



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



Selektywna hydroliza wiązań estrowych na przykładzie per-*O*-acetylowanej-D-glukopiranozy

Instrukcja do zajęć laboratoryjnych z przedmiotu
Chemia Bioorganiczna i Bionieorganiczna
Dla studentów kierunku Chemia specjalność Chemia Bioorganiczna

Opracowanie: mgr inż. Katarzyna Goj

Materiały zostały wykonane w ramach realizowanego na Politechnice Śląskiej projektu nr UDA-POKL.04.01.01-00-114/09-01 pt.: „Unowocześnienie i rozszerzenie oferty edukacyjnej na kierunku Chemia na Wydziale Chemicznym Politechniki Śląskiej – otwarcie specjalności Chemia Bioorganiczna” współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego.

CEL ĆWICZENIA

Celem niniejszego ćwiczenia jest przeprowadzenie i porównanie różnych metod hydrolizy wiązań estrowych na przykładzie per-*O*-acetylowanej-D-glukopiranozy.

PODSTAWY TEORETYCZNE

Grupy zabezpieczające są bardzo ważne przy przeprowadzaniu wielu reakcji chemicznych. Jeśli reakcja ma zajść w sposób regioselektywny konieczne jest odpowiednie zablokowanie reaktywnych miejsc wielofunkcyjnego związku w taki sposób, aby reakcja zaszła jedynie na pożądanej grupie funkcyjnej. Ma to szczególne znaczenie w przypadku chemii cukrów, w których występuje duża liczba grup hydroksylowych mogących ulegać reakcji. Dlatego należy wprowadzać odpowiednie grupy zabezpieczające. Muszą one jednak spełniać pewne kryteria.

Grupy zabezpieczające powinny posiadać następujące właściwości:

- powinny być łatwo wprowadzane;
- powinny być usuwane w sposób selektywny w łagodnych warunkach i z dobrą wydajnością;
- muszą wykazywać się trwałością w trakcie danej syntezy;
- powinny posiadać jak najmniej dodatkowych grup funkcyjnych mogących ulegać reakcjom ubocznym;
- muszą być łatwe w usunięciu na dowolnym etapie syntezy i z końcowego produktu.

W przypadku zabezpieczania grup hydroksylowych w syntezie oligosacharydów, należy dokonać wyboru odpowiednich grup zabezpieczających, tak aby reakcja przebiegała z możliwie największą wydajnością i selektywnością. Możemy podzielić grupy zabezpieczające na tzw. stałe i tymczasowe. Oba typy charakteryzują się własnymi warunkami ich wprowadzania i usuwania. Stałe grupy muszą charakteryzować się stabilnością aż do momentu zakończenia reakcji glikozylacji, także w trakcie wprowadzania bądź usuwania grup tymczasowych. Grupy tymczasowe natomiast muszą być stabilne jedynie od momentu ich wprowadzenia do chwili ich usunięcia. Wykorzystanie tych samych grup zabezpieczających do protekcji kilku grup funkcyjnych daje możliwość usunięcia ich równocześnie, zastosowanie różnych grup natomiast umożliwia selektywne odbezpieczanie pożądanych miejsc funkcyjnych.

Najpopularniejsze grupy ochronne wykorzystywane do zabezpieczania grup hydroksylowych możemy podzielić na:

Eterowe:

