



**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Laboratoř růstových regulátorů**

**Struktura neolignanů izolovaných z *Posidonia oceanica***

## **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor: **Sylvie Lévyová**  
Studijní program: B1501 Experimentální biologie  
Studijní obor: Experimentální biologie  
Forma studia: Prezenční  
Vedoucí práce: **doc. RNDr. Jiří Pospíšil, Ph.D.**  
Termín odevzdání práce: 2023

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Sylvie Lévyová
Název práce	Struktura neolignanů izolovaných z <i>Posidonia oceanica</i>
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra chemické biologie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci
Vedoucí práce	doc. RNDr. Jiří Pospíšil, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2023
Abstrakt	Předložená bakalářská práce se zabývá světem sekundárních metabolitů mořských rostlin. V teoretické části se pak věnuje polyfenolickým sekundárním metabolitům, neolignanům a zejména pak srovnává vlastnosti sekundárních metabolitů suchozemských a vodních rostlin. Experimentální část se pak věnuje přípravě neolignanu izolovaného z <i>Posidonia oceanica</i> a jeho strukturním derivátům. Připravené látky jsou pak otestovány na antihelmintickou aktivitu.
Klíčová slova	sekundární metabolity, fenypropanoidy, neolignany, organická syntéza, <i>Posidonia oceanica</i> , quiquesetinerviusin A, antihelmintická aktivita
Počet stran	73
Počet stran příloh	15
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Author's first name and surname	Sylvie Lévyová
Title of thesis	Structure of neolignans isolated from <i>Posidonia oceanica</i>
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Chemical Biology, Faculty of Science, Palacký University
Supervisor	doc. RNDr. Jiří Pospíšil, Ph.D.
The year of presentation	2023
Abstract	The present bachelor thesis deals with the world of secondary metabolites of marine plants. The theoretical part deals with polyphenolic secondary metabolites, neolignans and in particular compares the properties of secondary metabolites of terrestrial and aquatic plants. The experimental part deals with the preparation of neolignans isolated from <i>Posidonia oceanica</i> and their structural derivatives. The prepared substances are then tested for anthelmintic activity.
Keywords	secondary metabolites, phenylpropanoids, neolignans, organic synthesis, <i>Posidonia oceanica</i> , quiquesetinerviusin A, anthelmintic activity
Number of pages	73
Number of appendices	15
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracoval(a) samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne 9. 5. 2023

*/vlastnoruční podpis/*

## **Poděkování**

Jako první bych chtěla poděkovat vedoucímu mé bakalářské práce, doc. RNDr. Jiřímu Pospíšilovi, PhD. za výběr zajímavého tématu, za ochotu a pomoc při práci v laboratoři i mimo ni, za mnoho užitečných rad a zejména za optimismus a příjemné pracovní prostředí, které ve své skupině udržuje. Mé další díky patří Mgr. Danielu Chrenkovi, který mě ochotně seznámil se základními principy organické syntézy a provedl mě ne vždy snadnou cestou k cíli této práce.

Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Aleně Kadlecové, PhD. za odborné vedení při testování biologické aktivity. Nakonec bych chtěla poděkovat mým nejbližším za poskytnutí psychické podpory a za motivaci se této práci věnovat.

Chtěla bych také poděkovat za finanční podporu Interní grantové agentury Univerzity Palackého (IGA\_PrF\_2023\_16).

