

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra organické chemie



**Modulární syntéza a biologická aktivita fenypropanoidových
dimerů: Syntéza benzofuranového skeletu**

Bakalářská práce

Autor:	Denisa Vysloužilová
Studijní program:	Chemie
Studijní obor:	Bioorganická chemie a chemická biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Jiří Pospíšil, Ph.D.

Olomouc 2021

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení autora: Denisa Vysloužilová

Název práce: Modulární syntéza a biologická aktivita fenylypropanoidových dimerů: Syntéza benzofuranového skeletu

Typ práce: Bakalářská

Pracoviště: Katedra Organické chemie, Přírodovědecké fakulta, Palackého Univerzita v Olomouci

Školitel: doc. RNDr. Jiří Pospíšil, Ph.D.

Rok obhajoby: 2021

Abstrakt: Bakalářská práce popisuje vývoj nové univerzální metody pro přípravu neolignanového skeletu. Teoretická část obsahuje charakterizaci, biosyntézu a biologickou aktivitu neolignanů. V experimentální části se pak zaměřuji na popis syntézy neolignanového skeletu s hlavním důrazem na jeho modulárnost a také hospodárnost (optimalizace jednotlivých kroků). Vybrané produkty jsou pak otestovány na jejich anthelmintickou aktivitu.

Klíčová slova: neolignany, přírodní látky, syntéza, biologická aktivita, Suzuki coupling, diazosloučeniny

Počet stran: 53

Počet stran příloh: 7

Počet příloh: 1

Jazyk: Čeština

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Denisa Vysloužilová

Title: Modular synthesis and biological activity of phenylpropanoid dimers: Benzofuran motive

Type of thesis: Bachelor

Department: Department of Organic chemistry, Faculty of Science, Palacký Univerzity

Advisor: doc. RNDr. Jiří Pospíšil, Ph.D.

The year of presentation: 2021

Abstract: The bachelor thesis describes the development of an universal method for the preparation of a neolignan skeleton. The theoretical part contains the characterization, biosynthesis and biological activity of neolignans. In the experimental part, I focus on the description of the neolignan skeleton synthesis and the main emphasis is on its modularity and efficiency (optimization of each individual steps). Selected products are then tested for their anthelmintic activity.

Key words: neolignans, natural products, synthesis, biological activity, Suzuki coupling, diazocompounds

Number of pages: 53

Number of appendix pages: 7

Number of appendices: 1

Language: Czech

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu. Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry organické chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci

V Olomouci, 18. 5. 2021

.....

Denisa Vysloužilová

Poděkování

Upřímně, nevím, komu mám poděkovat dříve, takže pořadí neurčuje důležitost poděkování.

Když začnu úplně od začátku, tak mé první poděkování patří mé drahé rodině. Děkuji jim za lásku, nekonečnou podporu a za jejich výchovu. Mé další poděkování patří mému vedoucímu práce panu doc. RNDr. Jiřímu Pospíšilovi, Ph.D. Děkuji Ti, Jirko, za čas, který jsme strávili na konzultacích a labmeetinzích, za tvé vtipné historky a vtípky, kterými vždy sršíš a samozřejmě za odborné vedení celé této práce. Paní Mgr. Aleně Kadlecové, Ph.D. děkuji za odborné vedení při biologickém testování. Mnohokrát děkuji svému konzultantovi panu Mgr. Františkovi Zálešákovi, který měl se mnou trpělivost, i když jsem za ním přišla do kanceláře 100x za den s nějakým problémem. Dále jmenovitě děkuji Nikoli Šťastné, Mgr. et Mgr. Monice Tomanové, Mgr. Davidovi Profousovi a Bc. Jozefovi Kristkovi, že mi zpřijemnil čas strávený v laboratoři a i mimo ni. Za finanční podporu mého výzkumu děkuji svým rodičům a Interní Grantové Agentuře Univerzity Palackého v Olomouci (IGA_PrF_2021_024).

Obsah

Seznam zkratk	8
1 Úvod	9
1.1 Cíle práce	10
2 Teoretická část	11
2.1 Neolignany - rostlinné sekundární metabolity fenyylpropanoidového typu.....	11
2.1.1 Základní charakteristika.....	11
2.1.2 Biosyntéza.....	13
2.1.3 Zástupci neolignanů a jejich biologická aktivita	16
2.2 Předcházející práce v naší výzkumné skupině	19
3 Výsledky a diskuze	21
3.1 Retrosyntéza	21
3.2 První krok – syntéza základního skeletu 6	22
3.3 Suzuki coupling.....	25
3.3.1 Příprava boronové kyseliny 4	25
3.3.2 Příprava jodo derivátů 5.....	26
3.3.3 Suzuki coupling – optimalizace couplingového kroku.....	27
3.4 Redukce dvojně vazby v benzofuranovém cyklu – zacíleno na produkt 2	30
3.5 Biologické testy.....	33
3.5.1 Vyhodnocení naměřených hodnot	33
4 Závěr	35
5 Experimentální část	36
5.1 Obecné informace	36
5.1.1 Vizualizační roztoky pro TLC	37
5.2 Syntéza ethyl benzofuran-3-karboxylátu (6).....	37

5.2.1	Vedlejší produktu (9)	38
5.3	Syntéza (3-(ethoxykarbonyl)benzofuran-2-yl)boronové kyseliny (4)	38
5.4	Příprava reakčního partnerů pro Suzuki coupling.....	39
5.4.1	Syntéza 4-jodo-2-methoxyfenolu (5a)	39
5.4.2	Syntéza 1-(benzyloxy)-4-jodo-2-methoxybenzenu (5b).....	40
5.4.3	Syntéza <i>tert</i> -butyl(4-iodo-2-methoxyfenoxy)dimethylsilanu (5c).....	40
5.5	Suzuki coupling.....	41
5.5.1	Syntéza ethyl 2-(4-(benzyloxy)-3-methoxyfenyl)benzofuran-3- karboxylatu (3b).....	41
5.6	Biologické testování.....	42
5.6.1	Základní informace	42
5.6.2	Kultivace <i>C. elegans</i> na NGM miskách.....	44
5.6.3	Hodnocení Antihelmintické aktivity.....	45
6	Použitá literatura	49
7	Příloha.....	54

Seznam zkratek

DCM	dichlormethan	C4H	4-hydroxylyáza
ekviv.	ekvivalent	4CL	4-kumarát koenzym A ligáza
THF	tetrahydrofuran	CCR	skořicoát koenzym A reduktáza
LDA	diisopropylamid lithný	CAD	skořicoát alkoholdehydrogenáza
rt	laboratorní teplota, 23°C	Cald5H	koniferylaldehyd 5- hydroxyláza
m.p.	bod tání	OMT	<i>O</i> -methyltransferáza
EtOAc	ethyl-acetát	POC	fenol-oxidační coupling
RVO	rotační vakuová odparka	TBS	<i>tert</i> -butyldimethylsilyl
CDC	křížený dehydrogenační coupling	DME	1,2-dimethoxyethan
n.d.	nedetekováno	deg.	degradováno
EtOH	ethanol	n.a.	neanalyzováno
MeOH	methanol	n.p.	neproběhla
NGM	Nematode Growth Medium	LUMO	nejnižší neobsazený molekulový orbital
DMSO	dimethylsulfoxid	PG	chránicí skupina
LB	lysogenylové médium	IUPAC	Mezinárodní unie pro čistotu a užitou chemii
NMR	nukleární magnetická resonance		
HRMS	hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením		
MS	hmotnostní spektrometrie		
CDCl ₃	chloroform		
TLC	chromatografie na tenké vrstvě		
ppm	parts per million		
CC	sloupcová chromatografie		
PAL	fenylalaninamoniumlyáza		
TAL	tyrosinamoniumlyáza		

1 Úvod

Rostliny jsou důležitou každodenní součástí našich životů, již od nepaměti. Ať jsme my sami vegetariáni, a živíme se tedy přímo rostlinami nebo vegetariáni nejsme a živíme se kromě rostlin i živočichy, kteří se živili rostlinami, vyjde to na stejno. Každou molekulu kyslíku, kterou jsme kdy vdechli, vytvořila někdy někde nějaká rostlina či fotosyntetizující sinice. Ano, člověk nemůže žít samostatně, bez rostlin. Rostliny lidi fascinují již po tisíce let, a to nejen z hlediska potravy či materiální stránky, ale i jako léčebný materiál. Nejstarší písemné údaje o rostlinných léčivech pocházejí patrně z doby vlády čínského císaře Shen-Nunga z roku 2 700 př. n. l., kdy byla sepsána první kniha o léčivých bylinách. Později v Mezopotámii, z období kolem roku 2 600 př. n. l. pocházejí nejstarší záznamy o farmaceutické praxi, které byly sepsány na hliněné tabulky. Z těchto pramenů se dozvídáme o dobových způsobech užívání např. myrhy, cyprišového oleje, lékořice nebo máku. V archeologických vykopávkách z období starověkého Egypta se objevila sbírka, která uvádí 800 podrobných receptů využívajících léčivé rostliny. Mezi „léky“ popsanými ve sbírce nacházíme i takové, které se v lékařství využívají dodnes, např. opium, jako prostředek pro tlášení bolesti.¹ Můžeme tedy pozorovat, že lidé v dávných dobách věděli, které byliny léčí, a které naopak škodí. V 19. století, díky pokroku v technice a nástupem nových vědeckých metod se podařilo z mnohých bylin izolovat a identifikovat některé léčivé látky. A tak farmaceutický průmysl mohl začít vzkvétat. V dnešní době pomocí moderních bioanalytických a strukturních metod lze cíleně izolovat a identifikovat chemické entity zodpovědné za již dříve pozorované léčivé účinky. Následné studium těchto přírodních léčivých látek nám pak dovoluje poznat a popsat jejich mechanismus účinku v organismu.²

Vyšší rostliny jsou bohatým zdrojem bioaktivních složek používaných ve farmaceutickém a kosmetickém průmyslu. Vedle základních primárních metabolitů (např. lipidů, aminokyselin a sacharidů) jsou vyšší rostliny také schopny biosyntetizovat širokou škálu sloučenin s nízkou molekulární hmotností – sekundárních metabolitů. Rostlinné sekundární metabolity jsou definovány jako sloučeniny, které nemají žádnou rozpoznatelnou roli při udržování základních životních procesů

v rostlinách (to mají na starost primární metabolismy), ale jsou důležité pro udržení/zlepšení kvality života a pro komunikaci rostlin s jejím prostředím.

Produkce těchto sloučenin je často nízká (méně než 1 % suché hmotnosti), a je velmi závislá na fyziologickém a vývojovém stadiu rostliny a na prostředí, ve kterém rostlina žije.³ Malý (koncentračně) výskyt těchto látek v rostlinách a jeho závislost na životních podmínkách rostliny značně omezuje možnosti jejich izolace z přírodních zdrojů. Jedinou možností, jak tento typ látek popsat a následně ohodnotit jejich bioaktivitu je cíleně připravit v laboratořích. Dalším perspektivním cílem spojeným s přípravou těchto látek je syntéza jejich analogů. Ty totiž mohou disponovat ještě lepší biologickou aktivitou/menší cytotoxicitou než měla původní přírodní látka.

V mé bakalářské práci se zabývám přírodními biologicky aktivními látkami, které patří do velmi rozsáhlé skupiny fenolických sekundárních metabolitů nazvaných fenylypropanoidy. Tedy přesněji, já se soustředím zejména na jednu „úzkou“ oblast pokrývající jeden specifický typ dimerů fenylypropanoidů nazvaný neolignan. Základní kostra neolignanů je tvořena dvěma fenylypropanoidovými jednotkami, které z pohledu biologických vlastností překypují širokým spektrem biologických vlastností. To je také důvod, proč tyto látky studujeme.

1.1 Cíle práce

Cílem této bakalářské práce je vyvinout nový univerzální přístup k neolignanovému skeletu.

Přesněji cíle mé práce jsou následující:

1. Vypracovat rešerši zabývající se syntézou a biologickou aktivitou neolignanů
2. Nastínit vývoj syntetické metody umožňující přípravu centrálního strukturního motivu neolignanů – benzofuranového skeletu
3. Otestovat připravené látky na jejich biologickou aktivitu
4. Charakterizovat všechny připravené látky pomocí dostupných fyzikálně-chemických metod

2 Teoretická část

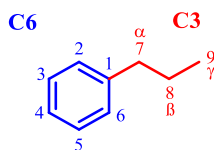
2.1 Neolignany - rostlinné sekundární metabolity fenylpropanoidového typu

2.1.1 Základní charakteristika

Neolignany patří do velmi rozsáhlé skupiny rostlinných sekundárních metabolitů, které spadají mezi přírodní látky fenolického typu.² Termín sekundární je mnohdy neoblíbený a to z důvodu, že může znamenat „méně důležitý“. Zde však atribut sekundární řeší jinou, a to v žádném případě méněcennou funkci. Jinou analogií by zde mohl být přírůstek se sekundární strukturou proteinů, která je samozřejmě stejně důležitá jako primární nebo terciální proteinová struktura.⁴ Sekundární metabolity jsou nepostradatelnou „výbavou“ rostlin, které je syntetizují z důvodu interakce jednotlivce (rostliny) s jeho prostředím. Jde především o ochranu před býložravci; před biotickým stresem, který mohou způsobovat infekce přenášené viry, bakteriemi či houbami; před abiotickým stresem vyvolaný změnami teplot a UV zářením. Dále jsou nepostradatelné pro opylovače a také působí jako odpuzovač proti škůdcům. Důležitou nepřímou roli hrají při vývoji a růstu organismu rostliny. Jejich nepřítomnost značně ovlivňuje kvalitu života. Pod selekčním tlakem neustále se měnícího prostředí se rostliny musí adaptovat, a protože k tomuto účelu rostliny využívají sekundární metabolity, je tedy jasné, že jich musí mít mnoho podskupin. Jen namátkou sem patří například terpeny, alkaloidy, anebo právě fenylpropanoidy.⁴⁻⁶

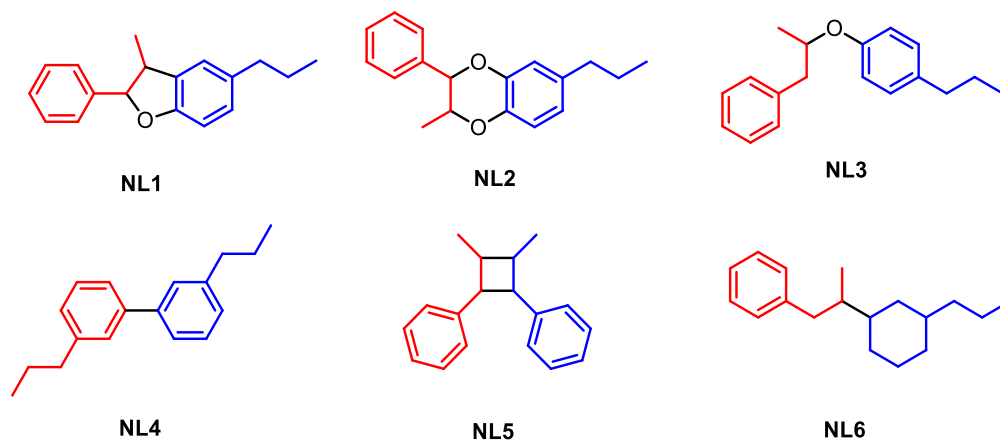
Do již zmíněné podskupiny fenylpropanoidů řadíme nejen neolignany, ale i lignany či lignin.⁶ Fenylpropanoidové sekundární metabolity jsou odvozené od aminokyselin fenylalaninu a tyrosinu a všechny tak mají uhlíkatou kostru složenou z C6-C3 jednotek. Tedy z benzenového jádra a postranního propylového řetězce (tzv. uhlovodíková funkční skupina).⁷ Podle IUPAC se základní fenylpropanoidová jednotka čísluje od 1 do 6 od propylové funkční skupiny přes aromatický kruh. Následně se

čísluje samotná propylová jednotka od 7 do 9. V některé literatuře se tyto uhlíky označují také jako α , β a γ . (Obr. 1)⁸



Obr. 1: Číslování základní fenylpropanoidové jednotky

Fenylpropanoidové dimery následně dělíme do dvou základních tříd. Nejdůležitější jsou lignany, které jsou tvořeny dvěma fenylpropanoidovými jednotkami, jež jsou spojeny σ kovalentní vazbou mezi atomy uhlíku C-8 (C- β) jednoho monomeru a C-8' (C- β') druhého monomeru (pro odlišení první monomer má čísla normální a druhý s '). Neolignany, druhá poněkud méně početně zastoupená třída, se liší od lignanů tím, že monomery jsou spojeny uhlíky jakýmkoliv jiným způsobem než přes C-8 (C- β) a C-8' (C- β'). U neolignanů ještě dále rozlišujeme jednu podtřidu – oxyneolignany. To jsou neolignany, kde jsou dva monomery spojené σ kovalentní vazbou C-O. Výše zmíněné typy vazeb mezi monomery ve spojení s rozličným stupněm oxidace aromatických jader, pak má za následek velmi strukturně rozmanité a bohaté počty neolignanů (Obr. 2).⁸ V mé bakalářské práci se zaměříme selektivně pouze na syntézu a vlastnosti 2,3-dihydrobenzofuranů typu **NL1**.

