

Biotin[6]uril – en makrocyklisk forbindelse, der vekselvirker med anioner

Ved at udnytte at reaktionen mellem formaldehyd og D-Biotin (et vitamin, og et naturligt forekommende *N,N'*-dialkylurinstof) er reversibel, kan oligomeriseringsreaktionen *guides* ved at tilsætte en *templat*. I dette bidrag forklarer jeg, hvordan dette er blevet udnyttet til at syntetisere makrocykler, der vekselvirker stærkt og selektivt til anioner, som var blevet brugt som templat i syntesen af makrocyklen, biotin[6]uril.

Af Michael Pittelkow.
Kemisk Institut,
Københavns Universitet

Hvis man lader urinstof ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$) reagere med formaldehyd (CH_2O) i koncentreret svovlsyre (H_2SO_4), får man en hård polymer (en såkaldt thermoset polymer), hvor de to NH_2 -grupper har reageret et antal gange med formaldehyd og er krydsbundet med CH_2 -grupper. De individuelle urinstof-enheder er altså forbundet via såkaldte aminor-funktionaliteter (figur 1).

Denne polymer kan dernæst nedbrydes, hvis man koger den i vandig syre, for eksempel vandig koncentreret saltsyre. Dette er helt klassisk, og observationen, at polymeren kan dannes og nedbrydes, åbner interessante muligheder for at bruge denne type af reaktion til at danne molekyler og materialer, der kan tilpasse sig de eksperimentelle omstændigheder, da den kemiske reaktion er reversibel (aminol-dannelsen) [1].

Hvis man i stedet for at bruge simpel urea reagerer formaldehyd med et *N,N'*-di-substitueret urinstof, så får man ikke længere krydsbundne polymerer, men i stedet enten lineære polymerer eller cykliske forbindelser. To eksempler på cykliske forbindelser er stofklasserne cucurbit[n]uriler og hemicucurbit[n]uril (n er antallet af monomere enheder) som er vist i figur 2, se side 20 [2-3].

Når hhv. hemicucurbit[n]uril og cucurbit[n]uril syntetiseres, er de konkrete betingelser vigtige, da kon-

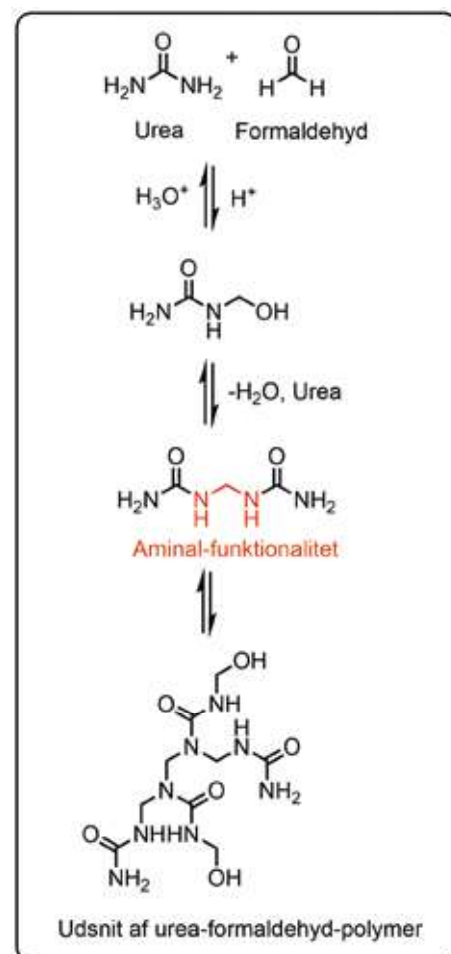
centrationen og arten af den valgte syre influerer udfaldet af syntesen. Som et eksempel dannes hemicucurbit[6]uril i næsten kvantitativt udbytte i 4 M HCl, hvorimod udfaldet er næsten kvantitativt til dodecameren hemicucurbit[12]uril, når 1 M HCl bruges. Faktisk kan hemicucurbit[6]uril dannes fra hemicucurbit[12]uril ved at opløse den i 4 M HCl, hvilket bekræfter, at aminor-dannelse er reversibel. Ligeledes kan størrelsen af makrocykler af cucurbit[n]uril-arten påvirkes betragteligt ved at ændre reaktionsbetingelserne (valg af syre, temperatur og koncentration).