# Obsah

<b>Seznam zkratek.....</b>	<b>8</b>
<b>1. Úvod .....</b>	<b>9</b>
1.1. Cíle práce.....	10
<b>2. Teoretická část.....</b>	<b>11</b>
2.1. Sekundární metabolity.....	11
2.1.1. Základní charakteristika .....	11
2.1.2. Rozdělení.....	12
2.1.3. Biosyntéza .....	15
2.1.4. Sekundární metabolity vodních rostlin .....	16
2.2. Fenylypropanoidy.....	17
2.2.1. Základní charakteristika .....	17
2.2.2. Vliv zvýšené koncentrace oxidu uhličitého na produkci fenylypropanoidů mořských rostlin .....	18
2.2.3. Lignin .....	19
2.3. Lignany a neolignany .....	20
2.3.1. Biosyntéza .....	21
2.3.2. Příklady vybraných neolignanů .....	24
2.3.3. Předcházející syntéza neolignanů v rámci naší výzkumné skupiny .....	30
<b>3. Výsledky .....</b>	<b>32</b>
3.1. Syntéza benzofuranového intermediátu VI.....	32
3.2. Esterifikační reakce .....	33
3.2.1. Přímá esterifikace vycházející z karboxylových kyselin .....	33
3.2.2. Nepřímá esterifikace vycházející z derivátů karboxylových kyselin .....	34
3.3. Desilylační reakce.....	36
3.4. Odstranění benzylických chránících skupin pomocí Lewisových kyselin.....	37
3.5. Odstranění benzylických chránících skupin hydrogenací .....	37
3.6. Biologické testování vybraných látek na jejich anthelmintickou aktivitu.....	38
<b>4. Diskuse.....</b>	<b>40</b>
4.1. Syntéza esterifikovaných derivátů pocházejících z diolů VI a X – klíčový krok syntézy .....	41
4.2. Deprotekce chránících skupin .....	43
4.3. Biologické testování .....	44
4.3.1. Vyhodnocení chitinasového testu .....	44
<b>5. Závěr.....</b>	<b>45</b>
<b>6. Experimentální část .....</b>	<b>46</b>
6.1. Obecné informace .....	46
6.1.1. Vizualizační roztoky pro TLC.....	47
6.2. Syntéza výchozího benzofuranového skeletu .....	47
6.2.1. Syntéza kyseliny <i>trans</i> -ferulové (II) .....	47
6.2.2. Methylace kyseliny <i>trans</i> -ferulové .....	48

6.2.3.	Oxidativní coupling látky III .....	48
6.2.4.	Ochránění hydroxylové skupiny látky IV .....	49
6.2.5.	Redukce látky V .....	50
6.3.	<i>Syntéza derivátů quiquesetinerviusinu A</i> .....	51
6.3.1.	Syntéza esteru látky VI a kyseliny benzoové .....	51
6.3.2.	Syntéza esteru látky X a kyseliny benzoové .....	53
6.3.3.	Syntéza esteru látky VI a kyseliny <i>p</i> -anisové .....	55
6.3.4.	Syntéza esteru látky X a kyseliny <i>p</i> -anisové .....	57
6.3.5.	Odchránění TBS skupiny intermediátu VI.....	58
6.3.6.	Odchránění TBS skupiny intermediátu X.....	59
6.4.	<i>Syntéza dihydroquiquesetinerviusinu A (XVII)</i> .....	60
6.4.1.	Ochrana OH skupiny kyseliny <i>p</i> -hydroxybenzoové a příprava jejího chloridu .....	60
6.4.2.	Esterifikace intermediátu VI 4-(benzyloxy)benzoyl chloridem.....	61
6.4.3.	Odchránění protekčních skupin látky VIIIc.....	62
6.5.	<i>Biologické testování</i> .....	64
6.5.1.	Základní informace.....	64
6.5.2.	Kultivace a věková synchronizace <i>C. elegans</i> .....	65
6.5.3.	Testování antihelmintické aktivity .....	66
<b>7.</b>	<b>Použitá literatura.....</b>	<b>67</b>
<b>8.</b>	<b>Přílohy .....</b>	<b>73</b>

## Seznam zkratek

SM	sekundární metabolity	MeOH	methanol
NMR	nukleární magnetická resonance	EtOH	ethanol
HRMS	vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie	DIPEA	N,N-diisopropylethylamin
UV	ultrafialové záření	DMF	dimethylformamid
DAHPS	3-Deoxy-D-arabino- heptulosonát 7-fosfát syntáza	TEA	trimethylamin
DAHP	3-deoxy-D-arabino- heptulosonát-7-fosfát	DMSO	dimethylsulfoxid
CAD	skořicoát alkoholdehydrogenáza	CC	sloupcová chromatografie
MOM	methoxymethyl ether	EtOAc	ethyl-acetát
DIBAL	diisobutylaluminiumhydrid	TLC	chromatografie na tenké vrstvě
MW	mikrovlnný	RVO	
EDC	Ethyl (dimethylaminopropyl) karbodiimid	CDCl <sub>3</sub>	deuterovaný chloroform
DMAP	4-dimethylaminopyridin	PMA	kyselina fosfomolybdenová
MOMCl	methoxymethyl chlorid	TBSCl	tert-butyldimethylsilyl chlorid
ekviv	ekvivalent	Hex	hexan
DCM	dichlormethan	TBAF	tetra-n-butylamonium fluorid
RT	pokožová (laboratorní) teplota, 23 °C	NGM	médium pro růst hlístic
		LB	lysogeny broth médium