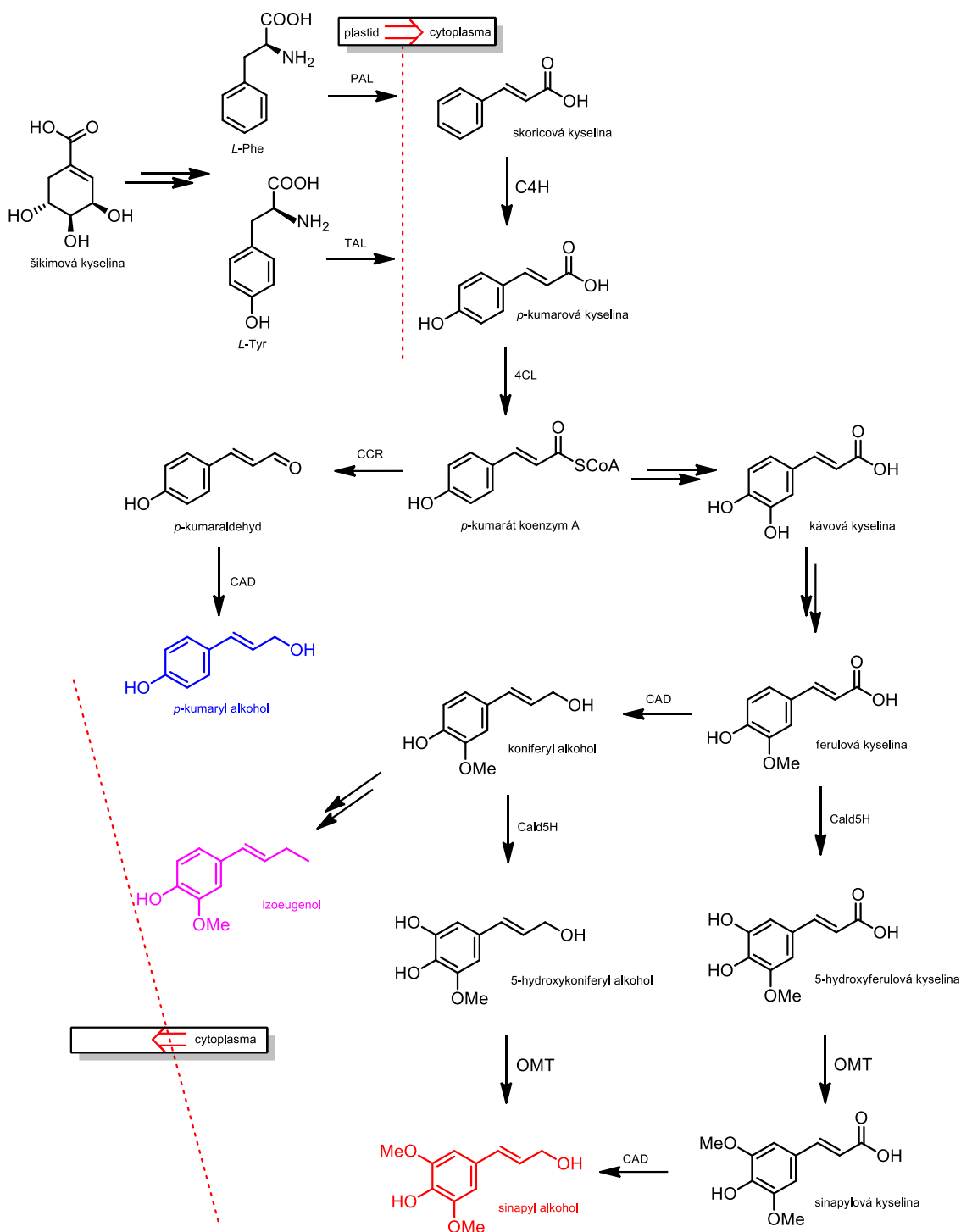


Obr. 2: Výběr charakteristických typů struktur neolignanů⁹

Také je třeba zmínit nejvýznamnější fenylpropanoidový polymer lignin. Jedná se o fenolový polymer, který umožňuje především skupině tracheofyta (patří sem plavuně, přesličky, kapradiny, nahosemenné a krytosemenné rostliny) fyzickou rigiditu a posiluje vodivé buňky pro transport vody na velké vzdálenosti.¹⁰

2.1.2 Biosyntéza

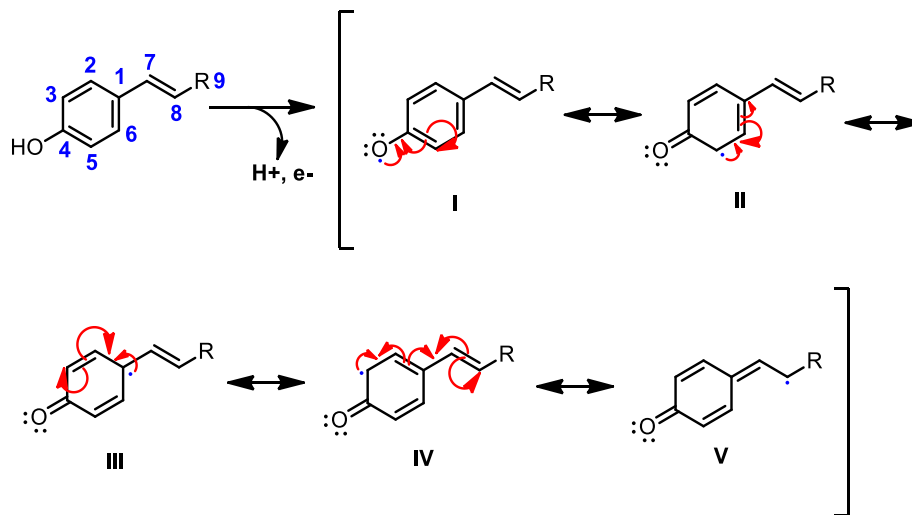
Rostliny syntetizují sekundární metabolity *de novo* z jednoduchých prekurzorů primárního metabolismu pomocí sofistikované sekvence reakcí katalyzovaných specifickými enzymy.⁴ Biosyntéza fenolických látek začíná šikimátovou dráhou, která nese název dle výchozí látky kyseliny šikimové. Samotná biosyntéza neolignanů pokračuje syntézou prekurzorů fenylpropanoidových monomerů. Kyselina šikimátová je aminována na aromatické aminokyseliny fenylalanin a tyrosin.² *L*-fenylalanin je následně v cytoplazmě neoxidativně deaminován fenylalaninamoniumlyázou (PAL) na *trans*-skořicovou kyselinu a amoniak. Odštěpuje se proton z C- β a poté se odštěpí aminoskupina z aminokyseliny. *L*-tyrosin se přeměňuje pomocí tyrosinamoniumlyázy (TAL) na 4-hydroxyskořicovou kyselinu (též známou jako kyselina *p*-kumarová), kterou lze dále transformovat na hydroxyskořicové deriváty (tzv. monolignoly), např. kyselinu sinapovou, kávovou či ferulovou. Její redukcí mohou vznikat i estery, alkoholy (např. koniferyl alkohol), aldehydy (*p*-kumaraldehyd) či alkeny (izoeugenol). Kyselina *p*-kumarová může vzniknout i z kyseliny skořicové prostřednictvím 4-hydroxylyázy (C4H). Následně reakcí kyseliny *p*-kumarové a 4-kumarát koenzym A ligázy (4CL) vzniká *p*-kumarát koenzym A, který má dvě metabolické cesty. První metabolická cesta dává vzniknout *p*-kumaryl alkoholu přes *p*-kumaraldehyd za pomoci skořicoát koenzym A reduktázy (CCR) a následnou reakcí se skořicoát alkoholdehydrogenázou (CAD). V druhé metabolické dráze *p*-kumarát koenzymu A jako první vzniká meziproduct kyselina kávová a následně kyselina ferulová, ze které poté za pomoci CAD vzniká koniferyl alkohol, anebo s koniferylaldehyd 5-hydroxylázy (Cald5H) pak vzniká 5-hydroxyferulová kyselina. Vícekrokovou úpravou koniferyl alkoholu získáme již zmíněný alken izoeugenol. Kyselina 5-hydroxyferulová dále reaguje s *O*-methyltransferázou (OMT) za vzniku sinapylové kyseliny, která se může reakcí s CAT přeměnit na sinapyl alkohol. Tento alkohol můžeme získat i z koniferyl alkoholu, který reaguje s Cald5H za vytvoření 5-hydroxykoniferyl alkoholu a ten poté s OMT dává vzniknout sinapyl alkoholu (Obr. 3).^{2,5,7,8,11–13}



Obr. 3: Nástin biosyntetické cesty fenylpropanoidních monomerů vycházejících ze šikimátové dráhy (převzaté a upravené ze Zálešák et al. 2019)

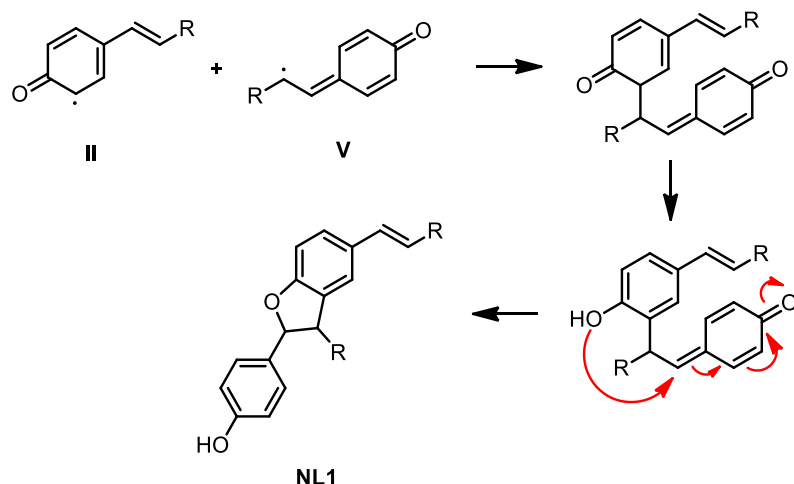
Tyto tři zvýrazněné monolignany jsou v přírodě dále dimerizovány a polymerizovány prostřednictvím fenol-oxidačního couplingu (POC), která umožňuje spojení jednotlivých monomerů vytvořením nových C-C nebo C-O vazeb.^{2,8} Tato dimerizace monomerů probíhá radikálovým mechanismem a je zprostředkována

enzymy lakkázami a peroxidázami.¹¹ Tyto dva enzymy se od sebe liší hlavně přítomností jiného tranzitního kovu v aktivním místě. Lakkázy obsahují Cu^{2+} , zatímco peroxidázy Fe^{2+} . Tyto kovy pak zajišťují jednoelektronovou oxidaci fenolátového anionu fenylypropanoidů za vzniku fenoxidového radikálu, který můžeme znázornit pomocí pěti rezonančních struktur (Obr. 4).⁸



Obr. 4: Číslování 4-hydroxyfenylpropanoidového monomeru podle IUPAC a jeho jednoelektronová oxidace tvořící mezomerní formy fenoxidového radikálu⁸

Fenylypropanoidové jednotky **II** a **V** následně podléhají dimerizaci za vzniku různých dimerů s rozličnými biologickými vlastnostmi. Mezi dvěma monomery se tak formují nové C-C nebo C-O vazby. Takto vzniklý dimer následně podléhá post dimerizačním neenzymatickým reakcím a poskytuje lignany a neolignany, jako různé strukturální deriváty (Obr. 5). Mohou tedy vznikat opticky čisté látky stejně jako racemáty.⁸

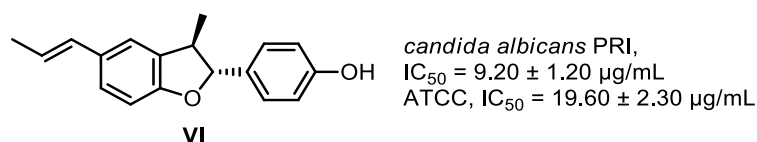


Obr. 5: Příklad fenol-oxidačního couplingu (POC), kde probíhá 5,8'-dimerizace a poskytuje neolignan 2,3-dihydrobenzofuranového typu známého pod označením **NL1**

2.1.3 Zástupci neolignanů a jejich biologická aktivita

V této části bakalářské práce jsem se zaměřila na neolignany typu NL1, tedy 2,3-dihydrobenzofuranového typu a uvedla jsem ty, které vykazující antifungální, cytotoxickou, antialergickou, antibakteriální a anti-HIV aktivitu. Zmíněná biologická aktivita je pak důvodem k cílené laboratorní syntéze těchto látek.

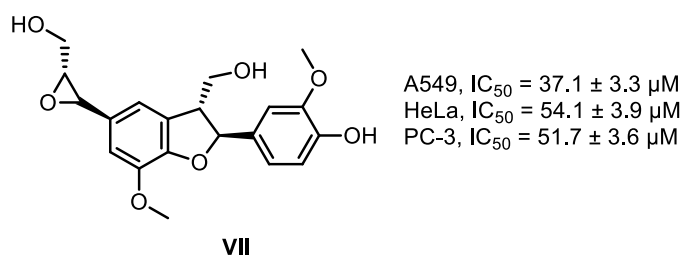
Conocarpan (VI)



Obr. 6: Chemická struktura conocarpanu **VI** a jeho antifungální aktivita

Látka conocarpan **VI** byla nalezena v několika druzích rostliny rodu *Piper*, jako jsou například *P. regnellii*, *P. solmsianum*, *P. decurrens*, *P. abutiloides*, *P. kadsurai*, a *P. rivinoide*. Vykazuje antifungální aktivitu proti kmenům *Candida albicans* (PRI, $IC_{50} = 111.1 \pm 38.80$, 75.60 ± 22.10 , $9.20 \pm 1.20 \mu\text{g/mL}$, ATCC 10231 = 113.40 ± 4.80 , 65.10 ± 3.80 , $19.60 \pm 2.30 \mu\text{g/mL}$), bylo však také zjištěno, že je cytotoxická pro buňky savců. Za zmínku stojí i její proapoptotický účinek, ale stále chybí informace o jejím podrobném mechanismu.¹⁴

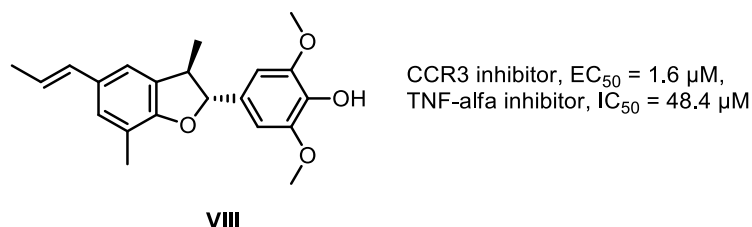
Lyciumnan (VII)



Obr. 7: Chemická struktura lyciumnanu VII a jeho cytotoxická aktivita

Neolignan lyciumnan VII byl izolován, jako bezbarvá olejovitá kapalina, z listů *Lycium barbarum* i s dalšími známými sloučeninami, jako například s kyselinou ferulovou a kyselinou *p*-kumarovou.¹⁵ *L. barbarum* patří mezi tradiční čínské léčivé rostliny, jejíž plody a listy se používají jako fytopreparáty a připravují se z nich speciální čaje.¹⁶ Lyciumnan VII vykazuje mírnou cytotoxickou aktivitu proti buněčným liniím A549 ($IC_{50} = 37.1 \pm 3.3$), HeLa ($IC_{50} = 54.1 \pm 3.9$) a PC-3 ($IC_{50} = 51.7 \pm 3.6$).¹⁵

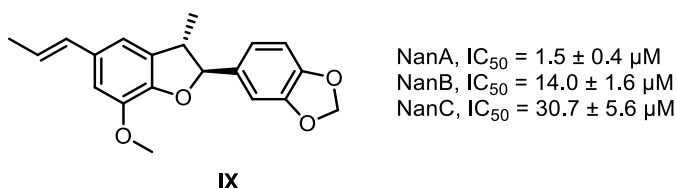
Maceneolignan A (VIII)



Obr. 8: Chemická struktura maceneolignan A VIII a jeho antialergická aktivita

Bylo odhaleno, že maceneolignan A VIII z rostliny *Myristica fragrans* je účinným inhibítorem ($EC_{50} = 1.6 \mu M$) CC chemokinového receptoru 3 (CCR3), který hraje hlavní roli při alergických onemocněních.¹⁷ V další publikaci autoři zjistili, že maceneolignan A VIII je silným inhibítorem produkce faktoru nekrózy nádorů- α (THF- α) ($IC_{50} = 48.4 \mu M$), který se účastní pozdní fáze alergických reakcí typu I.¹⁸

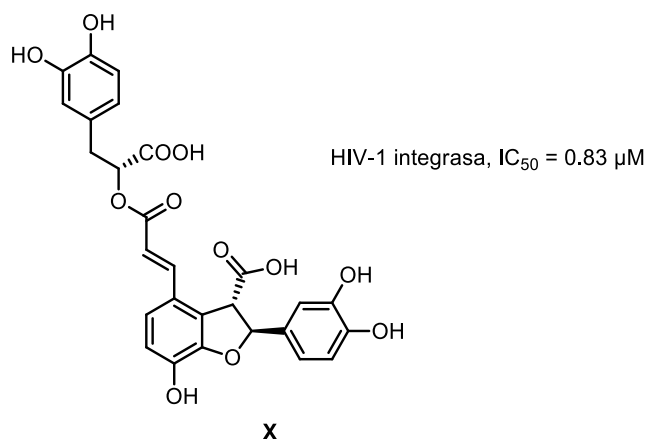
Licarín B (IX)



Obr. 9: Chemická struktura licarínu B IX a jeho antibakteriální aktivita

Látka licarín B IX byla izolována z rostliny *Myristica fragrans*, jako již zmíněná sloučenina maceneolignan A VIII. Tento neolignan působí proti bakterii *Streptococcus pneumoniae*, hlavnímu původci meningitidy a pneumonie. Licarín B působí inhibicí sialidázy NanA (IC₅₀ = 1.5 ± 0.4 μM), NanB (IC₅₀ = 14.0 ± 1.6 μM) a NanC (IC₅₀ = 30.7 ± 5.6 μM).¹⁹

Lithospermic acid (Litospermová kyselina) (X)



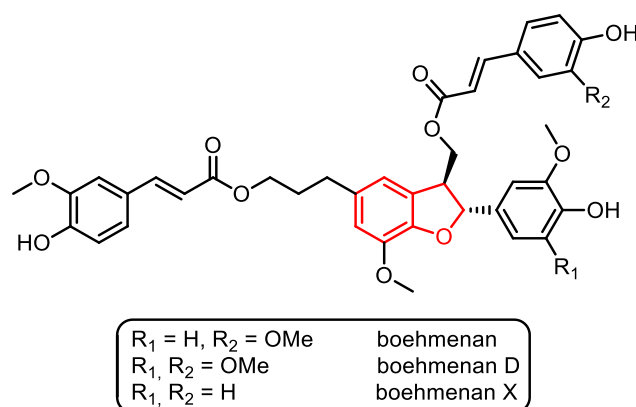
Obr. 10: Chemická struktura litospermové kyseliny X a její anti-HIV aktivita

Izolací z kořene byliny *Salvia miltiorrhiza*, byla získána kyselina litospermová X, která vykazuje silnou inhibici anti-HIV a nevykazuje žádnou cytotoxicitu pro lidské embryonální kmenové buňky H9 a to i při vysokých koncentracích. Bylo zjištěno, že IC₅₀ pro inhibici 3'-zpracování pomocí HIV-1 integrasy je 0.83 μM. Tento selektivní inhibitor integrasy by tedy mohl být novým terapeutickým léčivem pro AIDS, díky jeho vysoké účinnosti a necytotoxicitě.²⁰

2.2 Předcházející práce v naší výzkumné skupině

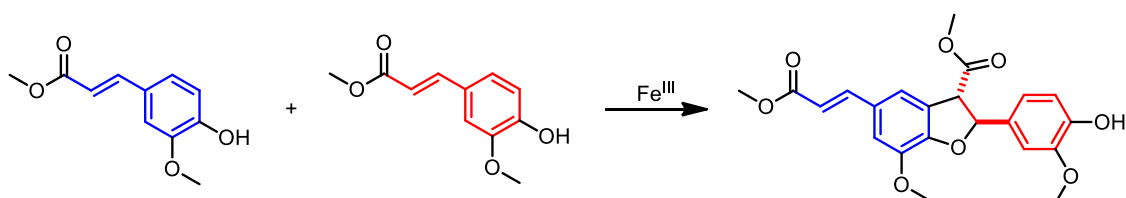
Jeden z cílů naší výzkumné skupiny je vyvinout nový přístup, resp. metodu, která by nám umožnila připravit benzofuranový skelet a z něj pak dále neolignanový skelet 2,3-dihydrobenzofuranového typu. Náš zájem o syntézu tohoto motivu je tedy založen na jeho očekávané biologické aktivitě.²¹ Navíc se také ukazuje, že některé vybrané deriváty těchto látek by mohli působit jako cytokininy (fytohormony) v signálních drahách rostlin.²²

Druhým cílem našeho zájmu jsou boehmenany (Obr. 11). Tyto látky byly identifikovány díky extrakčně řízeným biologickým testům různých rostlinných extraktů používaných v tradiční čínské medicíně.²³



Obr. 11: Vybraní zástupci třídy boemenanů

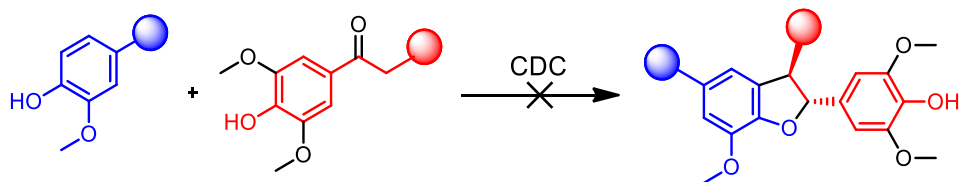
V předcházející práci naší skupiny se Mgr. Hana Kozubíková a Mgr. Daniela Konrádová zabývaly radikálovým homocouplingem dvou esterů za použití železa v oxidačním stavu (III), ale tyto reakce poskytovaly nízké výtěžky a pouze homodimery (Obr. 12).^{24–26}



Obr. 12: Radikálový homocoupling dvou esterů za použití železa v oxidačním stavu III

Syntézou Boehmenanu D se zabýval Bc. Pavol Tuna a Bc. Eliška Lachetová se ve své bakalářské práci zaměřila na neolignany. Ukázalo se, že ani jedna kombinace fenyln-β-ketoesteru neposkytuje při radikálovém kříženém dehydrogenačním couplingu

(CDC) benzofuranový produkt (Obr. 13).^{27,28} Obdobně tomu bylo i u Mgr. Zuzany Barbuščákové a jejího přístupu k tomuto motivu.²



Obr. 13: Radikálový křížený dehydrogenační coupling

Proto jsme sestavili vývoj nové metody založené na diazosloučeninách a Suzuki couplingu. Cílem této práce je tedy vyvinout nový přístup k neolignanovému skeletu – benzofuranovému jádru, která by nám následně umožnila připravit látky přírodního charakteru, které jsou známy pro své zajímavé biologické vlastnosti.

