byl převeden do roztoku 2,4 -dinitrofenylhydrazinu a nechán 30 min reagovat za stálého míchání. Po uběhnutí uvedené doby byl roztok převeden za stálého míchání do nasyceného roztoku NaHCO₃. Nevypadly žádné krystaly.

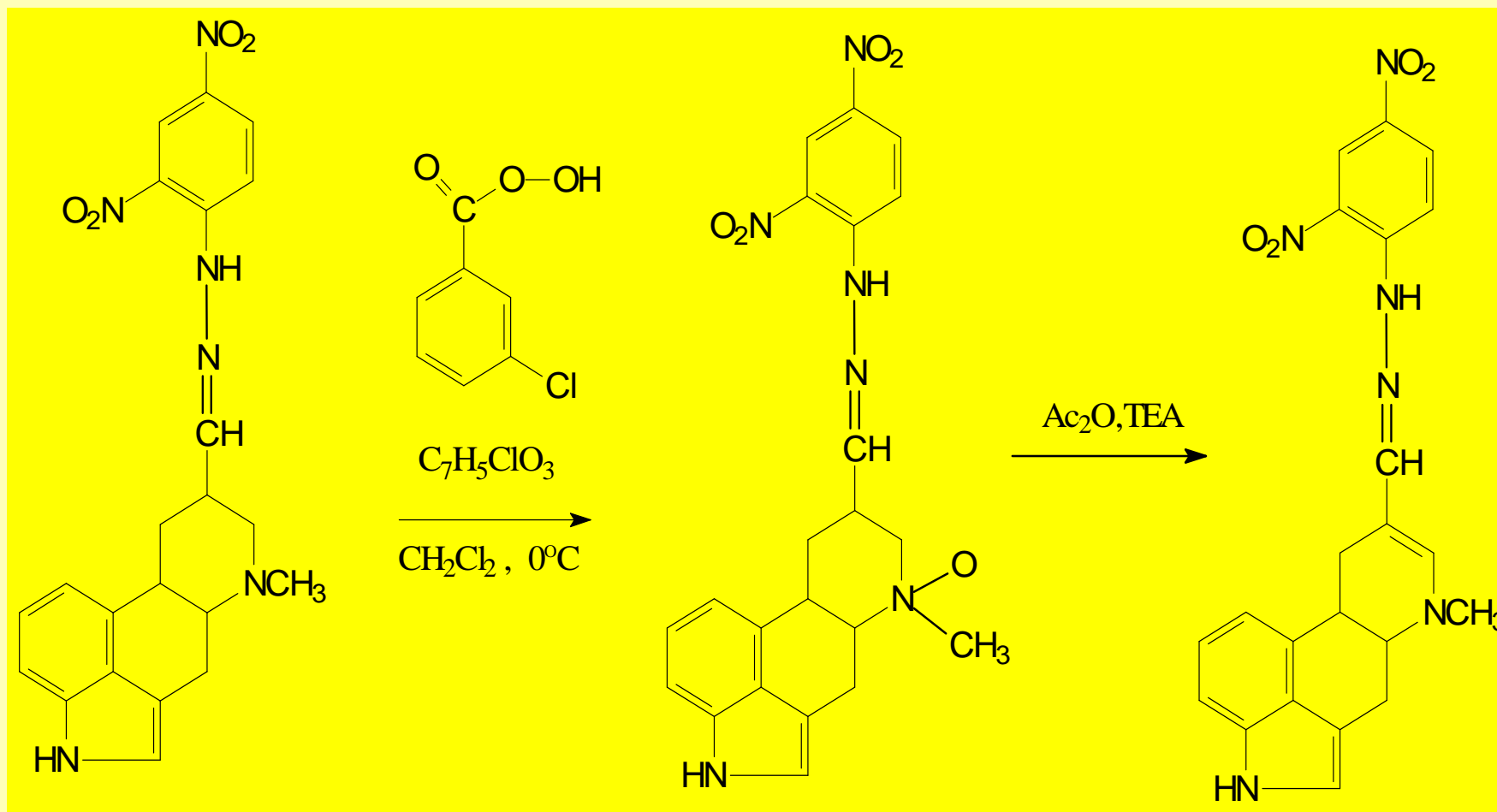
Reakční směs byla extrahována s CH₂Cl₂ v dělicí nálevce a odpařena na vakuové odparce.

ZÁVĚR:

Tato metoda se neosvědčila k získání krystalů . Byl získán pouze znečištěný roztok.

3) Příprava 2,4-dinitrofenylhydrazonu 6-methyl-8β-formyl-Δ7,8-ergolinu

PRINCIP:



a)POSTUP:

Hydrazon (**2a**)(0,12mmol) byl rozpuštěn v CH_2Cl_2 , k roztoku byla přidána MCPBA a roztok byl nechán 1h míchat při 0 °C. Po uběhnutí dané doby byl k roztoku přidán Ac_2O a TEA. Výsledný roztok byl po 1 hodině míchání při 0°C 2x vytřepán nasyceným roztokem NaHCO_3 a poté extrahován CH_2Cl_2 . Organická fáze byla vysušena bezvodým Na_2SO_4 a odpařena na vakuové odparce; odparek byl zbaven zbytků vlhkosti, tak že byl rozpuštěn v CH_2Cl_2 a pak k němu byl přidán toluen (tvoří s vodou azeotropní směs).

Chromatografie:

Mobilní fáze: CHCl_3 / toluen/ MeOH/ NH_3 = 85/ 10/ 5 / 0,5

ZÁVĚR:

Výtěžek čistého hydrazonu (**3**) je 0,007mmol (6 %).

MCPBA.....m-chloroperoxybenzoová kyselina

Ac_2Oacetanhydrid

Hydrazon (**2a**).....2,4 – dinitrofenylhydrazon dihydrolyserg-8-alu

Hydrazon (**3**)..... 2,4-dinitrofenylhydrazon 6-methyl-8 β -formyl- $\Delta^{7,8}$ -ergolinu

b) POSTUP:

MCPBA byla přečištěna (MCPBA je nestálá a přechází na m-chlorobenzoovou kyselinu).

MCPBA byla převedena do roztoku (přibližné pH=7,5) KH_2PO_4 a Na_2HPO_4 , roztok byl 10 min nechán míchat, poté byl odfiltrován na fritě. Byly získány krystaly MCPBA o předpokládané 90% čistotě.

Další postup byl totožný s postupem a).

Chromatografie:

1) Mobilní fáze:

Petrolether /ethylacetát = 4/ 1

Byl odstraněn nezreagovaný DNP-hydrazin.

2) Mobilní fáze:

CHCl_3 / toluen/ MeOH/ NH_3 = 85/ 10/ 5/ 0,5

ZÁVĚR:

Praktický výtěžek čistého hydrazonu (**3**) byl 4,1 %.

ZÁVĚR:

Vyvinuli a ověřili jsme
novou metodiku pro zavedení dvojné
vazby do polohy 7 dihydrolysergolu.

Struktura výsledného
2,4-dinitrofenylhydrazon 6-methyl-8 β -formyl- $\Delta^{7,8}$ -ergolinu
byla potvrzena nukleární magnetickou rezonancí.



Claviceps purpurea