# 1. Úvod

Stejně tak, jako člověk potřebuje ke spokojenému životu více než jen pouhé dostatečné podmínky k přežití, i rostliny, aby prospívaly, potřebují i něco jiného, než jsou primární metabolity umožňující pouhé přežívání. A tuto funkci u nich obstarávají sekundární metabolity (SM). Tyto na první pohled nevýznamné organické molekuly přináší rostlinám a dalším usedlým (nepohybujícím se) organismům, jako jsou houby či někteří nižší živočichové, nenahraditelnou podporu při boji s nepříznivými okolními vlivy a zlepšují tak kvalitu jejich života. Strukturní rozmanitost sekundárních metabolitů je tak srovnatelná s rozmanitostí samotné rostlinné a živočišné říše a tyto látky skýtají široké možnosti na poli vědy, a to ve více ohledech.

Předním důvodem pro zkoumání těchto látek je jejich biologická aktivita. Ačkoliv jsou ve většině případů tyto látky syntetizovány organismy z konkrétního důvodu, jako je například ochrana před predátory či fyzikálními vlivy, mohou různým způsobem ovlivňovat mnoho biologických aspektů řady dalších organismů. Není vzácným jevem, že některé sekundární metabolity vykazují vlastnosti sahající od toxicity pro nižší organismy, bakterie, plísně atd. přes schopnost pomáhat při léčbě určitých nemocí a bránit oxidačnímu stresu až po schopnost ovlivnit průběh a rychlost přenosu nervových vzruchů a tím pozměnit vnímání reality. Množství takovýchto přírodních látek spolu s množstvím cílových biologických aspektů poukazuje na prakticky nekonečné možnosti kombinací, které je důležité v zájmu vědy zkoumat. Vezmeme-li v potaz, že i nepatrná strukturní změna látky může dramaticky ovlivnit její biologickou aktivitu, možnost laboratorní syntézy derivátů SM mnohonásobně zvyšuje počet těchto možných kombinací.

Dalším z důvodů, proč je přínosné se zabývat SM, je porozumění jejich samotnému vzniku. Syntéza určitých typů SM souvisí s přítomností určitých biochemických drah, které se stejně jako zastoupení SM mohou v rámci různých organismů lišit. Tento vztah může přispět k identifikaci a fylogenetické klasifikaci druhů organismů. Syntéza SM se také může lišit i v rámci jednoho organismu, a to v závislosti na okolních podmínkách, ve kterých se organismus vyskytuje. Porozumění vztahu mezi mírou syntézy daného SM a prostředím organismu pak lze přispět k celkovým poznatkům o přírodním světě okolo nás.

## 1.1. Cíle práce

Cílem mé bakalářské práce byla syntéza jedné z takovýchto přírodních látek, quiquesetinerviusinu A. Tento SM, strukturně náležející do skupiny neolignanů, se přirozeně nachází v mořské trávě *Posidonia oceanica*. Tato rostlina tvoří ve středomořských pobřežních vodách rozsáhlá rašelinová ložiska uchovávající organickou hmotu až několik set let starou. Tato ložiska fungují jako tzv. uhlíkový archiv, prostřednictvím různých organických molekul uchovávají informaci o životních podmínkách, ve kterých žily až několik set let staré rostliny. Organická syntéza známých SM a jejich derivátů, které se v ložiskách mohou přirozeně nacházet, může napomoci při analýze této organické hmoty za účelem porozumění vztahu mezi produkcí SM a vlivy prostředí na vodní rostliny.

Cíle mé práce jsou pak následující:

1. Provést literární rešerši na téma sekundární metabolity se zaměřením na vodní rostliny a sekundární metabolity fenyylpropanoidového typu
2. Pokusit se o syntézu quiquesetinerviusinu A
3. Syntetizovat strukturní deriváty quiquesetinerviusinu A
4. Otestovat připravené látky na antihelmintickou aktivitu
5. Charakterizovat připravené látky pomocí NMR a HRMS spekter