- metylowe,
- etylowe,
- silylowe,
- trotylowe,
- benzylowe,
- allylowe,

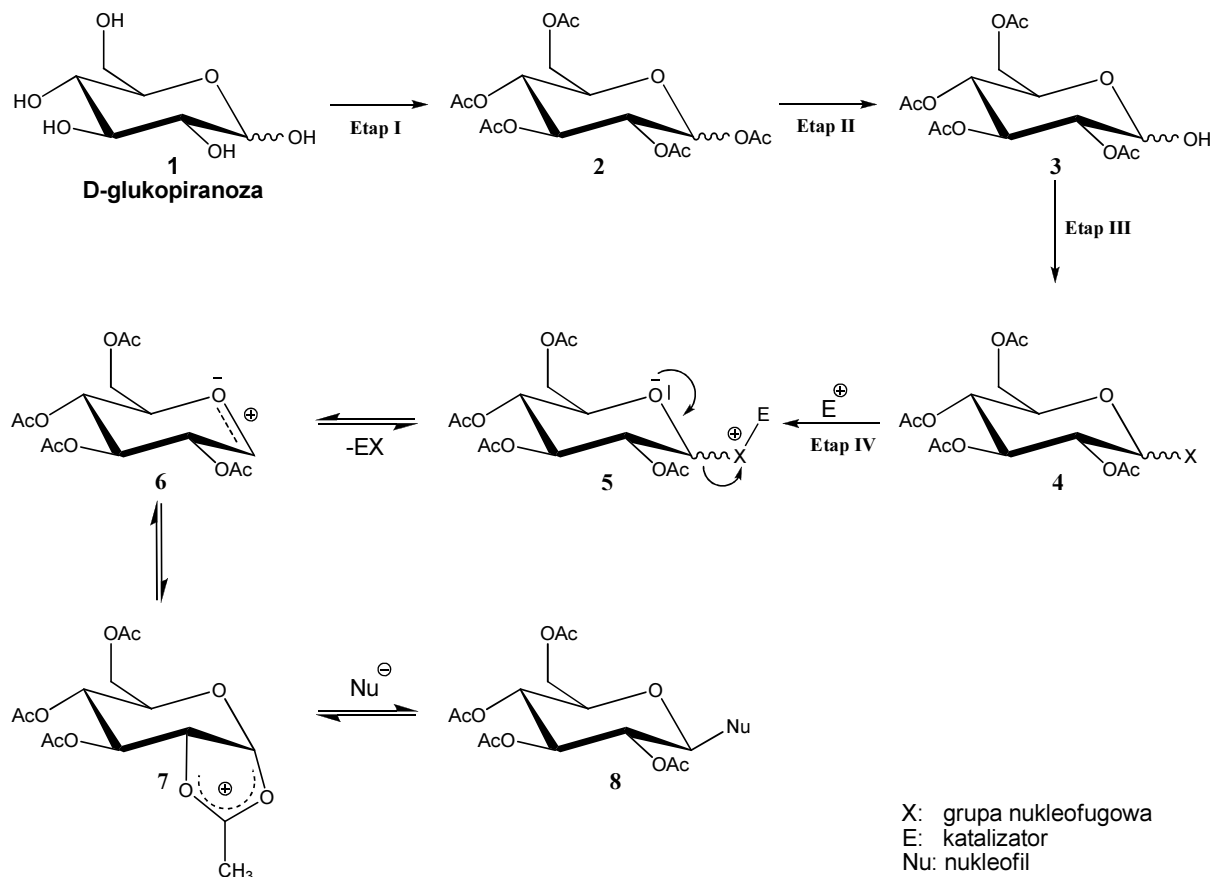
Estrowe:

- acetylowe,
- benzoilowe,
- krzemianowe;
- fosforanowe,
- siarczanowe,

Acetalowe:

- izopropylidenowe,
- cykloheksylo-1,2-diacetalowe,
- benzyldenowe.

Podstawowym problemem w syntezie glikozydów jest zapewnienie wysokiej stereoselektywności reakcji glikozylacji. Osiąga się ją poprzez odpowiednie dobranie reagentów i warunków reakcji (rozpuszczalnika, temperatury i katalizatora). W reakcjach glikozylacji istnieją różne drogi aktywowania centrum anomerycznego cukru ułatwiające wprowadzenie aglikonu.



Schemat 1

Najbardziej popularną estrową grupą zabezpieczającą jest grupa acetylowa (Ac). Wprowadzana jest ona do związku w reakcji z bezwodnikiem octowym w pirydynie (Etap I, **Schemat 1**). Pirydyna pełni w tej reakcji funkcję zarówno rozpuszczalnika jak i katalizatora. W warunkach tej reakcji powstaje mieszanina anomerów α i β (**2**), które są w stanie równowagi. Rozdzielenie tej mieszaniny metodami chromatograficznymi bądź przy użyciu krystalizacji jest zazwyczaj bardzo trudne. Dlatego opracowano również metody prowadzące do powstania tylko jednego z anomerów. Jedno z rozwiązań to *O*-acetylowanie z wykorzystaniem bezwodnika octowego i użycie octanu sodu jako katalizatora. W reakcji tej powstaje głównie anomer β . Żeby otrzymać anomer α , należy zamiast octanu sodu użyć katalitycznej ilości chlorku cynku albo kwasu nadchlorowego.