3 Výsledky a diskuze

Jak již bylo řečeno, cílem mojí bakalářské práce je vyvinout modulární syntézu benzofuranových skeletů. Jako cílová modelová struktura tak byla zvolena látka **1**, která je v podstatě nejjednodušší formou cílového skeletu neolignanů (Schéma 1). V následujících podkapitolách bych vás, milé čtenáře mé bakalářské práce, ráda provedla po cestě, kterou jsem ušla, abych se k této cílové molekule dostala.

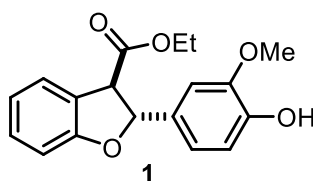


Schéma 1: Struktura cílové molekuly **1** – modelového substrátu pro naše cílové neolignany

3.1 Retrosyntéza

V naší skupině jsme se o syntézu cílové molekuly, (2*R*,3*R*)-ethyl 2-(4-hydroxy-3-methoxyfenyl)-2,3-dihydrobenzofuran-3-karboxylátu (**1**), v minulosti již několikrát pokoušeli (viz kapitola 2.2). Naše přístupy se setkávali s větším i menším úspěchem, ale jeden rys měly společný – ani jeden z nich nebyl obecně uplatnitelný. Proto jsme se rozhodli, že náš nový retrosyntetický přístup musí být co nejobecnější. Při retrosyntetickém plánování jsme tak hlavní důraz kladli na modulární (z hodně „building“ bloků) a konvergentní (můžeme měnit části molekul v průběhu syntézy) přístup. Na základě těchto dvou hlavních požadavků jsme navrhli postup ukázaný na Schéma 2.

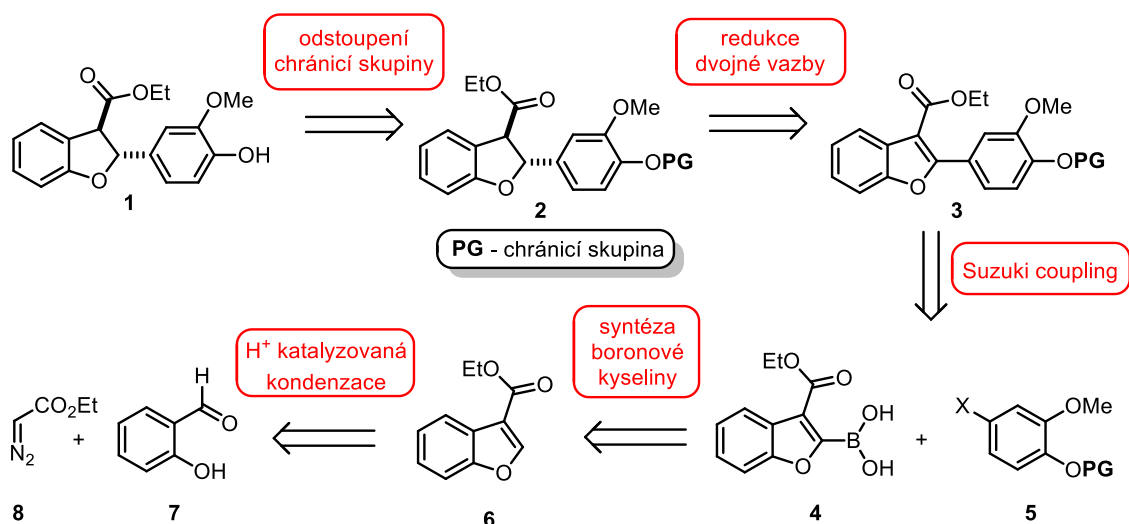


Schéma 2: Retrosyntéza naší cílové molekuly (2*R*,3*R*)-ethyl 2-(4-hydroxy-3-methoxyfenyl)-2,3-dihydrobenzofuran-3-karboxylátu **1**

Předpokládali jsme tedy, že látka **1** může být stereoselektivně (relativní stereochemie) připraven selektivní *anti*-redukcí benzofuranu **3** (radikálové podmínky).²⁹ Z pohledu modularity a budoucího testování na biologickou aktivitu, *cis*-hydrogenace je samozřejmě také možná. Syntéza benzofuranu **3** by byla založena na Suzuki-Miyaura couplingu mezi boronovou kyselinou **4** a odpovídajícím arylhalogenidem **5**. Samozřejmě, že v tomto kroku bychom mohli zvolit i opačný přístup (benzofuran s halogenidem a odpovídající aryl boronovou kyselinu – modulární přístup), ale z pohledu dostupnosti arylhalogenů a z pohledu syntézy boronové kyseliny **4**, která může být snadno získána z benzofuranu **6**, jsme se nejprve rozhodli pro tento přístup.

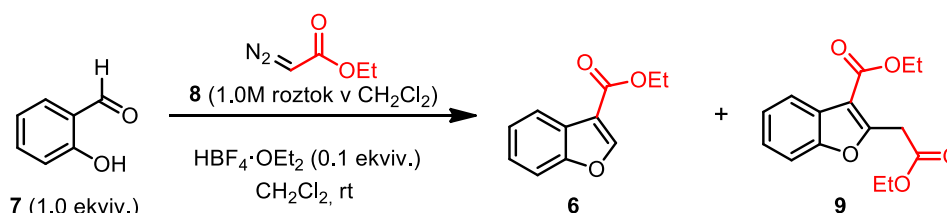
Boronová kyselina **4** tedy může být snadno připravena z benzofuranu **6** (selektivní lithiace/reakce s esterem kyseliny borité), tak nám již pouze zbýval vymyslet přístup k benzofuranovému skeletu **6**. V tomto ohledu jsme se rozhodli využít kyselou katalyzovanou kondenzační reakce mezi salicylaldehydem **7** a diazoesterem **8**.^{30,31}

3.2 První krok – syntéza základního skeletu **6**

Prvním klíčovým krokem našeho syntetického přístupu je kondenzační reakce mezi salicylaldehydem **7** a ethyl diazoesterem **8**. Tato reakce již byla nedávno v literatuře popsána a to dokonce i na stejném substrátu.^{30–32} Z literatury tedy víme, že tento typ kondenzace probíhá nejlépe, pakliže je katalyzován silnou Brønstedovou kyselinou (HBF₄). Pokusili jsme se tedy publikované reakční podmínky reprodukovat (Tabulka 1, řádek 1). Bohužel, výtěžek reakce byl pouze 12 % a ani konverze aldehydu **7** nebyla

kompletní. Spekulovali jsme, že možná za nízkým výtěžkem stojí rychlé přidání diazosloučeniny **8**, které mohlo vést k její dimerizaci/polymerizaci v kyselém prostředí. Rozhodli jsme se tedy její roztok přidat kontrolovaným způsobem a snížit její ekvivalenty (řádek 2). Bohužel ani v tomto případě nedošlo ke zvýšení výtěžku reakce. Dále jsme měnili ekvivalenty diazosloučeniny **8** (řádky 3-6) a zjistili jsme, že zvýšením množství diazolatky **8** dochází ke zvýšení konverze aldehydu **7**. Výtěžek reakce však nekoreloval s tímto zjištěním. Při použití 3.7 ekvivalentu látky **8** se nám ale povedlo izolovat a identifikovat jeden z vedlejších produktů reakce, látku **9** (řádek 6).

Tabulka 1: Optimalizace reakce mezi salicylaldehydem **7** a diazoesterem **8**



Řádek	Diazoacetát 8 (ekviv.)	Rychlost přidavku	Konverze látky 7 [%] ^{a)}	Výtěžek látky 3 [%] ^{b)}	Výtěžek látky 4 [%]
1	2.1 ekviv	Najednou	~65 %	12 %	n.d. ^{c)}
2	1.6 ekviv.	0.20 mL/min ^{d)}	~40 %	18 %	n.d. ^{c)}
3	3.0 ekviv.	0.20 mL/min ^{d)}	~80 %	52 %	n.d. ^{c)}
4	2.5 ekviv.	0.20 mL/min ^{d)}	~65 %	32 %	n.d. ^{c)}
5	2.0 ekviv.	0.20 mL/min ^{d)}	~50 %	28 %	n.d. ^{c)}
6	3.7 ekviv.	0.20 mL/min ^{d)}	~95 %	63 %	22 % ^{b)}
7	3.2 ekviv.	0.12 mL/min ^{d)}	~85 %	42 %	n.d. ^{c)}
8	2.1 ekviv.	0.08 mL/min ^{d)}	~75 %	52 %	n.d. ^{c)}
9	2.1 ekviv.	0.06 mL/min ^{d)}	stopy	70 %	n.d. ^{c)}

a) Určeno na základě analýzy ¹H NMR spektra surové reakční směsi (pouze přibližné určení bez použití vnitřního standardu)

b) Pro izolovanou čistou látku

c) Nebyl detekován

d) Přídavek reagentu dáván pomocí injekční pumpy

Toto pozorování nás dovedlo k závěru, že neustálé zvyšování přidavku diazosloučeniny **8** do reakční směsi sice zvyšuje konverzi aldehydu **7**, ale zároveň generuje značné množství vedlejších produktů. Proto jsme se postupně rozhodli přidat látku **8** pomaleji do reakční směsi (řádek 7). S radostí jsme pozorovali, že v tomto případě došlo k tvorbě produktu ve 42% výtěžku. Následné postupné snižování ekvivalentů a rychlosti přidavku diazosloučeniny **8**, nás pak vedlo k identifikaci

optimálních reakčních podmínek, za kterých došlo k úplné konverzi výchozí látky (aldehyd **7**) a k izolaci kýženého benzofuranu **6** v 70% výtěžku (řádek 9).

S optimalizovaným kondenzačním krokem jsme se hned mohli vrhnout na další krok syntézy. Předtím jsme ale chtěli přijít na to, jak v reakci vzniká vedlejší produkt **9**. Pakliže se zamyslíme nad reakčním mechanismem (Schéma 3), pak při reakci nejprve dojde k aktivaci aldehydu (H^+ katalýza, intermediát **10**), který tak může reagovat s diazolátkou **8**. Produkt adice **11** pak podléhá migraci fenylu za vzniku dikarboxylové sloučeniny **12**. Následná kondenzace (intramolekulární adice spojená s H^+ katalyzovanou eliminací vody) pak vede k produktu **6**.

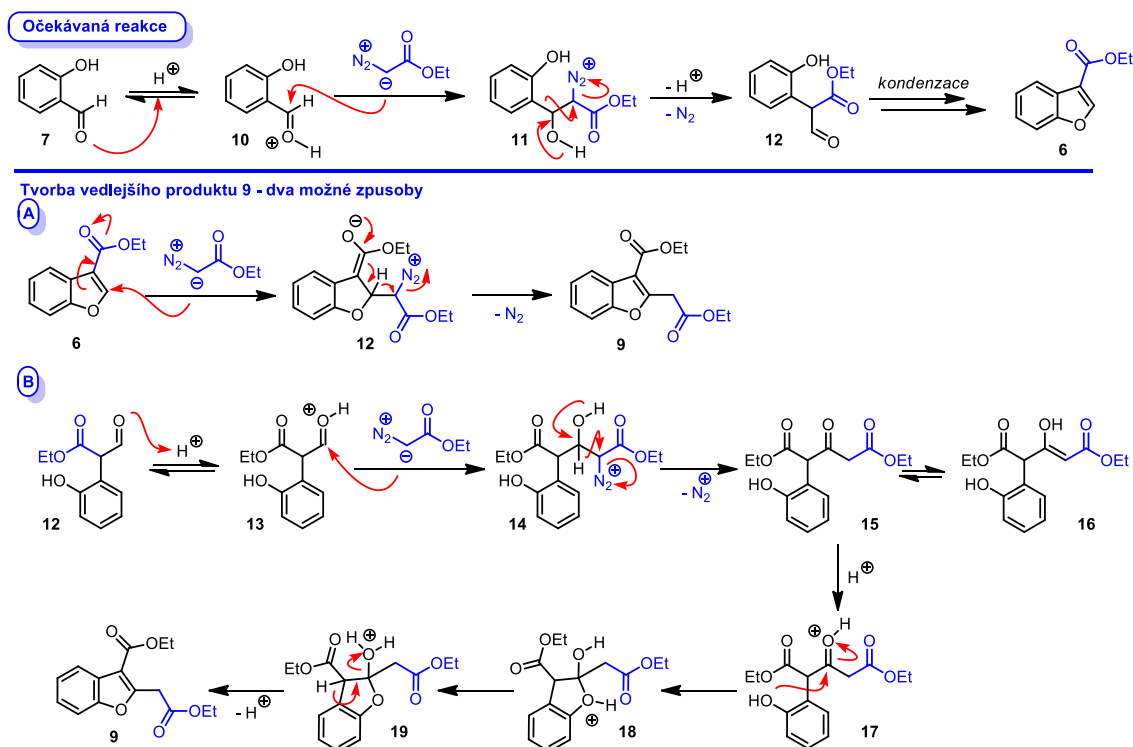


Schéma 3: Reakční mechanismus vzniku benzofuranu **6** (očekávaná reakce) a dvě navržené možné reakční cesty vedoucí ke vzniku vedlejšího produktu **9**

Vezmeme-li v úvahu tyto dva reakční mechanismy, tak produkt **9** může vzniknout, buďto z produktu **6** *via* Michaelovou adicí **8** na **6**, po které následuje migrace hydridového atomu vodíku a rearomatizací systému na látku **9** (možnost **A**), anebo z intermediátu **12** (možnost **B**). Ve druhém případě by pak dikarboxylová látka **12** podléhala adici s druhou molekulou diazolátky **8** za vzniku aduktu **14**, který po migraci hydridu vygeneruje β -ketoester **15**, který může podlehnout kondenzační reakci (intramolekulární cyklizace/eliminace vody) za vzniku námi pozorované látky **9**.

Obě tyto možnosti nám připadali přijatelné, ale díky kontrolnímu experimentu, kdy jsme nechali adukt **6** reagovat s nadbytkem diazosloučeniny **8** v přítomnosti HBF_4 (žádná pozorovaná reakce) jsme mohli možnost **A** vyloučit.

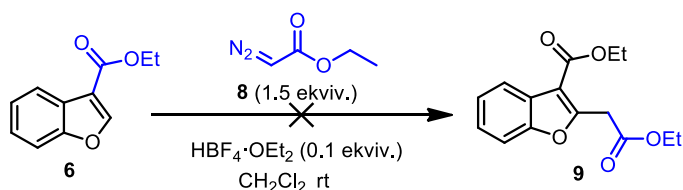


Schéma 4: Kontrolní experiment provedený za účelem potvrzení/vyvrácení navrženého mechanismu **A** pro tvorbu látky **9**

3.3 Suzuki coupling

Po optimalizování kondenzační reakce vedoucí k benzofuranu **6** jsme se vrhli na druhý klíčový krok – Suzukiho coupling^{33,34} (Schéma 5). Samozřejmě k tomu, abychom mohli tento krok úspěšně otestovat, tak jsme si nejprve museli připravit obě výchozí látky, boronovou kyselinu **4** a arylhalogenid **5**.

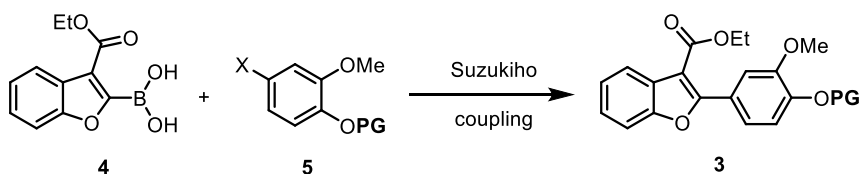


Schéma 5: Druhý klíčový krok – Suzukiho coupling

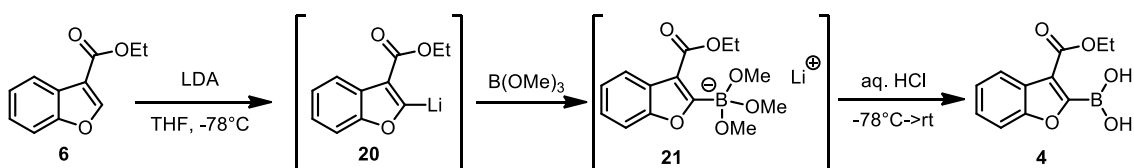
3.3.1 Příprava boronové kyseliny **4**

Nejprve jsme se zaměřili na syntézu boronové kyseliny **4**. Předpokládali jsme, že zavedení kyseliny borité do skeletu benzofuranu **6** nebude příliš obtížné, neboť je známo, že benzofurany snadno podléhají lithiaci v pozici 2 benzofuranového skeletu.³⁵ Předpokládali jsme také, že když použijeme nenukleofilní bázi (LDA), pak budeme moci generovat lithiovaný benzofuran **20** přímo v reakční směsi v přítomnosti s elektrofilem, esterem kyseliny borité ($\text{B}(\text{OMe})_3$). Vhodně zvolený acidobazický „work up“, pak *in situ* hydrolyzuje generovaný adukt **21** na cílenou kyselinu **4**.

Nejprve jsme tedy provedli reakci s 2.2 ekvivalenty LDA a $\text{B}(\text{OMe})_3$ (Tabulka 2, řádek 1). Očekávaný produkt byl izolován ve výtěžku 18 %. Povzbuzeni tímto výsledkem jsme se jali modifikovat ekvivalenty báze a trimethyl borátu, abysme nakonec zjistili, že je potřeba použít 3.0-3.5 ekvivalentu LDA a 2.2 ekvivalentu

boritého esteru (řádky 4 a 5). V tomto případě lze izolovat cílovou kyselinu **4** ve výtěžku mezi 80-85 %.

Tabulka 2: Optimalizace přípravy kyseliny borité **4**



Řádek	LDA (ekviv.)	B(OMe) ₃ (ekviv.)	Výtěžek látky 7 [%] ^{a)}
1	2.2 ekviv.	2.2 ekviv.	18 %
2	6.6 ekviv.	4.4 ekviv.	14 %
3	2.2 ekviv.	2.2 ekviv.	63 %
4	3.0 ekviv.	2.2 ekviv.	80 %
5	3.5 ekviv.	2.2 ekviv.	85 %
6	2.2 ekviv.	3.5 ekviv.	15 %
7	2.2 ekviv.	1.1 ekviv.	21 %
8	2.5 ekviv.	2.5 ekviv.	19 %

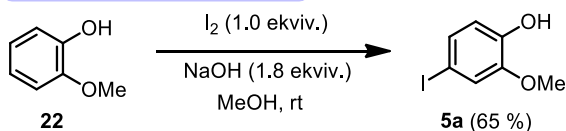
a) Odpovídá čistému izolovanému produktu.

3.3.2 Příprava jodo derivátů **5**

Následně jsme se vrhli na přípravu druhého reakčního partnera, arylhalogenidu **5**. Rozhodli jsme se, že z důvodu snadné syntézy se zaměříme nejprve na přípravu jodo derivátů od substrátu **5**. Jako výchozí látku jsme zvolili přírodní látku quaiacol **22**, která byla s pomocí publikovaného protokolu transformována na odpovídající aryljodid reakcí s I₂ v bazickém prostředí (Schéma 6A).³⁶ Jodo derivát **5a** byl připraven v 65% výtěžku.

Protože jsme měli z minulých let ve skupině zkušenosti s nekompatibilitou různých chránících skupin na těchto typech substrátů, ihned jsme si připravili i dva další deriváty jodoarylu **5a**. První z nich byl ochráněn na fenolu pomocí benzylové skupiny (látko **5b**, izolována v 55% výtěžku) a druhý pomocí TBS chránící skupiny (látko **5c**, izolována ve výtěžku 50 %).