## 2. Teoretická část

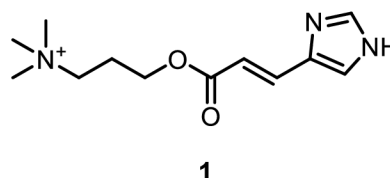
### 2.1. Sekundární metabolity

#### 2.1.1. Základní charakteristika

Rostliny, stejně jako někteří živočichové žijící přisedlou formou života, postrádají schopnost aktivního pohybu. Nemají tedy možnost aktivně reagovat na okolní vlivy, mezi které patří například spásání či stres vyvolaný mrazem či prudkým slunečním svitem. Na tento typ stresu si rostliny a přisedlé organismy vyvinuly sérii obranných mechanismů spočívající v syntéze sekundárních metabolitů. Na rozdíl od primárních metabolitů, které jsou nezbytné pro přežití, sekundární metabolity pozitivně ovlivňují kvalitu života rostliny. Jsou specifické jak pro jednotlivé druhy rostlin, tak i v rámci jednoho druhu pro rostliny žijící v různých lokalitách.<sup>1</sup> Je tedy zřejmé, že biosyntéza sekundárních metabolitů je podmíněna mnoha faktory, od vlivu prostředí až po množství srážek či přítomnost zdroje znečištění. Jak jsem již zmínila, produkce sekundárních metabolitů byla zaznamenána u některých nižších živočichů, jež žijí, podobně jako rostliny, přisedlým životem. Jsou tak prakticky nechráněni před predací a stresem z okolních vlivů, ochrana v podobě syntézy sekundárních metabolitů je tedy pro ně nezbytná. Typickým příkladem mohou být někteří mořští plži a mlži (Obr. 1a), jejichž výtažky jsou pro své léčebné účinky hojně využívány například v jihoafrických zemích<sup>2</sup>.



b)



Obr. 1. (a) *Dicathais orbita*, mořský plž syntetizující sekundární metabolity s léčebnými účinky<sup>2</sup> a (b) struktura murexinu **1**, jeden z těchto metabolitů působící jako svalový relaxant.<sup>2</sup>

Sekundární metabolity (SM) jsou biologicky aktivní látky s širokým spektrem biologických účinků. Již v pravěku lidé zjistili, že extrakty z vybraných rostlin, dnes

obecně označovaných jako léčivé rostliny, mohou mít specifické účinky na lidské tělo a mysl a naučili se je pro jejich vlastnosti využívat. V posledních letech se výzkumu SM dostává čím dál větší pozornosti, a to zejména z důvodu jejich potenciálního využití v některých odvětvích farmaceutického a potravinářského průmyslu. Největší uplatnění tyto látky nachází ve farmacii, dále pak v zemědělství či v kosmetice, kde je jejich přírodní původ z komerčních důvodů vítanou vlastností. Vysoká strukturní diverzita SM je pak příčinou jejich širokého uplatnění při výzkumu nových biologicky aktivních strukturních motivů, při hledání nových building bloků pro medicínální chemii. Tento typ přístupu pak umožňuje nalézt chemické postupy umožňující snadnou strukturní modifikaci cílových SM. Tyto postupy pak nacházejí využití při přípravě derivátů původních SM rostlin.

Za počátek výzkumu SM se považuje izolace morfinu, kterou v roce 1805 provedl chemik a farmaceut F. W. A. Sertürner, čímž učinil velký posun ve vývoji farmacie a přispěl k přerodu alchymie v moderní farmacii<sup>3</sup>. Izolace morfinu iniciovala izolaci dalších látek rostlinného původu, a vedla k identifikaci jejich chemické struktury a zkoumání jejich účinků. Ukázalo se, že SM jsou velmi rozsáhlou skupinou organických látek s velkou chemickou diverzitou. Do poloviny 20. století byly SM považovány za odpadní produkty metabolismu a předpokládalo se, že jejich struktura je výsledkem náhodných evolučních změn.<sup>4</sup> V posledních 50-ti letech se však tento názor v mnoha ohledech změnil. Dnes jsou SM chápány jako nedílná součást rostlinné ekologie a jejich výskyt není považován ani zdaleka za náhodný. V průběhu evoluce docházelo u jednotlivých linií rostlin ke tvorbě různých variací SM, přičemž přežívaly hlavně rostliny obsahující takové látky, které je dokázaly účinně chránit před škůdci a stresovými faktory. Opylovači dávali přednost rostlinám obsahujícím látky propůjčující květu lákavější barvu a vůni, což také pro tyto rostliny znamenalo významnou evoluční výhodu.<sup>4,5</sup>

