

O heleninu od Srećka Bošnjakovića do Lavoslava Ružičke i najnovijih saznanja – ogledni primjer razvoja organske kemije u XX. stoljeću

DOI: 10.15255/KUI.2016.008
KUI-4/2017
Pregledni rad
Prispjelo 1. ožujka 2016.
Prihvaćeno 11. travnja 2016.

V. Šunjić*

Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti, Zrinjski trg 11, 10 000 Zagreb

Ovo djelo je dano na korištenje pod
Creative Commons Attribution 4.0
International License



|| Sažetak

Prof. Srećko Bošnjaković (1865. – 1907.) prvi je kemičar u Hrvatskoj koji je izradio disertaciju na području organske kemije. U svojoj disertaciji objavljenoj 1893. pod naslovom “Gerhardtov helenin” Bošnjaković opisuje izolaciju helenina iz korijena biljke *Inula helenium* L., razdvajanje kemijski čistih supstancija i određivanje njihovih empirijskih formula elementarnom analizom. U disertaciji uz helenin koristi se i imenom alantolakton, koje se kasnije gotovo isključivo pojavljuje u literaturi. Budući da taj naziv ukazuje na postojanje laktonske skupine u heleninu, smatrao sam zanimljivim istražiti što je bilo poznato o toj strukturi u vrijeme Bošnjakovićevog rada na disertaciji te tko je točno odredio strukturu alantolaktona kao i nekih izomernih i srodnih spojeva koji se nalaze u prirodi. Pokazalo se da je velik doprinos tom području dao naš nobelovac Lavoslav Ružička, koji je u razdoblju 1931. – 1936. intenzivno istraživao strukture brojnih seskviterpena i postavio poznato Ružičkino biogenetsko izoprensko pravilo (*L. Ružička, The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds, Experientia* 9 (1953) 357–396).

Potaknut tom neočekivanom “hrvatskom vezom preko helenina” naišao sam na niz zanimljivih podataka o kasnijem razvoju kemije vezane uz helenin ili alantolakton, a posebno o doprinosu Lavoslava Ružičke određivanju strukture. U ovom pregledu detaljnije su opisana istraživanja Bošnjakovića na izolaciji alantolaktona i Ružičkina istraživanja na određivanju njegove strukture. Slijedi prikaz određivanja strukture, sinteze i najnovijih saznanja o vrlo značajnom biološkom djelovanju alantolaktona i njegovih srodnika. Put do najnovijih saznanja izvrstan je primjer razvoja organske kemije u XX. stoljeću.

|| Ključne riječi

Inula helenium L., helenin, alantolakton, struktura, stereokemija, biološko djelovanje, povijest kemije

Uvod

Ljekovita svojstva korijena biljke *Inula helenium* L., kod nas poznate pod brojnim imenima, alant, aman, bijeli oman, devesil, lepuh, ivanjsko zelje, veliki korijen, bila su poznata od antičkih vremena. Tako Plinije stariji predlaže svakodnevno žvakanje tog korijena zbog bolje probave, očuvanja zubnog mesa i liječenja išijasa.¹ Tradicionalno se korijen omana ekstrahirao vrućom vodom ili vinom te su uz različite dodatke pripremljeni napitci za liječenje bronhitisa, astme, za olakšano mokrenje, protiv šećerne bolesti i kožnih oboljenja.² Posebno je cijenjeno “omanovo vino”, ekstrakt u alkoholu, obično u komovici uz naknadni dodatak vina. Upotrebljavano je u ratovima kao stimulans vojnicima pred bitku, a u miru kao ljekovit vinski napitak osvježavajućeg okusa. Zbog velike vrijednosti na tržištu njegova je proizvodnja u srednjem vijeku povremeno monopolizirana od strane kraljeva i velmoža. Danas je još cijenjen alkoholni napitak *absinthe*, liker poznat na svjetskom tržištu, koji se najviše proizvodi u Švicarskoj, Francuskoj i Nizozemskoj. Ljekovita svojstva ekstrakta korijena omana bila su od davnina poznata i na Dalekom istoku, gdje je biljka uzgajana u poljima i vrtovima te naveliko prerađivana za raznovrsnu medicinsku primjenu.³

Bošnjakovićeva disertacija – što je to helenin ili alantolakton?

U povodu obilježavanja 150. godišnjice rođenja prof. Srećka Bošnjakovića (slika 1) organiziran je u Hrvatskoj akademiji znanosti i umjetnosti 24. studenoga 2015. znanstveni skup.⁴



Slika 1 – Fotografija S. Bošnjakovića, vjerojatno iz razdoblja rada na disertaciji

Fig. 1 – Photo of S. Bošnjaković, presumably from the period of his work on his Ph. D. Thesis

* Akademik Vitomir Šunjić
e-pošta: vsunji@hazu.hr



Slika 2 – Doktorska diploma dodijeljena 1893. S. Bošnjakoviću
Fig. 2 – Ph. D. diploma awarded to S. Bošnjaković in 1893

Pripremajući izlaganje na temu “Bošnjakovićev studij, usavršavanje i doktorska disertacija iz organske kemije”, upoznao sam pobliže njegovu disertaciju pod naslovom “Gerhardtov helenin”⁵ te radove njegovih prethodnika i suvremenika na tom području. Na slici 2 prikazana je doktorska diploma dodijeljena S. Bošnjakoviću od strane prof. Vinka Dvoržaka, rektora Sveučilišta Franje Josipa I. u Zagrebu.

Naslov disertacije ukazuje na to da je ona nastavak istraživanja C. Gerhardta objavljenih ranije, ali iz teksta disertacije vidi se da je na Sveučilištu u Zagrebu ta istraživanja započeo Bošnjakovićev mentor prof. Gustav Janeček. Posebno zanimljiva bila je Bošnjakovićeva upotreba naziva alantolakton za helenin iako mu nije poznata njegova struktura. Taj naziv ukazuje na prisutnost laktonske skupine u molekuli tog prirodnog spoja te potiče na pitanje tko je i kada taj naziv uveo u literaturu. Za dokaz laktonske funkcijske skupine danas držimo da je nužno imati UV, IR i NMR-spektre istraženog spoja. Budući da te spektroskopske metode nisu u to vrijeme bile dostupne, pokušao sam saznati na koji način su S. Bošnjaković i njegovi prethodnici odredili strukturu alantolaktona i izoalantolaktona. Pokazalo se da je za ispravno određivanje strukture prirodnog (+)-alantolaktona, uključujući i apsolutnu konfiguraciju na svim kiralnim centrima, bilo potrebno gotovo 100 godina! U razdoblju 1931. – 1936. na tom području radio je i naš nobelovac Lavoslav Ružička. Neke Ružičkine rezultate i zablude, kao i uzroke današnjeg velikog zanimanja za te prirodne spojeve iznosim u ovom članku.

Srećko Bošnjaković izradio je svoju disertaciju pod vodstvom prof. Gustava Janečka, vjerojatno uz prekide, u razdoblju 1885. – 1893. Naslov disertacije “Gerhardtov helenin” ukazuje na nastavak istraživanja strukture pretpostavljene od C. Gerhadta.⁶ Disertacija je pisana na hrvatskom jeziku, tiskana na 12 stranica te sadrži samo empirijske formule za pretpostavljene spojeve, ali bez strukturnih formula, reakcijskih shema ili slika.



Slika 3 – Korijen i stabljika *Inula helenium* L.
Fig. 3 – Root and stem of *Inula helenium* L.

Detaljno se opisuje proces ekstrakcije mljevenog korijena biljke *Inula helenium* L. u narodu poznate pod brojnim imenima, najčešće alant ili aman. Može narasti do 2 m i posjeduje gomoljasti korijen koji uz helenin sadrži i brojne druge biološki aktivne spojeve (slika 3).

Posebno je zanimljiva Bošnjakovićeva opaska u disertaciji da je istraživanja započeo mljevenjem 27 kg (!) korijenja *Inula helenium* L. te digeriranjem u etanolu, filtracijom i taloženjem skupljao pojedine frakcije. Ove je brojnim kristalizacijama iz etanola i vode dalje pročišćavao do kristaličnih uzoraka s više-manje konstantnim talištem kao jedinim indikatorom čistoće uzorka. Za alantolakton Bošnjaković je u disertaciji potvrdio formulu $C_{15}H_{20}O_2$, predloženu od Gerhardta (slika 4).

Elementarnoj analizi podvrgnuta daje zaključiti na empir. formulu $C_{15}H_{20}O_2$, onu istu, što ju podaje i Gerhardt svomu heleninu tališta $72^{\circ}C$, Kallen svomu anhidridu alantove kiseline tališta $66^{\circ}C$, i Posth svomu alantolaktonu tališta $76^{\circ}C$, i što približno odgovara brojevima, dobivenim spaljenjem Janečkove tvari tališta $67.1^{\circ}C$.

Rezultati elementarne analize moje tvari, sušene u vakuumu nad H_2SO_4 do konstantne težine jesu sljedeći:

I. 0.2068 g tvari: 0.5891 g CO_2 , 0.1633 g H_2O
II. 0.2156 g tvari: 0.6149 g CO_2 , 0.1675 g H_2O
III. 0.2279 g tvari: 0.6468 g CO_2 , 0.1757 g H_2O

Nadjeno:

	I.	II.	III.	Računano za $C_{15}H_{20}O_2$:
C	77.69	77.78	77.40	77.59
H	8.77	8.63	8.56	8.62
O	13.54	13.59	14.04	13.79

Slika 4 – Izvadak iz disertacije, gdje se upotrebljavaju nazivi helenin, anhidrid alantove kiseline i alantolakton za spoj empirijske formule $C_{15}H_{20}O_2$

Fig. 4 – Excerpt from Ph. D. Thesis where the names helenine, alantoic acid anhydride, and alantolactone are used for the compound of the empirical formula $C_{15}H_{20}O_2$

Istodobnu upotrebu naziva anhidrid i lakton, iako prva skupina sadrži tri, a druga samo dva kisikova atoma, Bošnjaković je preuzeo iz jednog ranijeg rada. Međutim zapazio je da se u smjesi s alantolaktonom javlja spoj koji prema elementarnoj analizi sadrži treći kisikov atom i nazvao ga je oksialantolakton, a ne anhidrid (slika 5). Struktura tog spoja određena je skoro 100 godina kasnije!

nidin je nadalje bez teka i mirisa, kristalizira dendritički“.

Buduć sam bio u posjedu tako male količine ove, od samoga dra. Janečka pripravljene tvari, da sam mogao tek jednu elementarnu analizu izvesti: ne će biti naravno ni empirička formula, na temelju te analize proračunana, posve pouzdana. Evo rezultata te analize:

0.0768 g tvari: 0.2030 g CO₂, 0.0568 g H₂O

Nadjeno: Računano za C₁₅H₂₀O₃:

C 72.09 72.58

G 8.22 8.06

O 19.69 19.36

Po tom bi taj helenidin mogao biti oksialantolakton, postao oksidacijom alantolaktona na zraku.

Slika 5 – Izvadak iz disertacije, gdje se uporebljava ime oksialantolakton za spoj empirijske formule C₁₅H₂₀O₃

Fig. 5 – Excerpt from thesis where the name oxyalantolactone is used for the compound of empirical formula C₁₅H₂₀O₃

U disertaciji se nadalje opisuje izolacija natrijeve soli kiseline dobivene hidrolizom alantolaktona te priprema slobodne kiseline empirijske formule C₁₅H₂₂O₃ (slika 6).

U vodenoj otopini NaOH tvar je za hlada netopiva, ali se raztapa grijanjem, a iz te se raztopine, kad je dovoljno razrijeđena i suvišna NaOH oprezno kojom kiselinom neutralizovana, ohladjenjem i stajanjem izlučuju pahulje mikroskopskih, igličastih kristala, svjetlucavih, lako topivih u hladnoj a još laglje u toploj vodi.

Nekolikoputnim prekrizalizovanjem čišćena, zatim sušena u eksikatoru do konstantne težine i spaljena uz dodatak H₂SO₄ daje: 0.2342 g tvari: 0.0602 g Na₂SO₄, što čini 8.33% Na, a formula C₁₅H₂₁O₃Na zahtieva 8.46% Na.

Slika 6 – Opis hidrolize alantolaktona i određivanje postotka natrija u soli

Fig. 6 – Description of hydrolysis of alantolactone and determination of sodium percentage in the salt

Iz anhidrida pripravljen je amid, a iz slobodne kiseline srebrove i barijeve soli. U zaključku disertacije Bošnjaković ističe da objavljuje samo dio svojega rada te se nada nastavitu istraživanja (slika 7).

