

SEPARACE KVARTÉRNÍCH BENZO[*c*]FENANTHRIDINOVÝCH ALKALOIDŮ Z *Macleaya cordata*

JAROSLAV VIČAR^a, MIROSLAV SOURAL^b
a JAN HLAVÁČ^b

^a Ústav lékařské chemie a biochemie, Lékařská fakulta,
^b Katedra organické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, Tř. Svobody 8, 771 47 Olomouc
jarvic@tunw.upol.cz

Došlo 25.2.09, přijato 4.11.09.

Klíčová slova: sanguinarin, chelerythrin, *Macleaya cordata*, dihydroderiváty

Úvod

Kvartérní isochinolinové alkaloidy sanguinarin (13-methyl[1,3]benzodioxolo[5,6-*c*]-1,3-dioxolo[4,5-*i*]fenanthridinium-chlorid, dále jen SG) a chelerythrin (1,2-dimethoxy-12-methyl[1,3]benzodioxolo[5,6-*c*]fenanthridinium-chlorid, dále jen CHE), vyskytující se v rostlinách čeledi Fumariaceae, Papaveraceae, Ranunculaceae a Rutaceae, jsou stále atraktivními sloučeninami pro základní a aplikovaný výzkum^{1,2}. Směsi sanguinarinu a chelerythrinu, na trhu nabízené jako sanguiritrin (alkaloidový extrakt *M. cordata*) a sanguinaria (alkaloidový extrakt z rhizomů *Sanguinaria canadensis*), jsou aktivními složkami přípravků ústní hygieny s prokázaným antiplakovým účinkem, resp. aditiva do krmiva hospodářských zvířat (prodáváno v EU pod názvem SANGROVIT[®], PHYTOBIOTICS Futterzusatzstoffe GmbH, Německo). Ačkoliv je v literatuře popsána jejich úplná syntéza, jejich

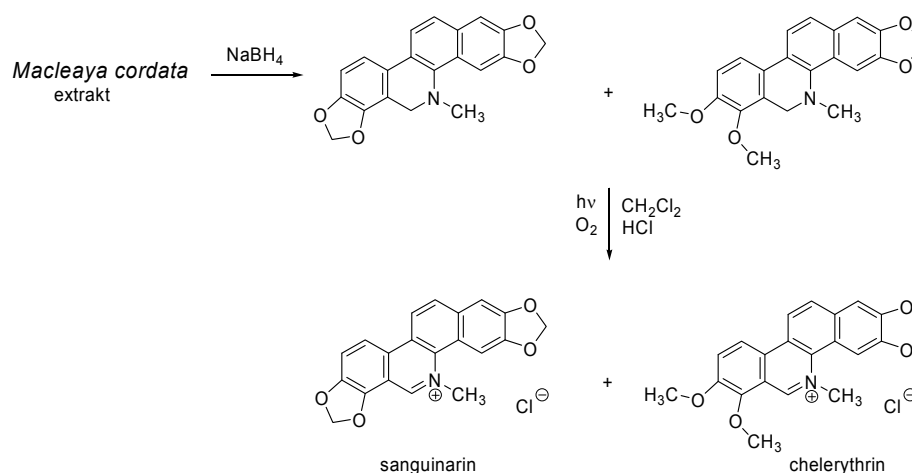
zdrojem zůstává nadále rostlinný materiál. Klíčovým faktorem ovlivňujícím cenu je pak vzájemná separace těchto alkaloidů.

Novější metody dělení SG a CHE se zřetelem na jejich stanovení v biologickém materiálu jsou shrnuty v článku³, přičemž většina prací citovaných v tomto přehledu, jakož i většina článků uveřejněných po tomto referátu, užívá pro separaci reverzní fáze (C₈-C₁₈) s gradientovou elucí, např. směsí pufr-acetonitril⁴⁻⁸, nebo pufr-methanol⁹. Jiný nosič, kopolymer methylakrylát-divinylbenzen, umožnil použití gradientu s ethanolem namísto acetonitrilu a je doporučován pro práci v průmyslovém měřítku¹⁰.

Pro preparativní dělení většího množství látek je však použití reverzní fáze ekonomicky velmi náročné. Pro preparativní dělení SG a CHE v laboratorním měřítku na jiných sorbentech byly popsány dva přístupy – buď kolonová chromatografie acetátů na Al₂O₃ s velkou spotřebou sorbentu a benzenu¹¹, nebo „flash“ chromatografie chloridů na tomtéž sorbentu, sice s použitím toluenu namísto problematického benzenu, nicméně stále experimentálně značně náročná¹². Dále byl popsán také obrácený přístup, nepolární sorbent typu kopolymer styren-divinylbenzen a eluce vodou a směsí voda-methanol¹³.

Celkově lze ale shrnout separace zmíněných alkaloidů ve formě kvartérních amoniových solí jako náročné jak po stránce chemické, tak zejména ekonomické.