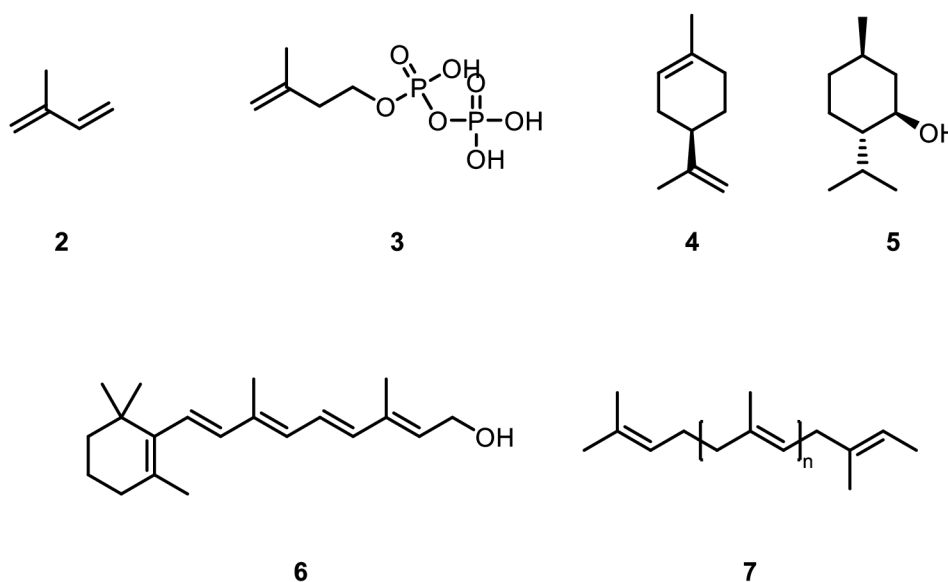
## 2.1.2. Rozdělení

Sekundární metabolity lze obecně rozdělit do 3 skupin na základě jejich chemické struktury a biosyntetického původu. Jmenovitě to jsou terpenoidy, alkaloidy a zejména fenoly, kterými se právě tato práce zabývá podrobněji. Nejprve bych však chtěla detailněji představit jednotlivé třídy SM:

### 2.1.2.1. Terpenoidy

Terpenoidy jsou látky, jejichž kostra je tvořena několika izoprenoidovými podjednotkami (2) (Obr. 2) a jedná se o nejrozšířenější skupinu rostlinných SM.<sup>6</sup> Základním krokem biosyntézy všech terpenoidů je polymerizace isoprenyl difosfátu (3) a od počtu polymerizovaných podjednotek se pak odvíjí názvy tříd terpenoidů (monoterpeny jsou tvořeny 2 podjednotkami, diterpeny jsou tvořeny 4 podjednotkami atd.).<sup>7</sup> Mimo své antimikrobiální a antivirotické účinky jsou terpenoidy zajímavé také z pohledu jejich fyzikálních vlastností. Tyto látky jsou totiž těkavé a mohou tak sloužit pro komunikaci s okolními rostlinami a organismy, například symbionty. Této vlastnosti je také často využíváno v aromaterapii.<sup>8</sup>

K nejznámějším terpenoidům patří například aromatické monoterpeny limonen (4) a mentol (5), diterpen retinol (6) či polymerní kaučuk (7), významný pro své elastické vlastnosti.



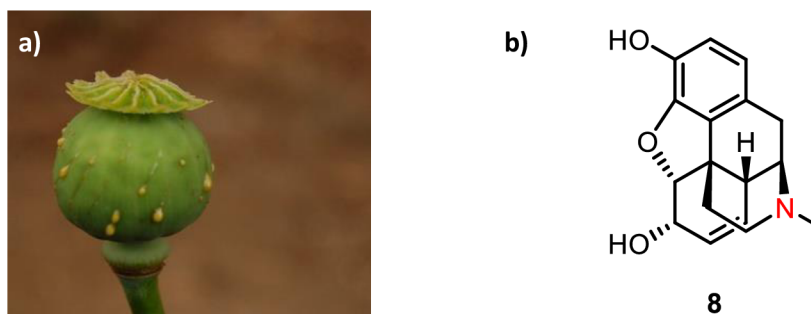
Obr. 2. Struktura izoprenu (2), isoprenyl difosfátu (3), monoterpenů limonenu (4) a mentholu (5), diterpenu retinolu (6) a polymerního přírodního kaučuku (7)

### 2.1.2.2. Alkaloidy

Další velkou skupinou SM jsou alkaloidy. Látky patřící do této skupiny jsou biosyntetizovány z aminokyselin a vyznačují se skeletem obsahujícím alespoň jeden atom dusíku. Díky schopnosti na sebe vázat volné radikály či některé ionty kovů fungující jako katalyzátory oxidačních reakcí jsou významnými antioxidanty, nicméně jejich využití v léčebných terapiích je velmi široké.<sup>9</sup>