Biotin[6]uril – en makrocyklisk forbindelse, der vekselvirker med anioner

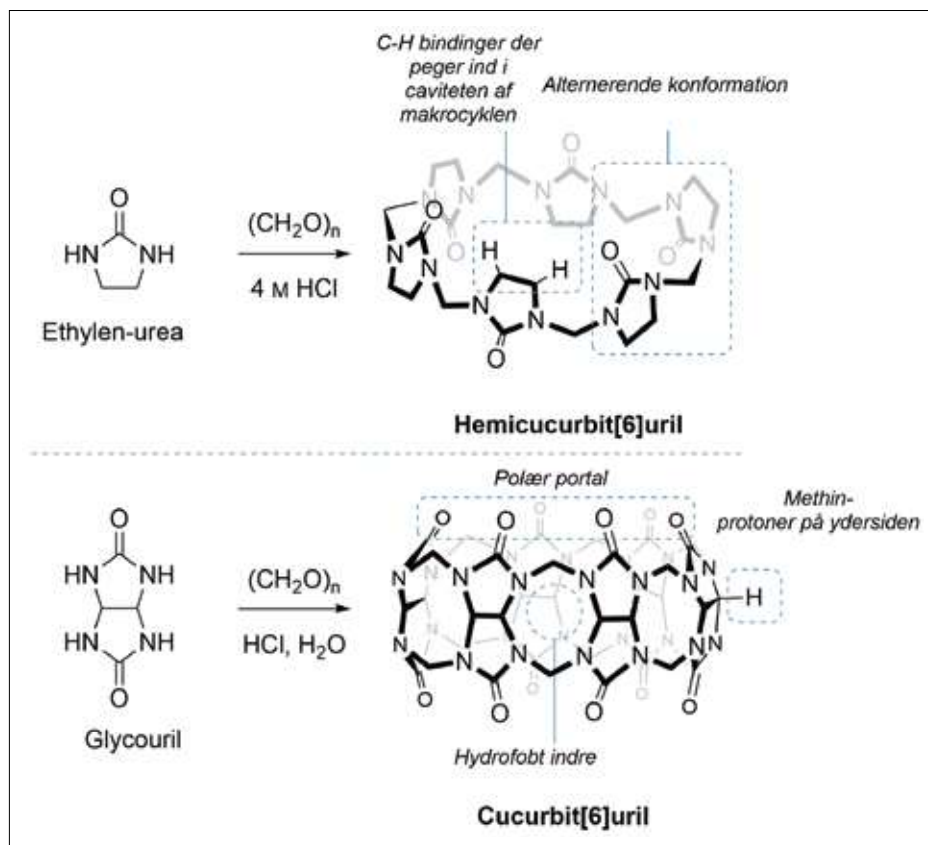
I vores forskningsgruppe på Kemisk Institut på KU beskrev vi for nogle år siden den første vandopløselige makrocykel af *N,N'*-ethylenurea-familien [4]. Med udgangspunkt i D-biotin lykkedes det os at syntetisere biotin[6]uril ved brug af betingelser, der minder om dem, der blev brugt i den oprindelige hemicucurbit[6]uril-syntese (figur 3 på side 20).

Biotin[6]uril kan syntetiseres under en række forskellige betingelser, men det højeste udbytte opnåede vi ved at reagere D-biotin og paraformaldehyd i 3,5 M H_2SO_4 med NaBr som additiv. Makrocyklen blev isoleret som en enkelt isomer med et udbytte på 63 procent (figur 3). Vi har sidenhen succesfuldt syntetiseret mere end et kilo af Biotin[6]uril.

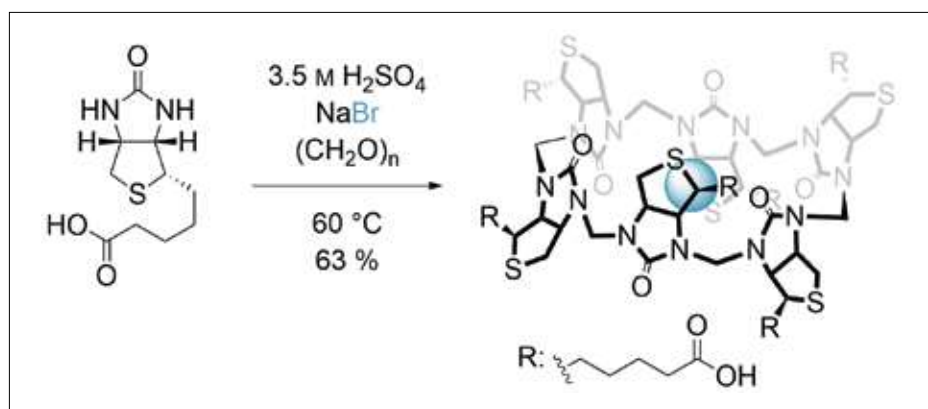
Makrocyklen består af seks D-biotin-



Figur 1. Reaktionen mellem formaldehyd og urinstof er reversibel og danner en thermosæt polymer under sure vandfri betingelser. Under sure vandige betingelser opløses polymeren på grund af den reversible aminor-dannelse.