Způsob, jak obejít přímou separaci kvartérních alkaloidů, navrhl Brossi a Borer¹⁴. Kvartérní alkaloidy redukovali na málo polární dihydroderiváty, ty potom dělili na sloupci Al₂O₃ elucí benzenem a produkty zpětně oxidovali Hg(CH₃COO)₂. Pro další zejména biologické studie je však použití rtuťnatých solí nevhodné a práce s karcinogenním benzenem nebezpečná. Proto byla naše snaha zaměřena na hledání efektivní ekonomicky přijatelné separace SG a CHE, navíc s ohledem na omezení toxicity použitých chemikálií.



Obr. 1. Schéma dělení směsi sanguinarinu a chelerythrinu z extraktu *Macleaya cordata*

V tomto článku navrhujeme ekonomicky přístupnou metodu dělení obou alkaloidů, založenou na postupu Brosiho a Borera, kdy eliminujeme použití benzenu a používáme fotochemickou oxidaci namísto rtuťnatých solí pro zpětné převedení rozdělených dihydroderivátů na kvartérní amoniové soli.

Experimentální část

Body tání byly stanoveny na Koflerově bloku a nejsou korigovány. $^1\text{H-NMR}$ spektra byla měřena na přístroji Bruker Avance 300 MHz. Čistota produktů byla ověřována na přístroji LC-20 Prominence (Shimadzu) pomocí kolony Purospher Star RP-18e, 5 μm , 250/4 (Merck) vybaveném detektorem diodového pole SPD-M20A a fluorimetrickým detektorem RF-10Ax1. Mobilní fázi byla 0,01 M 1-heptansulfonová kyselina/0,1 M triethylamin, pH 2,5 (H_3PO_4) v 25% acetonitrilu v gradientu s 0,01 M 1-heptansulfonová kyselina/0,1 M triethylamin, pH 2,5 (H_3PO_4) v 60% acetonitrilu, průtok 1 ml min^{-1} , detekce při 285 nm (UV) a/nebo 327 nm excitace – 577 emise (fluorimetrie). Sloupcová chromatografie byla prováděna na přístroji Sepacore Flash Chromatograph (Büchi). Při izolaci byla používána rozpouštědla čistoty p.a., NaBH_4 byl produkt firmy Aldrich. Extrakt z *Macleaya cordata* (Wild.) R.Br., Papaveraceae (obvykle označován jako sanguiritrin (CAS 112025-60-2)) pocházel od firmy CAMAS Technologies, Inc. (Broomfield, USA) s deklarovaným obsahem 532 mg g^{-1} chloridu sanguinarinu a 164 mg g^{-1} chloridu chelerythrinu.

Separace redukováných alkaloidů

Sanguiritrin (16 g) byl redukován NaBH_4 (22 g, přidáván v 10 dávkách v intervalech 10 min) v methanolu (2,2 l), za míchání při laboratorní teplotě. Odparek po odpaření methanolu byl rozpuštěn v chloroformu, extrakt byl vytřepán vodou do neutrální reakce, sušen Na_2SO_4 a odpařen. Získaný produkt (7 g) byl podroben separaci sloupcovou chromatografií. Podmínky separace (Sepacore Flash Chromatograph): kolona 150 \times 45 mm, silikagelová stacionární fáze DAVISIL LC60A 40–60 μm (Chromservis), mobilní fáze pro eluci dihydrosanguinarinu: chloroform, mobilní fáze pro eluci dihydrocheletrythrinu: chloroform:methanol (9:0,5), průtok 10 ml min^{-1} , detekce UV 275 nm.

Získané odparky čistých frakcí dihydrosanguinarinu (1,71 g) a dihydrocheletrythrinu (0,66 g) nebyly bezbarvé, což ukazuje na malý podíl zpětné oxidace během separačního procesu. Proto byly oba produkty ještě čištěny na sloupci silikagelu (7 g, 3 g), eluce chloroformem. Barevné složky byly zachyceny na sloupci, odparky eluátů rekrytalizací ze směsi chloroform-methanol poskytly 1,60 g bezbarvého dihydrosanguinarinu, b.t. 190–193 $^\circ\text{C}$ (cit.¹⁵ b.t. 195–196 $^\circ\text{C}$) a 0,56 g bezbarvého dihydrocheletrythrinu, b.t. 163–165 $^\circ\text{C}$ (cit.¹⁵ b.t. 169–171 $^\circ\text{C}$).

Fotochemická oxidace dihydrosanguinarinu a dihydrocheletrythrinu

Dihydrosanguinarin (166 mg) a konc. HCl (50 μl) v CH_2Cl_2 (25 ml) za probublání vzduchem v intervalech 15 min byly ozařovány na solárním simulátoru SOL-500 (Dr. Höhle UV Technology, SRN) ultrafialovým zářením vlnových délek 295–315 nm po dobu 1 h. Získaná sraženina byla odfiltrována, promyta etherem a sušena nad P_2O_5 při 70 $^\circ\text{C}$. Bylo získáno 178 mg (84 %) chloridu sanguinarinu ve formě trihydrátu, b.t. 270–274 $^\circ\text{C}$ (rozklad) (cit.¹⁵ b.t. 277 až 280 $^\circ\text{C}$), 300 MHz NMR spektrum odpovídá dané struktuře a je ve shodě s cit.¹⁶. Pro trihydrát $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{NO}_4\text{Cl} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ (421,8) vypočteno: 56,95 % C, 4,78 % H, 3,32 % N; nalezeno: 56,86 % C, 4,97 % H, 3,15 % N.