Pro lidstvo jsou již od pradávna nejvýznamnější pravděpodobně pro svoji schopnost působit jako neurotransmitery a ovlivňovat tak nervovou soustavu.<sup>10</sup> Jejich účinky sahají od narkózy, utlumení vědomí organismu, uvolnění svalů a úlevy od

bolesti přes halucinace a pozměněné vnímání reality až po navození pocitu nevyčerpatelné energie a euforie. Přírodní alkaloidy izolované z nezralých makovic máku setého (Obr. 3) a následně i jejich syntetické strukturální deriváty se nazývají opiové alkaloidy. Tyto látky působí jako velmi silná analgetika, pro své narkotické účinky jsou často zneužívány. Další pozoruhodnou vlastností alkaloidů je schopnost částečně měnit strukturu molekuly a tím i její biologickou aktivitu v závislosti na pH okolního prostředí. Strukturální změna mezi volným, neprotonovaným aminem a jeho protonovanou kvarterní formou pak mění povrch molekuly, ve které se tento bazický dusík nachází. Tato vlastnost pravděpodobně vysvětluje značnou toxicitu některých alkaloidů v cizích organismech, zatímco v případě organismů, kterými jsou biosyntetizovány, jsou zcela neškodné.<sup>9,11</sup>



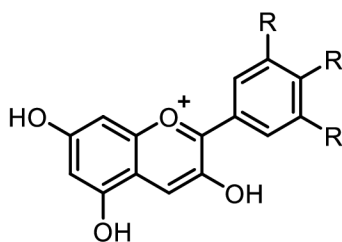
Obr. 3. (a) Nezralá makovice *Papaver somniferum*<sup>12</sup> a (b) struktura alkaloidu morfinu (8) se zvýrazněným heteroatomem dusíku

Většina látek z této skupiny sekundárních metabolitů se dále vyznačuje typickou hořkou chutí, která má sloužit jako odpuzovač býložravců při konzumaci rostliny. Pro některé organismy, mezi které patří zejména lidé, však může být naopak vyhledávaná. To lze pozorovat například na celosvětové konzumaci kávy, jejíž proslulou hořkou chuť částečně způsobuje alkaloid kofein<sup>13</sup>, zodpovědný také za stimulační účinky kávy.

### 2.1.2.3. Fenoly

Fenoly jsou sekundární metabolity, jejichž struktura obsahuje alespoň jedno či více aromatických jader substituovaných alespoň jednou hydroxylovou skupinou. V případě rostlin tyto látky poskytují rostlinám ochranu před predátory a parazity, před negativními vlivy UV záření a v neposlední řadě rostlinám poskytují i výhodu z reprodukčního pohledu. Ačkoliv jsou rostliny spojovány hlavně se zelenou barvou způsobenou chlorofylem, může jejich generativní i vegetativní část disponovat i barvami, jako jsou modrá, fialová, červená či žlutá. Tato barevnost je způsobena

právě přítomností fenolických sloučenin, zejména pak antokyanů<sup>14</sup> (Obr. 4). A tyto barvy pak mohou sloužit například při lákání opylovačů či odpuzení býložravců. Schopnost fenolických metabolitů pohlcovat UV světlo pak přispívá k jejich jednoduché spektrofotometrické identifikaci a spolu s jejich vysokou chemickou stabilitou a hojným zastoupením v prakticky všech vyšších rostlinách tak z těchto látek činí oblíbené fytochemické markery.<sup>14,15</sup>



Obr. 4. Základní struktura běžně se vyskytujících antokyanů.<sup>16</sup>

### 2.1.3. Biosyntéza

V průběhu komplexních reakcí primárních metabolických drah vznikají, jako vedlejší produkty, metabolity sekundární. Na první pohled by se tyto látky daly považovat za pouhé katabolity primárních metabolitů, při podrobnějším přezkoumání však zjišťujeme, že jsou SM naprosto nezbytné pro rostliny z pohledu kvality jejich života. Odsud také pochází přívlastek „sekundární“, který poukazuje na to, že tyto látky nejsou nezbytné pro růst a vývoj rostlin, avšak pro úspěšné přežití rostliny v přírodě jsou neméně důležité. Biosyntetické dráhy, během nichž vzniká většina SM, jsou zejména spojeny s glykolýzou (pentózofosfátový cyklus či citrátový cyklus)<sup>17</sup> a s dráhami pro syntézu kyseliny malonové a mevalonové (vznik některých fenolů a prekurzorů pro veškeré terpenoidy)<sup>18</sup>. Nejvýznamnějšími zdroji fenolických SM je pak fenylpropanoidová a zejména šikimátová dráha<sup>19</sup>. Tyto biosyntetické kaskády vedou ke vzniku základních koster molekul, jež jsou pak dále modifikovány pomocí specifických enzymů (substituce, izomerace, navázání nových funkčních skupin atd.).<sup>19</sup> Tento divergentní prvek následně vede k existenci rozsáhlého počtu strukturálně různorodých SM.