No on nije uspio nastaviti istraživanja alantolaktona i srodnih spojeva. Životni put odveo ga je prema osnivanju privatnog laboratorija, danas bi rekli kontrolno-analičkog laboratorija, za utvrđivanje kvalitete vode, vina, i niza drugih proizvoda iz poljoprivrede i šumarstva, a zatim i prema akademskoj karijeri.^{7,8}

Za sada objelodanujem ovaj dio svoga rada sa nakanom, da i ostale frakcije proučim, čim mi vrieme bude dopustilo. Ako ne uspijem, da frakcionovanom kristalizacijom iz preostalog mi materijala posve odstranim gore nabrojene slučenine i izoliram one, koje, kako se čini, u pretežnoj količini sačinjavaju sirovi helenin, pokušati ću frakcionovanim taloženjem odnosno kristalizacijom kojega derivata to postići, pri čem bih se i mogao nadati, da ću laglje do cilja doći.

Slika 7 – Zaključni stavak iz Bošnjakovićeve disertacije

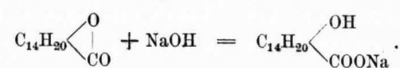
Fig. 7 – Final statement in Bošnjaković's thesis

Pregledom objavljenih radova o heleninu prije i u vrijeme izrade Bošnjakovićeve disertacije uočio sam da je i Gerhard u svojem radu navodio samo empirijske formule i koristio se nazivom helenin.⁶ Njegov eksperimentalni pristup primijenio je i Bošnjaković, a kao dokaz identiteta pročišćenih spojeva oba navode samo CH-analize. Određeni napredak postigao je J. Kallen, koji je pročišćeni spoj formule C₁₅H₂₀O₂ označio kao alantkamfor, helenin, ali i anhidrid alantove kiseline.⁹ Njegov rad citira Bošnjaković u svojoj disertaciji. No Kallen čini zanimljivu pogrešku, helenin naziva i anhidridom alantove kiseline, vjerojatno na osnovi njegove lake hidrolize u baznom mediju, iako bi empirijska formula trebala sadržati tri O-atoma! Taj "anhidrid" on hidrolizira u kiselinu ili amonolizom u amid, a iz kiseline pripravlja niz soli, slično rezultatima koje opisuje S. Bošnjaković.

Vrlo je zanimljivo da je prvi put ime alantolakton predložio W. Posth u svojoj disertaciji objavljenoj 1892. i zatim u radu iz 1895., dakle istodobno s Bošnjakovićevim radom na disertaciji. Bošnjaković Posthovu disertaciju poznaje i citira te se vjerojatno potaknut njome koristi imenom alantolakton. U prethodno objavljenom radu Posth prvi put daje zanimljiv prikaz djelomične strukturne formule alantolaktona (slika 8).¹⁰

schiedenes zum Ausdruck bringen. Wie bereits bemerkt, gab Kallen der aus dem Helenin Gerhardt's erhaltenen Säure den Namen Alantsäure; da nun durch nachfolgende Untersuchung erwiesen wird, dass diese Säure eine Oxysäure ist, welche sich sehr leicht in das ihr entsprechende Lacton umwandelt, so soll die Oxysäure den Namen Alantolsäure und ihr Lacton — das Helenin — die Bezeichnung Alantolacton erhalten.

Lacton und Essigsäureanhydrid zurück. Durch Erwärmen mit Alkalien geht das Alantolacton in das Alkalisalz der Oxysäure über, gemäss der Gleichung:

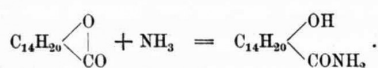


Slika 8 – Posthova argumentacija za ime alantolakton i prijedlog formule¹⁰

Fig. 8 – Posth's argumentation for the name alantolactone and proposed formula¹⁰

On dakle također ne zna strukturu alantolaktona, ali pretpostavlja postojanje laktonske skupine te provodi amonolizu i daje reakcijsku shemu (slika 9).

4) a. Durch Einwirkung von alkoholischem Ammoniak in der Kälte auf das Alantolacton erhält man das Amid der Oxy-säure, nach der Formel



Slika 9 – Opis pokusa i reakcijska shema amonolize alantolaktona¹⁰

Fig. 9 – Description of the experiment and reaction scheme for ammonolysis of alantolactone¹⁰

Bošnjaković međutim u svojoj disertaciji ne upotrebljava tu “parcijalnu” strukturnu formulu alantolaktona.

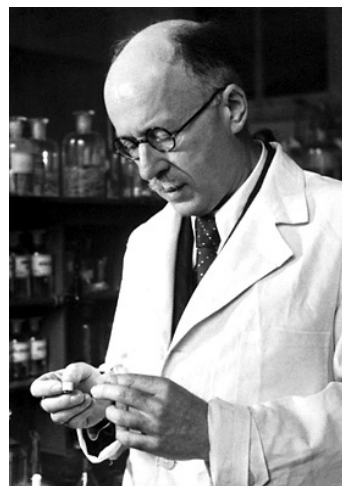
Zanimljivo je da se nakon tih radova skoro 40 godina ne pojavljuju radovi s područja kemije i strukture alantolaktona. Tek nakon 1930. godine drugi hrvatski organski kemičar nobelovac Lavoslav Ružička u svojim radovima o prirodnim spojevima, posebno terpenima i seskviterpenima, pristupa istraživanju alantolaktona.

Ružičkin doprinos poznavanju strukture – kako zapravo izgleda seskviterpen alantolakton?

Potvrdivši u disertaciji empirijsku formulu alantolaktona ($C_{15}H_{20}O_2$), priredivši amid i neke soli odgovarajuće kiseline te ukazavši na prisutnost oksialantolaktona ($C_{15}H_{20}O_3$) u ekstraktu korijena *Inula helenium* L., Bošnjaković je dao vrijedan doprinos poznavanju prirodnih spojeva iz skupine seskviterepena. No ostao je otvoren niz pitanja vezanih uz strukturu i stereokemijsku građu alantolaktona na koja u to vrijeme nije bilo moguće dati odgovor dostupnim metodama u sintetskoj i analitičkoj organskoj kemiji. Ovdje navodimo najvažnija:

- kako je izgrađen C_{15} -ugljikov kostur alantolaktona
- koliko prstena ili višestrukih veza sadrži
- koja je relativna konfiguracija oko C-atoma; cis/trans, E/Z
- koja je apsolutna konfiguracija na kiralnim centrima, asimetričnim C-atomima; R ili S?

Točne odgovore na ta pitanja dala je moderna organska kemija tek nakon 1950. godine, o čemu je riječ i u sljedećem poglavlju. Ipak prvu strukturnu formulu alantolaktona predlaže Ružička i daje odgovore na neka od gore postavljenih pitanja u okviru svojih radova na području seskviterepena objavljenih 1931. – 1933.^{11–13} Sigurno je da su ta istraživanja seskviterepena doprinijela Ružičkinu ukupnom znanstvenom opusu za koji mu je 1939. dodijeljena Nobelova nagrada (slika 10).



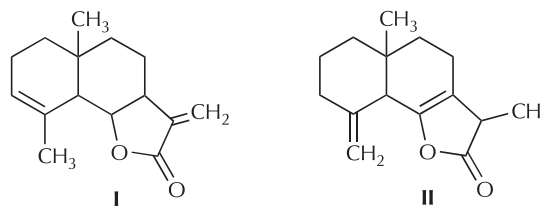
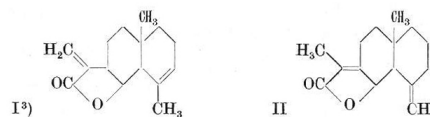
Slika 10 – Prof. Lavoslav Ružička (1887. – 1976.), dobitnik Nobelove nagrade 1939.

Fig. 10 – Prof. Lavoslav Ružička (1887–1976), 1939 Nobel laureate

Zanimljivo je dakle da su dva hrvatska kemičara u razmaku od skoro pola stoljeća istraživala strukturu tog prirodnog spoja i tako postavila temelje suvremenim znanjima na tom području.

U prvim radovima o alantolaktonu Ružička je predložio strukture I i II za alantolakton i izoalantolakton (slika 11).¹¹ Obje su se kasnije pokazale djelomično pogrešnim kako s obzirom na položaj aneliranog laktonskog prstena na dekalinski skelet, tako i s obzirom na položaj jedne dvostruke veze.

Auf Grund der bisher vorliegenden experimentellen Ergebnisse konnte man mit grosser Wahrscheinlichkeit für das Alantolacton Formel I und für das Iso-alantolacton Formel II ableiten²⁾:



Slika 11 – Ružičkin prijedlog formula alantolaktona i izoalantolaktona¹¹ te iste formule orijentirane u skladu s IUPAC-ovim pravilima o prikazu policikličkih spojeva

Fig. 11 – Ružička's proposal for the formula of alantolactone and isoalantolactone,¹¹ and the same formulas oriented according to IUPAC rules for polycyclic compounds

Pokušat ćemo razumjeti razloge za tako pretpostavljenu strukturu. U to vrijeme Ružička je postavio svoje zname-

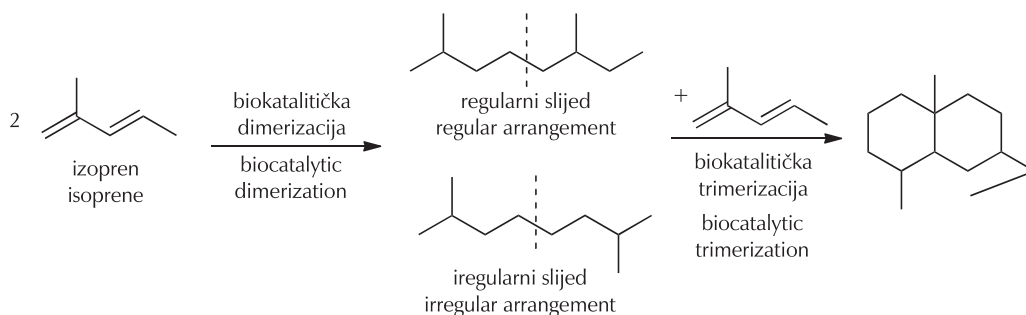
nito izoprensko pravilo koje kaže “ugljikov skelet terpena izgrađen je od izoprenskih jedinica u regularnom ili iregularnom slijedu” (slika 12).¹⁴

Primjer za biokatalitičku polimerizaciju tri mola izoprena u seskviterpene prikazana je na slici 13.

Ako pretpostavimo da je u to vrijeme bio poznat jednostavan izraz za računanje ekvivalenata dvostruke veze (EDV), tj. broja dvostrukih veza i prstena u molekuli poznate empirijske formule, tada je prema tom izrazu iz empirijske

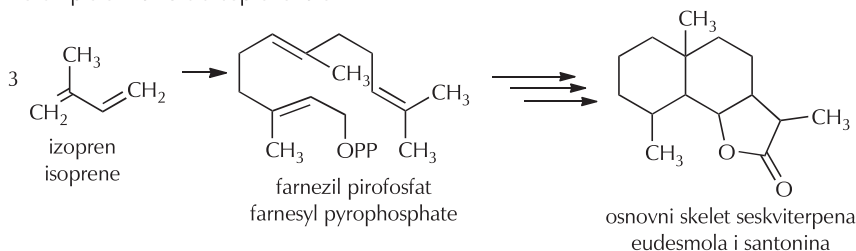
formule alantolaktone bilo lako odrediti da sadrži 6 EDV, slika 14.

