



Prof. dr hab. Jacek W. Morzycki

ul. Ciołkowskiego 1K, 15-245 Białystok ☎ (85) 738 82 60, fax: (85) 738 80 52, e-mail: morzycki@uwb.edu.pl

Białystok, 25.05.2016 r.

### RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Patrycji Gołębiowskiej  
pt. „Stereokontrolowana synteza pandarozydów E-J”

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska magister Patrycji Gołębiowskiej wykonana została w Zespole Stereokontrolowanej Syntezy Organicznej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Jacka Młynarskiego. Rozprawa liczy 187 ponumerowanych stron i ma układ typowy dla prac z zakresu chemii organicznej. Trzy główne części pracy o podobnej objętości to Część Literaturowa, Badania Własne i Część Doświadczalna. W pracy zacytowano 177 pozycji literaturowych.

Celem pracy doktorskiej było opracowanie syntezy bioaktywnych pandarozydów. Związki te zostały niedawno wyizolowane z karaibskiej gąbki *Pandaros acanthifolium*, zebranej u wybrzeży Martyniki. Pod względem chemicznym należą one do saponin steroidowych o specyficznej budowie pierścienia D. Ponieważ związki te występują w trudno dostępnym materiale zwierzęcym w znikomych ilościach i wykazują znaczną aktywność przeciwpierwotniakową, podjęcie próby ich syntezy chemicznej należy uznać za w pełni uzasadnione. Wszystkie pandarozydy posiadają zenolizowany układ  $\alpha$ -diketonu w pierścieniu D i grupę karbonylową w pozycji 23, różnią się natomiast między sobą obecnością wiązania podwójnego w pierścieniu B i jego położeniem, budową szkieletu węglowego w łańcuchu bocznym oraz częścią cukrową. We wszystkich pandarozydach steroidowy aglikon połączony jest wiązaniem  $\beta$ -glikozydowym z kwasem D-glukuronowym, który z kolei związany jest z D-glukozą ( $\beta$ -1,2), D-ksylozą ( $\beta$ -1,3) lub L-ramnozą ( $\alpha$ -1,4). W Części Literaturowej doktorantka obszernie przedstawiła budowę, występowanie, biosyntezę i aktywność biologiczną saponin, zarówno pochodzenia roślinnego jak i zwierzęcego. Ze zrozumiałych względów najdokładniej zostały omówione produkty wyizolowane z *Pandaros acanthifolium*, w tym pandarozydy i spokrewnione z nimi akantifoliozydy. Przedstawiony przegląd literatury jest niewątpliwie potrzebny i stanowi dobre wprowadzenie do lektury pracy doktorskiej. Wydaje mi się jednak, że należało założyć poprawność podanych przez cytowanych badaczy struktur wyizolowanych produktów bez szczegółowego wnikania w dowody spektroskopowe. W Części Literaturowej poruszona została też kwestia chemicznej syntezy saponin, m.in. z wykorzystaniem 1,2-anhydrocukrów jako donorów w reakcji glikozydowania, która to właśnie metoda była stosowana przez doktorantkę w pracy. Część tę zamyka podrozdział zatytułowany

„Metody funkcjonalizacji pierścienia D steroidów”, w którym przedstawiona została selektywna rodnikowa funkcjonalizacja „na odległość” metodą Breslowa. Muszę przyznać, że czytanie tego fragmentu pracy sprawiło mi dużą satysfakcję, bo przywołało osobiste wspomnienia sprzed blisko czterdziestu lat. W końcu lat siedemdziesiątych pasjonowałem się badaniami Breslowa i miałem szeroko zakrojone własne plany badawcze. Przygotowałem serię kwasów jodobenzoesowych i jodofenylooctowych, z których otrzymałem estry wybranych alkoholi triterpenoidowych. Związki te nadal znajdują się w moim magazynie podręcznym. Niestety wyjazd na kilkuletni staż zagraniczny pokrzyżował moje plany, do których po powrocie z zagranicy już nie wróciłem. Niemniej całą pracę doktorską przeczytałem z dużym zainteresowaniem, zwłaszcza że synteza saponin steroidowych jest też nie jest mi obca. Podejrzewam, że z tego właśnie powodu jestem bardziej krytyczny wobec recenzowanej pracy i wyczulony na błędy, których niestety w pracy nie brakuje, np. w streszczeniu angielskim „allowe” należy poprawić na „allow”, „glicosylation” na „glycosylation”. W całej pracy autorka ma problem z biernikiem pisząc „tą tezę”, „tą próbkę”, „tą reakcję”, „tą metodę” lub „tą metodologię”. W odniesieniu do omawianej Części Literaturowej we wzorze awenakozydu B (str. 29) konfiguracja na C20 jest błędna; we wzorach 3.13-3.15 (str. 59) brakuje jednego atomu węgla w łańcuchu bocznym. Z reguły autorka nie podaje konfiguracji na C5, chociaż w związkach steroidowych może być ona 5 $\alpha$ -H lub 5 $\beta$ -H. O ile można zakładać w większości przypadków tę pierwszą konfigurację (jeśli nie jest oznaczona), to brak oznaczenia konfiguracji 5 $\beta$ -H w kwasie chenodezoksycholowym (str. 58) jest już wyraźnym błędem. Wydaje mi się też, że lepiej używać nazwy „trichloroacetoimidan” zamiast stosowanej przez doktorantkę „trichloroacetymidat”. Nazwy kwasów na str. 71 są nieprecyzyjne, nazwy zwyczajowe są pomieszane z systematycznymi.