Mění se přírodní podmínky, ve kterých rostliny žijí, způsobují změny nejen v intenzitě, ale i ve stereospecifičnosti průběhu jednotlivých metabolických drah zodpovědných za tvorbu konkrétních skupin SM.<sup>20</sup> Tyto změny jsou v mnoha případech, stejně jako samotné zastoupení SM, opět velmi druhově specifické, takže není jednoduché jednoznačně určit, jakým způsobem rostliny obecně reagují na daný stresový faktor. Jsou známy případy, kdy stejnou látku produkuje jedna rostlina

dlouhodobě a nepřetržitě, zatímco jiná rostlina potřebuje vnější impuls, aby započala látku syntetizovat.<sup>19</sup> Současným trendem ve výzkumu SM, jež by měl vést nejen k pochopení vlivu SM na rostliny, ale i k identifikaci biologicky aktivních látek, je vedle pokračujících biologickou aktivitou řízených extrakcí i snaha o nalezení efektivních postupů k *de novo* přípravě těchto látek (identifikace jejich vlivu metodou externího přídatku), anebo cílená modifikace prostředí, v němž rostliny žijí (např. vystavování rostlin stresorům) či užití moderních metod metabolického inženýrství.<sup>17</sup>

#### **2.1.4. Sekundární metabolity vodních rostlin**

Rostliny, se kterými se nejčastěji setkáváme, jsou suchozemské a většina studií SM je zaměřena právě na ně. Hlavními důvody jsou velká rozmanitost suchozemských druhů a snadná dostupnost pro sběr vzorků nebo provádění experimentů s nimi. Je však třeba zmínit, že SM nalezneme také v rostlinách žijících částečně či úplně pod hladinou sladkých i slaných vod. Z fyzikálního a chemického hlediska jsou vodní rostliny vystaveny velmi odlišnému prostředí než rostliny suchozemské, a je tedy na místě prozkoumat také SM vodních rostlin. Tvorba SM je na těchto faktorech přímo závislá a složení metabolomu tedy bude značně odlišné zejména z pohledu struktury látek zde přítomných. Důvodem různorodosti při produkci SM je například vysoký obsah solí v mořské vodě, který vede k včleňování halogenů do SM mořských řas, nebo naopak absence atmosférického dusíku, což vysvětluje pro mořské rostliny typickou absenci dusík obsahujících SM. Jedná se především o alkaloidy, které jsou suchozemskými rostlinami produkovány hojně.<sup>21</sup>

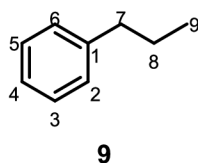
Kromě prostředí působí na suchozemské a vodní rostliny také odlišné negativní vlivy, proti kterým se musí bránit. Rostliny žijící pod vodní hladinou jsou v menší míře vystaveny UV záření, což je pravděpodobně důvodem pro nízký obsah fenolických SM v porovnání se suchozemskými rostlinami.<sup>22</sup> Zatímco pro suchozemské rostliny představují hrozbu zejména specializovaní herbivoři, vodní rostliny se musí bránit především před velkým množstvím druhů omnivorů, což nejspíš vedlo ke zvýšenému obsahu různých SM s nesespecifickým odpuzujícím účinkem. Suchozemské rostliny oproti tomu disponují hlavně druhově specifickými SM, jejichž účelem je odradit určitého herbivora.<sup>21,22</sup> Vodní rostliny mají také výrazně nižší úroveň strukturální ochrany a opory, kterou u suchozemských rostlin zajišťuje zejména lignin. Hrozba v podobě okusu je tedy pro vodní rostliny mnohem akutnější než možnost „být zašlapán a ulehnout“, což tedy s vysokou pravděpodobností vede ke snížení obsahu polyfenolických látek v rostlinách (opora a odpuzení) a zvýšení obsahu SM nepolyfenolického původu s odpuzujícím účinkem pro omnivory.<sup>22</sup>



## 2.2. Fenylpropanoidy

### 2.2.1. Základní charakteristika

Jedním ze základních typů fenolických SM jsou fenylpropanoidy. Tímto názvem se většinou označují tzv. C<sub>6</sub> – C<sub>3</sub> sloučeniny (Obr. 5), jejich dimery, oligomery, polymery a deriváty. C<sub>6</sub> podjednotka pak označuje 6-ti uhlíkaté benzenové jádro a C<sub>3</sub> podjednotka značí propanovou skupinu navázanou na aromatické jádro.<sup>23,24</sup> Název fenylpropanoid tedy přímo označuje základní jednotku této struktury.