Grupy acetylowe można łatwo usuwać na drodze hydrolizy, aminolizy lub amoniolizy - co często wykorzystuje się do projektowania wieloetapowych syntez sacharydów. Hydrolizę octanów można katalizować zarówno przy użyciu zasady jak i kwasu. Grupy te są jednak względnie stabilne w środowisku kwaśnym. Najczęściej usuwa się je przy użyciu metanolanu sodu (MeONa), amoniaku (NH₃) bądź wodorotlenku potasu (KOH) w metanolu. Natomiast

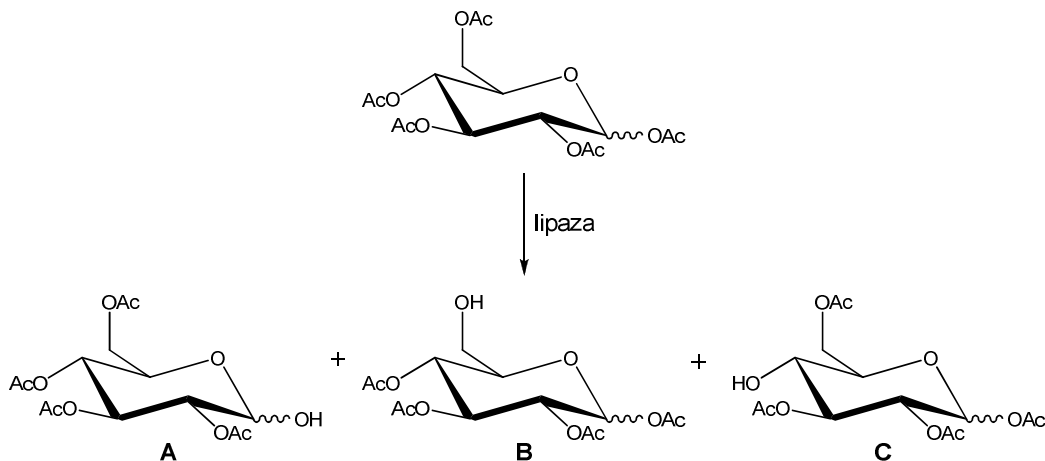
selektywna hydroliza wiązania estrowego przy atomie węgla anomerycznego (Etap II, **Schemat 1**) wymaga odpowiednio dobranych warunków.

Przegląd chemicznych metod selektywnej hydrolizy grupy estrowej przy anomerycznym atomie węgla:

Lp.	Warunki reakcji	Czas	Wydajność	Literatura
1	Octan hydrazyny, DMF, 55 °C,	15min	~100%	[1]
2	Octan hydrazyny, DMF, 20 °C,	3h	99%	[2]
3	1H-imidazol, metanol, 40 °C	26h	~100%	[3]
4	Bu ₃ SnOMe, THF, reflux	18h	94%	[4]
5	FeCl ₃ *6H ₂ O, acetonitryl, 70 °C	30 min	92%	[5]
6	Amoniak, THF : methanol (7:3)	20min	92%	[6]
7	HClO ₄ -SiO ₂ , acetonitryl, 70 °C	1.5h	92%	[7]
9	Benzylamina , THF, 20 °C	30h	92%	[8]
9	Kwas octowy, etylenodiamina, THF	18h	71%	[9]
10	Metanolan sodu, THF	6h	70%	[10]