Badania własne doktorantka rozpoczęła od opracowania metod syntezy glikozydów steroidowych z disacharydami wchodzącymi w skład pandarozydów będących celem syntezy. Ponieważ nie dysponowała właściwym aglikonem, przeprowadziła syntezy z modelowym steroidem zwierzęcym, czyli cholesterolem. Zatem pierwszym celem była synteza trzech glikozydowych pochodnych cholesterolu z disacharydem zawierającym kwas glukuronowy z D-glukozą w pozycji C'2, D-ksylozą w pozycji C'3 lub L-ramnozą w pozycji C'4. Przeprowadzone badania wykazały, że najkrótsza i najwydajniejsza ścieżka syntetyczna do modelowych połączeń z cholesterolem prowadzi przez jego reakcję z odpowiednim 1,2-anhydrocukrem, otrzymanym z dostępnego handlowo 3,4,6-tri-O-acetylo-D-glukalu, jako donorem w reakcji glikozydowania. Doktorantka opracowała nową procedurę epoksydowania-glikozydowania, w wyniku której glikozydy cholesterolu powstawały z wydajnościami powyżej 65%. Ta część badań zakończyła się pełnym sukcesem doktorantki. Przy projektowaniu syntez dr Gołębiowska wykazała się dobrą znajomością chemii cukrów. Z powodzeniem wykonała zaplanowane transformacje związane z manipulacją grupami funkcyjnymi, co świadczy o umiejętności prowadzenia wieloetapowych syntez. Opracowane procedury powinny zostać wykorzystane przy syntezie właściwych saponin, chociaż moje wątpliwości budzi utlenianie glukozy w glikozydzie do kwasu glukuronowego w jednym z ostatnich etapów syntezy. Wprowadzcie zastosowane warunki (TEMPO, NaOCl, 0 °C)

są dość łagodne, ale trudno jest ocenić podatność na utlenianie/chlorowanie pierścienia D w pandarozydach. Inną kwestią potraktowaną w pracy dość marginalnie jest tworzenie się mieszanin glikozydów w metodzie glikozylacji z wykorzystaniem 1,2-anhydrocukrów jako donorów. Kwestia ta została poruszona szerzej tylko na str. 87, gdzie opisane zostały reakcje glukalu zabezpieczonego objętościowymi grupami silylowymi prowadzące do mieszanin produktów  $\alpha$ -Man i  $\beta$ -Glc w porównywalnych ilościach (na schematach występuje tylko pożądaný produkt  $\beta$ -Glc). Jak ta sprawa się przedstawia w przypadku innych substratów?

W tej części pracy występuje trochę błędów. Związek 4.4 (str. 85) jest glukalem a nie 3,4,6-tri-*O*-acetylo-D-glukozą. Związek 4.36 (opis na str. 90) należy najpierw przekształcić w glikal 4.37, a dopiero potem poddać procedurze epoksydowania-glikozydowania. „One-pot reakcje” (str. 100, 110) to żargon, podobnie jak „estryfikacja metylowa” (str. 110) czy „przygotowałam trzy cząsteczki mono- i disacharydowe” (str. 114) – trzy cząsteczki to niewiele; przydałby się chociaż 1 miligram.