Možemo zaključiti da je Ružička pretpostavio strukturu dekalina u molekuli alantolaktone te peteročlani lakton. Tako dobivamo definirana četiri EDV, tri prstena i vezu C=O u laktonu. Preostala dva ekvivalenta nezasićenosti velikom vjerojatnošću pripadaju dvjema vezama C=C. Sada se javlja pitanje detaljnije strukture, gdje je priključen laktonski prsten na dekalinski segment i gdje se nalaze dvostruke veze (slika 14)? Na prijedlog struktura I i II za alantolaktone



Slika 12 – Opća shema za izoprensko pravilo, nastajanje diterpena i seskviterpena
Fig. 12 – General scheme for the isoprene rule, formation of diterpenes and sesquiterpenes

primjer za Ružičkino izoprensko pravilo
an example of Ruzicka's isoprene rule



Slika 13 – Polimerizacije izoprena u seskviterpene
Fig. 13 – Polymerization of isoprene to sesquiterpenes

osnovna saznanja o strukturi alantolaktone,
dostupna na osnovi empirijske formule i Ružičkina terpenkog pravila

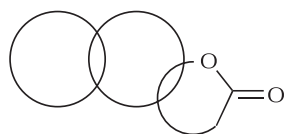
basic knowledge of the structure of alantolactone,
based on the empirical formula and Ruzicka's terpene rule

elementi nezasićenosti,
ekvivalent dvostruke veze (EDV)
EDV = Σ dvostruke veze + prstenovi

$$C_aH_b(O_c) \quad EDV = \frac{(2a+2)-b}{2} \quad C_{15}H_{20}(O_2) \Rightarrow EDV = 6!$$

elements of unsaturation,
double bond equivalent (DBE)
DBE = Σ double bonds + rings

$$C_aH_b(O_c) \quad DBE = \frac{(2a+2)-b}{2} \quad C_{15}H_{20}(O_2) \Rightarrow DBE = 6!$$



struktura dekalina
structure of decaline

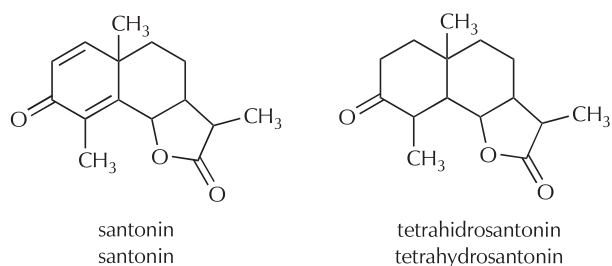
lakton
lactone

EDV = tri prstena + C=O = 4
do EDV = 6 treba odrediti položaj dviju dvostrukih veza!

DBE = three rings + C=O = 4
for DBE = 6 we need to know the position of the two double bonds!

Slika 14 – Mogući put prema prvom prijedlogu strukture alantolaktone
Fig. 14 – Possible route to the first proposal of the structure of alantolactone

izoalantolaktone s 5-eročlanim laktonskim prstenom Ružička je vjerojatno bio potaknut i radovima Cleoma i Hawortha u kojima je određena struktura santonina i tetrahidrosantonina (slika 15).¹⁵ U tim strukturama potvrđen je *angulirani položaj laktonskog prstena*, što je vjerojatno potaklo Ružičku na prijedlog struktura **I** i **II** u slici 11.



Slika 15 – Strukture santonina i tetrahidrosantonina¹⁵
Fig. 15 – Structures of santonine and tetrahydrosantonine¹⁵

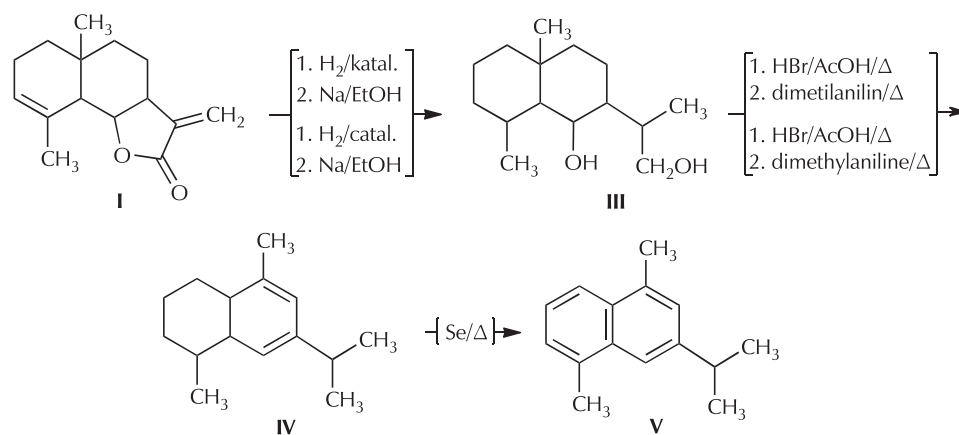
Iako su se strukture alantolaktone i izoalantolaktone pokazala pogrešnim, priprava čistih uzoraka zahtijevala je enorman eksperimentalni rad. Ružička navodi u eksperimentalnom dijelu jednog rada da je za pripremu čistog alantolaktone bilo potrebno provesti oko 300 kristalizacija (slika 16)!¹²

Zuerst krystallisierte das schwerlösliche Dihydro-iso-alantolacton aus, dann das Iso-alantolacton und schliesslich das Alantolacton, dessen Reinigung am meisten Schwierigkeiten machte. Es waren dazu etwa 300 Krystallisationen nötig. Die Präparate wurden bis zum

Slika 16 – Izvadak iz eksperimentalnog dijela Ružičkinog rada u Helv. Chim. Acta 1931.¹²

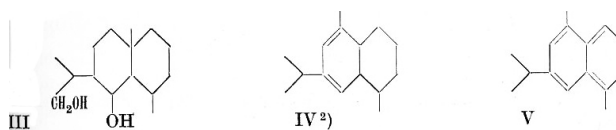
Fig. 16 – Detail from the experimental part of the Ružička paper in Helv. Chim. Acta 1931¹²

Strukture **I** i **II** Ružička želi potvrditi 1933. god. u svojem sljedećem radu iz područja seskviterpena i to reakcijama



Shema 1 – Ružičkin prikaz transformacije pretpostavljenog alantolaktone **I** u spojeve **III** – **V**¹³
Scheme 1 – Ružička's presentation of the transformation of proposed alantolactone **I** to compounds **III**–**V**

odgradnje i hidrogenacije do spojeva poznate strukture, dakle *kemijskom korelacijom*.¹³ Posebno je zanimljiv postupak dokazivanja strukture **I** pripremom derivata **III** – **V** (slika 17).¹³



Slika 17 – Ružičkin prijedlog dokaza strukture alantolaktone **I** prevođenjem u spojeve **III** – **V**¹³

Fig. 17 – Ružička's proposal for proving the structure of alantolactone **I** by transformation to compounds **III**–**V**

Spojevi **III** i **IV** derivati su potpuno i djelomično hidriranog naftalena, a spoj **V** je trialkilirani naftalen. Njihova priprava iz pretpostavljene strukture alantolaktone prikazana je u shemi 1, na osnovi podataka koje daje Ružička u svojem originalnom radu.¹³

Strukturu 1,5-dimetil-7-izopropil naftalena **V** dokazao je neovisnom sintezom, dok migraciju metilne skupine s atoma u premoštenju na atom C(5) tumači "pregradnjom pinakolnog tipa iscrpno bromiranog intermedijara". Bitno je međutim uočiti da spojevi **IV** i **V** *ne otkrivaju ni položaj dvostrukih veza niti položaj aneliranog laktonskog prstena u polaznom alantolaktone*. Stoga zapravo te transformacije ne potvrđuju jednoznačno predloženu strukturu **I**!

Možemo zaključiti da su Ružičkini radovi predstavljali velik doprinos razumijevanju strukture politerpena, posebno seskviterpena, iako u njima nije potpuno točno određena struktura alantolaktone i izoalantolaktone. Trebalo je proći četvrt stoljeća dok moderne sintetske i spektroskopske metode u organskoj kemiji nisu omogućile korekciju strukture tih spojeva. Nakon toga se pristupilo i određivanju *relativne i apsolutne konfiguracije* u enantiomerno čistom prirodnom (+)-alantolaktone za koji su u posljednjim desetljećima zapažena brojna zanimljiva biološka djelovanja.

Opaska. Zanimljivo je da D. Grdenić, pišući o S. Bošnjakoviću (Kem. u Ind. 42 (1993) 171–186), ne opaža da je Ružičkin prijedlog strukture alantolaktona dijelom pogrešan! Grdenić kaže: "Vrijedi spomenuti da je strukturu alantolaktona odredio L. Ružička sa suradnicima četrdeset godina kasnije: Helv. Chim. Acta 14 (1931) 1090, ibid. 16 (1933) 268. Potvrdili su formulu $C_{15}H_{20}O_2$ koju je odredio Bošnjaković, ali ga nisu citirali. Za njegov članak objavljen u Rađu JAZU 113 (1893) 140, nisu znali. Nije bio referiran u Chem. Zentralblattu".

Zahvaljujem prof. S. Paušek-Badždar koja me upozorila na ovaj tekst akademika D. Grdenića.

Novija strukturna istraživanja alantolaktona

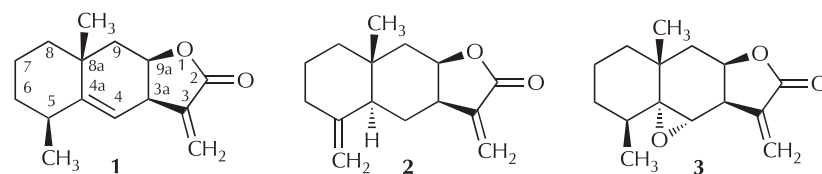
Ispravno određivanje strukture i stereokemijske građe alantolaktona omogućio je napredak sintetskih i spektroskopskih metoda u organskoj kemiji u drugoj polovici prošlog stoljeća. Tomu su slijedile sinteze alantolaktona i izoalantolaktona, oba u racemičnom obliku, te istraživanja bioloških svojstava i priprava njihovih derivata, o čemu se govori u sljedećem poglavlju.

Ovdje ćemo prvi put pokazati danas prihvaćene strukture alantolaktona **1**, izoalantolaktona **2** i oksialantolaktona **3**, spojeva koje još u svojoj disertaciji spominje S. Bošnjaković, dok je strukturu prvoga pokušavao odrediti L. Ružička!

Alantolakton **1** i izoalantolakton **2** sadrže četiri kiralna, stereogena ili asimetrična centra, a oksialantolakton čak 6. Na slici 18 uz formulu **1** navedeno je puno kemijsko ime alantolaktona i numeracija prema IUPAC-u. Navedene su danas prihvaćene apsolutne konfiguracije na kiralnim centrima. Dakle četiri asimetrična centra u prirodnom (+)-alantolaktonu posjeduju konfiguraciju 3aR,5S,8aR,9aR. Ovdje se primjenjuje danas prihvaćena Cahn-Ingold-Prelova (CIP) konvencija.¹⁶

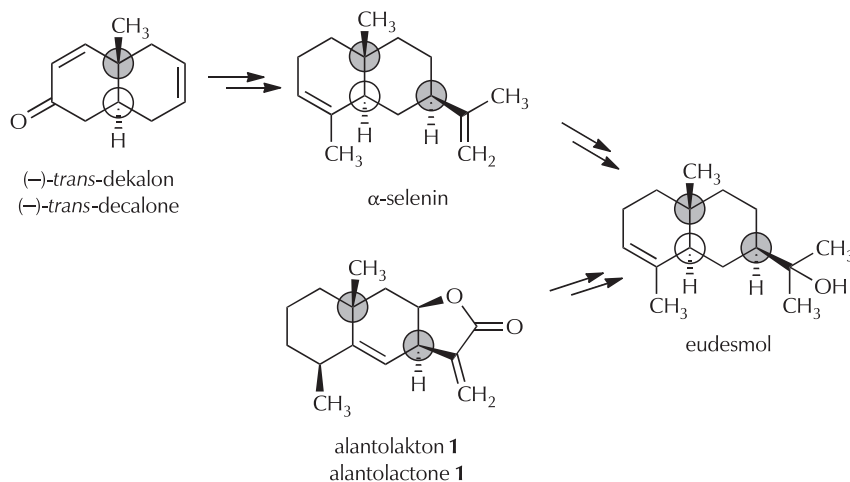
Dug je bio put kojim se došlo do strukture alantolaktona **1**, tražio se niz sintetskih korelacija sa spojevima poznate strukture i spektroskopskih podataka.