A - Syntéza jodo derivátu 5a



B - Transformace jodo derivátu 5a na O-chráněné deriváty 5b a 5c

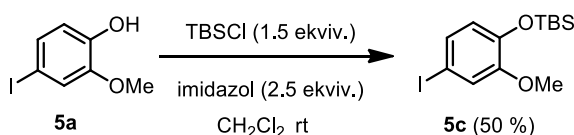
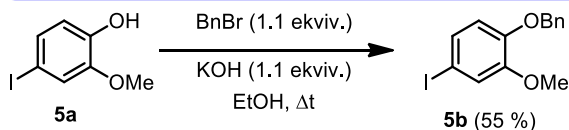


Schéma 6: Příprava jodo derivátů 5

3.3.3 Suzuki coupling – optimalizace couplingového kroku

Suzuki-Miyaura coupling³⁷ umožňuje provádět reakce za (a) v protickém prostředí a za (b) využívá snadno dostupné a stabilní reakční partnery, jako kyselinu boritou. Reakce je obdobně jako všechny ostatní cross-kopulační reakce katalyzována komplexy palladia v oxidačním stavu (0).

Pakliže se na tuto reakci podíváme trochu důkladněji, tak Suzuki coupling je v podstatě několik po sobě jdoucích reakcí, kdy palladiový katalyzátor je jakousi spojnicí mezi nimi (Schéma 7). Podívejme se na to ještě trochu důkladněji a v kontextu našich substrátů. Prvním krokem je oxidativní adice palladia (0) do vazby aryl(C-sp²)-jód (reakce s aryljodidem **5**). Při tomto kroku dojde k oxidaci palladia z oxidačního čísla (0) na (II). Tento krok je důležitý, protože intermediát **23** pak dále může v katalytickém cyklu vystupovat jako elektrofil (na palladiu). Následně dojde k výměně ligandů (ligand I za OH⁻ - reakce probíhá v přítomnosti NaOH) a tento nový intermediát **24**, tak může vstoupit do reakce s borátovým anionem **25**. Tento tzv. „ate“ komplex vzniká v reakční směsi z důvodu interakce mezi volným orbitalem na atomu bóru boronové kyseliny **4** a hydroxylovým anionem. Tato etapa je velice důležitá, protože ještě více aktivuje původní boronovou kyselinu a zvyšuje její reaktivitu vůči elektrofilnímu komplexu **24**. Následná transmetalace (výměna ligandů na Pd (II) spojená se vznikem stabilního borátu) pak dává za vznik intermediátu **26**. Při transmetalaci nedochází ke změně oxidačního čísla na palladiu. Komplex **26** ale není úplný šampion stability, protože na

něm již nejsou stabilizující ligandy a podléhá reductivní eliminaci. Při této reakci dochází konečně ke vzniku kýžené C-C vazby a tedy produktu **3**. Zároveň se do reakční směsi uvolňuje palladiový katalyzátor, ale tentokrát již v oxidačním stavu (0). Takže nový cyklus s reakcí mezi dvěma novými molekulami kyseliny borité **4** a aryljodidem **5** může začít.³⁸

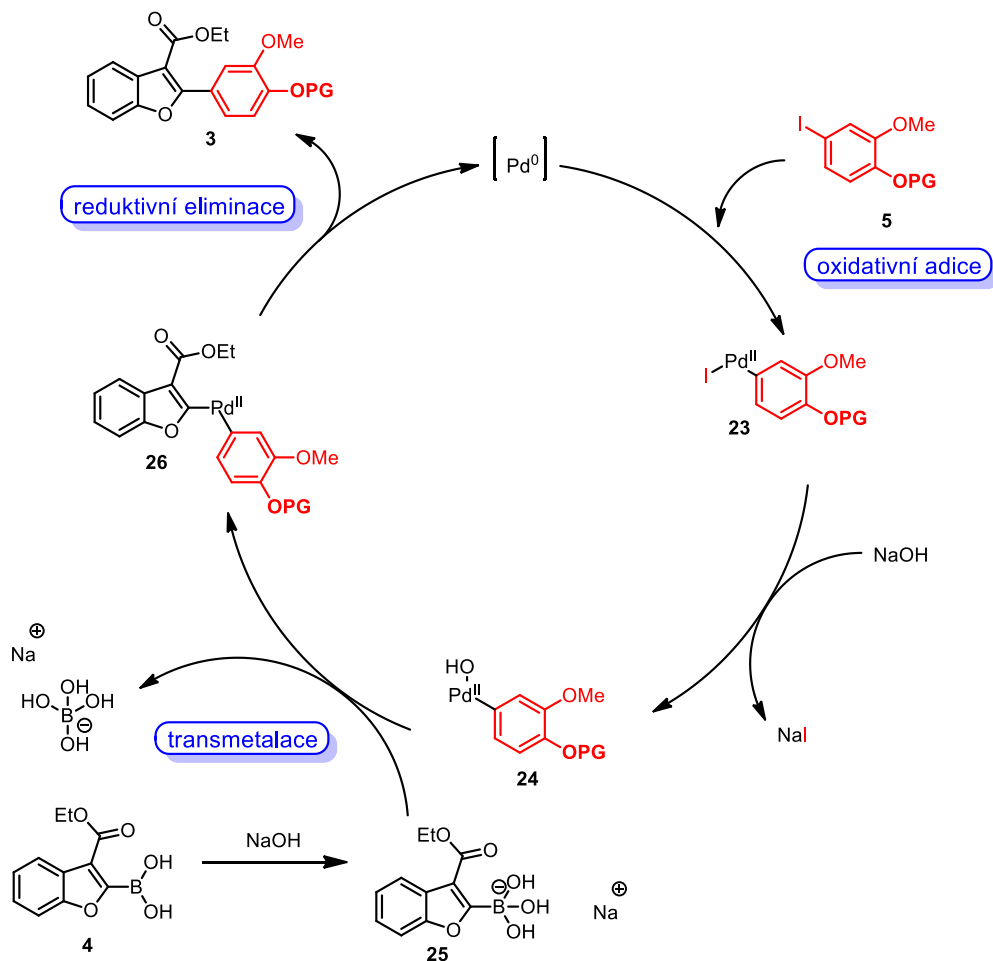
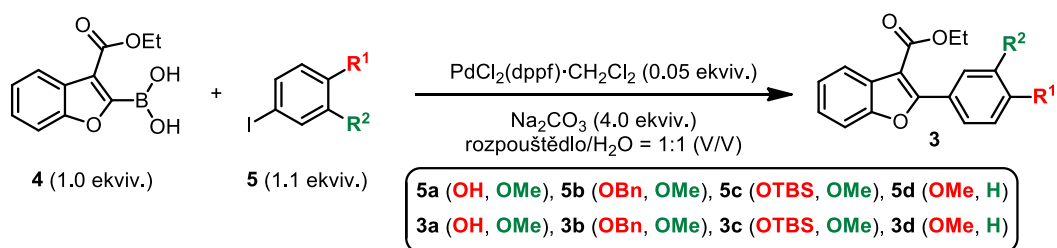


Schéma 7: Reakční mechanismus Suzuki couplingu v kontextu mých substrátů

Testování reakčních podmínek Suzukiho couplingu jsme začali screeningem reakčních podmínek (Tabulka 3). Jako katalyzátor jsme použili PdCl₂(dppf)·CH₂Cl₂ (jde o pre-katalyzátor, protože Pd je v oxidačním stavu (II)). Před reakcí je *in situ* Pd (II) redukováno přítomnou bází na Pd (0), který následně vstupuje do reakčního cyklu.

Tabulka 3: Optimalizace Suzukiho couplingu^{a)}



Řádek	Aryljodid (R ¹ , R ²)	Rozpouštědlo	Teplota	Čas [h]	Očekávaný produkt (R ¹ , R ²)	Konverze ^{b)} (výťažek, %) ^{c)} látky 3
1	5b (OBn, OMe)	1,4-dioxan	40°C	5 h	3b (OBn, OMe)	99 % (n.a.) ^{d)}
2	5d (OMe, H)	1,4-dioxan	40°C	5 h	3d (OMe, H)	99 % (n.a.) ^{d)}
3	5d (OMe, H)	DME	40°C	5 h	3d (OMe, H)	99 % (n.a.) ^{d)}
4	5b (OBn, OMe)	DME	40°C	5 h	3b (OBn, OMe)	99 % (32 %)
5	5b (OBn, OMe)	DME	40°C	5 h	3b (OBn, OMe)	99 % (27 %)
6	5b (OBn, OMe)	DME	40°C	2 h	3b (OBn, OMe)	89 % (7 %)
7	5b (OBn, OMe)	DME	70°C	5 h	3b (OBn, OMe)	deg.
8	5c (OTBS, OMe)	DME	70°C	5 h	3c (OTBS, OMe)	deg.
9	5a (OH, OMe)	DME	70°C	5 h	3a (OH, OMe)	deg.
10	5c (OTBS, OMe)	DME	40°C	5 h	3a ^{e)} (OH, OMe)	57 % (18 %)
11	5a (OH, OMe)	DME	40°C	5 h	3a (OH, OMe)	deg.
12	5b (OBn, OMe)	DME	40°C	12 h	3b (OBn, OMe)	99 % (64 %)

a) Reakce prováděny na 0,085 mmol boronové kyseliny 4

b) Konverze udává poměr mezi detekovaným produktem 3 a výchozí látkou 4 (0 % - pouze výchozí látka přítomna; 99 % - pouze produkt přítomen, deg. – degradace, není přítomna ani výchozí látka 4, ani produkt 3). Zjištěno na základě analýzy ¹H NMR spekter surové reakční směsi

c) Odpovídá izolovanému produktu po čištění pomocí kolonové chromatografie na SiO₂

d) Izolace produktů nebyla po reakci provedena

e) Desilylovaný produkt 3a byl po reakci izolován místo očekávaného produktu 3c.

Při optimalizaci reakčních podmínek jsem použila dvě různá rozpouštědla, 1,4-dioxan a DME, dvě různé teploty, 40°C a 70°C (teploty se vztahují k teplotě lázně), a čtyři různé substráty 5a-d (*p*-methoxy jodobenzen 5d byl použit jako „standardní“ výchozí látka pro otestování reakčních podmínek). Ukázalo se, že pokud probíhá reakce za vyšší teploty (70°C, řádky 7 a 8), tak dochází k degradaci boronové kyseliny 4. Konverze boronové kyseliny 4 byla jak v 1,4-dioxanu, tak v DME po 5 h kvantitativní. ¹H NMR spektra surové reakční směsi po reakci ale ukázali, že reakce provedené

v DME jsou mnohem čistší (méně vedlejších produktů a degradace). Bohužel jsme zjistili, že za těchto prvních podmínek (řádek 4) jsme schopni z reakční směsi izolovat cílový produkt **3b** pouze v 32% výtěžku (pozorovaná konverze látky **4** byla >99 %). Reakci jsme ještě jednou zopakovali (řádek 5), ale dosáhli jsme velice podobného výtěžku. Zkrácení reakční doby, abychom zabránili potencionální degradaci produktu **3b** také nepomohlo (řádek 6). Výše zmíněné zvýšení teploty resp. změna reakčních partnerů vedla pouze k degradaci boronové kyseliny **4** (řádky 7-9). Pakliže byly substráty **5a** a **5c** reagovány při 40°C (řádky 10 a 11), tak v případě fenolu **5a** docházelo k degradaci aryljodidu **5a** a v případě substrátu **5c** byl izolován jako jediný produkt reakce fenol **3a** vzniklý pravděpodobně desilylací produktu **3c** po úspěšném couplingu (předpokládáme, že pokud by došlo k desilylaci před couplingem, tak by výsledný aryljodid **5a** podlehl degradaci stejně, jako tomu bylo v případě reakce na řádku 11). Nakonec se ukázalo, že pakliže podstatně zvýšíme reakční čas, tak jsme schopni izolovat kýžený produkt couplingu **3b** v 64% výtěžku.

Vybavení tímto povzbudivým výsledkem a dostatečným množstvím výchozí látky pro příští krok jsme se mohli vrhnout na redukci násobné vazby v látce **3b**.

3.4 Redukce dvojnásobné vazby v benzofuranovém cyklu – zacíleno na produkt 2

Jakmile se nám povedlo provést Suzuki coupling a získat kýžený produkt **3b**, vrhli jsme se na předposlední krok syntézy – *trans*-selektivní redukci dvojnásobné vazby ve furanovém kruhu látky **3b**. Redukcí dvojnásobné vazby bychom tak získali neolignanový motiv přítomný ve skeletu 2,3-dihydrobenzofuranových neolignanů s obecným vzorcem známým pod označením **NL1** (Obr. 2).

Na základě předchozích zkušeností z naší skupiny jsme zvolili pro tento krok redukci pomocí hořčkových pilin v protickém rozpouštědle.²⁴ Tento typ transformace probíhá radikálovým mechanismem, kdy dochází k transferu elektronu z atomů hořčíku do LUMO orbitalu benzofuranu **3b**.³⁹ Bohužel v námi testovaném případě reakce neproběhla (Schéma 8).

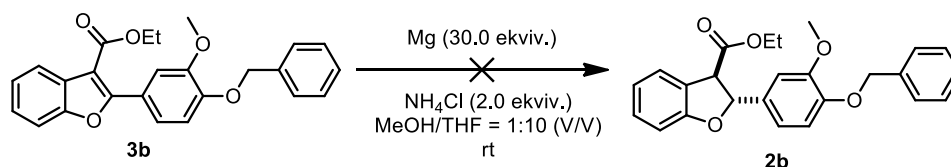


Schéma 8: Redukce násobné vazby v benzofuranu **3b**

Toto pozorování bylo více než překvapivé, protože v naší skupině jsme již obdobnou redukci na velice podobném substrátu dělali.²⁴ Proto jsme se nejprve provedli aktivaci hořečnatých pilin a prachu pomocí klasických postupů a to ať již reakcí HCl/H₂O/EtOH/Et₂O anebo při reakci s I₂. Bohužel ani v jednom případě nedošlo ke vzniku stop produktu. Pouze výchozí látka **3b** byla vždy reisolována z reakční směsi po reakci. Abychom se přesvědčili, že Mg piliny jsou dostatečně reaktivní a jsou schopny provést redukci tohoto typu substrátu, tak jsme ponechali reagovat náš produkt kondenzace **6** za těchto redukčních podmínek (Schéma 9). V tomto případě došlo během 6 h ke kvantitativní konverzi látky **6** na očekávaný produkt **27** (produkt pouze detekován na NMR, ale neizolován).

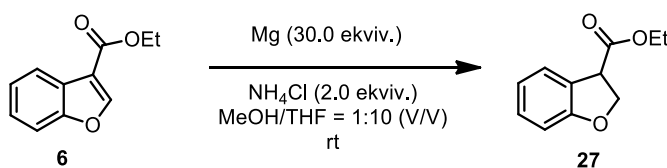
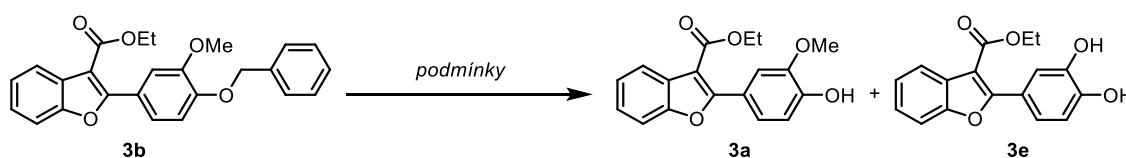


Schéma 9: Pokus redukce modelového substrátu

Po tomto výsledku jsme tedy nabyli přesvědčení, že za nereaktivitu látky **3b** je zodpovědný substrát – buďto ze sterických nebo elektronových důvodů. Uvažovali jsme tedy, že pravděpodobně benzylová funkční skupina na **3b** je zodpovědná za anihilaci radikálového procesu při redukci (snadná tvorba radikálů, které budou ihned „quenchnuty“ přítomným zdrojem protonů – MeOH). Rozhodli jsme se tedy odstranit tuto chránící skupinu a nahradit ji jinou chránící skupinou resp. vyzkoušet redukci bez přítomné chránící skupiny (Tabulka 4).

Překvapivě se tento úkol ukázal obtížnější, než jsme čekali. Za standardních podmínek reduktivního odstranění benzylové chránící skupiny (H₂/Pd/C) nebyla pozorována tvorba kýženého produktu (Tabulka 4, řádky 1 a 2). Stejná situace se opakovala v případě použití MgBr₂ (řádek 4). Pakliže jsme použili silnější Lewisovu kyselinu, jako BF₃·SMe₂, reakce proběhla s kompletní debenzylací, ale zároveň i demethylací za vzniku produktu **3e** (řádek 3). Naštěstí v případě použití NaI/BF₃·Et₂O systému došlo k tvorbě produktu **3a** (řádek 5).

Tabulka 4: Testované reakční podmínky vhodné pro debenzylaci benzofuranu **3b**



Řádek	Podmínky	Produkt (výtěžek, %)	Poznámka
1	10 % Pd/C (0.1 ekviv.), MeOH, H ₂ (1 atm.), rt, 24 h	n.p. ^{b)}	3b rekuperována
2	10 % Pd/C (0.1 ekviv.), EtOAc, H ₂ (1 atm.), rt, 24 h	n.p. ^{b)}	3b rekuperována
3	Me ₂ S·BF ₃ (6.6 ekviv.), CH ₂ Cl ₂ , rt, 13 h	3e (63 %)	Pozorována demethylace
4	MgBr ₂ ·Et ₂ O (1.2 ekviv.), CH ₂ Cl ₂ , rt, 3 h	n.p. ^{b)}	3b rekuperována
5	NaI (2.0 ekviv.), BF ₃ ·Et ₂ O (2.0 ekviv.), CH ₂ Cl ₂ , 0°C, 2 h	3a (83 %)	

a) Odpovídá čistému, izolovanému produktu.

b) n.p. – reakce neprobíhá, nedetekován žádný produkt.

Tedy majíce v ruce hned dva kýžené odchráněné produkty **3a** a **3e**, otestování redukce dvojné vazby pomocí hořčíku již nic nebránilo (Schéma 10). Bohužel ani v jednom případě nedošlo k tvorbě cílových redukováných látek **2a** anebo **2e**. Tyto dvě neúspěšné reakce tak zůstávají otevřenou výzvou pro moji diplomovou práci.