W następnej kolejności doktorantka przystąpiła do syntezy aglikonu. Postanowiła wykorzystać jako substrat handlowo dostępny stigmasterol. Jego zaletą jest posiadanie w łańcuchu bocznym podwójnego wiązania pozwalającego na niezbędne modyfikacje w tej części cząsteczki. Ponadto posiada on dodatkową grupę etylową przy C24, podobnie jak pandarozidy G-J, chociaż o przeciwnej konfiguracji. Wydaje się, że jej odwrócenie będzie możliwe po wprowadzeniu grupy karbonylowej w pozycję 23. Syntezy pandarozydów E i J nie znalazły się nawet w planach doktorantki i nie bardzo rozumiem dlaczego figurują one w tytule pracy. Mankamentem wybranego substratu jest brak grupy funkcyjnej w pierścieniu D. Wydaje się, że dogodniejszym substratem do syntez byłaby diosgenina, która taką funkcję posiada. Doktorantka postanowiła sfunkcjonalizować pierścień D w pochodnej stigmasterolu metodą Breslowa. Po utlenianiu allilowym octanu stigmasterolu powstała 7-okso pochodną poddano redukcji Bircha. Otrzymany nasycony 7-keton (brak informacji na temat konfiguracji na C5) został zabezpieczony w postaci ketalu (czyli z utworzeniem dioksolanu, a nie dioksanu jak doktorantka pisze na str. 104 i 106). Po hydrolizie octanu przeprowadzona została inwersyjna estryfikacja metodą Mitsunobu z kwasem 4-benzoilofenylooctowym. Otrzymany ester miał być naświetlany lampą UV wysokiej mocy, ale okazało się, że doktorantce nie udało się uzyskać dostępu do takiej lampy. Skoro nie ma dostępu do lampy, to zapewne należało zastosować bardziej wydajną procedurę funkcjonalizacji pozycji 14 opisaną zresztą w Części Literaturowej z użyciem *p*-jodofenylooctanu, dichlorku jodobenzenu i nadtlenu benzoilu. Jednak moim zdaniem, planowana reakcja i tak nie miała szans na powodzenie. Pierścień dioksolanowy przy C7 skutecznie osłania wewnątrzcząsteczkowe podejście do atomu wodoru przy C14, nie wspominając o efekcie indukcyjnym. Doktorantka szybko się zreflektowała zmieniając plan syntezy. Grupa karbonylowa w 7-ketonie została selektywnie zredukowana do 7 $\alpha$ -alkoholu, który został następnie zestryfikowany chlorkiem kwasu *m*-jodobenzoesowego. Proces funkcjonalizacji pierścienia D został poprzedzony transformacją łańcucha bocznego mającą na celu wprowadzenie grupy karbonylowej w pozycję 23. W wyniku reakcji z MCPBA otrzymano mieszaninę epoksydów, którą przekształcono w mieszaninę bromohydrin w reakcji z HBr. Te z kolei utleniono do  $\alpha$ -bromoketonów odczynnikami Jones'a,

a następnie usunięto brom w reakcji z  $\text{LiI}/\text{BF}_3$ . Otrzymaną mieszaninę ketonów rozdzielono chromatograficznie uzyskując pożądaną 23-keton z zadowalającą wydajnością. Szkoda, że w pracy brak jest informacji, czy wyizolowany został również 22-keton i w jakiej ilości. Doktorantka nie porusza również kwestii ewentualnej epimeryzacji w obu ketonach pod wpływem  $\text{BF}_3$  na sąsiednich centrach stereogenicznych i jak w zasadzie została udowodniona struktura wyodrębnionego ketonu. Otrzymany 23-keton poddany został chlorowaniu w pozycji  $17\alpha$  metodą Breslowa, a surowy produkt przeksztalcono w  $\Delta^{16}$  olefinę na drodze eliminacji we wrzącej pirydynie. Uzyskano pożądaną produkt z wydajnością 50%. Niestety prace syntetyczne musiały się zakończyć na tym etapie ze względu na brak czasu, a projekt będzie kontynuowany przez kolegów z Zakładu.

Część Doświadczalna pracy jest napisana starannie i w pełni dokumentuje uzyskane rezultaty. Dobrym pomysłem było wyodrębnienie poza opis eksperymentów charakterystyki otrzymanych produktów. Szkoda, że brak jest opisu produktów ubocznych powstających w wyniku prowadzonych syntez (np.  $\alpha$ -mannozydy, izomeryczne ketony, itp.)

Cała praca doktorska mgr Patrycji Gołębiowskiej pisana była zapewne w pośpiechu i z tego powodu zawiera dość liczne błędy. Nie utrudniają one jednak czytania pracy, która moim zdaniem jest interesująca i oddaje złożoność zagadnienia, z którym przyszło się zmierzyć doktorantce. Praca zawiera bogaty materiał eksperymentalny, który z pewnością będzie wykorzystany w dalszych badaniach. Otrzymane wyniki są omawiane w sposób systematyczny, a wyciągane na ich podstawie wnioski są na ogół poprawne. W przypadku prowadzenia syntezy docelowej dobrze jest otrzymać założony produkt końcowy. Tak się nie stało w tym przypadku, ale opracowana została synteza części cukrowej i otrzymano zaawansowany półprodukt, który może być przekształcony w pożądaną aglikon.

Doktorantka niewątpliwie wykazała się znajomością nowoczesnej chemii organicznej. Jest ona współautorką dwóch publikacji w bardzo dobrych czasopismach, chociaż nie związanych z pracą doktorską. Wyniki swoich badań prezentowała na wielu konferencjach krajowych i międzynarodowych.

W moim przekonaniu oceniana praca spełnia ustawowe wymagania stawiane pracom doktorskim. W związku z tym wnioskuję do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego o przyjęcie rozprawy doktorskiej magister Patrycji Gołębiowskiej i dopuszczenie jej do publicznej obrony.

Jacek Morayci