Prvom sintetskom korelacijom s eudesmolom određena je (R)-apsolutna konfiguracija na C(3a) i C(8a) atomima u premoštenjima alantolaktona.¹⁷ Time je pokazano da metilna skupina u premoštenju dekalona zauzima β -položaj, tj. iznad ravnine planarne strukture, kako je utvrđeno za niz seskviterpena i steroida. Apsolutna konfiguracija eudesmola utvrđena je na osnovi sinteze iz optički istog (-)-trans-dekalona.^{17,18}



Slika 18 – (+)-Alantolakton (3aR,5S,8aR,9aR)-3a,5,6,7,8,8a,9,9a-oktahidro-5,8a-dimetil-3-metilen-nafto[2,3-b]furan-2(3H)-on (**1**), izoalantolakton (**2**) i oksialantolakton (**3**)

Fig. 18 – (+)-Alantolactone (3aR,5S,8aR,9aR)-3a,5,6,7,8,8a,9,9a-octahydro-5,8a-dimethyl-3-methylene-naphtho[2,3-b]furan-2(3H)-one (**1**), isoalantolactone (**2**) and oxialantolactone (**3**)



Shema 2 – Korelacija apsolutne konfiguracije na C(8a) i C(3a) atomima alantolaktona **1** s poznatom strukturom (-)-trans-dekalona preko α -selenina i eudesmola¹⁷

Scheme 2 – Correlation of the absolute configuration on C(8a) and C(3a) atoms of alantolactone **1** with known structure of (-)-trans-decalone over α -selenine and eudesmole¹⁷

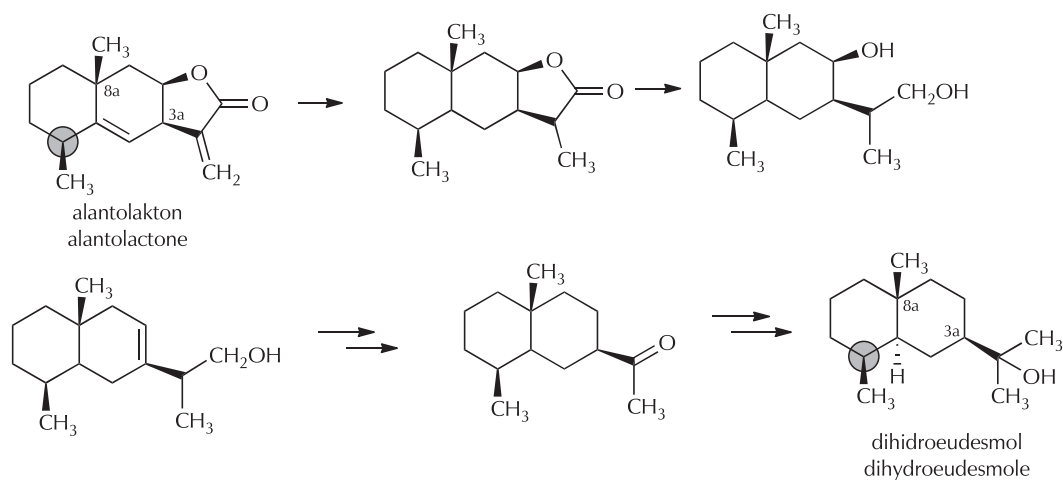
Nešto kasnije Tanabe i suradnici pokazali su da je laktonski prsten linearno, a ne angularno vezan na dekalinski kostur,^{19,20} odn. da se skupina OH nalazi na C(9a) a ne na atomu C(4) prema IUPAC-ovoj numeraciji. Isti autori su alantolakton preveli nizom reakcija u dihidroeuodesmol poznate apsolutne konfiguracije čime je potvrđena (*R*)-apsolutna konfiguracija na C(8a) i C(3a) kiralnim centrima, ali i utvrđena (*S*)-konfiguracija na atomu C(5) (shema 3).¹⁹

Kada je određena β -relativna konfiguracija C(5) metilne skupine u alantolaktonu, bilo je to neočekivano jer se tada nalazi u aksijalnom, dakle stereokemijski nepovoljnijem položaju na cikloheksanskom prstenu.^{21,22} Koju godinu poslije češki autori su potvrdili kemijskom korelacijom strukture tetrahydroalantolaktone s kostolom, za koji je bilo poznato da posjeduje apsolutne konfiguracije 3a*R*, 4a*S* i 8a*R* na kiralnim centrima (shema 4).²³

Cocker i sur. proveli su kemijsku korelaciju tetrahydroalantolaktone sa f-santoninom (shema 5).²⁴

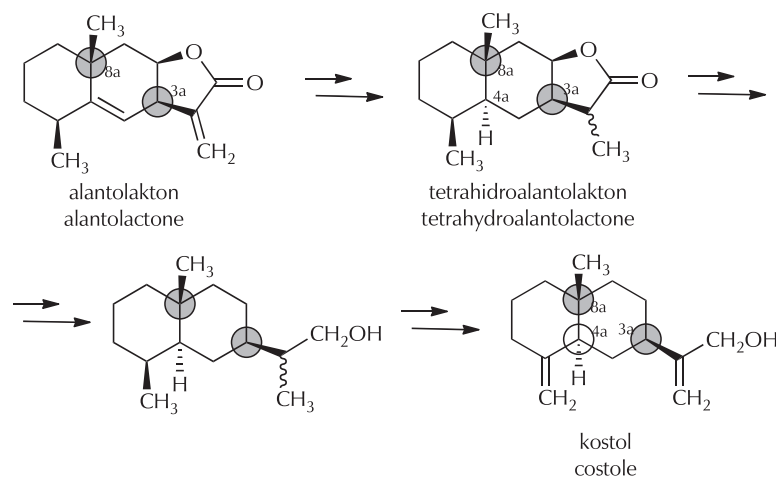
U toj je sintezi realizirana zanimljiva migracija laktonske skupine iz angularnog u linearni položaj na dekalinskom prstenu. Zatim treba uočiti da polazni lakton posjeduje *trans*-konfiguraciju, dok je za tetrahydroalantolaktone *cis*-konfiguracija tek pretpostavljena. Tako je ostalo otvoreno pitanje je li laktonski prsten u alantolaktonu i dihydroalantolaktonu vezan *cis*- ili *trans*- na dekalin. Drugim riječima ostala je nerazjašnjena apsolutna konfiguracija na atomu C(9a). U tu svrhu primijenjena je jedna tada moderna *kiroptička metoda*. Ona se zasniva na spektroskopskom podatku; predznaku krivulje *optičke rotacijske disperzije* (ORD), kojem doprinosi laktonski centar prema Hudson-Klyne-ovom pravilu.²⁵

Prema navedenom pravilu, ako vodikov atom u γ -laktonu s kiralnim centrom na C-atomu koji nosi aciliranu hidrosilnu supinu (alkoksi ugljikov atom) leži ispod ravnine crteža u prikazanoj projekciji na slici 19, tada je taj lakton dekstrorotatoran, odn. pokazuje pozitivnu ORD-krivulju, i



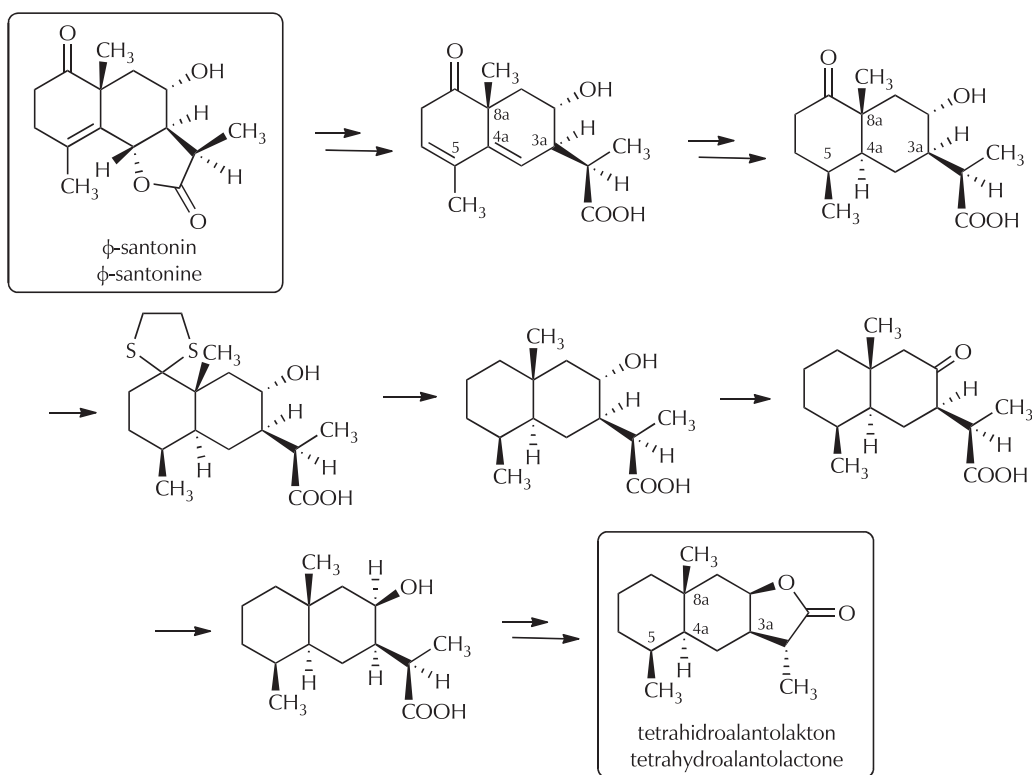
Shema 3 – Kemijska korelacija alantolaktone i dihydroeuodesmole¹⁹

Scheme 3 – Chemical correlation of alantolactone with dihydroeuodesmole¹⁹



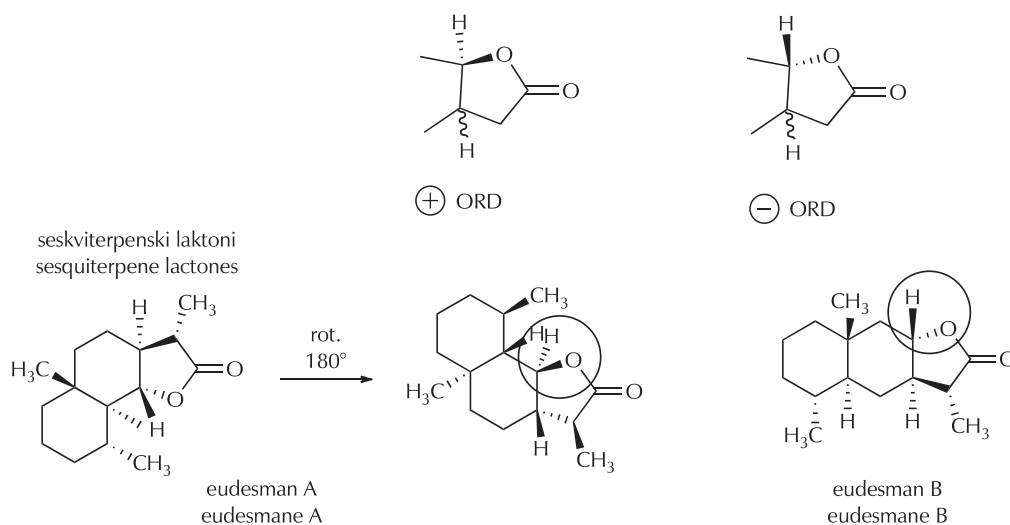
Shema 4 – Kemijska korelacija(+)-alantolaktone i kostole²³

Scheme 4 – Chemical correlation of alantolactone with costole²³

Shema 5 – Kemijska korelacija tetrahidroalantolaktona i f-santonina²⁴Scheme 5 – Chemical correlation of tetrahydroalantolactone and f-santonine²⁴

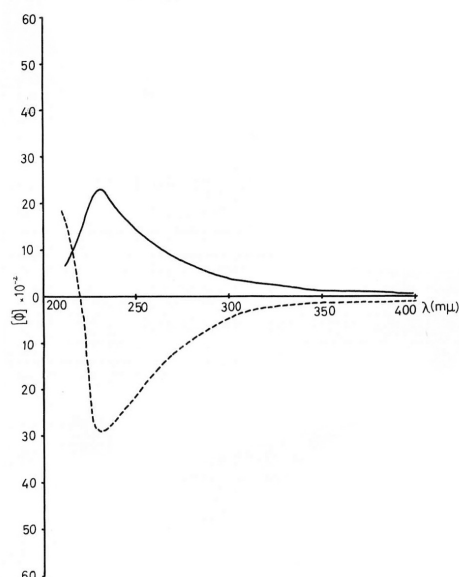
obrnuto. Na slici 19 rotirana je formula eudesmana **A** tako da se jasno vidi α -H-atom na alkoksi C-atomu.²⁷ Na istoj slici pokazana je projekcija laktonske skupine seskviterpenskog laktona, eudesmana **A** i **B**, koji posjeduju suprotne apsolutne konfiguracije na alkoksilnom ugljikovu atomu.^{26,27}

Na slici 20 vidimo da je ORD-krivulja za eudesman **A** pozitivna u skladu s navedenim pravilom te iz strukturne formule slijedi (*R*)-konfiguracija na alkoksi C-atomu. Negativna krivulja za strukturni izomer **B** ukazuje na (*S*)-konfiguraciju na analognom kiralnom centru.