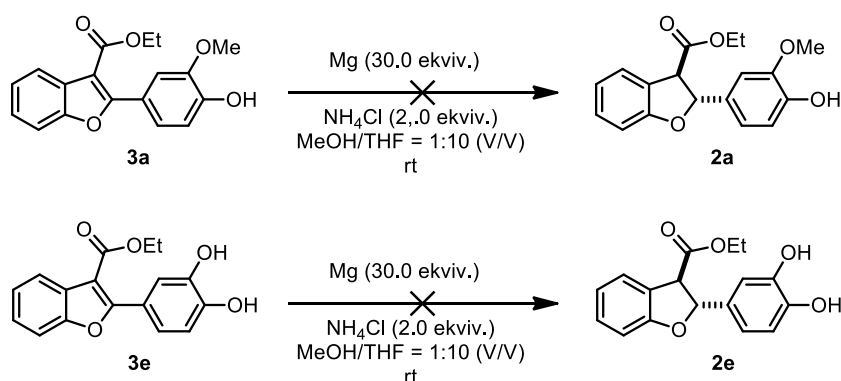


Schéma 10: Redukce olefinu v benzofuranu **3a** a **3e**

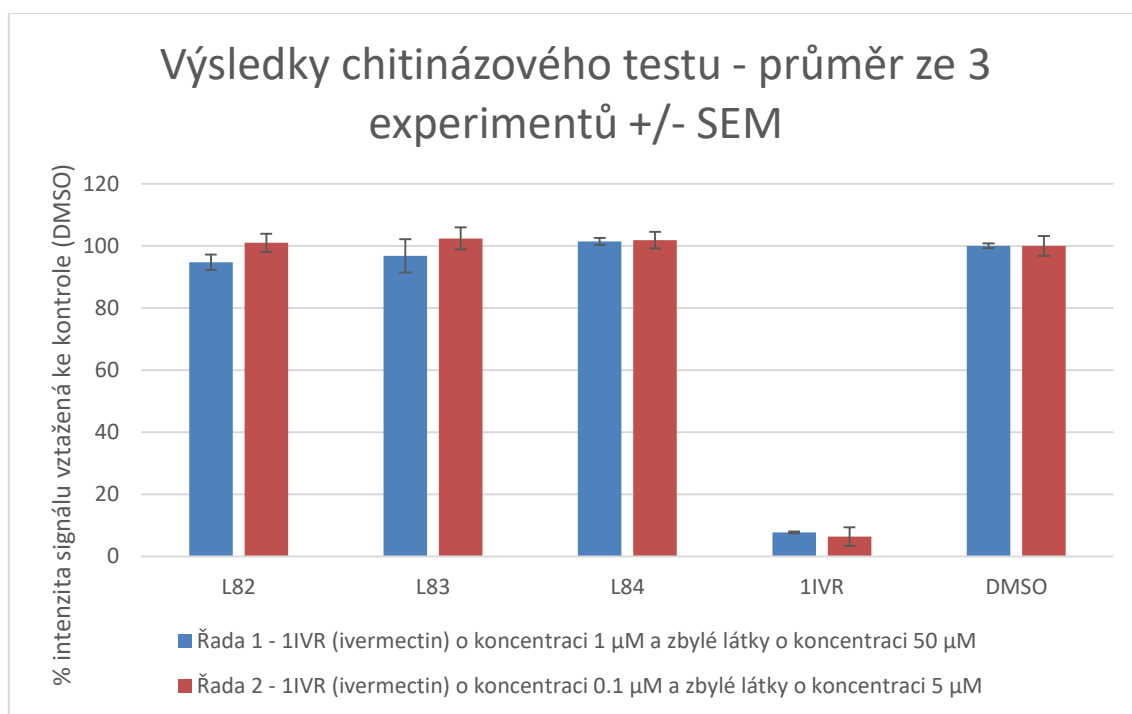
3.5 Biologické testy

Připravené látky v této práci (ethyl benzofuran-3-karboxylát **6** (L84), ethyl 2-(2-ethoxy-2-oxoethyl)benzofuran-3-karboxylát **9** (L82) a ethyl 2-(4-(benzyloxy)-3-methoxyfenyl)benzofuran-3-karboxylát **3b** (L83)) (Obr. 14) jsem podrobila testování na jejich biologickou aktivitu vůči modelovým organismům *Caenorhabditis elegans* Wildtype N2 na Lékařské fakultě Univerzity Palackého v Ústavu klinické a molekulární patologie pod vedením paní Mgr. Aleny Kadlecové, Ph.D. Biologické testování bylo provedeno podle postupu publikovaném v časopise *Journal of Biomolecular Screening*.⁴⁰

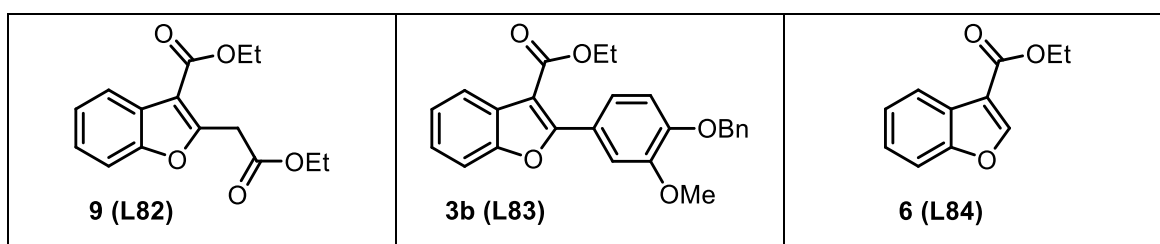
3.5.1 Vyhodnocení naměřených hodnot

Výsledky naměřených hodnot chitinázového testu jsou zobrazeny v grafu 1. Počet biologických opakování je 3. Pro každý experiment byl spočítán průměr z technického triplikátu, směrodatné odchylky (ukazatel kvality experimentu) a procentuální intenzity signálů vztažené k DMSO (čím více se hodnota blíží 100 %, tím je látka méně biologicky aktivní). V grafu 1 lze také vidět chybovou úsečku značící se SEM (Standard Error of the Mean).

Připravené látky v této práci tedy nevykazovaly výrazný toxický efekt *C. elegans*, a proto jsme se rozhodli dále nezkoumat jejich potenciální anthelmintickou aktivitu na dalších typech hlístic.



Graf 1: Výsledky chitinázového testu připravených látek a s pozitivní (1IVR – ivermectin) a negativní (DMSO) kontrolou



Obr. 14: Struktury testovaných látek (číslo odpovídající značení v této práci následované číslem, pod kterým se daná látka zúčastnila testování)

4 Závěr

Ve své bakalářské práci jsem se zaměřila na látky přírodního charakteru a to přesněji na neolignany 2,3-dihydrobenzofuranového typu známé pod označením NL1.

V teoretické části jsem zmínila jejich charakteristiku, biosyntézu a vybrala jsem některé zástupce se zajímavou biologickou aktivitou.

Cílem této práce byl vyvinout nový přístup k neolignanovému skeletu založeného na diazosloučeninách a Suzuki couplingu, jakožto dvou modulárních přístupech, které by nám měly umožnit modulární („stavebnicový“) přístup k tomuto typu sloučenin. V rámci této práce se mi podařilo zoptimalizovat oba dva klíčové kroky syntézy – kondenzační reakci a Suzukiho coupling. Bohužel náš postup ztroskotal, tedy prozatím ztroskotává, na předposledním kroku – *trans*-selektivní redukci 2,3-násobné vazby v benzofuranovém kruhu. A to je krok, kterému bych se ráda do budoucna věnovala a „rozlouskla“ jej.

Součástí mého projektu bylo také ohodnocení biologické aktivity mnou připravených benzofuranů. Prozatím jsem otestovala 3 připravené klíčové látky s benzofuranovým skeletem na *C. elegans*. Testování ale ukázalo, že ani jedna z nich není biologicky aktivní. Je tedy potřeba se zaměřit na opravdový NL1 skelet – 2,3-dihydrobenzofuranový strukturní motiv, který by měl v analogii se známými přírodními látkami skýtat mnohem více šancí na relevantní biologickou aktivitu.

5 Experimentální část

5.1 Obecné informace

Veškeré reakce byly prováděny, pakliže není uvedeno jinak, v bezvodém prostředí. Aparatury byly žihány plamenem pod pozitivním tlakem inertního plynu (argon). Veškerá rozpouštědla použitá pro reakce byla, jestli není uvedeno jinak, zbavena přítomné vlhkosti pomocí standartních sušících kolon, dle protokolu vyvinutého H. C. Grubsem a jeho spolupracovníky.

Pro sloupcovou chromatografii (CC) bylo využito silikagelu, jako stacionární fáze a směsi hexan:EtOAc (V/V), pokud není uvedeno jinak, jako mobilní fáze. Při dělení sloupcovou chromatografií bylo použito postupného gradientu, kdy polárnější frakce mobilní fáze byla skokově přidávána do mobilní fáze (například dle následujícího postupu: hexan:EtOAc = 20:1→10:1→4:1→2:1). Eluované frakce byly jímány po 5-30 mL frakcích a jejich obsah byl monitorován pomocí TLC. Frakce obsahující stejný produkt byly spojeny a následně odpařeny na rotační vakuové odparce (RVO).

K měření NMR spekter byl použit spektrometr JEOL ECA400II pracující při frekvenci 399.78 MHz (^1H) a 100.53 MHz (^{13}C). Měření byla prováděna za laboratorní teploty, přičemž vzorky byly rozpuštěny a následně měřeny v rozpouštědle CDCl_3 . Chemické posuny zbytkového signálu nedeuterovaného, resp. ne zcela deuterovaného rozpouštědla sloužily ke kalibraci měřených ^1H NMR spekter. Chemický posun zbytkového nedeuterovaného resp. částečně nedeuterovaného rozpouštědla v daném rozpouštědle je CDCl_3 (7.27 ppm). Ve spektrech ^{13}C bylo využito ke kalibraci charakteristického signálu atomu ^{13}C substituovaného atomem vodíku ^2H . Chemický posun je CDCl_3 (77.23 ppm, střední signál). Finální produkty byly purifikovány pomocí kolonové chromatografie na silikagelu (viz výše). Měření hmotnostních spekter bylo realizováno na přístroji značky Waters (Q-TOF MICRO). Elementární analýzy byly provedeny na přístroji EA1112 Flash analyser (Thermo-Finnigan). Teploty tání byly měřeny na přístroji SMP 30 (Stuart[®]) a nejsou korigovány. Průběh reakcí byl monitorován pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC) na silikagelu. Pro tento typ

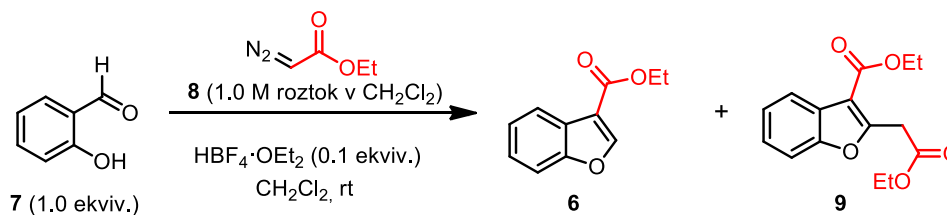
operace byly použity aluminiové desky pokryté silikagelem 60 SIL G/UV254 s fluorescentním indikátorem (Machery-Nagel). Jednotlivé sloučeniny přítomné v reakční směsi byly dále vizualizovány pomocí vizualizačních roztoků.

5.1.1 Vizualizační roztoky pro TLC

Metody přípravy:

- Zásaditý roztok KMnO_4 byl připraven rozpuštěním 9 g KMnO_4 a 20 g K_2CO_3 ve 150 mL 10% NaOH .
- Vanilinový roztok byl připraven rozpuštěním 2 g vanilinu ve 100 mL ethanolu obsahující 1 mL koncentrované H_2SO_4 .
- Hannesianův vizualizační roztok byl připraven rozpuštěním 12 g kyseliny fosfomolybdenové v 250 mL ethanolu.

5.2 Syntéza ethyl benzofuran-3-karboxylátu (6)



Do roztoku salicylaldehydu **7** (3 g, 24.56 mmol, 1.0 ekv.) v dichlormethanu (20.9 mL) se přidá $\text{HBF}_4 \cdot \text{OEt}_2$ (399 mg, 2.46 mmol, 0.1 ekv.) za laboratorních podmínek za stálého míchání. Dochází ke vzniku červené roztoku. Ethyl diazoacetát **8** (5.89 g, 51.59 mmol, 2.1 ekv.) v dichlormethanu (5.5 mL) se přikapává do reakční směsi pomocí syringe pump rychlostí 0.06 mL/min. Během přidávání roztoku ethyl diazoacetátu **8** se uvolňuje dusík a reakční směs se zahřívá. Dále je směs míchána přes noc za laboratorních podmínek a poté je rozpouštědlo odstraněno na RVO. Do vzniklého roztoku se přidá koncentrovaná kyselina sírová (1.2 mL), a vzniklá reakční směs se ponechá míchat při rt po dobu 1 h. Celý roztok se pak zneutralizuje nadbytkem nasyceného vodného roztoku NaHCO_3 (34 mL). Výsledné vrstvy se oddělí a vodná vrstva je extrahována EtOAc (2x30 mL). Spojené organické fáze jsou promyty vodou (10 mL) a nasyceným vodným roztokem NaCl (30 mL), sušeny pomocí MgSO_4 , zfiltrány a organická rozpouštědla jsou odstraněna na RVO. Odparek je následně

purifikován pomocí sloupcové chromatografie (SiO₂, hexan:EtOAc = 10:1), která poskytne cílovou látku **6** (3.29 g, 70 %) jako nažloutlou olejovitou kapalinu.

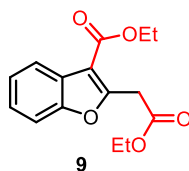
¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm) 8.26 (s, 1H), 8.09 – 8.05 (m, 1H), 7.55 – 7.52 (m, 1H), 7.38 – 7.35 (m, 2H), 4.42 (q, *J* = 7.20 Hz, 2H), 1.43 (t, *J* = 7.10 Hz, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm) 163.6, 155.8, 151.1, 125.4, 124.8, 124.3, 122.2, 114.9, 111.8, 60.7, 14.5.

MS (ES⁺), *m/z* (%): [M+H]⁺ 191

HRMS (Q-TOF) *calcd.* pro C₁₁H₁₂O₄ [M+K]⁺: 247.0367, nalezeno 247.0370

5.2.1 Vedlejší produktu (9)



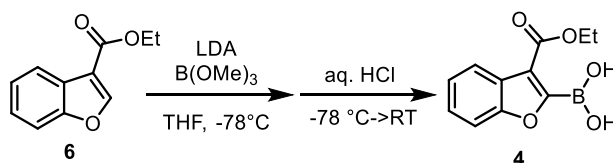
¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm) 8.02 – 7.98 (m, 1H), 7.49 – 7.45 (m, 1H), 7.34 – 7.30 (m, 2H), 4.42 (q, *J* = 7.10 Hz, 2H), 4.26 (s, 2H), 4.21 (q, *J* = 7.20 Hz, 2H), 1.41 (t, *J* = 7.10 Hz, 3H), 1.27 (t, *J* = 7.10, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm) 168.3, 164.0, 158.3, 154.2, 125.8, 125.1, 124.1, 122.3, 111.3, 111.2, 61.6, 60.7, 34.6, 14.4, 14.2.

MS (ES⁺), *m/z* (%): [M+H]⁺ 277

HRMS (Q-TOF) *calcd.* pro C₁₅H₁₆O₅ [M+H]⁺: 277.1071, nalezeno 277.1074

5.3 Syntéza (3-(ethoxykarbonyl)benzofuran-2-yl)boronové kyseliny (4)



Směs ethyl benzofuran-3-karboxylátu **6** (250 mg, 1.31 mmol, 1.0 ekviv.) a trimethyl borátu (300 mg, 2.89 mmol, 2.2 ekviv.) se rozpustí v suchém tetrahydrofuranu (4 mL) a vše je ochlazeno na -78 °C (CO₂/aceton). Dále se přidá pomocí injekční stříkačky diisopropylamid lithný (1.45 mL, 2M THF/heptan/ethylbenzen, 2.89 mmol, 2.2 ekviv.)

a výsledná reakční směs se míchá po dobu 45 min za stejných podmínek. Poté se přidá roztok kyseliny chlorovodíkové (4.8 mL, 4M v H₂O) a výsledný roztok se nechá ohřát na rt. Směs se míchá 10 min za laboratorní teploty a celá reakční směs se extrahuje pomocí EtOAc (4x20 mL). Sloučené organické fáze jsou promyty vodou (10 mL) a nasyceným vodným roztokem NaCl (10 mL), sušeny pomocí MgSO₄, zfiltrovány a organická rozpouštědla jsou odstraněna na RVO. Vzniklý odparek je následně purifikován pomocí sloupcové chromatografie (SiO₂, hexan:EtOAc = 1:5), a poskytl cílovou boritou kyselinu **4** (194 mg, 63 %) ve formě nažloutlých krystalků.

m.p. = 119 – 120°C

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm) 8.07 – 8.02 (m, 1H), 8.64 – 7.60 (m, 1H), 1.36 (s, 1H), 7.47 – 7.35 (m, 2H), 4.55 (q, *J* = 7.10 Hz, 2H), 1.53 (t, *J* = 7.10 Hz, 3H).

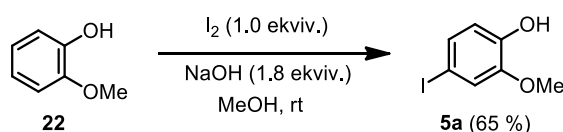
¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm) 167.9, 156.8, 127.0, 124.9, 124.5, 123.6, 123.2, 112.3, 62.4, 14.3.

MS (ES⁺), m/z (%): [M+H]⁺ 217

HRMS (Q-TOF) *calcd.* pro C₁₂H₁₂BO₅ [M-H]⁻: 247.0783, nalezeno 247.0779

5.4 Příprava reakčního partnerů pro Suzuki coupling

5.4.1 Syntéza 4-jodo-2-methoxyfenolu (**5a**)



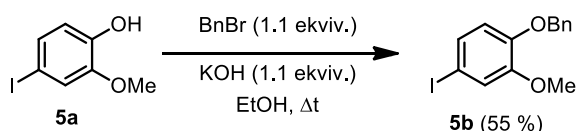
Do roztoku quaiacolu **22** (1.65 g, 13.29 mmol, 1.0 ekviv.) a NaOH (1 g, 25.13 mmol, 1.9 ekviv.) v MeOH (35 mL) ochlazeného na teplotu 0°C (voda/led) se přidá I₂ (3.4 g, 13.29 mmol, 1.0 ekviv.). Reakční směs se míchá při 0°C 1.5 h před přidáním 5% roztoku kyseliny chlorovodíkové, aby se dosáhlo pH 2 (3.5 mL). Organické rozpouštědlo se odstraní na RVO a zbytek se rozsuspenduje v diethyl etheru (20 mL). Výsledné vrstvy se oddělí a vodná vrstva je extrahována diethyl etherem (3x50 mL). Spojené organické fáze jsou promyty 10% roztokem thiosíranu sodného (2x50 mL), vysušeny pomocí MgSO₄, zfiltrovány a organické rozpouštědlo se odpaří na RVO. Výsledná látka **9a** (2.2 g, 65 %) je tmavě žlutá olejovitého charakteru.

^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm) 7.20 – 7.16 (m, 1H), 7.11 (d, $J = 2.00$ Hz, 1H), 6.68 (d, $J = 8.30$ Hz, 1H), 5.57 (s, 1H), 3.87 (s, 3H).

MS (ES⁻), m/z (%): [M-H]⁻ 249

HRMS (Q-TOF) *calcd.* pro C₇H₇IO₂ [M+K]⁺: 288.9122, nalezeno 288.9184

5.4.2 Syntéza 1-(benzyloxy)-4-jodo-2-methoxybenzenu (5b)



Benzyl bromid (819 mg, 4.79 mmol, 1.1 ekvív.) se přidá do roztoku 4-jodo-2-methoxyfenolu **5a** (1.1 g, 4.35 mmol, 1.0 ekvív.) a KOH (271 mg, 4.83 mmol, 1.1 ekvív.) v ethanolu (21 mL) a směs je refluxována po dobu 12 h. Po vychladnutí roztoku se rozpouštědlo odpaří na RVO. Dále je přidána voda (15 mL) a směs je extrahována pomocí EtOAc (3x15 mL). Sloučené organické fáze jsou promyty 2M roztokem KOH (3x15 mL), vysušeny pomocí MgSO₄, zfiltrovány a organické rozpouštědlo je odpařeno na RVO. Surový produkt byl purifikován pomocí sloupcové chromatografie (SiO₂, hexan:EtOAc = 6:1) a poskytla látku **5b** (780 mg, 55 %) ve formě hnědé olejovité kapaliny.

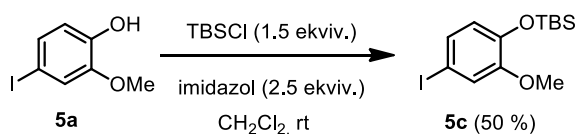
^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm) 7.43 – 7.31 (m, 5H), 7.17 – 7.13 (m, 2H), 6.64 – 6.61 (m, 1H), 5.12 (s, 2H), 3.86 (s, 3H)

^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm) 190.7, 148.4, 136.8, 129.8, 128.7, 128.1, 127.4, 121.1, 116.1, 83.2, 71.2, 56.3.

MS (ES⁺), m/z (%): [M+H]⁺ 341

HRMS (Q-TOF) *calcd.* pro C₁₄H₁₃IO₂ [M+NH₄]⁺: 358.0298, nalezeno 358.0302

5.4.3 Syntéza *tert*-butyl(4-iodo-2-methoxyfenoxy)dimethylsilanu (5c)



4-jodo-2-methoxyfenol **5a** (377 mg, 1.51 mmol, 1.0 ekvív.), *tert*-butylchlorodimethylsilan (341 mg, 2.26 mmol, 1.5 ekvív.) a imidazol (257 mg, 3.77

mmol, 2.5 ekviv.) se rozpustí v dichlormethanu (2 mL) za laboratorní teploty. Směs se míchá 3 h před přidáním vody (10 mL) a extrakcí s dichlormethanem (3x10 mL). Sloučené organické fáze jsou promyty vodou (10 mL) a nasyceným roztokem NaCl (10 mL), vysušeny pomocí MgSO₄, zfiltrovány a organické rozpouštědlo se odpaří na RVO. Surový produkt je purifikován pomocí sloupcové chromatografie (SiO₂, hexan:EtOAc = 12:1) a poskytla **5c** (270 mg, 50 %) ve formě žluté olejovité kapaliny.

