

AUTOREFERAT

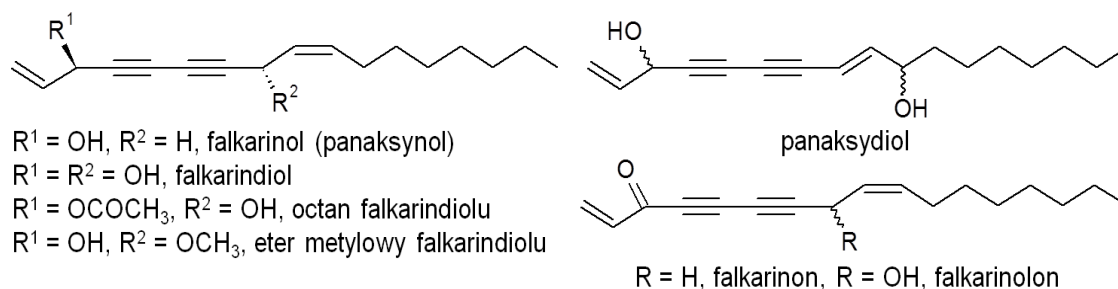
Analiza wtórnych metabolitów roślin przy użyciu metod spektroskopii oscylacyjnej oraz obliczeń kwantowo-chemicznych

mgr Maciej Roman

Wydział Chemii UJ, Zakład Fizyki Chemicznej, Zespół Obrazowania Ramanowskiego

Celem badań stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej była analiza strukturalna i spektroskopowa związków należących do trzech grup wtórnych metabolitów roślin. Badania były prowadzone w celu określenia zależności pomiędzy strukturą elektronową a widmem oscylacyjnym oraz wpływu czynników zewnętrznych na strukturę związku, a pośrednio też na widmo. Ponadto, celem badań było wykorzystanie spektroskopii oscylacyjnej do identyfikacji i określenia dystrybucji analizowanych związków w materiale roślinnym i produktach farmaceutycznych.

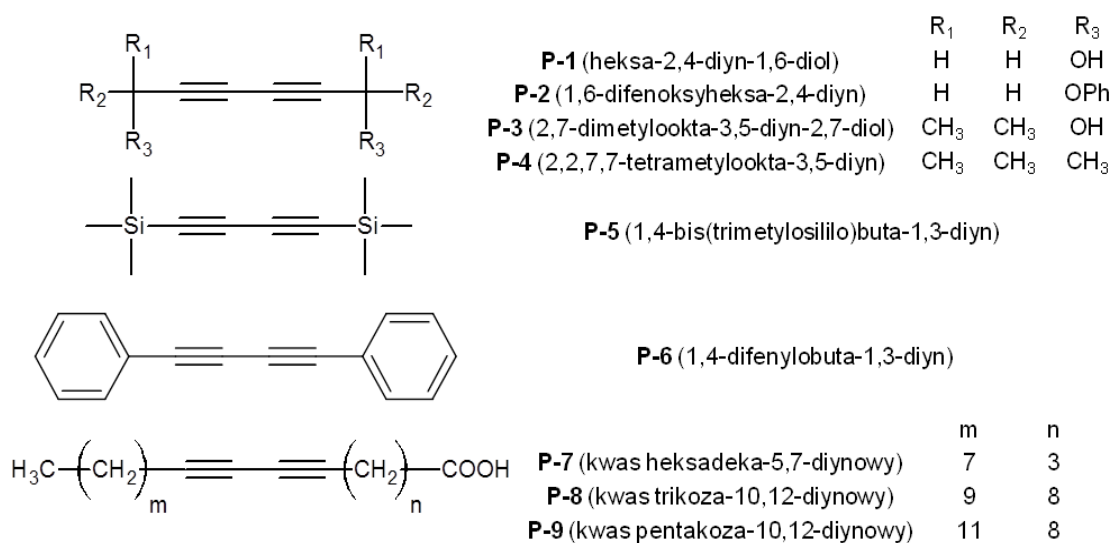
Pierwszą badaną grupą były poliacetyleny. Poliacetyleny, a właściwie poliiny, to związki organiczne zawierające w swojej strukturze przynajmniej dwa wiązania potrójne węgiel-węgiel, które z reguły są ze sobą sprzężone. Najczęściej spotykanymi związkami tego typu są diacetyleny tworzące liniowy układ diacetylenowy $-C\equiv C-C\equiv C-$, do którego przyłączone są różne podstawniki. Związki te należą do wtórnych metabolitów roślin i wykazują właściwości bioaktywne. Naturalnie występujące poliacetyleny syntezowane są przez rośliny jako ważne związki ochronne przeciw insektom, grzybom oraz chorobom. Najbardziej znanymi przedstawicielami tej grupy związków są diacetyleny typu falkarinol (Rys. 1).