Slika 19 – Enantiomerne konfiguracije g-laktona i suprotni predznaci pripadnih ORD-krivulja; prikaz eudesmana A i B suprotnih konfiguracija na alkoksilnom C-atomu

Fig. 19 – Enantiomeric configurations of g-lactones and opposite signs of their ORD curves; presentation of eudesmanes A and B with opposite configurations on the alkoxy C-atom

Slika 20 – ORD krivulje eudesmana **A** (—) i **B** (---)²⁶Fig. 20 – ORD curves of eudesmane **A** (—) and **B** (---)²⁶

Tetrahydroalantolactone (X), although of general type (IX), shows a plain negative o.r.d. curve at low wavelength. This lactone and similar related compounds are now being investigated in collaboration with Professor W. Cocker (Trinity College, Dublin).

Slika 21 – Izvadak iz rada citiranog u ref. 25

Fig. 21 – Excerpt from the paper cited in ref. 25

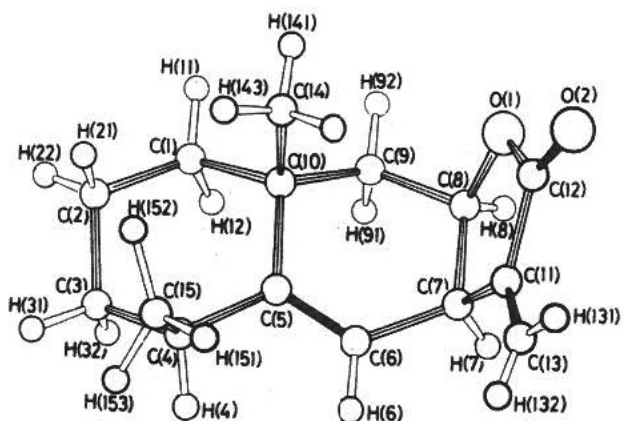
Iznenadjenje se javilo pri pokušaju određivanja tom metodom apsolutne konfiguracije na C(9a) u tetrahydroalantolaktonu! U originalnom radu autori navode kako citiramo (slika 21).²⁵

Dakle tetrahydroalantolaktone je iznenađujuće odstupio od Hudson-Klyneova pravila i pokazao negativnu ORD-krivulju umjesto očekivane pozitivne, tj. izostala je potvrda (*R*)-konfiguracije na C(9a). Autori su najavili rješenje tog problema, ali ga nisam našao objavljenog. Kasnije su međutim u više navrata drugi autori pokazali da se javljaju iznimke od "laktorskog pravila" kada na predznak ORD-krivulje utječu drugi kiralni centri u molekuli koji se nalaze u blizini stereoelektronskog okoliša kiralnog centra laktanske skupine.

No svi rezultati objavljeni u literaturi ipak konvergiraju prema definiciji apsolutne konfiguracije na četiri kiralna centra u alantolaktoneu kao 3a*R*,5*S*,8a*R*,9a*R*, kao što je pokazano u formuli **1** na str. 18.

Godine 1986. provedena je prva rendgenska strukturalna analiza uzorka prirodnog (+)-alantolaktonea te strukturalna molekule prikazana na slici 22.²⁸

U slici se ne primjenjuje IUPAC-ova numeracija, ali strukturalna jasno pokazuje β-položaj metilnih skupina na C-atomima ovdje označenim C(4) i C(10) i *cis*-fuzionirani 5-eročlani laktanski prsten u konformaciji planarizirane omotnice (engl. *flattened envelope*). Posebno je značajna

Slika 22 – Kristalna strukturalna (+)-alantolaktonea²⁸Fig. 22 – Crystal structure of (+)-alantolactone²⁸

izloženost reaktivne α-metilenske skupine laktone koja je skoro u okomitom položaju prema bicikličkom kosturu. Kako ćemo vidjeti, toj strukturalnoj značajki kao i reaktivnosti enona pripisan je bitan doprinos biološkim djelovanjima, posebno antitumornom, alantolaktonea i nizu drugih α-metilen-γ-laktonea.

Konfiguracije na kiralnim centrima u strukturalni na slici 22 odgovaraju onima u formuli **1**. No valja ipak istaknuti da u

tom radu nije određena apsolutna konfiguracija (+)-enantiomera alantolaktana **1** prikazana na slici 22, nego je izvedena iz prethodnih kemijskih korelacija koje se ovom poglavlju analiziraju. Naime, određivanje apsolutne konfiguracije rendgenskom strukturnom analizom zahtijeva primjenu Bijvoetove metode anomalne disperzije (engl. *anomalous dispersion*, ili *resonant scattering*), koju autor u ovom radu nije primijenio.²⁹ Prema pretraživanju baze podataka CSD-a verzija 5.37, do studenoga 2015. određeno je 12 kristalnih struktura alantolaktana, izolanolaktana, njihovih epoksida i još nekoliko derivata.*

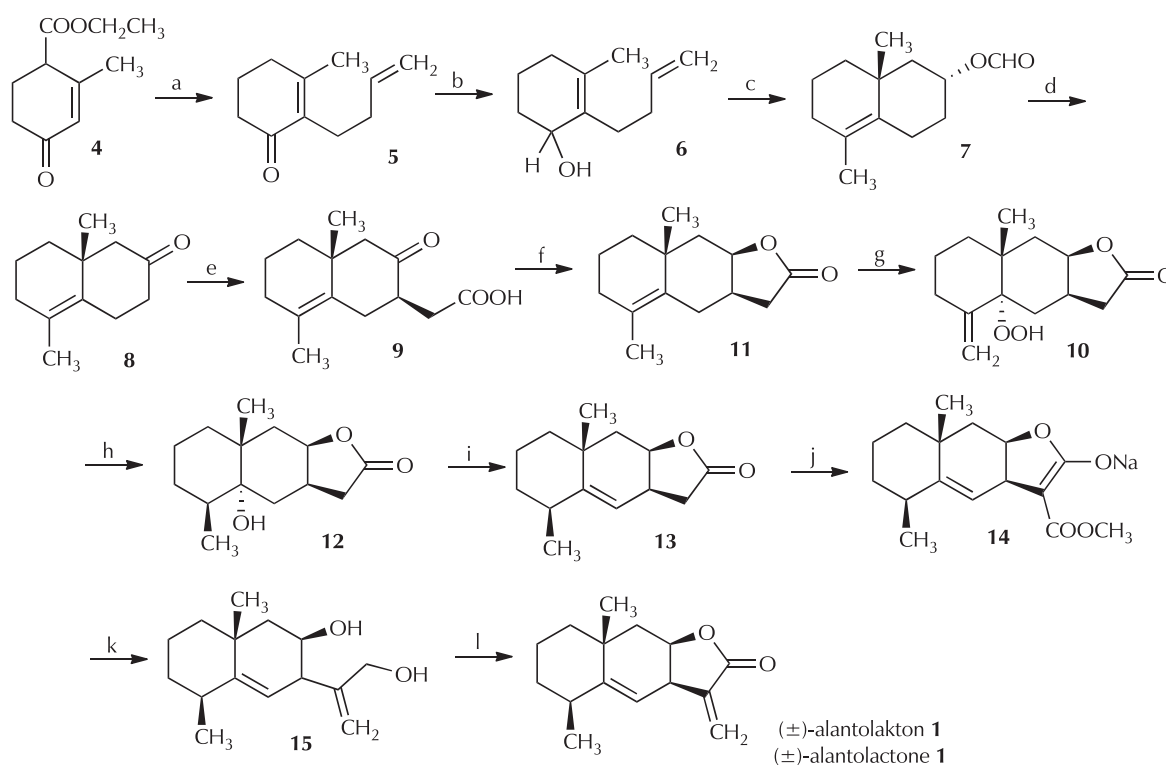
I tako se pokazuje da se predložena apsolutna konfiguracija alantolaktana zasniva na kemijskoj i spektroskopskoj korelaciji sa sličnim strukturama, od kojih ova zadnja nije jednoznačna. Ipak možemo sa sigurnošću reći da je struktura (+)-alantolaktana **1** potpuno u skladu s današnjim znanjima o građi brojnih sličnih terpena i seskviterpena.

* Zahvaljujem kolegama dr. sc. Mariji Luić i dr. sc. Zoranu Štefaniću u Instituta Ruđer Bošković za provedeno pretraživanje i pripremljene podatke.

Sinteze racemata alantolaktona i izoalantolaktona

Radovi na utvrđivanju strukture alantolaktana i prvi rezultati bioloških istraživanja koja su ukazivala na niz potencijalnih terapijskih svojstava potaknuli su totalne sinteze tih spojeva. Prvom *stereoselektivnom sintezom* pripremljen je racemat alantolaktana (\pm)-**1** polazeći od lako dostupnog Hagemannova estera **4**. Budući da alantolaktan posjeduje 4 kiralna centra, mogući broj stereoisomera je 2^4 odn. 16. Tom sintezom priređen je jedan od osam mogućih racemata (shema 6).³⁰

U shemi su prikazane apsolutne konfiguracije kao i u originalnom radu, koje odgovaraju onima u prirodnom (+)-alantolaktanu iako u to vrijeme one nisu bile jednoznačno potvrđene. Struktura pripremljenog racemata potvrđena je poredbom s IR i ¹H-NMR-spektrima prirodnog (+)-alantolaktana te retencijskim vremenom u plinskoj kromatografiji. Ključne korake u toj sintezi predstavljaju c), konstrukcija karbocikličkog kostura olefinskom ciklizacijom **6** u **7**, g) modifikacija ugljikovog skeleta stereoselek-

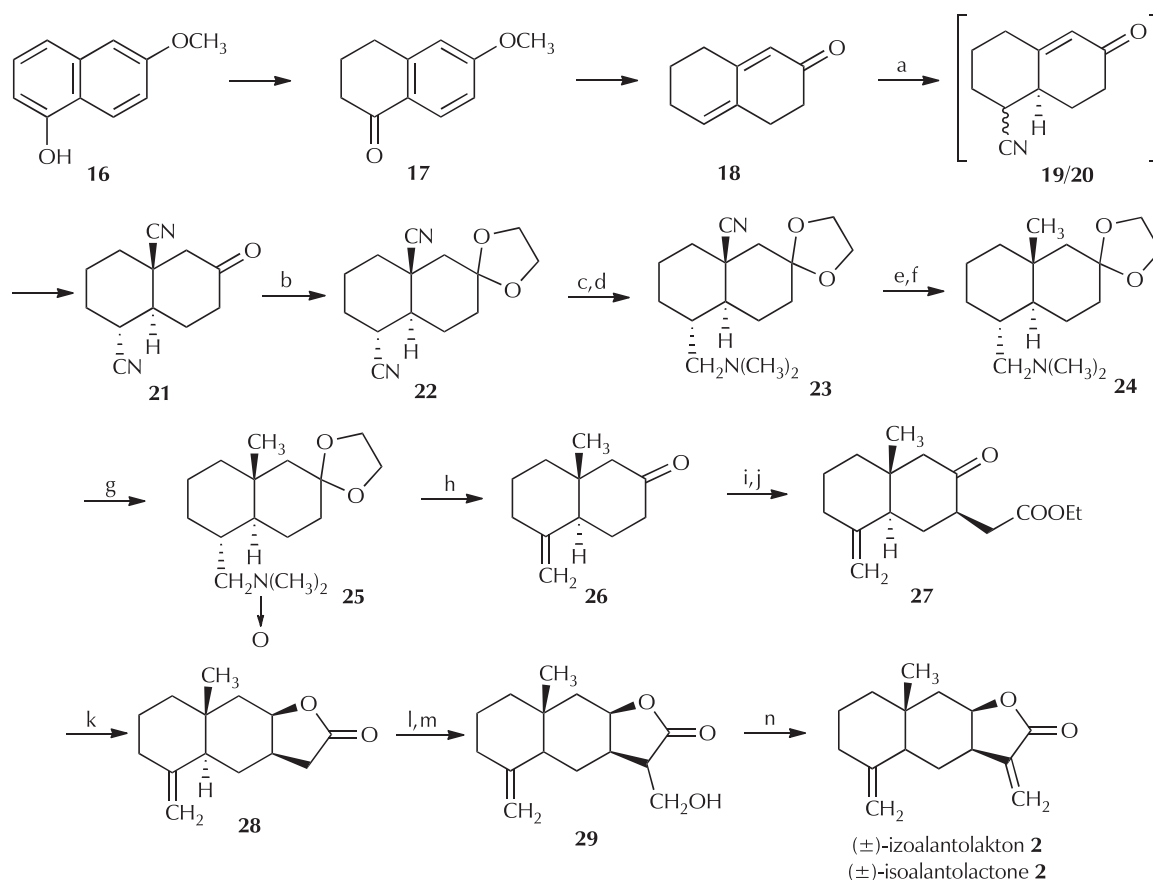


Shema 6 – Prva totalna sinteza racemičnog alantolaktana.³⁰

Reakcijski uvjeti i reagensi: a) NaH/4-brombut-1-en, zatim 15 % KOH/EtOH/ Δ , b) MeLi/Et₂O, c) HCOOH/ Δ , d) H₂CrO₄/MeOH, e) pirrolidin, BrCH₂COOEt/KOH, f) CH₂N₂/Et₂O, KBH₄/MeOH, g) h v, O₂/Et₂O, h) Pd/C, H₂, i) SOCl₂/piridin, j) NaH/C=O(OMe)₂, k) LiAlH₄/Et₂O, l) MnO₂/benzene