Dihydrocheletrythin (460 mg) a konc. HCl (130 μl) v CH_2Cl_2 (130 ml) za probublání vzduchem v intervalech 15 min byly ozařovány na solárním simulátoru SOL-500 (Dr. Höhle UV Technology, SRN) ultrafialovým zářením vlnových délek 295–315 nm po dobu 4 h. Během reakce bylo postupně doplněno 120 ml rozpouštědla. Rozpouštědlo bylo odpařeno na objem asi 50 ml, po stání přes noc v lednici byl produkt odfiltrován a promyt etherem. Bylo získáno 380 mg chloridu cheletrythrinu, který byl dále čištěn krystalizací: produkt byl za varu rozpuštěn ve vodě (25 ml), po ochlazení byl roztok filtrován, k filtrátu byla přidána konc. HCl (0,60 ml) a roztok byl ponechán 3 dny v lednici. Chlorid cheletrythrinu byl odfiltrován, promyt malým množstvím 2 M-HCl a sušen nad P_2O_5 při 70 $^\circ\text{C}$.

Bylo získáno 249 mg (46 %) produktu o složení $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_4\text{NCl} \cdot 1\frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$ (410,8), b.t. 195–201 $^\circ\text{C}$ (cit.¹⁵ b.t. 202–203 $^\circ\text{C}$). Vypočteno: 61,39 % C, 5,12 % H, 3,41 % N; nalezeno: 61,42 % C, 5,37 % H, 3,41 % N. 300 MHz NMR spektrum odpovídá dané struktuře a je ve shodě s cit.¹⁶.

Závěr

Popsaný postup umožňuje izolovat z ekonomicky dostupného extraktu dostatečná množství obou sloučenin v čistém stavu a tím výrazně zlevňuje vstupy pro farmakologické experimenty.

Autoři děkují za finanční podporu projektům GA ČR 525/07/0871 a MSM 6198959216.

LITERATURA

1. Dostál J., Slavík J.: Chem. Listy 94, 15 (2000).
2. Zdařilová A., Malíkova J., Dvořák Z., Ulrichová J., Šimánek V.: Chem. Listy 100, 30 (2006).
3. Dvořák Z., Kubán V., Klejduš B., Hlaváč J., Vičar J., Ulrichová J., Šimánek V.: Heterocycles 68, 2403 (2006).
4. Chen Y. Z., Liu G. Z., Shen Y., Chen B., Zeug J. G.: J. Chromatogr., A 1216, 2104 (2009).

5. Suchomelová J., Bochořáková H., Paulová H., Musil P., Táborská E.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 44, 283 (2007).
6. Klvana M., Chen J., Lepine F., Legros R., Jolicoeur M.: *Phytochem. Anal.* 17, 236 (2006).
7. Liang M., Zhang W., Hu J., Liu R., Zhang C.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 42, 178 (2006).
8. Luo X. B., Chen B., Yao S. Z.: *Phytochem. Anal.* 17, 431 (2006).
9. Psotová J., Klejduš B., Večeřa R., Kosina P., Kubáň V., Vičar J., Šimánek V., Ulrichová J.: *J. Chromatogr., B* 830, 165 (2006).
10. Pi G., Ren P., Yu J., Shi R., Yuan Z., Wang C.: *J. Chromatogr., A* 23, 17 (2008).
11. Slavík J., Slavíková L.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 25, 1667 (1960).
12. Dostál J., Táborská E., Slavík J.: *Fitoterapia* 63, 61 (1992).
13. Tanahashi T., Zenk M.: *J. Nat. Prod.* 53, 579 (1990).
14. Brossi A., Borer R.: *Lloydia* 28, 199 (1965).
15. Southon I. W., Buckingham J.: *Dictionary of Alkaloids*. Chapman and Hall, London 1989.
16. Marek R., Toušek J., Dostál J., Slavík J., Dommissé R., Sklenář V.: *Magn. Reson. Chem.* 37, 781 (1999).

J. Vičar^a, M. Soral^b, and J. Hlaváč^b (^a*Institute of Medicinal Chemistry and Biochemistry*, ^b*Department of Organic Chemistry, Palacký University, Olomouc*): **Separation of Quaternary Benzo[c]phenanthridine Alkaloids from *Macleaya cordata***

A cost-effective method for separation of sanguinarine and chelerythrine from commercial *Macleaya cordata* extract (sanguiritrin) is described. In the first step, the alkaloids are reduced with NaBH₄ to dihydro derivatives, which are easily separated by column chromatography on silica gel with chloroform and chloroform-methanol elution. In the second step, the dihydro derivatives are photochemically oxidized to the title alkaloids.