Kolejnym ważnym etapem podczas projektowania wieloetapowych syntez jest wprowadzenie odpowiedniej grupy nukleofugowej w pozycję anomeryczną (Etap III, **Schemat 1**). Rolę grupy nukleofugowej spełniają grupy lub aniony będące grupami łatwo odchodzącymi w reakcjach podstawienia nukleofilowego S_N1 i S_N2. Są to słabe zasady takie jak jony halogenowe, najczęściej chloru i bromu, octanowe, tosyłanowe, imidowe itd. Aby ułatwić reakcję podstawienia nukleofilowego stosuje się katalizę kwasową, zarówno kwasami Brönsteda jak i Lewisa (Etap IV, **Schemat 1**). Najczęściej stosowane metody polegają na użyciu kwasów Lewisa (np. sole srebra i cyny(IV), trifluorometanosulfonian trimetylosililu, (TMS-triflan, TMSOTf)), które powodują przemianę 1-halogeno-, 1-*O*-acylo-, 1-*O*-alkilo-furanozydów lub piranozydów w jon oksoniowy. W obecności grupy estrowej w pozycji C-2 pierścienia cukrowego jon oksoniowy **6** jest stabilizowany przez utworzenie jonu acylooksoniowego **7**. Utworzony jon acylooksoniowy determinuje kierunek ataku czynnika nukleofilowego, który może zachodzić tylko od strony bardziej odsoniętej w odniesieniu do grupy partycypującej. Gdy grupa ta znajduje się po „ stronie α”, w cukrach szeregu D, poniżej płaszczyzny pierścienia, powstaje glikokoniugat o konfiguracji β (**8**).

Alternatywą w stosunku do opisanych powyżej chemicznych metod deacetylowania jest enzymatyczna hydroliza wiązań estrowych z użyciem enzymu lipazy. Specyficzność pozycyjną lub regiospecyficzność lipaz definiuje się jako zdolność tych enzymów do odróżnienia dwóch zewnętrznych pozycji (pierwszorzędowych wiązań estrowych) i wewnętrznej pozycji (drugorzędowego wiązania estrowego).



Schemat 2

Katalizowanie reakcji przez lipazy w środowisku o ściśle określonym pH pozwala na zwiększenie kontroli nad przebiegiem reakcji. Przykładowo zastosowanie lipazy wyizolowanej ze szczepu *Pseudomonas fluorescens* w buforze fosforanowym o pH=7 daje jako produkt reakcji regioizomer **A** (Schemat 2) z 80% wydajnością po oczyszczeniu.

PRZEBIEG ĆWICZENIA

1. Selektywna hydroliza wiązań estrowych z zastosowaniem lipazy

Odczynniki

- Penta-*O*-acetylo-D-glukopiranoza
- Enzym (lipaza trzustkowa)
- Bufor fosforanowy pH=7,0
- Dimetyloformamid (DMF)
- Chloroform
- Metanol
- Octan Etylu
- MgSO₄
- Żel krzemionkowy

Szkło i inne materiały oraz potrzebny sprzęt laboratoryjny

- Kolba stożkowa 50 ml
- Mieszadło magnetyczne
- Element mieszający
- Cylinder miarowy
- Kolba okrągłodenna 100 ml
- Rozdzielacz
- Lejek
- Bagietka
- Bibuła filtracyjna
- Pipeta Pasteura
- Pipety szklane na 1 i 2ml
- Zlewka
- Wyparka rotacyjna
- Kolumna chromatograficzna
- Odbieralniki

Wykonanie ćwiczenia

W kolbie płaskodennej o pojemności 50 ml rozpuścić 300 mg per-*O*-acetylowanej-D-glukopiranozy w 30 ml 10% r-ru DMF w buforze fosforanowym. Po rozpuszczeniu cukru dodać enzym (0,75g/mmol cukru) i mieszać powstałą zawiesinę w temperaturze pokojowej. Przebieg reakcji kontrolować za pomocą chromatografii TLC (układ rozwijający chloroform : metanol, 10:1, v:v) co 30 minut. Wyznaczyć współczynnik R_f dla wszystkich produktów reakcji.

Po stwierdzeniu całkowitego przereagowania substratu mieszaninę reakcyjną ekstrahować octanem etylu (2x20 ml). Połączone warstwy organiczne przemyć wodą (2x20 ml), osuszyć nad bezwodnym siarczanem(VI) magnezu i przesączyć na lejku z sączkiem karbowanym. Octan etylu odparować za pomocą rotacyjnej wyparki próżniowej.

Otrzymany syrop oczyścić za pomocą chromatografii kolumnowej. Do zlewki wsypać żel krzemionkowy, wlać chloroform i mieszając doprowadzić do postaci zawiesiny bez pęcherzyków powietrza. Następnie zawiesinę żelu wlać na kolumnę chromatograficzną. Po kondycjonowaniu kolumny mieszaninę reakcyjną rozpuszczoną w 1 ml chloroformu nanieść na kolumnę za pomocą pipetki Pasteura. Produkt wymywać z kolumny za pomocą gradientowego układu eluującego chloroform : metanol. Po zebraniu odpowiednich frakcji zawierających produkt reakcji odparować rozpuszczalnik pod próżnią i wyznaczyć masę powstałego produktu w celu oznaczenia wydajności przeprowadzonej reakcji.