Rys. 1. Wzory strukturalne diacetylenów naturalnych typu falkarinol.

W ramach badań analizie poddano szereg związków należących do poliacetylenów, w tym zarówno związki naturalne (falkarinol, falkarindiol) jak i związki modelowe. W celu lepszego poznania właściwości spektroskopowych poliacetylenów, w pierwszej kolejności zbadano wpływ podstawników na strukturę elektronową układu diacetylenowego wykonując obliczenia teoretyczne dla prostych symetrycznie dipodstawionych diacetylenów. Na tym etapie badań przeanalizowano 35 różnych związków. W kolejnym kroku przeprowadzono szczegółową analizę wybranych sześciu prostych diacetylenów, dla których przeprowadzono obliczenia teoretyczne i pomiary spektroskopowe (Rys. 2, związki **P-1** do **P-6**). Następnie, chcąc poznać właściwości związków zbliżonych budową do poliacetylenów naturalnych, analogiczną analizę przeprowadzono dla trzech kwasów diacetylenowych, które posiadają w swojej strukturze długie łańcuchy alifatyczne (Rys. 2, związki **P-7** do **P-9**). Ostatnim etapem badań była analiza poliacetylenów pochodzenia roślinnego oraz ich identyfikacja bezpośrednio w materiale roślinnym, tj. w korzeniach roślin z rodziny selerowatych (*Apiaceae*).

Analiza teoretyczna efektu podstawnikowego w symetrycznie dipodstawionych diacetylenach pozwoliła na wyznaczenie korelacji pomiędzy właściwościami elektronowymi podstawników a parametrami geometrycznymi oraz częstościami drgań charakterystycznych układu diacetylenowego. Zgodnie z otrzymanymi wynikami wzrost właściwości elektronowo-donorowych podstawnika powoduje zwiększenie się długości wiązań potrójnych węgiel-węgiel, a tym samym obniżenie częstości drgań charakterystycznych, co można zaobserwować na widmach oscylacyjnych w postaci przesunięć odpowiednich pasm.



Rys. 2. Wzory strukturalne i nazwy badanych poliacetylenów modelowych.