Figur 2. Syntese og strukturer af hemicucurbit[6]uril og cucurbit[6]uril.



Figur 3. Syntese af biotin[6]uril.

monomerer og den alternerende rumlige orientering af carbonylgrupperne, der er forbundet via methylenbroer ved urea-kvælstofatomerne. Dette skaber en hydrofob indre af makrocyclen med tolv C-H-grupper, der peger ind i kaviteten. Det er de H'er, der sidder i brohovederne på den konvekse del af D-biotin-enhederne. Kaviteten i biotin[6]uril kan inkludere (binde) en række småmolekyler (ethanol, vand) samt anioner så som iodid.

Røntgenstrukturen af biotin[6]uril-iodid-bindingskomplekset med iodid bundet er vist i figur 4 [4].

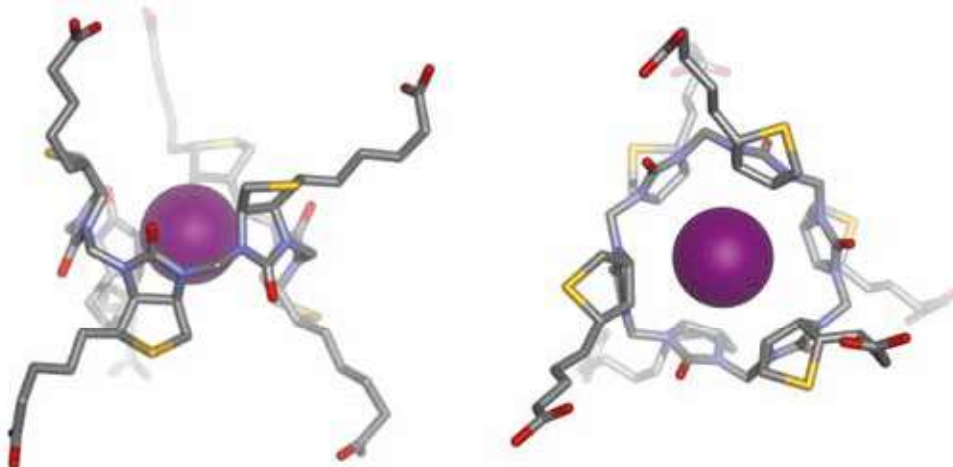
Vi udførte syntesen af biotin[6]uril ved forskellige koncentrationer af HCl og fandt, at 7 M HCl gav den reneste

reaktion. Det var bemærkelsesværdigt, at et reaktionsmedium med samme H^+ -koncentration (3,5 M H_2SO_4) og en halidskabelon (chlorid eller bromid) resulterede i det samme produkt, hvilket beviser, at syntesen bliver guidet af binding til anionen. Dette kaldes en "termodynamisk templateeffekt" [5].