2. Selektywna hydroliza wiązań estrowych z zastosowaniem octanu hydrazyny

Odczynniki

- Penta-*O*-acetylo-D-glukopiranoza
- Octan hydrazyny
- DMF
- Octan Etylu
- MgSO₄
- Metanol
- Chloroform
- Żel krzemionkowy

Szkło i inne materiały oraz potrzebny sprzęt laboratoryjny

- Fiolka o pojemności 25 ml
- Mieszadło magnetyczne
- Element mieszający
- Pipety szklane na 1,2 i 5ml
- Komora chromatograficzna (TLC)
- Rozdzielacz
- Lejek
- Bagietka
- Bibuła filtracyjna
- Kolba okrągłodenna o pojemności 50 ml
- Pipeta Pasteura
- Cylinder miarowy
- Zlewka
- Kolumna chromatograficzna
- Odbieralniki

Wykonanie ćwiczenia

Do 300 mg per-*O*-acetylowanej-D-glukopiranozy rozpuszczonej w 3 ml DMF dodać 80 mg octanu hydrazyny. Reakcję poradzić na mieszadle magnetycznym w temperaturze pokojowej. Przebieg reakcji kontrolować za pomocą chromatografii TLC (układ rozwijający chloroform : metanol, 10:1, v:v) co 5 minut. Wyznaczyć współczynnik R_f dla wszystkich produktów reakcji.

Po stwierdzeniu całkowitego przereagowania substratu do mieszaniny reakcyjnej dodać wodę (10 ml), a następnie ekstrahować octanem etylu (2x10 ml). Warstwę organiczną przemyć wodą (2x10 ml) i osuszyć nad bezwodnym siarczanem(VI) magnezu i przesączyć na lejku z sączkiem karbowanym. Octan etylu odparować za pomocą rotacyjnej wyparki próżniowej.

Otrzymany syrop oczyścić za pomocą chromatografii kolumnowej (jak w Ćwiczeniu 1).

3. Selektywna hydroliza wiązań estrowych z zastosowaniem węglań amonu

Odczynniki

- Penta-*O*-acetylo-D-glukopiranoza
- Węglan amonu
- DMF
- Metanol
- Chloroform

Szkło i inne materiały oraz potrzebny sprzęt laboratoryjny

- Fiolka o pojemności 10 ml
- Mieszadło magnetyczne z grzaniem
- Element mieszający
- Pipety szklane na 1 i 2ml
- Komora chromatograficzna (TLC)

Wykonanie ćwiczenia

W fiolce o pojemności 10 ml rozpuścić 0,256 mmola (100 mg) per-*O*-acetylowanej-D-glukopiranozy w 3 ml DMF. Następnie dodać 10 eq węglań amonu ($M=96$ g/mol). Reakcję prowadzić na mieszadle magnetycznym w podwyższonej temperaturze (ok. 40 °C). Przebieg reakcji kontrolować za pomocą chromatografii TLC (układ rozwijający chloroform : metanol, 10:1, v:v) co 30 minut. Wyznaczyć współczynnik R_f dla wszystkich produktów reakcji.

Po stwierdzeniu całkowitego przereagowania substratu do mieszaniny reakcyjnej dodać wodę (5 ml), doprowadzić 1 N roztworem HCl do odczynu obojętnego, a następnie ekstrahować octanem etylu. Warstwę organiczną przemyć wodą i osuszyć nad bezwodnym siarczanem(VI) magnezu i przesączyć na lejku z sączkiem karbowanym. Octan etylu odparować za pomocą rotacyjnej wyparki próżniowej.

Otrzymany syrop oczyścić za pomocą chromatografii kolumnowej (jak w Ćwiczeniu 1).