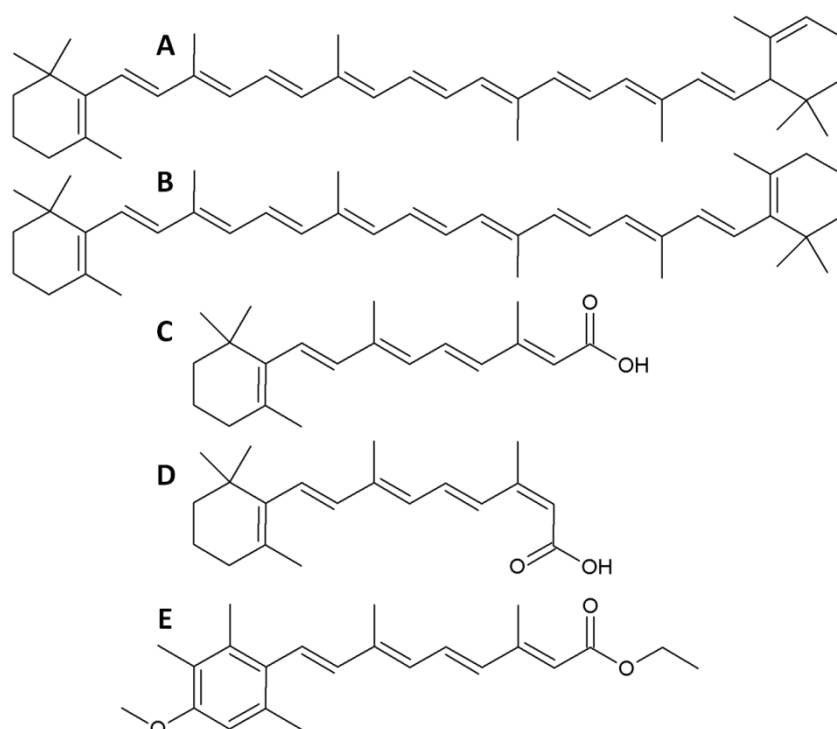
Teoretyczna analiza strukturalna wybranych prostych diacetylenów oraz kwasów diacetylenowych (związki **P-1** do **P-9**) pozwoliła na wyznaczenie stabilnych struktur elektronowych tych związków, na podstawie których wykonano symulację teoretycznych widm oscylacyjnych. Przeprowadzone obliczenia wykorzystano do interpretacji widm doświadczalnych (widma absorpcyjne w podczerwieni i ramanowskie). Szczególną uwagę zwrócono na częstości drgań rozciągających $C\equiv C$ diacetylenów, które zgodnie z przewidywaniami teoretycznymi zmieniają się w zależności od podstawnika. Dodatkowo, na niektórych widmach oscylacyjnych badanych związków zaobserwowano dublety w miejscu występowania pasm charakterystycznych, które wynikają z obecności zjawiska rezonansu Fermiego. W przypadku kwasów diacetylenowych, spektroskopia ramanowska została użyta jako skuteczna metoda badania stopnia polimeryzacji tych związków pod wpływem światła UV.

Naturalnie występujące poliacetyleny typu falkarinol były analizowane pod kątem wpływu otoczenia (rozpuszczalnika) na położenia pasm drgań rozciągających $C\equiv C$. Potwierdzono występowanie poliacetylenów (falkarinolu i falkarindiolu, Rys. 2) w korzeniach kilku odmian marchwi dzikiej oraz w korzeniach pasternaku, pietruszki i selera. Dzięki zastosowaniu techniki mapowania ramanowskiego wyznaczono dystrybucję badanych związków w tkankach korzeni. Największe stężenie poliacetylenów zaobserwowano w zewnętrznych tkankach korzenia (tkanki floemu), podczas gdy w rdzeniu ich ilość była znikoma.

Drugą grupą badanych związków były karotenoidy. Karotenoidy to nienasycone węglowodory o specyficznej budowie, której elementem charakterystycznym jest układ sprzężonych wiązań podwójnych węgiel-węgiel. Są one popularnymi barwnikami w roślinach oraz należą do naturalnych przeciwutleniaczy. Dość istotną kwestią w kontekście diety człowieka jest fakt, iż karotenoidy są prekursorami witaminy A będąc jednocześnie jej głównym źródłem u człowieka. Główna funkcja karotenoidów w roślinach związana jest natomiast z fotosyntezą, która łączy absorpcję światła, transfer energii i jej rozproszenie po układzie oraz procesy transferu elektronów. Do najbardziej znanych karotenoidów należą m.in. β -karoten, likopen i luteina.