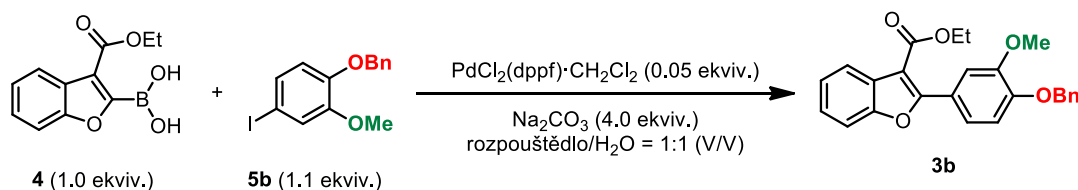
¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm) 7.14 – 7.09 (m, 2H), 6.59 (d, *J* = 8.20 Hz, 1H), 3.78 (s, 3H), 0.98 (s, 9H), 0.14 (s, 6H).

¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm) 152.1, 145.4, 130.1, 123.0, 121.4, 83.4, 55.8, 25.8, 18.6, -4.5.

MS (ES⁺), *m/z* (%): [M+K]⁺ 403

5.5 Suzuki coupling

5.5.1 Syntéza ethyl 2-(4-(benzyloxy)-3-methoxyfenyl)benzofuran-3-karboxylatu (**3b**)



Směs (3-(ethoxykarbonyl)benzofuran-2-yl)boronové kyseliny **4** (20 mg, 0.085 mmol, 1.0 ekviv.), 1-(benzyloxy)-4-jodo-2-methoxybenzenu **5b** (32 mg, 0.094 mmol, 1.1 ekviv.), PdCl₂ (dppf)·CH₂Cl₂ (3.5 mg, 0.004 mmol, 0.05 ekviv.) a uhličitanu sodného (36 mg, 0.34 mmol, 4.0 ekviv.) se umístí do baňky, která je opatřena pryžovým septem. Přidá se deionizovaná voda (0.4 mL) a 1,2-dimethoxyethan (0.4 mL). Reakční směs se míchá za teploty 40°C po dobu 12 h. Po ukončení reakce je směs extrahována do dichlormethanu (3x10 mL). Sloučené organické fáze jsou promyty vodou (10 mL) a nasyceným roztokem NaCl, vysušeny pomocí MgSO₄, zfiltrovány a organické rozpouštědlo se odpaří na RVO. Surový produkt je purifikován pomocí sloupcové chromatografie (SiO₂, hexan:EtOAc = 6:1) a poskytla látku **3b** (0.022 mg, 64 %) se získá ve formě žluté olejovité kapaliny.

^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm) 8.06 – 8.02 (m, 1H), 7.76 (d, $J = 2.00$ Hz, 1H), 7.69 – 7.66 (m, 1H), 7.53 – 7.50 (m, 1H), 7.45 (d, $J = 1.20$ Hz, 2H), 7.41 – 7.31 (m, 5H), 6.98 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 5.25 (s, 2H), 4.42 (q, $J = 7.10$ Hz, 2H), 3.99 (s, 3H), 1.43 (t, $J = 7.10$ Hz, 3H).

^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm) 164.4, 160.8, 153.6, 150.2, 149.2, 136.9, 128.8, 128.1, 127.5, 127.4, 125.1, 124.1, 123.1, 122.8, 122.7, 113.2, 113.1, 111.1, 108.2, 71.0, 60.8, 56.4, 14.5.

MS (ES⁺), m/z (%): [M+H]⁺ 403

HRMS (Q-TOF) *calcd.* pro C₂₅H₂₂KO₅ [M+K]⁺: 441.1099, nalezeno 441.1104

5.6 Biologické testování

5.6.1 Základní informace

C. elegans Wildtype N2 a bakterie *Escherichia coli* OP50 jsou z Caenorhabditis genetic center. Substrát chitinázy a pozitivní kontrola je z Merck. Základní chemikálie jsou z LachNer. Kvasnicový extrakt, trypton, pepton a agra jsou z VWR. Na stáčení látek se používala centrifuga Jouan BR4i. Všechny operace se prováděly ve sterilním prostředí v horizontální laminární box s prouděním vzduchu zajištěným pomocí Aura HZ 72 T od firmy BIOAIR. Bakterie byly inkubovány v inkubátoru Medline a na kultivaci *C. elegans* byl použit Q-CELL. Mikroskopy se používali Bresser Researcher ICD a Leica. Na stočení malých zkumavek se používala mini centrifuga od firmy Labnet. Na pipetování se používala multikanálová mikropipeta Transferpette[®] S-12, pipetor SWIFTPET PRO a pipety značky Finnpipette[®] o různých objemech. Na měření intenzity fluorescence se použil přístroj Infinite M200 PRO od firmy TECAN. Termoshaker byl použit Mixing Block MB-102. Na protřepávání vzorků se používala třepačka IKA[®] KS 260 basic.

K experimentu byly použity tyto chemikálie:

- **NGM agar (400 ml):** 1.2 g NaCl, 1 g peptonu, 7.8 g agaru se doplní destilovanou vodou do 400 mL. Před vložením do autoklávu se přidá 400 μL cholesterolu (5 mg/mL v ethanolu). Poté se necháme médium zchladnout a přidá se: 200 μL 1M CaCl₂ (sterilní), 400 μL 1M MgSO₄

(sterilní), 10 mL fosfátový pufr pH 6.0 (sterilní). Následně se médium rozlije do Petriho misky.

- **Lysogenylové (LB) médium:** 10 g trypton, 5 g kvasnicový extrakt, 10 g NaCl. Chceme-li pevné médium, přidá se 15 g agaru. Před vložením do autoklávu se směs doplní destilovanou vodou na 1 l.
- **Promývací roztok M9:** 15 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, 3 g KH_2PO_4 , 5 g NaCl, 0.25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a doplní se destilovanou vodou na 1 l před vložením do autoklávu.
- **S-complete médium:** Do 1 l S-basal se přidá 10 mL citrátového pufru (sterilní), 10 mL stopových prvků (sterilní), 3 ml 1M CaCl_2 (sterilní), 3 ml 1M MgSO_4 (sterilní).
- **Roztok na synchronizaci (bleaching):** 8 mL voda, 1.5 mL roztok NaClO, 0.5 mL 10M NaOH
- **Pufr na chitinázovou assay (pH 10.6):** 40 g NaOH, 75 g glycinu, se doplní destilovanou vodou do 1 l.
- **Fosfátový pufr (PPB):** K 136 g KH_2PO_4 se přidá destilovaná voda na objem 900 mL. pH se upraví na 6.0 s použitím 5M KOH a doplní se destilovanou vodou na 1 l. Dále se směs vloží do autoklávu.
- **Stopové prvky:** 1.86 g Na_2EDTA , 0.69 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.20 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.29 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.016 g CuSO_4 a doplní se destilovanou vodou na 1 l. Dále se směs vloží do autoklávu.
- **Citrátový pufr:** 268.8 g citrátu sodného, 26.3 g monohydrátu kyseliny citronové se doplní destilovanou vodou do 900 mL. pH se upraví na 6.0 s použitím 5M KOH a doplní se destilovanou vodou na 1 l. Dále se směs vloží do autoklávu.
- **S-basal:** K 5.9 g NaCl a 50 mL fosfátového pufru (nesterilní) se přidá 1 mL cholesterolu (5 mg/mL v ethanolu) a doplní se destilovanou vodou na 1 l. Dále se směs vloží do autoklávu.
- **Mrazící roztok:** 5.85 g NaCl, 6.8 g KH_2PO_4 , 300 g glycerolu, 5.6 mL 1M NaOH se doplní se destilovanou vodou na 1 l. Dále se směs vloží do autoklávu.
- Další: Savo, DMSO, Ivermectin, substrát pro chitinázu, Levamisol, Mebendazol

5.6.2 Kultivace *C. elegans* na NGM miskách

Nejprve se připraví bakterie v LB médiu, a to tak, že se do Erlenmeyerovy baňky dá LB medium. Z LB misky, kde jsou bakterie, se nabere kolonie pomocí sterilní kličky. Baňku s médiem se dá na třepačku (150 rpm). Kultivace probíhá při 37°C přes noc. Původní LB miska se pravidelně obměňuje. Obměna se provádí tak, že se křížovým roztěrem nasadí na novou LB misku 1 kolonie z předešlé misky.

Dále se musí připravit NGM misky. Nejprve se na Petriho misky rozpipetuje tekuté medium. Po zchladnutí a ztuhnutí media se do misky přidá 100 µL suspenze *E. coli* v LB médiu. Nasazené bakterie se rozetřou pomocí sterilní hokejky, zavře se miska a chvíli se nechá stát v boxu, dokud se medium nevstřebá. Kultivace opět probíhá přes noc při 37°C.

Poté se z původní misky obsahující početnou populaci *C. elegans*, pomocí sterilizovaného skalpelu, vyřízne čtvereček NGM a přenesse se na čerstvě připravenou misku s *E. coli*.

Dále se připraví bakterie v S-complete. Nejprve se předváží centrifugační zkumavky, pak se do zkumavek přepipetuje 50 mL bakteriální suspenze v LB a stočí (4 100 rpm, 15 min). Vymyjí se stěny zkumavky několika mL S-basal a poté se buničina navlhčí 70% ethanolem, tímto je buničina sterilní. Přebytečná tekutina ze zkumavek a víček se vyklepe na tuto sterilizovanou buničinu. Zkumavky se nechají v boxu vyschnout, dokud nebudou viditelné kapky. Zváží se zkumavky s vlhkou peletkou, odečte se váha čisté zkumavky a následně se spočítá váha peletky. Poté se resuspenduje S-complete v takovém množství, aby se získala suspenze o koncentraci 60 mg bakterií/ml a dále je skladována v lednici.

Při kultivaci *C. elegans* se nejprve populace, která je věkově synchronizovaná, přepipetuje do Petriho misky. Přidá se požadované množství S-complete a bakteriální suspenze. Do experimentu obvykle chceme 3 mg/mL, bakteriální suspenzi v S-complete se tedy ředí 10x. Populace se chová na třepačce v tekutém médiu, aby měli dostatečnou distribuci vzduchu.

Věková synchronizace *C. elegans*, neboli bleaching se provádí tak, že populace s vysokým obsahem dospělých, těhotných jedinců se smyje pomocí M9 pufru do mikrozkušavek. Mikrozkušavky se vloží do centrifugy asi na 10 s. Odstraní se největší množství supernatantu a přidá se 1 mL čerstvě připraveného roztoku na bleaching a umístí se do termoshakeru, který je nastaven na pokojovou teplotu a na

nejvyšší otáčky (1 500 rpm), dokud okem nejsou vidět červi (obvykle 5-10 minut). Mikrozkušavky se vloží do centrifugy na 10 s a i déle, aby byla peletka usazená. Odsaje se roztok na bleaching, 3x se promyje pomocí roztoku M9 a 2x roztokem S-complete. Před přesunutím peletky do 15 mL mikrozkušavky s 5 mL S-complete, se směs vloží do centrifugy. Po tomto bleachingu jsou přítomny v populaci pouze vajíčka, která se přes noc vylíhnou.

Hladová populace, která hlavně obsahuje čerstvě vylíhlé larvy, se může zamrazit. Smyjí se pomocí M9 z NGM misek a 1x se promyje 1 mL M9. Následně se odsaje 0.5 mL M9 a přidá se 0.5 mL zamrazovacího roztoku. Nakonec se uchovávají při -80°C . Rozmrazování poté probíhá tak, že zkumavka s požadovanou populací se vyjme z mrazáku a nechá se pomalu roztát. Zkumavka se vloží do centrifugy a dále se odsaje peletka a přenesení se na čerstvou NGM misku. Druhý den by měli být vidět vzpamatování jedinci.

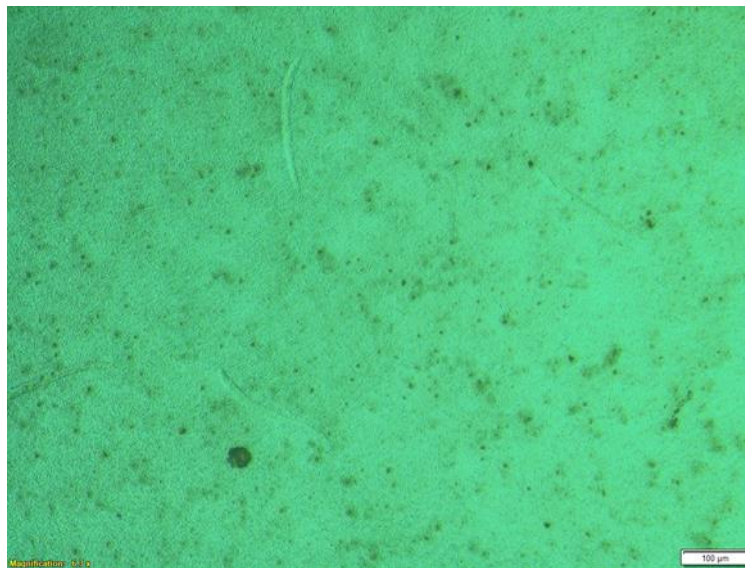
5.6.3 Hodnocení Antihelmintické aktivity

Nejprve se musí připravit desky na testování. Začne se tím, že čerstvě vylíhlé larvy připravené bleachingem se spočítají. Je potřeba, aby v jedné jamce bylo mezi 15-30 červy, to odpovídá 150-300 ks/mL. Pro testování ve dvou koncentracích, tzv. screening je potřeba 10 mL suspenze na 1 desku s 3 mg/mL bakterií. Do sterilního rezervoáru se připraví požadované množství suspenze. Do sloupce 1 a 7 jamkové desky se napipetuje 330 μL suspenze. Do sloupce 4 a 10 se napipetuje 270 μL suspenze. Látky se testují v koncentracích 50 μM a 5 μM , k 330 μL suspenze, tedy se přidá 0.33 μL požadované látky. Poslední dvě jamky ve sloupci 7 jsou vyhrazeny pro kontroly. Ivermectin o koncentraci 1 μM a 0.1 μM se použije jako pozitivní kontrola (Obr. 15) a DMSO jako negativní kontrola (Obr. 16). Pro ukázkou účinku jsme použili i Levamisol (Obr. 17) a Mebendazol (Obr. 18).

Poté se pomocí multikanálové pipety přenesení 30 μL suspenze ze sloupce 1 do sloupce 4 a ze sloupce 7 do sloupce 10. Tímto se látky zředí 10x. Nyní je 300 μL otrávené suspenze ve všech 4 sloupcích. Dál se připraví technický triplikát rozpipetováním 100 μL ze sloupce 1 do sloupce 2 a 3, atd. Na desku se dá folie a nechá se inkubovat na třepačce 4 dny, dokud červi nedospějí a nezačnou se množit. Poté se provede skórování a to tak, že desky se prohlédnou pod mikroskopem a zaznamenává se situace v jamkách podle stupnice 1 až 5 (1 – populace je naprosto v pořádku, 2 – mírné

zpomalení pohybu jedinců a méně potomstva, 3 – zpomalení vývoje, 4 – úplné zastavení vývoje, 5 – mrtvá populace). Látky připravené v této práci neměly žádný viditelný efekt a populace se podobaly populaci v negativní kontrole.

Dále se provádí chitinázový test a to tak, že se nejprve desky vloží na 1 hodinu do inkubátoru na 37°C. Dále se desky vloží do centrifugy (1 500 rpm, 2 min), abychom se zbavili kondenzace na folii. Přidá se substrát pro chitinázu (4-methylumbelliferyl β -*D-N,N',N''*-triacetylchitotriosid, 0.8 mM, v -20°C). V jamkách je tedy 100 μ L suspenze, takže se přidá 2.5 μ L zásobního roztoku o koncentraci 0.8 mM, aby se docílilo požadované koncentrace. Desky se dále inkubují po dobu 1 hodiny při 37°C. Po uběhnutí inkubační doby se přidá pufr pro chitinázovou assay. Desky se vloží do přístroje Tecan, kde se zvolí protokol “chitinase-c-elegans-AK” (excitace při 360 nm a emise při 460 nm). Naměřené hodnoty se vyhodnotí.



Obr. 15: Pozitivní kontrola – Ivermectin o koncentraci 1 μ M – silně paralyzovaní jedinci staří 4 dny, kteří se dále nemohli vyvíjet



Obr. 16: Negativní kontrola – DMSO – prospívající 4 dny staří jedinci



Obr. 17: Levamisol o koncentraci 100 μM – lehce paralyzovaní jedinci, staří 4 dny
s velkým počtem vajíček



Obr. 18: Mebendazol o koncentraci 100 μM – 4 dny staří jedinci s adipozitou

6 Použitá literatura

- (1) Pokorná, T. *Diplomová práce*, **2017**, Univerzita Palackého v Olomouci.
- (2) Barbuščáková, B. Z. *Diplomová práce*, **2018**, Univerzita Palackého v Olomouci.
- (3) Namdeo, A. G. *Phcog Rev.: Review Article Precursor Feeding for Enhanced Production of Secondary Metabolites: A Review. Rev. Lit. Arts Am.* **2007**, *1* (2), 227–231.
- (4) Hartmann, T. From Waste Products to Ecochemicals: Fifty Years Research of Plant Secondary Metabolism. *Phytochemistry* **2007**, *68* (22–24), 2831–2846. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.09.017>.
- (5) Adámková, Š.; Luhová, L.; Petřivalský, M.; Peč, P. Role L-Fenylalaninamoniumlyasy Při Obranné Reakci Rostlin. *Chem. List.* **2006**, *100* (7), 486–494.
- (6) Harmatha, J. U. H. Strukturní Bohatství a Biologický Význam Lignanů. *Chem. List.* **2005**, *99*, 622–632.
- (7) El-Seedi, H. R.; El-Said, A. M. A.; Khalifa, S. A. M.; Göransson, U.; Bohlin, L.; Borg-Karlson, A. K.; Verpoorte, R. Biosynthesis, Natural Sources, Dietary Intake, Pharmacokinetic Properties, and Biological Activities of Hydroxycinnamic Acids. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60* (44), 10877–10895. <https://doi.org/10.1021/jf301807g>.
- (8) Magoulas, G. E.; Papaioannou, D. Bioinspired Syntheses of Dimeric Hydroxycinnamic Acids (Lignans) and Hybrids, Using Phenol Oxidative Coupling as Key Reaction, and Medicinal Significance Thereof. *Molecules* **2014**, *19* (12), 19769–19835. <https://doi.org/10.3390/molecules191219769>.
- (9) Pan, J. Y.; Chen, S. L.; Yang, M. H.; Wu, J.; Sinkkonen, J.; Zou, K. An Update on Lignans: Natural Products and Synthesis. *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26* (10), 1251–1292. <https://doi.org/10.1039/b910940d>.
- (10) Weng, J. K.; Chapple, C. The Origin and Evolution of Lignin Biosynthesis. *New Phytol.* **2010**, *187* (2), 273–285. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03327.x>.
- (11) Zálešák, F.; Bon, D. J. Y. D.; Pospíšil, J. Lignans and Neolignans: Plant