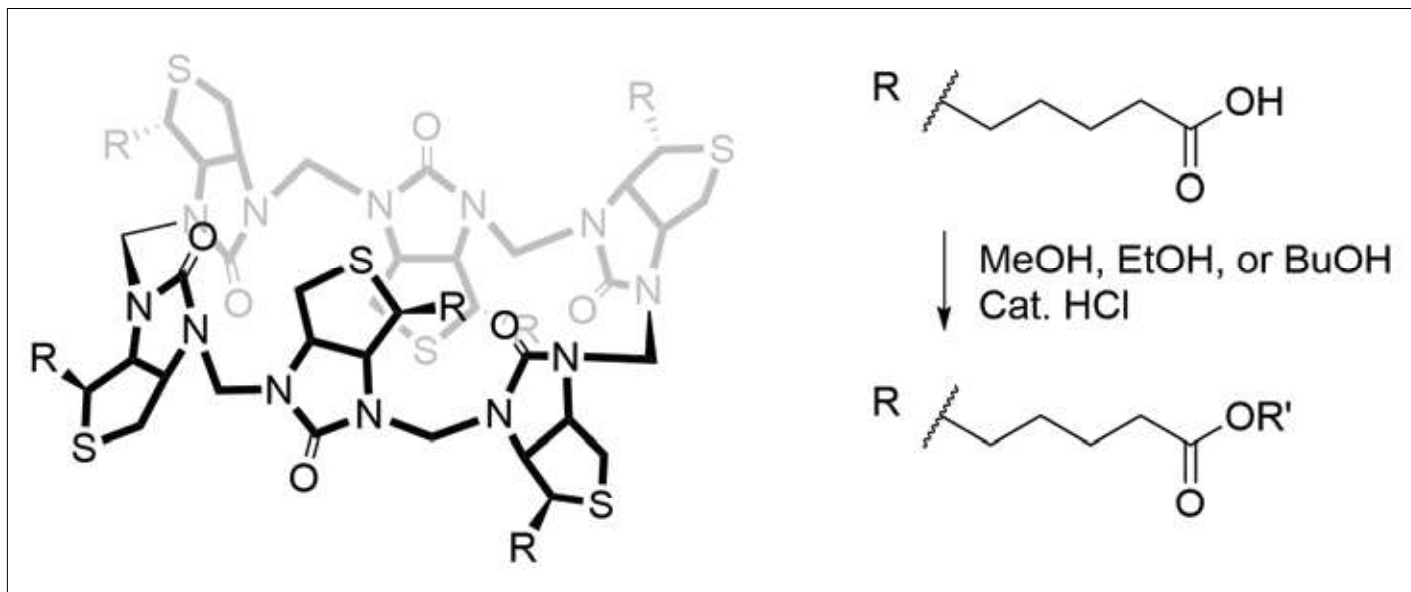
Monovalente anioner bindes af biotin[6]uril i vand ved pH 7,5 med præference for blødere anioner, hvilket ses af præferencerækkefølgen $\text{SCN}^- > \text{I}^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^-$ [6]. 1:1-Støkiometri blev observeret for alle undersøgte anioner ved hjælp af Jobs metode og massespektrometri-analyse. Biotin[6]uril vekselvirker ikke væsentligt med kationer som Na^+ , K^+ og Cs^+ , og ændring af pH fra 10,8 til 7,5 påvirkede ikke bindingsisotermier (ITC). Ved anvendelse af ITC til undersøgelser i vand fandt vi, at det enthalpiske bidrag er væsentligt og stort, mens det entropiske bidrag er lille. Biotin[6]uril binder anioner via C-H...anion-vekselvirkninger fra de tolv hydrogenatomer, der peger ind i kaviteten.

Biotin[6]uril blev gjort opløselig i organiske opløsningsmidler ved at omdanne carboxylsyernerne til estere – henholdsvis methyl- (bio[6]me), ethyl- (bio[6]et) og butylestere (bio[6]bu). Dette blev gjort ved hjælp af en Fischers estersyntesestrategi direkte på biotin[6]uril (figur 5) [7].

^1H -NMR- og ITC-titreringer blev brugt til at undersøge bindingsvekselvirkningerne i hexaestrene. Anioner som Cl^- , NO_3^- , HCO_3^- og SO_4^{2-} blev undersøgt i acetonnitril, og biotin[6]uril-hexaestrene havde sammenlignelige bin-



Figur 4. Røntgenkristalstruktur af biotin[6]uril-iodid-bindingskomplekset (venstre: sidevisning, højre: topvisning).



Figur 5. Syntese af biotin[6]uril-hexaestere.

dingsaffiniteter, uanset om undersøgelserne blev udført med bio[6]me, bio[6]et eller bio[6]bu for både chlorid og nitrat. Igen blev der observeret 1:1-støkiometri for alle anioner. Bindingsvekselvirkningen for chlorid blev bestemt ved ITC og var både enthalpisk og entropisk favorabel i modsætning til, hvad der blev fundet for bio[6] i vand, hvor entropien var ufavorabel.

I det organiske opløsningsmiddel binder chlorid-ioner cirka to størrelsesordener stærkere end NO_3^- og HCO_3^- , mens der ikke blev observeret binding for SO_4^{2-} -anionen. HCO_3^- er mere basisk end de øvrige anioner og er derfor normalt den bedre acceptør for konventionelle hydrogenbindinger (HNO_3 $\text{pK}_a = -1,3$; H_2CO_3 $\text{pK}_a = 3,6$ og $10,3$), så de lignende K_a -værdier for NO_3^- og HCO_3^- indikerer forskellen mellem konventionelle hydrogenbindinger og C-H...anion-vekselvirkninger.