W ramach rozprawy doktorskiej badaniami objęto karotenoidy występujące w korzeniu marchwi, w tym dwa najważniejsze z nich, czyli α - i β -karoten, oraz trzy związki z grupy retinoidów (tretynoinę zwaną również kwasem retinowym, izotretynoinę oraz etretynat) będące metabolitami retinolu, głównego składnika witaminy A (Rys. 3). Podobnie jak w przypadku poliacetylenów, celem badań była analiza strukturalna i spektroskopowa

wybranych karotenoidów. Ze względu na to, że analizowane związki są stosowane jako substancje czynne w produktach farmaceutycznych, wykonano także badania wpływu na ich strukturę czynników zewnętrznych (środowiskowych) takich jak rozpuszczalnik, pH czy temperatura. Ponadto, wykonano badania materiału roślinnego analizując wpływ warunków uprawy roślin oraz ich przechowywania na zawartość β -karotenu. Celem badań mikroskopowych materiału roślinnego było określenie składu i dystrybucji poszczególnych karotenoidów w kryształach obecnych w komórkach korzenia marchwi.



Rys. 3. Struktury badanych karotenoidów: α -karotenu (A), β -karotenu (B), tretynoiny (C), izotretynoiny (D) oraz etretynatu (E).

Przeprowadzenie analizy strukturalnej β -karotenu i trzech retinoidów pozwoliło na uzyskanie teoretycznych widm oscylacyjnych, które użyto następnie do interpretacji widm doświadczalnych oraz potwierdzenia obecności badanych karotenoidów w lekach. Różnice w liczbie wiązań podwójnych oraz w rodzaju grupy terminalnej (pierścienia) wpłynęły na położenie pasm charakterystycznych (pasma ν_1 , ν_2 oraz ν_3 odpowiednio w zakresach $1510 - 1580 \text{ cm}^{-1}$, $1150 - 1190 \text{ cm}^{-1}$ oraz $1000 - 1020 \text{ cm}^{-1}$) i umożliwiły na tej podstawie identyfikację badanych związków.

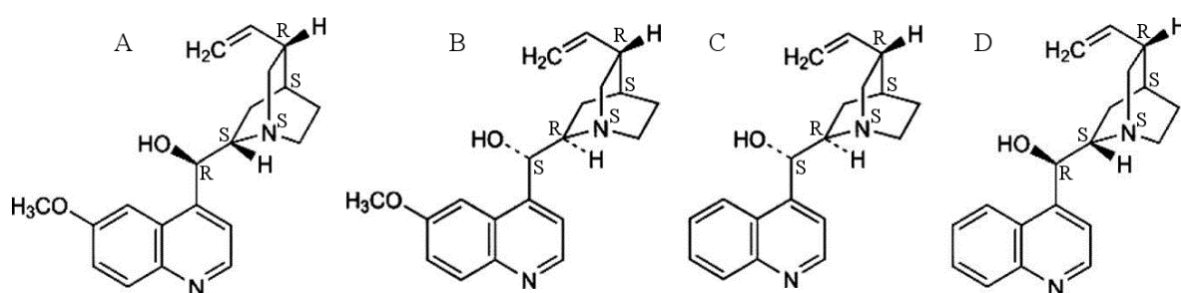
Wpływ czynników zewnętrznych na widma ramanowskie karotenoidów zbadano zarówno dla standardów analizowanych związków jak i dla materiału roślinnego. Badania nad zależnością pomiędzy położeniem pasm ν_1 , ν_2 oraz ν_3 na widmach ramanowskich a rodzajem

rozpuszczalnika (polarny, niepolarny) przeprowadzono dla etretynatu. Dla niektórych rozpuszczalników zaobserwowano przesunięcie pasma ν_1 , które nie korelowało jednak ze stałymi dielektrycznymi poszczególnych rozpuszczalników. Prawdopodobną przyczyną zmian na widmach ramanowskich była agregacja lub samoorganizacja cząsteczek etretynatu, co jest dość powszechne dla retinoidów tego typu. W przypadku wpływu pH na widma ramanowskie etretynatu, zauważono wyraźne przesunięcie ($5 - 7 \text{ cm}^{-1}$) pasma ν_1 dla wartości pH powyżej 12, co zinterpretowano jako efekt hydrolizy tego związku w środowisku silnie zasadowym. Syntetyczny β -karoten poddano analizie temperaturowej. Wraz ze wzrostem temperatury zaobserwowano nieznaczne przesunięcie w kierunku niższych liczb wszystkich trzech pasm charakterystycznych (ν_1 , ν_2 oraz ν_3) tego związku oraz zmiany ich intensywności. Przeprowadzone obliczenia teoretyczne pozwoliły na przypisanie tych zmian do wzrastającej abundancji wysokoenergetycznych konformerów β -karotenu przy wyższych temperaturach. Badania przeprowadzone na materiale roślinnym dotyczyły natomiast wpływu nawodnienia i warunków przechowywania na zawartość i skład karotenoidów w korzeniach marchwi uprawnej. W przypadku analizy wpływu nawodnienia zaobserwowano wyraźny wzrost zawartości karotenoidów dla roślin z ograniczonym dostępem do wody, natomiast przechowywanie materiału biologicznego w warunkach dostępu światła i podwyższonej temperatury powodowało szybką degradację tych metabolitów, co widoczne było na odpowiednich widmach ramanowskich w postaci malejących intensywności pasm charakterystycznych.