4. Selektywna hydroliza wiązań estrowych z zastosowaniem imidazolu

Odczynniki

- Penta-*O*-acetylo-D-glukopiranoza
- Imidazol
- Metanol
- Chloroform

Szkło i inne materiały oraz potrzebny sprzęt laboratoryjny

- Fiolka o pojemności 10 ml
- Mieszadło magnetyczne z grzaniem
- Element mieszający
- Pipety szklane na 1 i 2ml
- Komora chromatograficzna (TLC)

Wykonanie ćwiczenia

W fiolce o pojemności 10 ml rozpuścić 0,256 mmola (100 mg) per-*O*-acetylowanej-D-glukopiranozy w 3 ml metanolu. Następnie dodać 1.1 eq imidazolu ($M=68$ g/mol). Reakcję prowadzić na mieszadle magnetycznym w podwyższonej temperaturze (ok. 40 °C). Przebieg reakcji kontrolować za pomocą chromatografii TLC (układ rozwijający chloroform : metanol, 10:1, v:v) co 30 minut. Wyznaczyć współczynnik R_f dla wszystkich produktów reakcji.

Po stwierdzeniu całkowitego przereagowania substratu podjąć mieszaninę reakcyjną na wyparce rotacyjnej, następnie dodać wodę (5 ml), doprowadzić 1 N roztworem HCl do odczynu obojętnego, a następnie ekstrahować octanem etylu. Warstwę organiczną osuszyć nad bezwodnym siarczanem(VI) magnezu i przesączyć na lejku z sączkiem karbowanym. Octan etylu odparować za pomocą rotacyjnej wyparki próżniowej.

Otrzymany syrop oczyścić za pomocą chromatografii kolumnowej (jak w Ćwiczeniu 1).

5. Selektywna hydroliza wiązań estrowych z zastosowaniem metanolanu sodu w THF

Odczynniki

- Penta-*O*-acetylo-D-glukopiranoza
- Metanolan sodu
- THF
- Metanol
- Chloroform

Szkło i inne materiały oraz potrzebny sprzęt laboratoryjny

- Fiolka o pojemności 10 ml
- Mieszadło magnetyczne
- Element mieszający
- Krystalizator
- Lód
- Pipety szklane na 1 i 2ml
- Komora chromatograficzna (TLC)

Wykonanie ćwiczenia

W fiolce o pojemności 10 ml zawiesić 10 mg metanolanu sodu w 3 ml THF. Następnie mieszaninę umieścić w łaźni wodno-lodowej, dodać 0,256 mmola (150 mg) per-*O*-acetylowanej-D-glukopiranozy. Reakcję poradzić na mieszadle magnetycznym w łaźni wodno-lodowej. Przebieg reakcji kontrolować za pomocą chromatografii TLC (układ rozwijający chloroform : metanol, 10:1, v:v) w 5, 15, 30, 60, 90, 120 minucie reakcji. Wyznaczyć współczynnik R_f dla wszystkich produktów reakcji. Zaproponować struktury otrzymanych produktów z uzasadnieniem wyboru.

Po stwierdzeniu całkowitego przereagowania substratu podjąć mieszaninę reakcyjną na wyparce rotacyjnej, następnie dodać wodę (5 ml), doprowadzić 1 N roztworem HCl do odczynu obojętnego, a następnie ekstrahować octanem etylu. Warstwę organiczną osuszyć nad bezwodnym siarczanem(VI) magnezu i przesączyć na lejku z sączkiem karbowanym. Octan etylu odparować za pomocą rotacyjnej wyparki próżniowej.

Otrzymany syrop oczyścić za pomocą chromatografii kolumnowej (jak w Ćwiczeniu 1).

6. Całkowita hydroliza wiązań estrowych z wykorzystaniem 1M roztworu metanolanu sodu w metanolu

Odczynniki

- Penta-*O*-acetylo-D-glukopiranoza
- 1M roztwór metanolanu sodu w metanolu
- Metanol
- Chloroform

Szkło i inne materiały oraz potrzebny sprzęt laboratoryjny

- Fiolka o pojemności 10 ml
- Mieszadło magnetyczne
- Element mieszający
- Pipety szklane na 1 i 2ml
- Komora chromatograficzna (TLC)

Wykonanie ćwiczenia

W fiolce o pojemności 10 ml rozpuścić 0,256 mmola (100 mg) per-*O*-acetylowanej-D-glukopiranozy w 3 ml metanolu. Następnie dodać 0,02 mmola 1M roztworu metanolanu sodu w metanolu. Reakcję poradzić na mieszadle magnetycznym w temperaturze pokojowej. Przebieg reakcji kontrolować za pomocą chromatografii TLC (układ rozwijający chloroform : metanol, 10:1, v:v) w 5, 15, 30, 60, 90, 120 minucie reakcji. Wyznaczyć współczynnik R_f dla wszystkich produktów reakcji. Zaproponować struktury otrzymanych produktów z uzasadnieniem wyboru.