- Secondary Metabolites as a Reservoir of Biologically Active Substances.
Pharmacol. Res. **2019**, *146*, 104284. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104284>.
- (12) Attoumbre, J.; Hano, C.; Mesnard, F.; Lamblin, F.; Bensaddek, L.; Raynaud-Le Grandic, S.; Laine, É.; Fliniaux, M. A.; Baltora-Rosset, S. Identification by NMR and Accumulation of a Neolignan, the Dehydrodiconiferyl Alcohol-4-β-D-Glucoside, in *Linum Usitatissimum* Cell Cultures. *Comptes Rendus Chim.* **2006**. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2005.06.012>.
- (13) Satake, H.; Ono, E.; Murata, J. Recent Advances in the Metabolic Engineering of Lignan Biosynthesis Pathways for the Production of Transgenic Plant-Based Foods and Supplements. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61* (48), 11721–11729. <https://doi.org/10.1021/jf4007104>.
- (14) Cunha, M. R.; Tavares, M. T.; Fernandes, T. B.; Parise-Filho, R. Peppers: A “Hot” Natural Source for Antitumor Compounds. *Molecules* **2021**, *26* (6), 1521. <https://doi.org/10.3390/molecules26061521>.
- (15) Wang, Y.; Li, J.; Ma, H. R.; Numonov, S. R.; Aisa, H. A. New Neolignan from *Lycium Barbarum*. *Chem. Nat. Compd.* **2016**, *52* (3), 396–398. <https://doi.org/10.1007/s10600-016-1657-9>.
- (16) Lee, G. H.; Shin, Y.; Oh, M. J. Aroma-Active Components of *Lycii Fructus* (Kukija). *J. Food Sci.* **2008**, *73* (6), 500–505. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00851.x>.
- (17) Morikawa, T.; Hachiman, I.; Matsuo, K.; Nishida, E.; Ninomiya, K.; Hayakawa, T.; Yoshie, O.; Muraoka, O.; Nakayama, T. Neolignans from the Arils of *Myristica Fragrans* as Potent Antagonists of CC Chemokine Receptor 3. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79* (8), 2005–2013. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b00262>.
- (18) Morikawa, T.; Hachiman, I.; Ninomiya, K.; Hata, H.; Sugawara, K.; Muraoka, O.; Matsuda, H. Degranulation Inhibitors from the Arils of *Myristica Fragrans* in Antigen-Stimulated Rat Basophilic Leukemia Cells. *J. Nat. Med.* **2018**, *72* (2), 464–473. <https://doi.org/10.1007/s11418-017-1170-x>.
- (19) Park, J. Y.; Hwan Lim, S.; Ram Kim, B.; Jae Jeong, H.; Kwon, H. J.; Song, G. Y.; Bae Ryu, Y.; Song Lee, W. Sialidase Inhibitory Activity of Diarylnonanoid and Neolignan Compounds Extracted from the Seeds of *Myristica Fragrans*. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2017**, *27* (14), 3060–3064. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.05.055>.
- (20) Abd-Elazem, I. S.; Chen, H. S.; Bates, R. B.; Huang, R. C. C. Isolation of Two

- Highly Potent and Non-Toxic Inhibitors of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Integrase from *Salvia Miltiorrhiza*. *Antiviral Res.* **2002**, *55* (1), 91–106. [https://doi.org/10.1016/S0166-3542\(02\)00011-6](https://doi.org/10.1016/S0166-3542(02)00011-6).
- (21) Di Micco, S.; Spatafora, C.; Cardullo, N.; Riccio, R.; Fischer, K.; Pergola, C.; Koeberle, A.; Werz, O.; Chalal, M.; Vervandier-Fasseur, D.; Tringali, C.; Bifulco, G. 2,3-Dihydrobenzofuran Privileged Structures as New Bioinspired Lead Compounds for the Design of MPGES-1 Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, *24* (4), 820–826. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.01.002>.
- (22) Binns, A. N.; Chen, R. H.; Wood, H. N.; Lynn, D. G. Cell Division Promoting Activity of Naturally Occurring Dehydrodiconiferyl Glucosides: Do Cell Wall Components Control Cell Division? *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1987**, *84* (4), 980–984. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.4.980>.
- (23) Pan, L.-L.; Wang, X.-L.; Luo, X.-L.; Liu, S.-Y.; Xu, P.; Hu, J.-F.; Liu, X.-H. Boehmenan, a Lignan From the Chinese Medicinal Plant *Clematis Armandii*, Inhibits A431 Cell Growth via Blocking P70S6/S6 Kinase Pathway. *Integr. Cancer Ther.* **2017**, *16* (3), 351–359. <https://doi.org/10.1177/1534735416669803>.
- (24) Barbušćáková, Z.; Kozubíková, H.; Zálešák, F.; Doležal, K.; Pospíšil, J. General Approach to Neolignan-Core of the Boehmenan Natural Product Family. *Monatshefte für Chemie - Chem. Mon.* **2018**, *149* (4), 737–748. <https://doi.org/10.1007/s00706-017-2132-4>.
- (25) Konrádová, D.; Kozubíková, H.; Doležal, K.; Pospíšil, J. Microwave-Assisted Synthesis of Phenylpropanoids and Coumarins: Total Synthesis of Osthol. *European J. Org. Chem.* **2017**, *2017* (35), 5204–5213. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201701021>.
- (26) Tamašeková, P. *Diplomová práce*, **2018**, Univerzita Palackého v Olomouci.
- (27) Tuna, P. *Bakalářská práce*, **2019**, Univerzita Palackého v Olomouc.
- (28) Lachetová, E. *Bakalářská práce*, **2019**, Univerzita Palackého v Olomouci.
- (29) Bongen, P.; Pietruszka, J.; Simon, R. C. Dynamic Kinetic Resolution of 2,3-Dihydrobenzo[*b*]Furans: Chemoenzymatic Synthesis of Analgesic Agent BRL 37959. *Chem. - A Eur. J.* **2012**, *18* (35), 11063–11070. <https://doi.org/10.1002/chem.201200683>.
- (30) Rahaman, M.; Ali, M. S.; Jahan, K.; Belayet, J. Bin; Rahman, A. F. M. T.; Hossain, M. M. Chemistry of 3-Hydroxy-2-Aryl Acrylate: Syntheses, Mechanisms, and Applications. *Org. Chem. Front.* **2021**, *8* (1), 169–191.

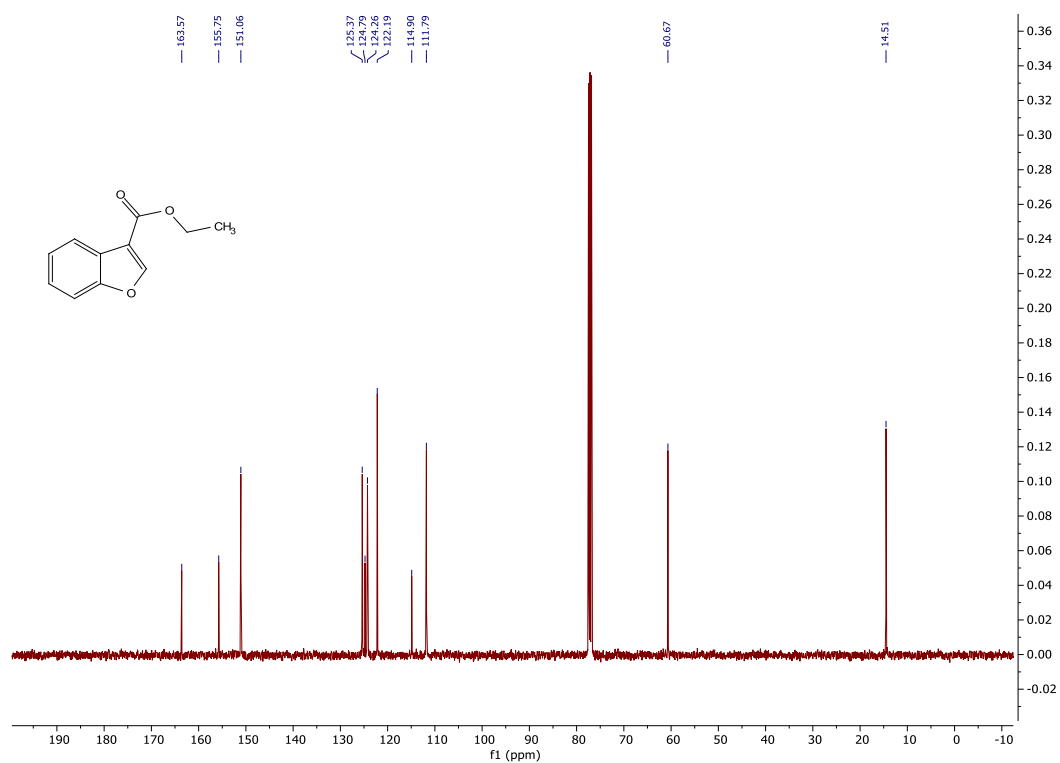
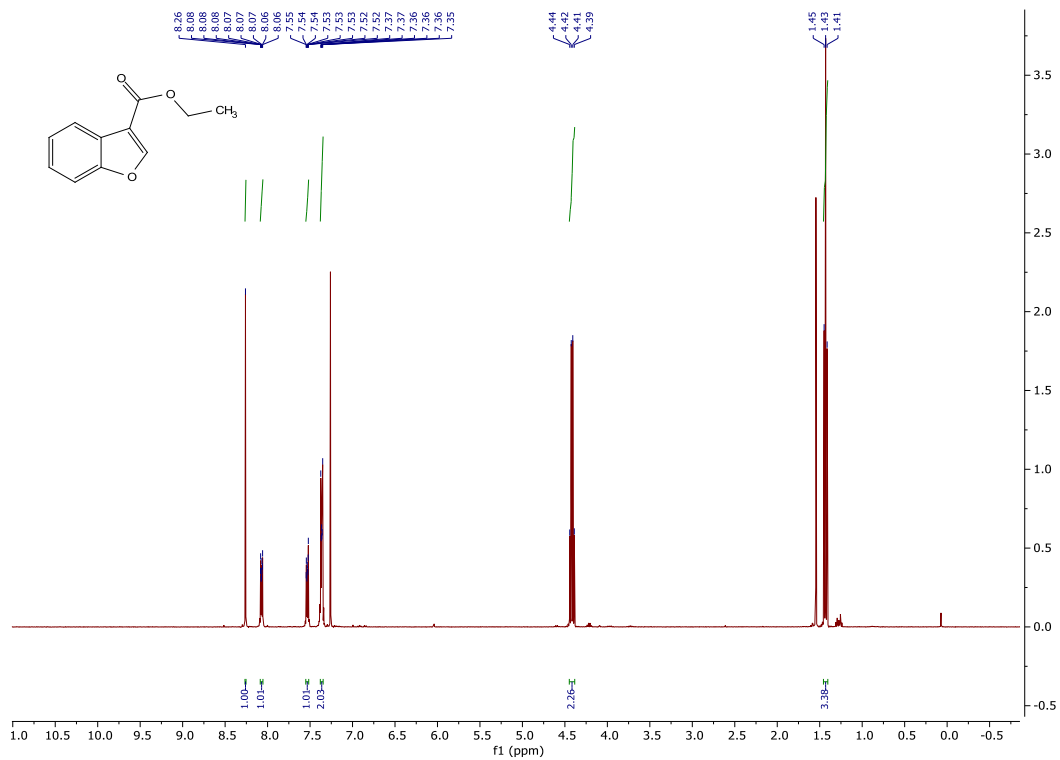
<https://doi.org/10.1039/D0QO01157F>.

- (31) Rahaman, M.; Ali, M. S.; Jahan, K.; Hinz, D.; Belayet, J. Bin; Majinski, R.; Hossain, M. M. Synthetic Scope of Brønsted Acid-Catalyzed Reactions of Carbonyl Compounds and Ethyl Diazoacetate. *J. Org. Chem.* **2021**, *86* (9), 6138–6147. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.0c02972>.
- (32) Qin, L.; Vo, D.-D.; Nakhai, A.; Andersson, C. D.; Elofsson, M. Diversity-Oriented Synthesis of Libraries Based on Benzofuran and 2,3-Dihydrobenzofuran Scaffolds. *ACS Comb. Sci.* **2017**, *19* (6), 370–376. <https://doi.org/10.1021/acscombsci.7b00014>.
- (33) Wang, Z.; Elokdah, H.; McFarlane, G.; Pan, S.; Antane, M. Regioselective Suzuki Coupling of Benzofuran or Benzothiophene Boronic Acids and Dibromo Substituted Naphthalenes: Synthesis of a Potent Inhibitor of Plasminogen Activator Inhibitor-1. *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47* (20), 3365–3369. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2006.03.090>.
- (34) Hooshmand, S. E.; Heidari, B.; Sedghi, R.; Varma, R. S. Recent Advances in the Suzuki–Miyaura Cross-Coupling Reaction Using Efficient Catalysts in Eco-Friendly Media. *Green Chem.* **2019**, *21* (3), 381–405. <https://doi.org/10.1039/C8GC02860E>.
- (35) Costa, A. M. B. S. R. C. S.; Dean, F. M.; Jones, M. A.; Varma, R. S. Lithiation in Flavones, Chromones, Coumarins, and Benzofuran Derivatives. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1985**, 799. <https://doi.org/10.1039/p19850000799>.
- (36) Fryatt, T.; Botting, N. P. The Synthesis of Multiply ¹³C-Labelled Plant and Mammalian Lignans as Internal Standards for LC-MS and GC-MS Analysis. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2005**, *48* (13), 951–969. <https://doi.org/10.1002/jlcr.1007>.
- (37) Miyaura, N.; Yamada, K.; Suzuki, A. A New Stereospecific Cross-Coupling by the Palladium-Catalyzed Reaction of 1-Alkenylboranes with 1-Alkenyl or 1-Alkynyl Halides. *Tetrahedron Lett.* **1979**, *20* (36), 3437–3440. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)95429-2](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)95429-2).
- (38) Gujral, S. S.; Khatri, S.; Riyal, P.; Gahlot, V. Suzuki Cross Coupling Reaction- A Review. *Indo Glob. J. Pharm. Sci.* **2012**, *2* (4), 351–367.
- (39) Fischer, J.; Savage, G. P.; Coster, M. J. A Concise Route to Dihydrobenzo[b]Furans: Formal Total Synthesis of (+)-Lithospermic Acid. *Org. Lett.* **2011**, *13* (13), 3376–3379. <https://doi.org/10.1021/ol201130h>.

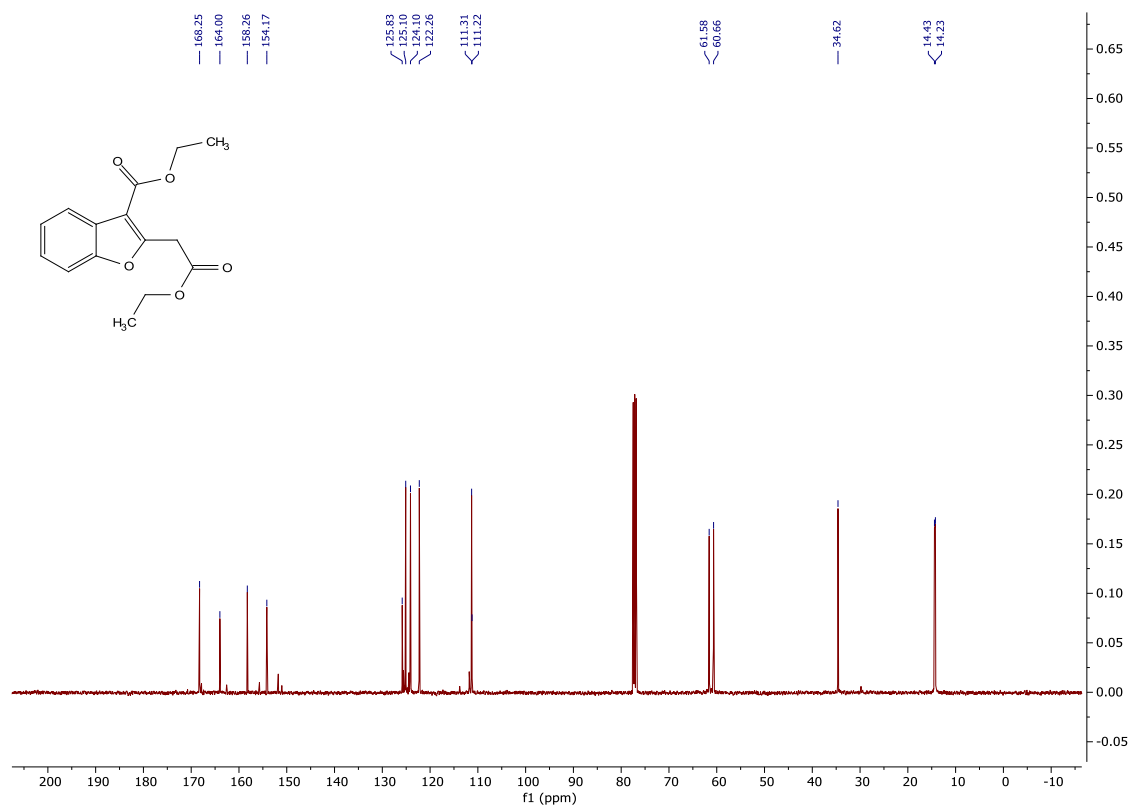
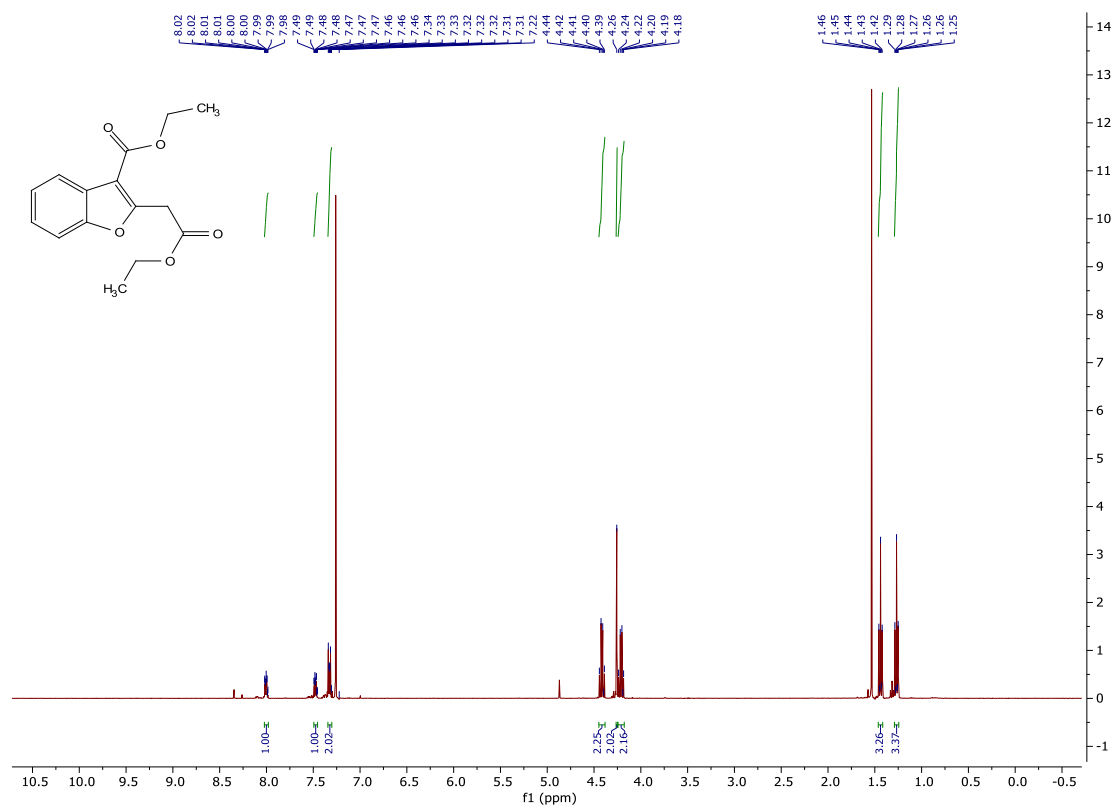
- (40) Ellerbrock, B. R.; Coscarelli, E. M.; Gurney, M. E.; Geary, T. G. Screening for Presenilin Inhibitors Using the Free-Living Nematode, *Caenorhabditis Elegans*. *J. Biomol. Screen.* **2004**, *9* (2), 147–152.
<https://doi.org/10.1177/1087057103261038>.