Badaniom spektroskopowym poddano również komórki korzeni odmian marchwi, które charakteryzują się różną zawartością poszczególnych karotenoidów (α -karotenu, β -karotenu i ksantofili). Pierwszym etapem badań była identyfikacja karotenoidów w pomarańczowych kryształach obecnych w cytoplazmie komórkowej przy pomocy spektroskopii ramanowskiej. Położenie pasma ν_1 (ok. 1518 cm^{-1}) pozwoliło stwierdzić, że głównym składnikiem obserwowanych kryształów był β -karoten. Bardziej szczegółowe badania z wykorzystaniem techniki mapowania ramanowskiego i mikroskopu konfokalnego umożliwiły identyfikację innych karotenoidów (luteiny, α -karotenu) jak również określenie przestrzennej dystrybucji tych związków. Wyniki analiz map ramanowskich wskazały na współwystępowanie karotenoidów (β -karotenu, α -karotenu lub/i luteiny) we wszystkich badanych kryształach oraz ich homogeniczną dystrybucję w całej objętości analizowanych obiektów.

Trzecią grupą związków, które zostały wybrane jako przedmiot badań w ramach rozprawy doktorskiej, były cztery alkaloidy drzewa chinowego, czyli chinina, chinidyna,

cynchonina i cynchonidyna (Rys. 4). Alkaloidy te są znanymi związkami chiralnymi o potwierdzonych właściwościach przeciwmalarycznych. Występują głównie w korze drzewa chinowego oraz w innych spokrewnionych gatunkach z rodziny marzanowatych (*Rubiaceae*). Najbardziej znanym alkaloidem z tej grupy związków jest chinina, która przez ponad 300 lat pełniła kluczową rolę w leczeniu malarii. Pomimo późniejszego wyparcia chininy przez m.in. chlorochininę, związek ten jest nadal stosowany w przypadku leczenia bardzo odpornych szczepów tej choroby. Z drugiej strony, chinina jest używana także w przemyśle spożywczym jako dodatek o gorzkim smaku, np. w tonikach, oraz w przemyśle farmaceutycznym jako lek na skurcze mięśni, np. w tabletkach leku Limptar[®] N.



Rys. 4. Wzory strukturalne oraz konfiguracje centrów chiralnych badanych alkaloidów drzewa chinowego: chinina (A), chinidyna (B), cynchonina (C) oraz cynchonidyna (D).

Celem badań nad alkaloidami drzewa chinowego było przeanalizowanie zależności pomiędzy ich strukturą elektronową a właściwościami spektroskopowymi. Ze względu na to, że alkaloidy drzewa chinowego są związkami chiralnymi, oprócz wykonania pomiarów standardowymi metodami spektroskopii ramanowskiej i absorpcyjnej w podczerwieni, do analizy spektroskopowej zastosowano również metodę ramanowskiej aktywności optycznej (ROA). Badane alkaloidy pochodzenia naturalnego są składnikami leków, stąd też jednym z celów badań było określenie wpływu czynników środowiskowych na ich strukturę. Szczególną uwagę skupiono na zależności występowania form kationowych alkaloidów od pH roztworu wodnego, w którym zostały rozpuszczone. Niskie pH panujące w żołądku ma istotny wpływ na postać jonową alkaloidów trafiających tam jako składniki leku. Analityczne zastosowanie spektroskopii oscylacyjnej wykorzystano natomiast do identyfikacji i badania dystrybucji chininy w produkcie farmaceutycznym.