Scheme 6 – First total synthesis of racemic alantolactone³⁰

The reaction conditions and reagents: a) NaH/ 4-bromobut-1-ene, then 15 % KOH/EtOH/ Δ , b) MeLi/Et₂O, c) HCOOH/ Δ , d) H₂CrO₄/MeOH, e) pyrrolidine, BrCH₂COOEt/KOH, f) CH₂N₂/Et₂O, KBH₄/MeOH, g) h v, O₂/Et₂O, h) Pd/C, H₂, i) SOCl₂/pyridine, j) NaH/(C=O(MeO)₂, k) LiAlH₄/Et₂O, l) MnO₂/benzene



Shema 7 – Prva sinteza sinteza (±)-izoalantolaktona³¹

Reakcijski uvjeti i reagensi: a) AlEt_3 , HCN, b) $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, H^+/Δ , c) Pd, H_2 , d) HCHO, NaBH_4 , e) $\text{Al}(\text{Bu})_2\text{H}$, f) 85 % NH_2NH_2 , H_2O , $\text{KOH}/\text{glikol}/\Delta$, g) MCPBA/ Δ , h) 80 % AcOH/Δ , i) piroolidin/ Δ j) $\text{CH}_2\text{BrCOOEt}$, k) $\text{NaBH}_4/\text{MeOH}$, l) HCOOEt , NaH, m) $\text{NaBH}_4/\text{MeOH}$, n) TsCl/piridin/ Δ

Scheme 7 – First synthesis of (±)-isovalantolactone³¹

The reaction conditions and reagents: a) AlEt_3 , HCN, b) $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, H^+/Δ , c) Pd, H_2 , d) HCHO, NaBH_4 , e) $\text{Al}(\text{Bu})_2\text{H}$, f) 85 % NH_2NH_2 , H_2O , $\text{KOH}/\text{glycol}/\Delta$, g) MCPBA/ Δ , h) 80 % AcOH/Δ , i) pyrrolidine/ Δ j) $\text{CH}_2\text{BrCOOEt}$, k) $\text{NaBH}_4/\text{MeOH}$, l) HCOOEt , NaH, m) $\text{NaBH}_4/\text{MeOH}$, n) TsCl/pyridine/ Δ

ativnom fotooksigenacijom olefina **10** zatim i) dehidratacija **12** u **13**, te stupnjevi j,k,l) koji predstavljaju originalnu sintezu α -metilen- γ -butirolaktona u transformaciji **13** u (±)-**1**. I tako je racemični alantolakton pripremljen u 12 sintetskih koraka, što ovu elegantnu sintezu ne čini prihvatljivom za izvedbu u tehnološkom mjerilu.

Budući da su farmakološka istraživanja u posljednjim desetljećima sve više ukazivala na značajna i različita farmakoforna svojstva γ -butirolaktonske skupine, to su mnogi prirodni spojevi koji sadrže ovu skupinu postali predmet intenzivnih sintetskih istraživanja, među njima i izoalantolacton **2**. Objavljene su dvije stereoselektivne totalne sinteze racemičnog izoalantolaktona (±)-**2**.^{31–33}

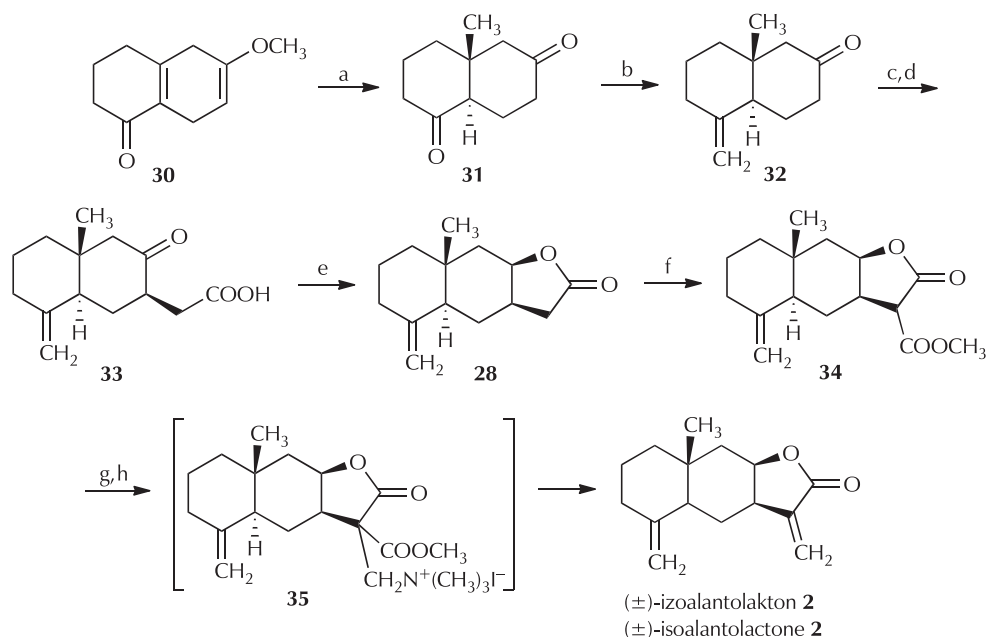
Prva sinteza izoalantolaktona prikazana je u shemi 7.^{31,32} Pošavši od metoksi- α -naftola **16**, autori su pripravili ciklički keton **17**, zatim konjugirani dienon **18** te adicijom jednog mola HCN dobili smjesu *cis/trans*-dijastereomera **19/20**. S drugim molom cijanida dobiven je, kako navode, "samo jedan dicijanoketon", zapravo *trans*-racemat **21**. Nakon zaštite keto-skupine u **22** preveli su selektivnim reduktivnim metiliranjem jednu cijano-skupinu u dimetilaminome-

tilnu skupinu u spoju **23**, zatim hidrogenolizom druge cijano-skupine u premoštenju pripravili spoj **24**. U dva koraka je terc-amino skupina preko N-oksida **25** prevedena u metilensku skupinu u **26**. Alkilacija intermedijarnog enamina po Storku³⁴ (nije prikazan u shemi) rezultirala je spojem **27** s kaboksimetnom skupinom u β -položaju. Ciklizacija u lakton **28** uslijedila je nakon redukcije karbonilne skupine koja je protekla nestereoselektivno, kako je ukazano u radu *Marshalla i sur.*³⁰ Za lakton **28** navedena je *cis*-konfiguracija iako je vjerojatno nastala smjesa *cis/trans*-izomera. U zadnjim koracima uvedena je egzo-metilenska skupina u γ -lakton preko intermedijara **29**. Ne navode se iskorištenja u pojedinom koraku niti ukupno iskorištenje na (±)-izoalantolaktone **2** nakon 16 sintetskih koraka.

Druga, znatno kraća sinteza prikazana je u shemi 8.³³ Polazeći od enona **30** autori su pripravili intermedijar **32** modifikirajući uvjete iz ranijeg rada³² te zatim uveli karboksimetilnu skupinu u dva koraka, aktivirajući α -C atom prolaznim uvođenjem metoksikarbonilne skupine u spoj **34** u koraku f) koristeći dimetilkarbonat. U shemi 8 upotrijebljen je broj **28** za intermedijar već pripremljen u shemi 7.

Ključni stereoselektivni korak te sinteze od samo osam koraka postignut je pripremom *cis*-laktona. Upotrebom K-selekttrida, kalijeve soli sterički zahtjevnog borhidrida, isklju-

čivo je nastao *cis*-laktonski prsten u spoju **28** (shema 9). U shemi je istaknuto snažno steričko ometanje aksijalne metilne skupine pristupu K-selekttrida koji bi vodio do ne-

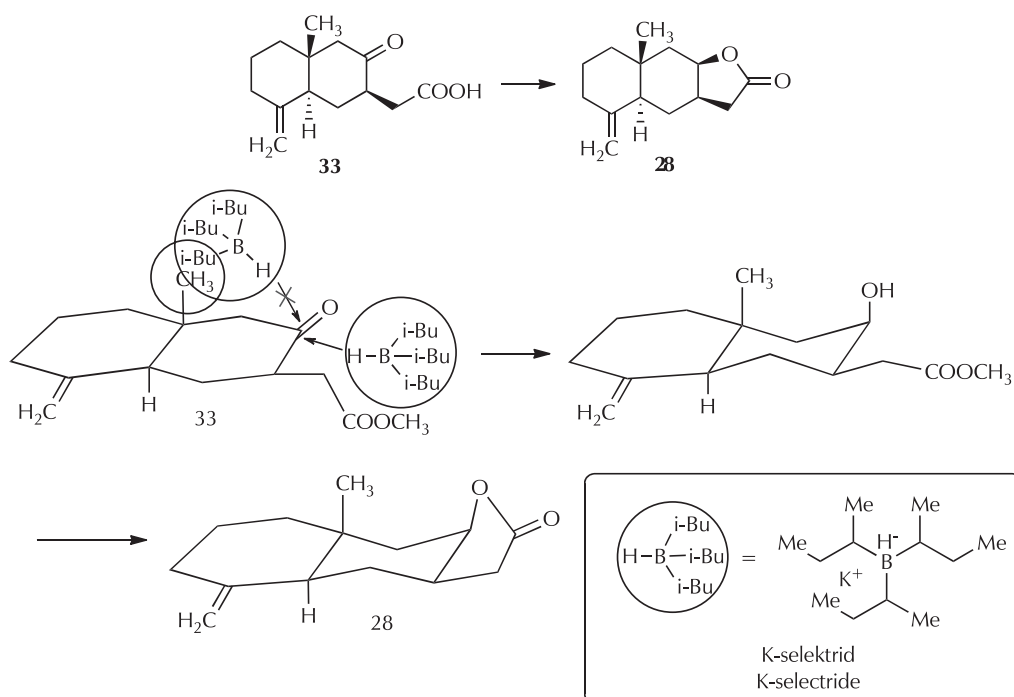


Shema 8 – Druga totalna sinteza (±)-izoalantolaktona **2**³³

Reakcijski uvjeti i reagensi: a) $\text{Li}(\text{CH}_3)_2\text{Cu}$, Et_2O , b) $\text{Ph}_3\text{P}^+-\text{CH}_2^-$, DMSO, c) NaH, $\text{CO}(\text{OCH}_3)_2$, d) NaH, $\text{BrCH}_2\text{COOCH}_3$, THF, zatim $\text{Ba}(\text{OH})_2$, EtOH/Δ , e) CH_2N_2 , Et_2O , zatim K-selektрид, THF, -78°C , f) NaH, $\text{CO}(\text{OCH}_3)_2$, g) CH_2O (37%), $\text{Me}_2\text{NH}\cdot\text{HCl}$, dioksan, h) MeI, DMF, 80°C

Scheme 8 – Second total synthesis of (±)-isoalantolactone **2**³³

The reaction conditions and reagents: a) $\text{Li}(\text{CH}_3)_2\text{Cu}$, Et_2O , b) $\text{Ph}_3\text{P}^+-\text{CH}_2^-$, DMSO, c) NaH, $\text{CO}(\text{OCH}_3)_2$, d) NaH, $\text{BrCH}_2\text{COOCH}_3$, THF, then $\text{Ba}(\text{OH})_2$, EtOH/Δ , e) CH_2N_2 , Et_2O , then K-selectride, THF, -78°C , f) NaH, $\text{CO}(\text{OCH}_3)_2$, g) CH_2O (37%), $\text{Me}_2\text{NH}\cdot\text{HCl}$, dioxane, h) MeI, DMF, 80°C



Shema 9 – Stereoselektivna redukcija ketona i ciklizacija u *cis*-lakton **13**

Scheme 9 – Stereoselective reduction of ketone and cyclization to *cis*-lactone **13**

poželjnog *trans*-laktona s OH-skupinom u ekvatorijalnom položaju. Postignuta *cis*-selektivnost iznosila je preko 98 % dok s nizom drugih kompleksnih hidrida nije prelazila 60 %.