7 Příloha

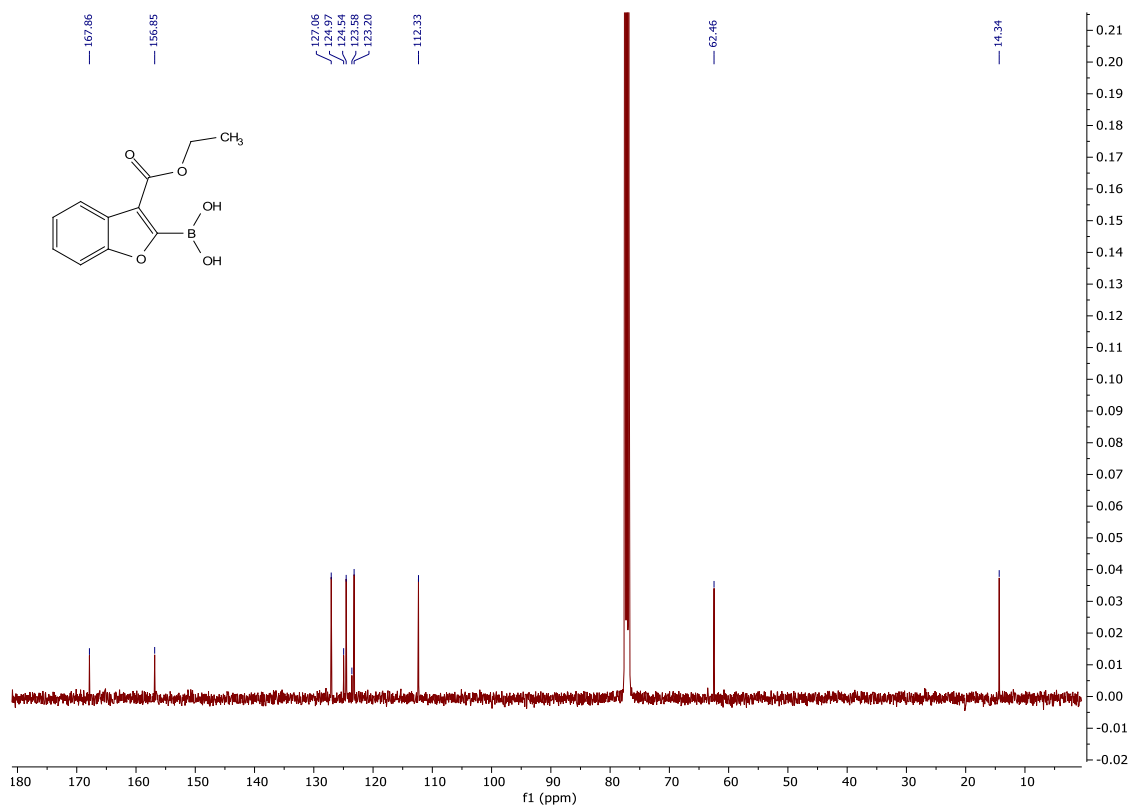
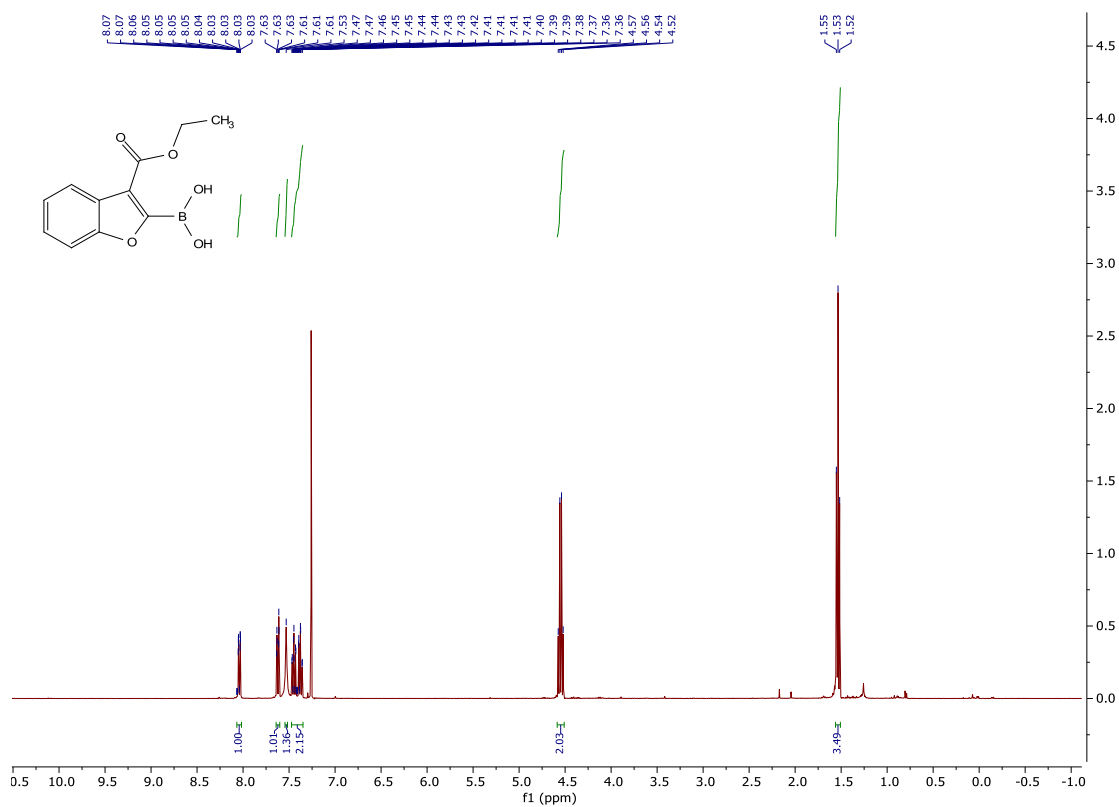
^1H a ^{13}C spektra látky 6



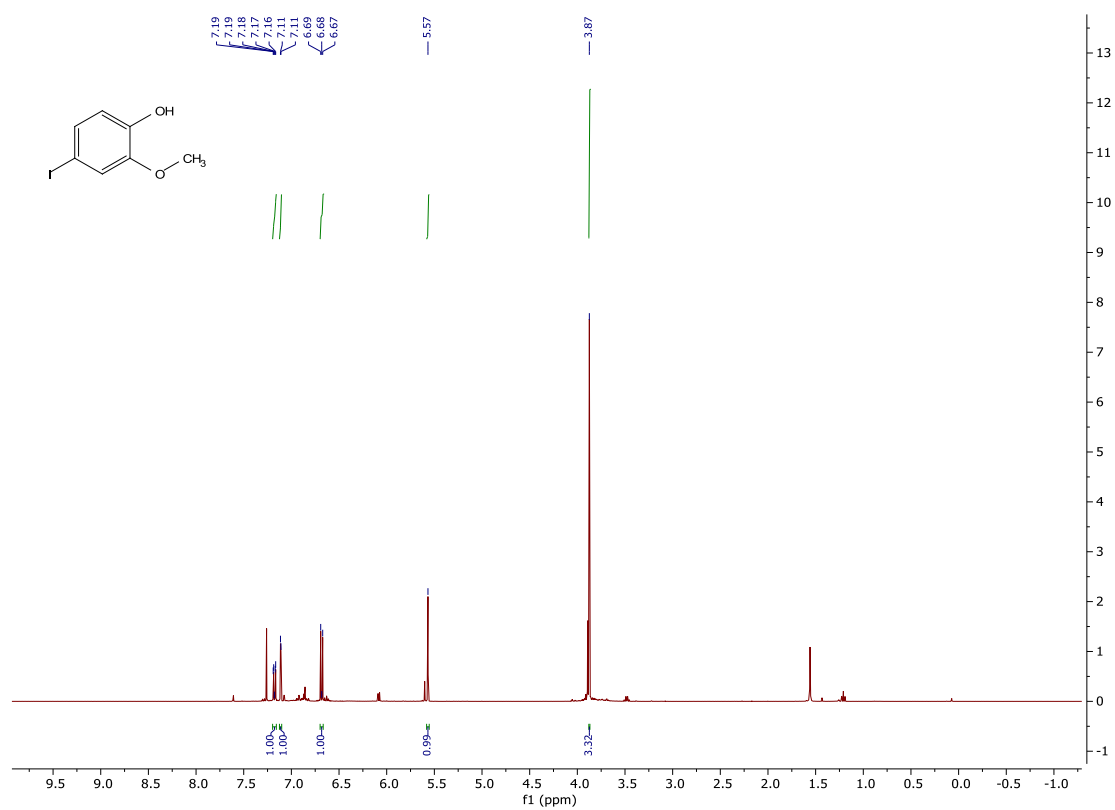
¹H a ¹³C spektra látky 9



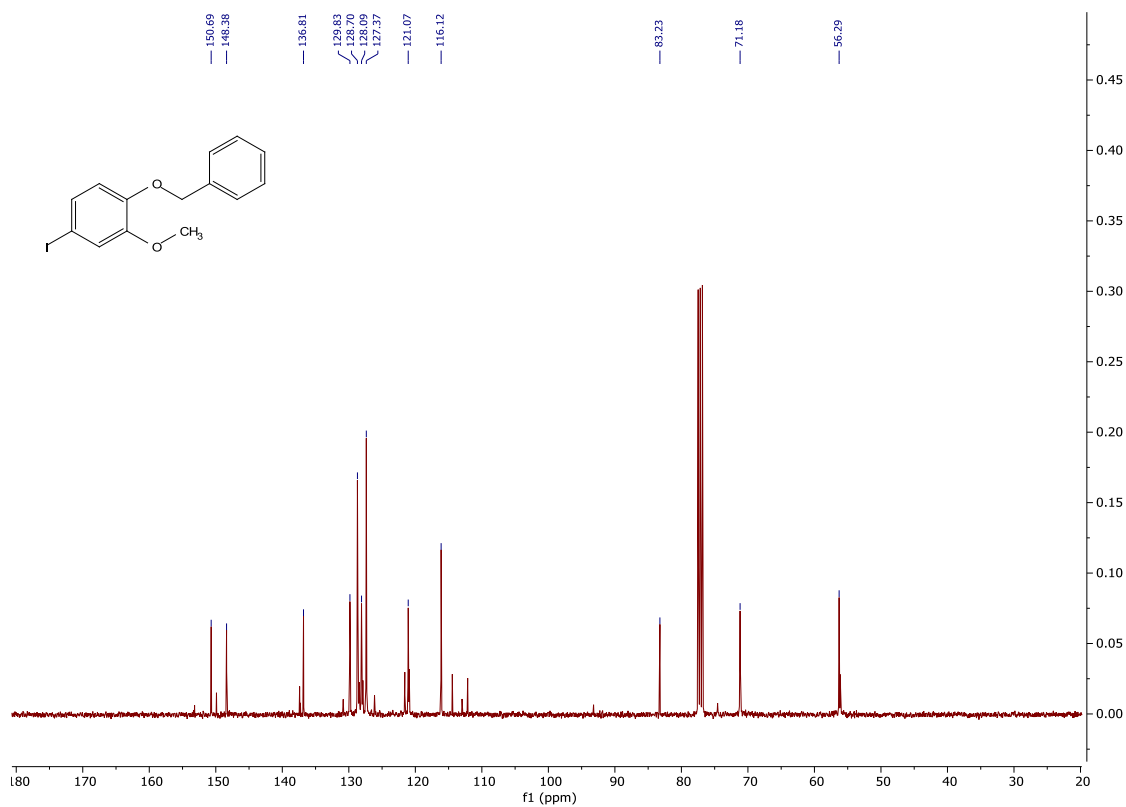
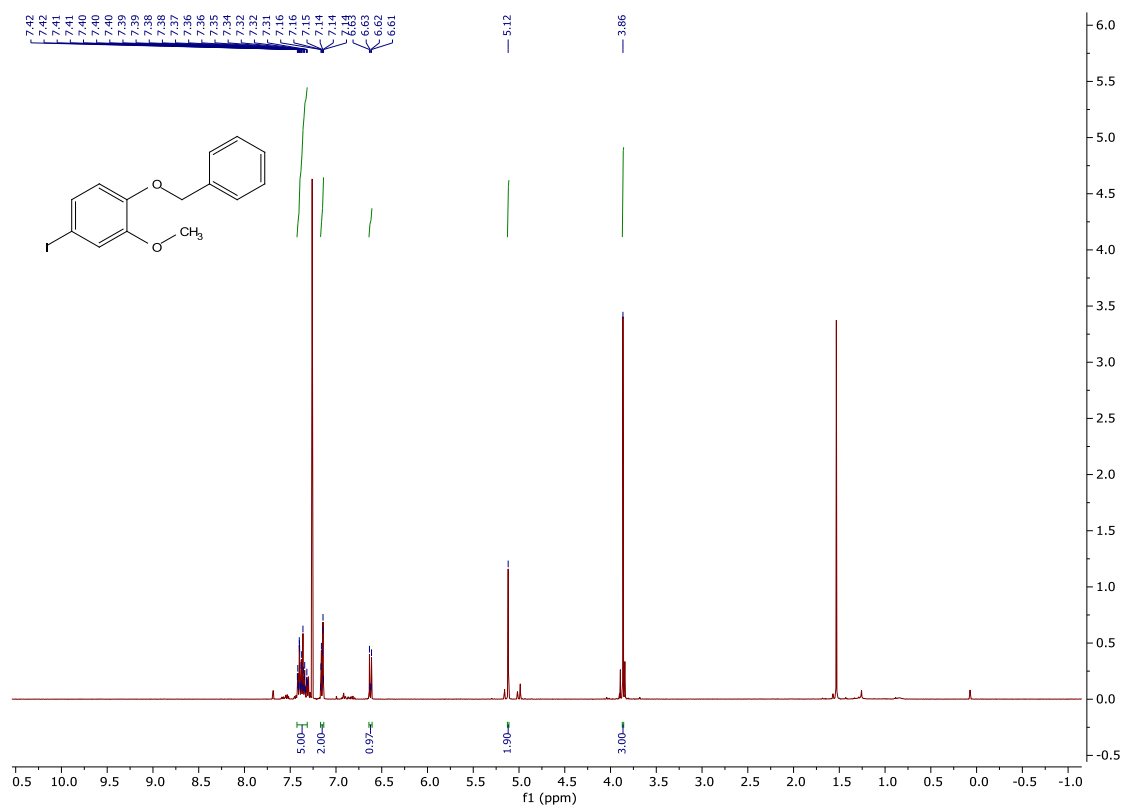
¹H a ¹³C spektra látky 4



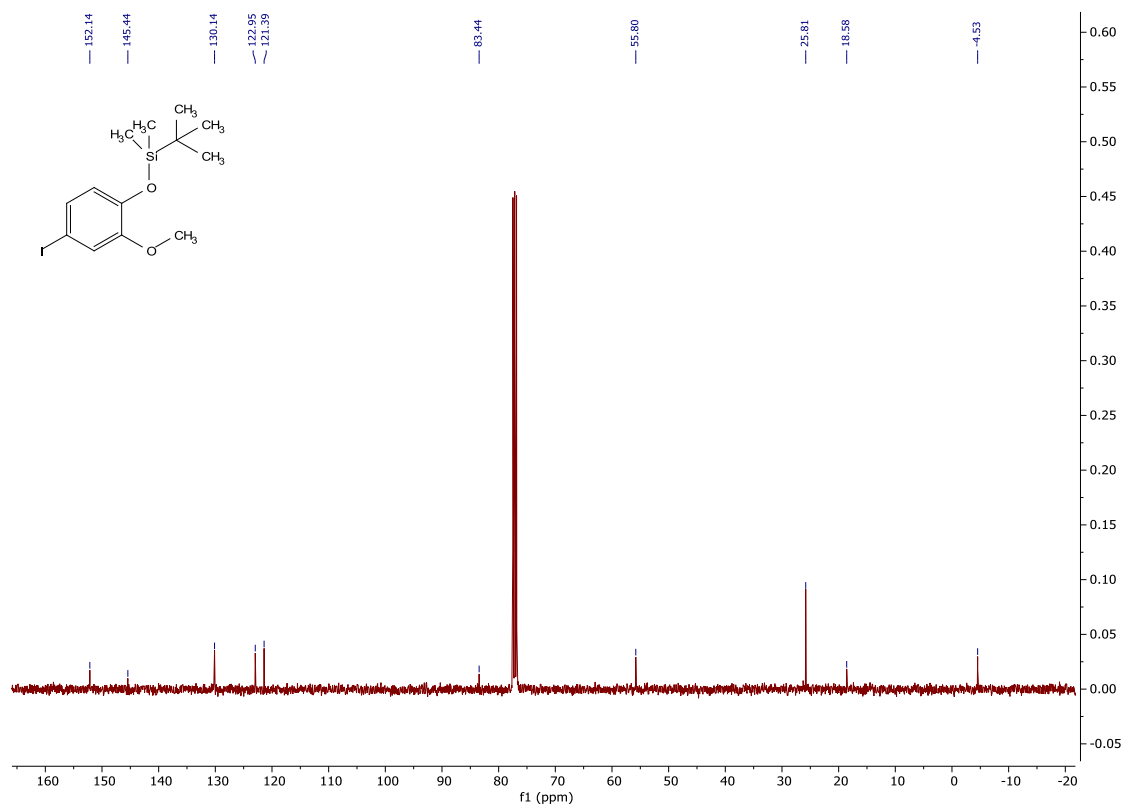
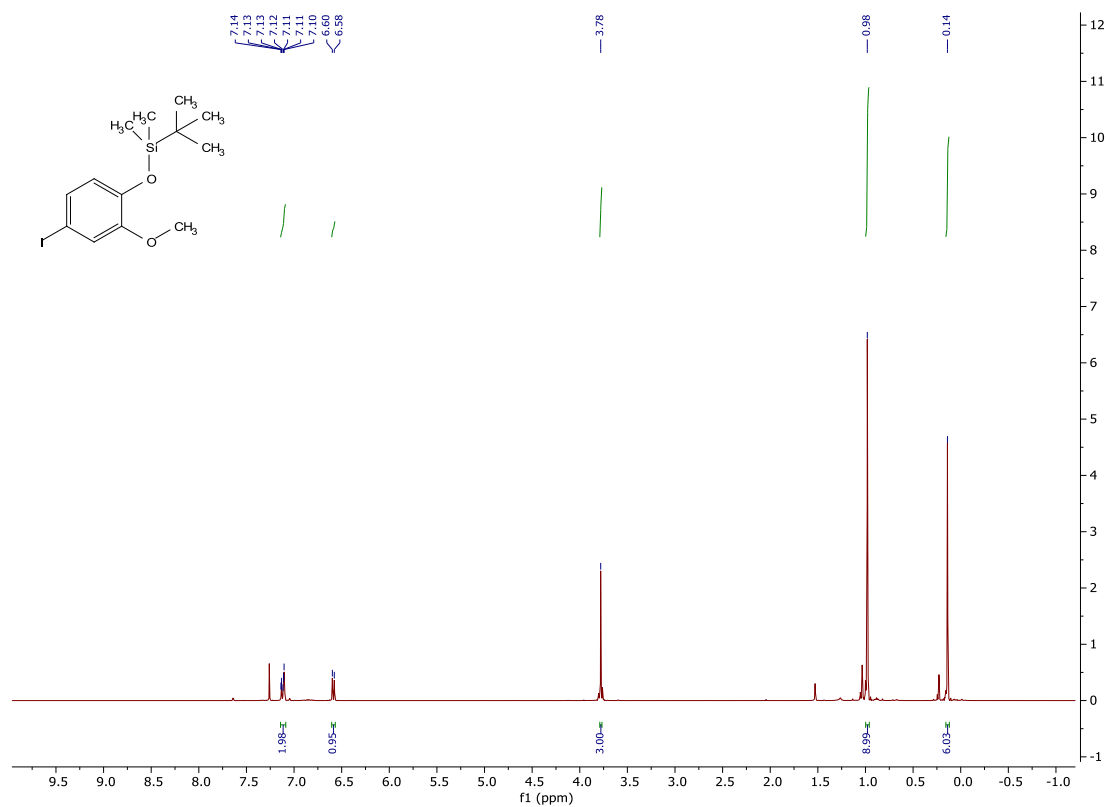
^1H a ^{13}C spektra látky 5a



^1H a ^{13}C spektra látky 5b



^1H a ^{13}C spektra látky 5c



^1H a ^{13}C spektra látky 3b