Analiza strukturalna alkaloidów drzewa chinowego pozwoliła na wyznaczenie stabilnych struktur elektronowych tych związków oraz otrzymanie teoretycznych widm oscylacyjnych, które użyto do interpretacji widm doświadczalnych. Widma ramanowskie analizowanych alkaloidów, szczególnie ich roztworów wodnych, są do siebie bardzo podobne

ze względu na podobieństwo strukturalne odpowiednich związków (pary pseudoenancjomerów, np. chinina i chinidyna). W związku z tym, identyfikacja poszczególnych związków na podstawie widm ramanowskich była bardzo trudna. Zastosowanie metody badań aktywności optycznej (ROA) pozwoliło na rozróżnienie związków chiralnych o takiej samej strukturze molekularnej (pseudoenancjomerów), a nawet związków o takiej samej konfiguracji absolutnej, ale różniących się obecnością dodatkowych grup funkcyjnych (np. chinina i cynchonidyna). Widma ROA alkaloidów drzewa chinowego zarejestrowano i zinterpretowano po raz pierwszy.

Ze względu na niskie pH panujące w żołądku, chininę jako składnik leków przeciwmalarycznych i przeciwskurczowych poddano badaniom spektroskopowym w roztworach wodnych o zmieniającym się pH. Zarówno spektroskopia ramanowska jak i metoda ROA umożliwiły śledzenie procesu protonacji w cząsteczkach chininy przy rosnącej kwasowości roztworów wodnych. Przeprowadzone obliczenia teoretyczne pozwoliły natomiast na interpretację obserwowanego przesunięcia (o ok. 20 cm^{-1} w kierunku wyższych liczb falowych) pasma charakterystycznego przy ok. 1370 cm^{-1} , które towarzyszy protonacji atomu azotu w układzie chinolinowym.

Chinina była analizowana także w tabletkach leku Limptar[®] N, który stosowany jest w leczeniu skurczy łydek. Celem tych badań była identyfikacja substancji czynnej bezpośrednio w materiale farmaceutycznym oraz określenie dystrybucji chininy w całej objętości tabletki. Widma oscylacyjne zarejestrowane z tabletki Limptar[®] N potwierdziły obecność chininy, przy czym na widmie absorpcyjnym IR zaobserwowano także pasma pochodzące od innych składników (wypełniaczy) leku, takich jak żelatyna, stearynian magnezu, celuloza mikrokrystaliczna, tlenek krzemu(IV), talk, polimetakrylany czy olej rycynowy. Wyniki mapowania ramanowskiego wskazały na stosunkowo homogeniczny rozkład chininy w obrębie badanej warstwy tabletki, choć zaobserwowano warstwy o nieznacznie większym i mniejszym stężeniu chininy.

Uzyskane wyniki dla trzech grup związków należących do wtórnych metabolitów roślin pokazały, że metody spektroskopii oscylacyjnej są bardzo użyteczne do analizy strukturalnej tych związków, badania wpływu czynników zewnętrznych na ich struktury jak również do identyfikacji i określenia ich dystrybucji przestrzennej w materiale roślinnym i farmaceutycznym. Dodatkowe zastosowanie obliczeń kwantowo-chemicznych pozwoliło na pełną interpretację wyników doświadczalnych oraz lepsze zrozumienie procesów chemicznych i oddziaływań międzycząsteczkowych w badanych układach rzeczywistych.