PRZYGOTOWANIE DO ZAJĘĆ:

1. Przeczytaj uważnie instrukcję i dokładnie przeanalizuj czynności oraz techniki laboratoryjne opisane w części eksperymentalnej, następnie zapoznaj się z zagrożeniami związanymi z stosowanymi odczynnikami oraz poszczególnymi czynnościami wykonywanymi na zajęciach (karty charakterystyk)
2. Zwróć uwagę czy znasz następujące pojęcia: katalizator, enzym, kataliza enzymatyczna, regiospecyficzność, regioselektywność, grupa partycypująca, grupa nukleofugowa, aglikon, donor glikozylowy.
3. Zastanów się czy wiesz:
 - a) jakie są chemiczne metody selektywnej hydrolizy wiązań estrowych pochodnych cukrów,
 - b) na czym polega selektywność katalizy enzymatycznej,
 - c) jakie są wady i zalety katalizy enzymatycznej,
 - d) jaka jest rola grup ochronnych,
 - e) jakie znasz rodzaje grup ochronnych,
 - f) czym charakteryzują się estrowe grupy ochronne.

WYTYCZNE DO SPRAWOZDANIA:

Sprawozdanie powinno zawierać dokładny opis przebiegu ćwiczenia, obserwacje dokonane podczas prowadzenia reakcji, jak i ich oczyszczania, wklejone i opisane płytki TLC, policzone współczynniki R_f , policzone wydajności reakcji. We wnioskach należy zawrzeć porównanie przeprowadzonych metod hydrolizy z uwzględnieniem wad i zalet każdej z nich, wyznaczeniem tych najbardziej selektywnych.

LITERATURA

- [1] T. Ren, D. Liu, *Tetrahedron Letters*, 40 (1999) 7621 – 7626
- [2] N. Van Tuyen, S. Claessens, P. Habonimana, K.A. Tehrani, L. Puyvelde, N. de Kimpe, *Synlett.*, 15 (2006) 2469 – 2471
- [3] Patent; B. N' Beyond, Biotech Pvt. Ltd., *Glyco-phosphorylated biologically active agents*, WO2007/52308; (2007); (A2) English
- [4] T. Raab, D. Barron, F. Arce Vera, V. Crespy, M. Oliveira, G. Williamson, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (2010) 2138 - 2149
- [5] S. K. Das et al., *Carbohydrate Research*, 342 (2007) 2309–2315
- [6] D. Redoules, J. Perie, *Tetrahedron Letters*, 40 (1999) 4811 - 4814
- [7] P. Tiwari, A.K. Misra, *Tetrahedron Letters*, 47 (2006) 3573 - 3576
- [8] T.B. Cai, D. Lu, X. Tang, Y. Zhang, M. Landerholm, P.G. Wang, *J. Org. Chem.*, 70 (2005) 3518 - 3524
- [9] M. van Scherpenzeel et al., *Bioorg. Med. Chem.*, 18 (2010) 267–273
- [10] Ai J. Lin, L. Li, S.L. Andersen, D.L. Klayman, *J. Med. Chem.*, 35 (1992) 1639 – 1642
- [13] D.E. Levy, P. Fugedi, *The Organic Chemistry of Sugars*, Taylor & Francis Group LLC (2006)
- [14] A. Wiśniewski, J. Madaj, *Podstawy Chemii Cukrów*, PDN, Poznań (1998)
- [15] G. J. Boons, K.J. Hale, *Organic Synthesis With Carbohydrate*, Sheffield Academic Press (2000) 26-55
- [16] A. Bastida, R. Fernandez-Lafuente, G. Fernandez-Lorente, J.M. Guisan, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9 (1999) 633-636