Ostali koraci u shemi 8 idu uz zadržavanje konfiguracije na sva četiri kiralna centra. Vrijedno je istaknuti aktivaciju α -C atoma do keto-skupine, tj. povećanje C–H-kiselosti prolaznim uvođenjem karboksimetilne skupine koristeći dime-tilkarbonat i zatim provedbu Mannichove reakcije. U zadnjim koracima eliminacija terc-amina u intermedijaru **35** vodi do egzometilenske skupine u (\pm)-izoalantolaktonu **2**.

Do sada u literaturi nije opisana *asimetrična sinteza* enantiomerno (optički) čistog alantolaktona **1** niti izoalantolaktona **1a**. Taj projekt sigurno predstavlja kako znanstveni tako i tehnološko-ekonomski vrlo vrijedan izazov s obzirom na visoku cijenu prirodnog materijala i zanimljive rezultate brojnih bioloških istraživanja, od kojih su najznačajnija navedena u sljedećem poglavlju. Neki podatci o cijeni, globalnom tržištu i patentnoj zaštiti navedeni su u zadnjem poglavlju.

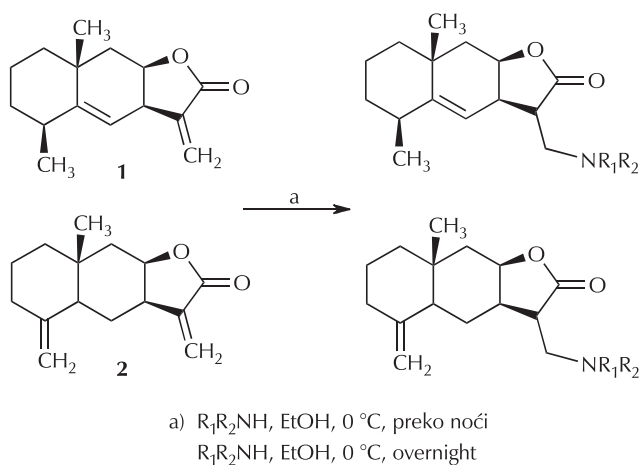
Terapeutske perspektive alantolaktona – je li to čudotvoran lijek?

Impresivan je broj u posljednje vrijeme zapaženih, terapeutskih obećavajućih bioloških svojstava alantolaktona i izoalantolaktona. Ona potvrđuju i proširuju tradicionalna zapažanja o ljekovitom učinku ekstrakta iz korijena zapaženja o ljekovitom učinku ekstrakta iz korijena *Inula helenium* i drugih vrsta *Inula*. Predklinička istraživanja provode se kako s pročišćenim aktivnim spojevima iz korijena vrsta *Inula* tako i s ekstrahiranim smjesama. Tako je hlapljivo ulje *Inula helenium* uz antitumorsko pokazalo i antibakterijsko djelovanje.³⁵ Zapaženo zanimljivo djelovanje alantolaktona kojim reducira sklonost kukaca prema hrani (engl. *insect feeding deterrent*) te ukazano na mogućnost zaštite biljaka od napada određenih skupina kukaca.³⁶ U više radova potvrđeno je njegovo insekticidno i antibakterijsko djelovanje.^{37,38} Među antibakterijskim svojstvima eudesmanolida iz *Inula helenium* posebno se ističe aktivnost alantlaktona prema *Mycobacterium tuberculosis*.³⁹

Za alantolakton i niz analoga izoliranih iz korijena *Inula helenium* L. određena je antimikrobna aktivnost na nizu bakterijskih sojeva. Nekoliko derivata pokazalo je snažno antibakterijsko djelovanje, znatno veće od poznatog antibiotika ampicilina.⁴⁰ Alantolakton i izoalantolakton pokazali su najdjelotvornije insekticidno djelovanje u nizu testiranih seskviterpenoida, flavanoida, fitosterola i nekih drugih prirodnih spojeva, posebno na ličinku *Aedes aegypti*. U nastavku istraživanja provedene su kemijske modifikacije alantolaktona radi povećanja insekticidnog djelovanja, a najbolji rezultat dao je derivat alantolaktona priređen Mi-

chaleovom adicijom propilamina na α -metilensku skupinu.⁴¹ *Cantrell i sur.* pokazali su u nizu radova da alantolakton spada u najdjelotvornije pesticide te da uz to posjeduje i antimikobakterijska svojstva.^{42,43}

Pokazano je da alantolakton sprječava ekspresiju oksidaze dušikova oksida i ciklooksigenaze, ključnih enzima u pojavi inflamatornih procesa, te stoga pokazuje obećavajuće antiinflamatorno djelovanje.³⁷ Sve više se istražuje mehanizam antitumorskog djelovanja alantolaktona. Nedavno je opisano da alantolakton inducira apoptozu u glioblastiloma stanicama i definiran je mehanizam indukcije. Taj rezultat obećava primjenu alantolaktona u terapiji glioblastiloma multiform, najmalignijeg i najagresivnijeg primarnog tumora mozga u odraslih.⁴⁴ Pošavši od alantolaktona i izoalantolaktona pripremljen je niz citotoksičnih α -aminometil-supstituiranih laktona stereoselektivnom Michaelovom adicijom sekundarnih amina, shema 10. Svi novi spojevi inducirali su apoptozu i djelovali kao alkilirajući agensi.⁴⁴ Zanimljivo je primijetiti da Michaelovi adukti zapravo predstavljaju potencijalnu zaštitnu skupinu za α -metilensku dvostruku vezu u laktону budući da se aminoskupina može eliminirati nakon kvaternizacije, što je prikazano u shemi 8.



Shema 10 – Priprema citotoksičnih produkata Michaelovom adicijom na alantolakton i izoalantolakton⁴⁴

Scheme 10 – Preparation of cytotoxic products by Michael-type addition to alantolactone and isoalantolactone⁴⁴

Za smjesu alantolaktona i izoalantolaktona izoliranu iz korijena *Inula helenium* subsp. *turcoracemosa* utvrđeno je snažno antiproliferativno i antimikrobno djelovanje.⁴⁰ Testiranjem na antitumorsko djelovanje od sedam pročišćenih seskviterpena iz korijena *Inula helenium* L. najaktivnijim se pokazao alantolakton, njegovo djelovanje *in vitro* usporedivo je s poznatim lijekom fluorouracilom.⁴⁵

Patenti, globalno tržište i cijene alantolaktona – vrijedi li danas istraživati prirodne spojeve?

Patenti na području primjene alantolaktona i izoalantolaktona pojavljuju se posljednjih desetljeća. Odnose se ponajprije na metode izolacije i pročišćavanja aktivne supstancije nakon ekstrakcije prirodnog materijala.

Tako se u jednom patentu štiti "simultana priprava" oba laktone koja se zapravo sastoji od njihove kromatografske separacije iz ekstrakta upotrebljavajući u kontinuiranom procesu trokomponentnu smjesu *n*-heksan-etilacetat-acetonitril kao eluens.⁴⁶ Zaštićena je priprava i primjena "visoko djelotvornog ekstrakta" iz *Inula racemosa* kojim se postiže vazodilacija i drugi učinci na krvožilni sustav.⁴⁷

U 2016. objavljen je tehnološki postupak izolacije alantolaktona i izoalantolaktona iz korijena *Inula racemosa* Hook.f ekstrakcijom superkritičnom tekućinom uz primjenu CO₂ (engl. SFE, *supercritical fluid extraction*). Opisani su optimalni uvjeti za ekstrakciju, tlak 50 MPa, temperatura 50 °C te izolacija produkta smrzavanjem. Na taj način obogaćen je sadržaj na oba izomera u produktu izolacije do 30,7 %.⁴⁸

Primjena ekstrakta *Inula helenium* L. ili izoliranih alantolaktona i izoalantolaktona u terapiji malignih i inflamatornih oboljenja predmet je jedne patentne zaštite.⁴⁹ Patentima je posebno zaštićeno anthelminsko i antineoplastno djelovanje hlapljivih ulja koja sadrže izoalantolakton.⁵⁰

Kompleksnost sinteze i ograničena dostupnost iz prirodnog materijala s jedne strane te sve veći broj objavljenih rezultata o specifičnom biološkom učinku alantolaktona s druge, čine ga danas vrlo traženim prirodnim spojem na svjetskom tržištu. To rezultira i visokom cijenom, koja je dostupna samo za neke distributere. Tako Sigma-Aldrich nudi alantolakton po cijeni od 81,10 \$/5 mg, 323,50 \$/50 mg, Molbase Co. po cijeni od 59 \$/10 mg, 759 \$/g, ali od nedavno nudi i racemat po cijeni od 1974 \$/kg. Taj podatak ukazuje na to da je na većoj skali realizirana (ili planirana!?) komercijalna sinteza racemata alantolaktona.

Kao proizvođači alantolaktona reklamira se nekoliko tvrt-

ki, uglavnom iz Istočne Azije; China Chemical, Chengdu Pufeide, Exion Hong Kong, Tocris Biotech Band i dr. Podatci o cijeni alantolaktona dostupni su od tih tvrtki tek nakon potpisivanja ugovora o tajnosti i priloženim podacima o tražitelju informacije!

Početak 2016. g. objavljen je dokument pod imenom *Alantolactone (CAS 546-43-0) Market Research Report*, u kojem se nalaze podatci o globalnom tržištu, cijenama alantolaktona na lokalnim tržištima, o područjima primjene, proizvodnim postupcima i patentima.⁵¹ Taj izvještaj dostupan je po cijeni od 2500 US\$!

Zaključak

Raznovrsno biološko djelovanje spojeva dobivenih iz korijena biljke *Inula helenium* L. opisano je još u antička vremena, a pripravci ekstrakta korijena te biljke upotrebljavani su u narodu kao lijek protiv niza oboljenja, od dijareje, kožnih infekcija, upala dišnih organa do liječenja tuberkuloze. U drugoj polovici XIX. stoljeća utvrđeno je da je najznačajnija komponenta tih pripravka spoj nazvan helenin, inulin ili alantolakton.

Istraživanju alantolaktona i srodnih seskviterpena doprinijela su u razmaku od 40 godina dva hrvatska kemičara, Srećko Bošnjaković i nobelovac Lavoslav Ružička. Njihovi rezultati su u temelju današnjeg razvoja tih prirodnih spojeva u potencijalne lijekove na vrlo različitim terapijskim područjima. U ovom pregledu se nakon kraćeg opisa istraživanja alantolaktona i srodnih seskviterpena od strane S. Bošnjakovića i L. Ružičke iznose i noviji rezultati istraživanja strukture, sinteze i biološkog djelovanja alantolaktona i izoalantolaktona. Posebno su istaknuta terapijska područja na kojima se javlja potencijalna primjena alantolaktona te prvi patenti i tržišne cijene za taj prirodni spoj.

Vrijedi još istaknuti da su u preglednom članku iz 2006. kineski autori objavili strukture 792 seskviterpena iz niza eudesmana, kamo spadaju alantolakton i njegovi srodnici te citiraju 593 rada objavljena na tom području, što jasno ukazuje velik interes raznih znanstvenih disciplina za tu skupinu prirodnih spojeva.⁵²