Wyniki badań stanowiących istotę rozprawy doktorskiej opisano w następujących publikacjach:

Publikacje w czasopismach z listy filadelfijskiej:

1. **M. Roman**, M. Baranska Natural monoacetylenes studied by quantum-chemical chemistry, *Spectrosc.-Int. J.*, 24, 2010, 417-420 (IF₂₀₁₃ = 0,831)
2. M. Baranska, R. Baranski, E. Grzebelus, **M. Roman**, In situ detection of a single carotenoid crystal in a plant cell using Raman microspectroscopy, *Vib. Spectr.*, 56, 2011, 166-169 (IF₂₀₁₃ = 1,547)
3. **M. Roman**, J. Cz. Dobrowolski, M. Baranska, Theoretical modeling of molecular spectra parameters of disubstituted diacetylenes, *J. Chem. Inf. Model.*, 51, 2011, 283-295 (IF₂₀₁₃ = 4,068)
4. **M. Roman**, R. Baranski, M. Baranska, Nondestructive Raman analysis of polyacetylenes in Apiaceae vegetables, *J. Agric. Food Chem.*, 59, 2011, 7647-7653 (IF₂₀₁₃ = 3,107)
5. **M. Roman**, J. Cz. Dobrowolski, M. Baranska, R. Baranski, Spectroscopic Studies on Bioactive Polyacetylenes and Other Plant Components in Wild Carrot Root, *J. Nat. Prod.*, 74, 2011, 1757-1763 (IF₂₀₁₃ = 3,947)
6. M. Baranska, **M. Roman**, J.Cz. Dobrowolski, H. Schulz, R. Baranski, Recent advances in Raman analysis of plants: alkaloids, carotenoids, and polyacetylenes, *Curr. Anal. Chem.*, 9, 2013, 99-118 (IF₂₀₁₃ = 1,194)
7. **M. Roman**, A. Kaczor, J. Cz. Dobrowolski, M. Baranska, Structural changes of β -carotene and some retinoid pharmaceuticals induced by environmental factors, *J. Mol. Struct.*, 1037, 2013, 99-108 (IF₂₀₁₃ = 1,599)
8. **M. Roman**, M. Baranska, Vibrational and theoretical study of selected diacetylenes, *Spectrochim. Acta A*, 113, 2013, 493-503 (IF₂₀₁₃ = 2,129)
9. **M. Roman**, M. Baranska, Vibrational and theoretical study of diacetylenic acids, *Spectrochim. Acta A*, w druku, DOI: 10.1016/j.saa.2014.08.057 (IF₂₀₁₃ = 2,129)

Pozostałe publikacje:

1. **M. Roman**, K. Chruszcz-Lipska, J. Celka, M. Baranska, Raman optical activity of cinchona alkaloids, *Biomedical Spectroscopy and Imaging*, 2, 2013, 359–365
2. M. Baranska, **M. Roman**, K. Majzner, General overview on vibrational spectroscopy applied in biology and medicine, w: *Optical Spectroscopy and Computational Methods in Biology and Medicine*, M. Baranska (ed.), Springer, ISBN 978-94-007-7831-3, str.: 3-14, 2014

Prace będące w recenzji:

1. **M. Roman**, K. M. Marzec, E. Grzebelus, P. W. Simon, M. Baranska, R. Baranski, Composition and homogeneity of carotenoid crystals in carrot cells revealed by high resolution Raman imaging, *Spectrochim. Acta A*

2. **M. Roman**, K. Chruszcz-Lipska, M. Baranska, Raman Optical Activity analysis of cinchona alkaloids, *J. Raman Spectrosc.*

Badania przeprowadzono w ramach następujących projektów:

1. Projekt MPD (Międzynarodowe Projekty Doktoranckie) pt. „Analiza wtórnych metabolitów roślinnych” realizowany na Wydziale Chemii UJ oraz w Instytucie Chemii Ekologicznej, Analiz Roślinnych i Ochrony Produktów Przechowywanych w Niemczech
2. Projekt „*Doctus – Małopolski fundusz stypendialny dla doktorantów*” współfinansowany ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego
3. Grant Narodowego Centrum Nauki (nr 2012/05/N/ST4/00226) pt. „Analiza alkaloidów chinolinowych metodami spektroskopii oscylacyjnej”