Vi testede anion-transport for biotin[6]uril-hexaestrene ved brug af unilamellære vesikler bestående af POPC, kolesterol (70/30) og bio[6]-hexaester ved hjælp af lucigenin-assayet, der er blevet udviklet af Davis-gruppen i Bristol. Chlorid-ion transport blev fulgt ved brug af emissionen fra lucigenin på grund af quenching af lucigenin ved den stigende chloridkoncentration inde i vesiklen (figur 6).

Ved tilsætning af chlorid blev der observeret et fald i emissionen ved 535 nm, hvilket viste, at bio[6]-estrene transporterede chlorid ind i vesiklerne. Alle tre bio[6]-estere viste transport, hvor butylesteret var den hurtigste transporter.

Interessant nok medførte en ændring fra NO_3^- til SO_4^{2-} i lucigenin-assayet, at transporten stoppede fuldstændigt, hvilket indikerer, at biotin[6]uril-hexaestrene ikke kan transportere intravesikulært SO_4^{2-} ud af vesiklerne, når Cl^- transporteres ind. Dette er forventeligt, da det divalente sulfation ikke bindes af bio[6]-strukturen. NO_3^- er i stand til at transporteres ud af vesiklerne for at opretholde elektroneutralitet. Denne ændring fra nitrat til sulfat viser også, at bio[6]-estrene ikke transporterer Na^+ -ioner, da indstrømning af Na^+ ligeledes ville opretholde elektroneutralitet.

Dette eksperiment viser høj selektivitet for chloridtransport frem for bicarbonat- og sulfattransport. Den bemærkelsesværdige selektivitet af bio[6]-estere i både aniontransport og anionbinding kan muligvis skyldes den relativt "bløde" karakter af C-H-hydrogenbindingen sammenlignet med andre hydrogenbindingsdonorer, hvilket favoriserer blødere

anioner frem for hårde anioner (Cl^- frem for eksempelvis HCO_3^-).

Konklusioner og fremtidig forskning

I min gruppe arbejder vi på nye aspekter af kemien af biotin[6]uril – især hvordan vi kan funktionalisere makrocyclen på nye måder til for eksempel at binde anioner stærkere, og til selektivt at kunne binde både anioner og kationer samtidigt.

Tak

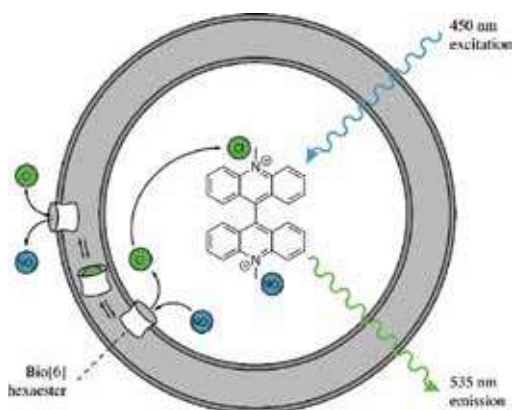
Tak til nuværende og tidligere gruppe-medlemmer, mine skønne kollegaer på KU, samt samarbejdspartnere.

E-mail:

Michael Pittelkow: pittel@chem.ku.dk

Referencer

1. B. Tollens, *Chem. Ber.*, **1884**, 17, 653-659.
2. N.N. Andersen, M. Lisbjerg, K. Eriksen, M. Pittelkow, *Isr. J. Chem.*, 2018, 3-4 (58), 435-448.
3. L. Isaccs, *Chem. Commun.*, **2009**, 619-629.
4. M. Lisbjerg, B.M. Jessen, B. Rasmussen, B.E. Nielsen, A.Ø. Madsen, M. Pittelkow, *Chem. Sci.*, **2014**, 5(7), 2647-2650.
5. P.T. Corbett, J. Leclair, L. Vial, K.R. West, J.-L. Wietor, J.K.M. Sanders, S. Otto, *Chem. Rev.*, 106(9), 3652-3711.
6. a) N.N. Andersen, K. Eriksen, M. Lisbjerg, M.E. Ottesen, B.O. Milhøj, S.P.A. Sauer, M. Pittelkow, *J. Org. Chem.*, **2019**, 84, 5, 2577-2584. b) M. Lisbjerg, B.E. Nielsen, B.O. Milhøj, S.P.A. Sauer, M. Pittelkow, *Org. Biomol. Chem.*, **2015**, 13, 369-373.
7. M. Lisbjerg, H. Valkenier, B.M. Jessen, H. Al-Kerdi, A.P. Davis, M. Pittelkow, *J. Am. Chem. Soc.*, **2015**, 137(15), 4948-4951.



Figur 6. Lucigenin-assayet anvendt i undersøgelsen af aniontransport ved biotin[6]uril-hexaestere.