Literatura

References

1. T. Bartram, Bartram's Encyclopedia of Herbal Medicine, Robinson Publishing Ltd., London, 1998.
2. M. Howard, Traditional Folk Remedies. Century, 1987., str. 135-136.
3. B.-E. van Wyk, M. Wink, Medicinal Plants of the World, Times Editions, Singapore, 2004., str. 181-182.
4. Znanstveni skup u povodu obilježavanja 150. godišnjice rođenja prof. dr. sc. Srećka Bošnjakovića, 24. 11. 2015., HAZU, Zagreb.
5. S. Bošnjaković, Gerhardtov helenin, Rad JAZU **113** (1893) 140-152.
6. C. Gerhardt, Über das Helenin, Liebigs Ann. Chem. **34** (1840) 192-204, doi: <https://doi.org/10.1002/jlac.18400340206>.
7. S. Paušek-Baždar, Srećko Bošnjaković, Hrvatski biografski leksikon, sv. 2, Leksikografski zavod "Miroslav Krleža", Zagreb, 1989., str. 210.
8. S. Paušek-Baždar, Srećko Bošnjaković, u D. Grdenić (ur.), Gustav Janaček, život i djelo, HAZU, Zagreb, 2002., str. 140-141.
9. J. Kallen, Ueber Helenin und Alantcampher, Ber. Dtsch. Chem. Ges. **9** (1876) 154-157, doi: <https://doi.org/10.1002/cber.18760090148>.
10. J. Brecht, Ueber das Alantolactone (Helenin), W. Posth, Liebigs Ann. Chem. **285** (1895) 349-384, doi: <https://doi.org/10.1002/jlac.18952850306>.
11. L. Ružička, M. M. Janot, Hoehere Terpenverbindungen. L. Zur Kenntniss des Sclareols, Helv. Chim Acta **14** (1931) 645-650, doi: <https://doi.org/10.1002/hlca.19310140162>.
12. L. Ružička, P. Pieth, Polyterpene und Polyterpenoide. LV. Zur Kenntniss der alantolactone, Helv. Chim Acta **14** (1931) 1090-1103, doi: <https://doi.org/10.1002/hlca.19310140519>.
13. L. Ružička, P. Pieth, Th. Rechstein, E. Emann, Polyterpene und Polyterpenoide LXXX. Zur Kenntnis der Alantolactone. Synthese des 1,4-Dimethyl-6-isopropyl- und des 1,5-Dimethyl-7-isopropyl-naphthalins, Helv. Chim Acta **16** (1933) 268-275, doi: <https://doi.org/10.1002/hlca.19330160137>.
14. L. Ružička, The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. Experientia **9** (1953) 357-396, doi: <https://doi.org/10.1007/BF02167631>.
15. C. R. Clemo, R. D. Haworth, The constitution of santonin. Part III. Proof of the positions of the methyl groups, J. Chem. Soc. (1930) 2579-2582, doi: <https://doi.org/10.1039/JR9300002579>.
16. R. S. Cahn, C. K. Ingold, V. Prelog, Specification of molecular chirality, Angew. Chem. Int. Ed. **5** (1966) 385-415, doi: <https://doi.org/10.1002/anie.196603851>.
17. R. B. Woodward, F. Sondheimer, D. Taub, K. Heussler, W. M. McLamore, The total synthesis of steroids, J. Am. Chem. Soc. **74** (1952) 4223-4251, doi: <https://doi.org/10.1021/ja01137a001>.
18. L. B. Barkley, M. F. Farrar, W. S. Knowles, H. Raffelson, Q. E. Thompson, Studies in Steroid Total Synthesis. II. Correlation of Optically Active Bicyclic Intermediates with Natural Steroids, J. Am. Chem. Soc. **76** (1954) 5014-5016, doi: <https://doi.org/10.1021/ja01649a003>.
19. K. Tsuda, K. Tanabe, I. Iwai, K. Funakoshi, The structure of alantolactone, J. Am. Chem. Soc. **79** (1967) 5721-5724, doi: <https://doi.org/10.1021/ja01578a037>.
20. K. Tanabe, The structure of Alantolactone. The conversion of alantolactone into Dihydroeudesmol, Chem. Pharm. Bull. **6** (1958) 214-217, doi: <https://doi.org/10.1248/cpb.6.214>.
21. H. Matsuma, I. Iwai, E. Ohki, Sesquiterpenoids I. 3-Oxo-tetrahydroalantolactone, J. Pharm. Soc. Jpn. **74** (1954) 738-741.
22. W. Cocker, T. B. H. McMurray, Stereochemical relationships in the eudesmane (selinane) group of sesquiterpenes, Tetrahedron **8** (1960) 181-104, doi: [https://doi.org/10.1016/0040-4020\(60\)80028-2](https://doi.org/10.1016/0040-4020(60)80028-2).
23. V. Benešová, V. Sýkora, V. Herout, F. Šorm, The absolute configuration of costol and alantolactone, Chem. and Ind. (1958) 363-364.
24. W. Cocker, T. B. H. McMurry, L. O. Hopkins, The chemistry of ψ -santonin. Part XI. Its absolute configuration, J. Chem. Soc. (1959) 1998-2003, doi: <https://doi.org/10.1039/JR9590001998>.
25. W. Klyne, P. M. Scopes, A. Williams, Optical rotatory dispersion. Part XXVII. The Hudson lactone rule, J. Chem. Soc. (1965) 7237-7242, doi: <https://doi.org/10.1039/jr9650007237>.
26. W. Klyne, P. M. Scopes, u G. Slatkovic (ur.), ORD and CD in Organic Chemistry, Hyden & Sons, Ltd., 1967., str. 193-207.
27. P. Crabbe, ORD and CD in Chemistry and Biochemistry, Academic Press, 1972., str. 50-54.
28. H. W. Schmalle, Structure of 4 β ,10 β -Dimethyleudesma-5,11(13)-diene-7 β -lactone (Alantolactone), Acta Cryst. (1986) C42 705-708, doi: <https://doi.org/10.1107/s0108270186094842>.
29. J. Bijvoet, A. F. Peerdeman, A. J. van Bommel, Determination of the Absolute Configuration of Optically Active Compounds by Means of X-Rays, Nature **168** (1951) 271-272, doi: <https://doi.org/10.1038/168271a0>.
30. J. A. Marshall, N. Cohen, A. R. Hochstetler, Synthetic Studies Leading to dl-Telekin and dl-Alantolactone, J. Am. Chem. Soc. **88** (1966) 3408-3417, doi: <https://doi.org/10.1021/ja00966a041>.
31. A. Minato, T. Nagasaki, Synthesis of (\pm)-attractylon, Chem. Commun. (1965) 377-379, doi: <https://doi.org/10.1039/C19650000377>.
32. A. Minato, I. Horibe, A new synthetic method for exocyclic methylene $\alpha\beta$ -unsaturated γ -lactones and synthesis of (\pm)-isoalantolactone Chem. Commun. (1965) 531-532, doi: <https://doi.org/10.1039/C19650000531>.
33. R. B. Miller, R. D. Nash, A Highly Stereoselective total synthesis of (+)-isoalantolactone, Tetrahedron **30** (1974) 2961-2965, doi: [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)97472-1](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)97472-1).
34. G. Stork, S. R. Dowd, A New Method for the Alkylation of Ketones and Aldehydes: the C-Alkylation of the Magnesium Salts of N-Substituted Imines, J. Am. Chem. Soc. **85** (1963) 2178-2180, doi: <https://doi.org/10.1021/ja00897a040>.
35. S. S. Lim, J. R. Kim, T. Konishi, J. H. Y. Park, J. S. Kim, Induction of detoxifying enzyme by sesquiterpenes present in Inula helenium, J. Med. Food, **10** (2007) 503-510, doi: <https://doi.org/10.1089/jmf.2006.209>.

36. A. K. Picman, R. H. Elliott, G. H. N. Towers, Insect feeding deterrent property of alantolactone, *Biochem. Systematics and Ecology* **6** (1978) 333–335, doi: [https://doi.org/10.1016/0305-1978\(78\)90054-6](https://doi.org/10.1016/0305-1978(78)90054-6).
37. A. Deriu, S. Zanetti, L. A. Sechi, A. Piras, S. Porcedda, E. Tuveri, Antimicrobial activity of *Inula helenium* L. essential oil against Gram-positive and Gram-negative bacteria and *Candida* sp., *J. Antimicrob. Agents* **31** (2008) 588–590, doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.02.006>.
38. H.-L. Jiang, J. Chen, X.-J. Jin, J.-L. Yang, Y. Li, X.-J. Yao, Q.-X. Wu, Sesquiterpenoids, alantolactone analogues and seco-guaiene from roots of *Inula helenium*, *Tetrahedron* **67** (2011) 9193–9198, doi: <https://doi.org/10.1016/j.tet.2011.09.070>.
39. J. Chun, R. J. Choi, S. Khan, D.-S. Lee, Y.-C. Kim, Y.-J. Nam, D.-U. Lee, Y. S. Kim, Alantolactone suppresses inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by down-regulating NF- κ B, MAPK and AP-1 via the MyD88 signaling pathway in LPS-activated RAW 264.7 cells, *Internat. Immunopharmacol.* **14** (2012) 375–383, doi: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2012.08.011>.
40. A. Gokbulut, E. Sarer, Isolation and quantification of alantolactone/isoalantolactone from roots of *Inula helenium* subsp. *turcoracemosa*, *Turk. J. Pharm. Sci.* **10** (2013) 447–452.
41. N. J. Lawrence, A.T. McGown, J. Nduka, J. A. Hadfield, R. G. Pritchard, Cytotoxic Michael-type amine adducts of a-methylene lactones alantolactone and isoalantolactone, *Bioorg. & Med. Chem. Letters* **11** (2001) 429–431, doi: [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(00\)00686-7](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(00)00686-7).
42. C. L. Cantrel, S. G. Franzblau, N. F. Fischer, Antimycobacterial plant terpenoids, *Planta Medica* **67** (2001) 685–694, doi: <https://doi.org/10.1055/s-2001-18365>.
43. C. L. Cantrell, F. E. Dayan, S. O. Duke, Natural products as sources of new pesticides, *J. Nat. Products* **75** (2012) 1231–1242, doi: <https://doi.org/10.1021/np300024u>.
44. M. Khan, F. Yi, A. Rasul, T. Li, N. Wang, H. Gao, R. Gao, T. Ma, Alantolactone induces apoptosis in glioblastoma cells via GSH depletion, ROS generation and mitochondrial dysfunction, *IUBMB Life* **64** (2012) 783–794, doi: <https://doi.org/10.1002/iub.1068>.
45. T. Konishi, Y. Shimada, T. Nagao, H. Okabe, T. Konoshima, Antiproliferative sesquiterpene lactones from the roots of *Inula helenium*, *Biol. Pharm. Bull. Jpn.* **25** (2002) 1370–1372, doi: <https://doi.org/10.1248/bpb.25.1370>.
46. F. Li, D. Liu, Method for preparing alantolactone and isoalantolactone simultaneously, IPC C07D307/92 CN 102558120 (A), 11. 7. 2012.
47. G. Banerjee, P. M. Dias, R. Kalathil, Plant extract of inula racemose, PCT/EP2014/051590, WO 2014124803 A1, 21. 8. 2014.
48. X.-F. Chi, H.-L. Yue, X.-H. Zhao, F.-Z. Hu, Obtaining alantolactone and isoalantolactone from *Inula racemosa* Hook.f. by optimized supercritical fluid extraction, *Ind. Crop. Prod.* **79** (2016) 63–69, doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.10.025>.
49. L. Sang Kook, M. Hye Yeong, Composition of *Inula helenium* L. extract or alantolactone or isoalantolactone isolated therefrom for prevention and treatment of cancer or inflammatory diseases, IPC A61K35/78, KR Pat. 20040107185, 20. 12. 2004.
50. Y. Yang, H. Wan, H. Xy, L. Zhang, C. Yan, Medical use of volatile oil traditional chinese medicine, CN 101002812 A, 25. 7. 2007.
51. Market Publishers, *Alantolactone (CAS 546-43-0) Market Research Report 2015* (1. 1. 2016.), URL: <https://marketpublishers.com/r/AC7B6ED70A0EN.html>.
52. Q.-X. Wu, a Y.-P. Shi, Z.-J. Jia, Eudesmane sesquiterpenoids from the Asteraceae family, *Nat. Prod. Rep.* **23** (2006) 699–734, doi: <https://doi.org/10.1039/b606168k>.

SUMMARY

On Helenine from Srećko Bošnjaković to Lavoslav Ružička – Model Example for Development of Organic Chemistry in 20th Century

Vitomir Šunjić*

Prof. Srećko Bošnjaković (1865–1907) is considered as the first Croatian chemist who completed Ph. D. thesis in the field of organic chemistry. In his thesis published in 1893 under the title “Gerhardt’s Helenine” S. Bošnjaković has described isolation of helenine from the roots of *Inula helenium* L., separation of chemically pure substances and determination of their empirical formulae by elemental analysis. In his thesis the names helenine and alantolactone were used, the second one appears exclusively in the recent literature. Since this name indicates existence of lactone group in helenine it was interesting to investigate what was known at that time about the structure of this natural product, in particular who has determined exact structure of alantolactone and its isomers and congeners, sesquiterpenes present in the Nature. It turned out that our Nobel laureate Lavoslav Ružička greatly contributed to the knowledge of this field, who in the period 1931–1936 investigated structures of numerous sesquiterpenes and formulated well-known Ružička’s biogenetic isoprene rule (L. Ružička, The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds, *Experientia* 9 (1953) 357–396).

Prompted by this unexpected “Croatian connection by helenine”, I have discovered interesting development of chemistry related to alantolactone, in particular contribution of Lavoslav Ružička to structure determination.

In this review the work of Bošnjaković and Ružička is presented and new results revealed on structure determination, synthesis and important biological properties of alantolactone and related sesquiterpenes. Most recent results and accumulated knowledge on alantolactone represent an excellent example for development of organic chemistry in the XXth century.

Keywords

Inula helenium L., helenine, alantolactone, structure, stereochemistry, biological activity, history of science

Croatian Academy of Sciences and Arts
Zrinjski trg 11
10000 Zagreb
Croatia

Review
Received March 1, 2016
Accepted April 11, 2016