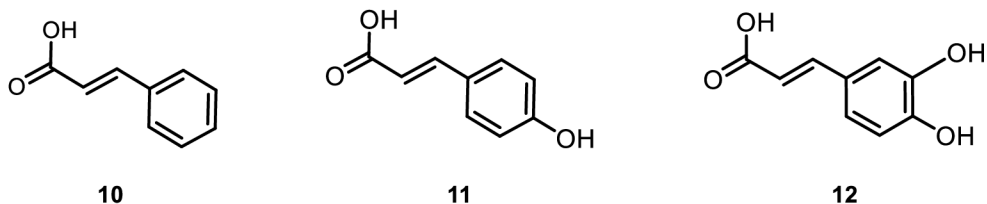


Obr. 5. Struktura fenylpropanoidové základní stavební jednotky **9**.

Typickou vlastností pro jednoduché fenylpropanoidy je těkavost a pronikavé aroma, jež je zodpovědné za výrazné vůně bylinek a koření.<sup>23</sup> Díky tomu se také tyto látky staly ekonomicky významné, a to zejména v potravinářském a kosmetickém průmyslu.

Jeden z významných a základních fenylpropanoidů, cinnamaldehyd, je látka produkovaná zástupci rodu skořicovník a je zodpovědná za typické skořicové aroma.<sup>25</sup> Významné jsou také jeho chelatační, antibakteriální a antiproliferační vlastnosti<sup>26</sup>, díky kterým je tato látka potenciálně využitelná i ve farmaceutickém průmyslu.

Tyto látky vznikají v rostlinách v rámci fenylpropanoidové dráhy deaminací aminokyseliny fenylalaninu a případně i tyrosinu, aminokyselin obsahujících právě strukturu C<sub>6</sub> – C<sub>3</sub>. Dalšími produkty této biosyntézy jsou hlavně kyselina skořicová (cinamová, **10**), *p*-kumarová (**11**) a kávová (**12**) (Obr. 6).<sup>23,27</sup> Tato metabolická dráha je podrobněji popsána v kapitole 2.3.1.



Obr. 6. Struktura kyseliny skořicové (**10**), *p*-kumarové (**11**) a kávové (**12**).

Obecně, fenylypropanoidy hrají u rostlin důležitou roli při ochraně před abiotickými stresovými faktory. Fenolické SM dokážou, jak již bylo zmíněno, pohlcovat záření v UV spektru a rostlinu tedy chrání před zhoubným vlivem UV záření. Jejich produkce také stoupá například při snížení teploty okolí, kdy se ve formě polymerů ligninu a suberinu začleňují do buněčné stěny, kde působí jako vodní bariéra a brání tak poškození buněk mrazem.<sup>28</sup>

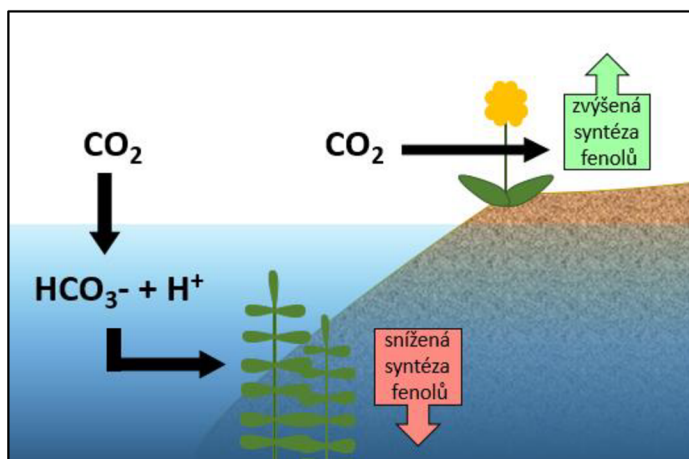
## **2.2.2. Vliv zvýšené koncentrace oxidu uhličitého na produkci fenylypropanoidů mořských rostlin**

Pro mořské rostliny představují fenylypropanoidy zejména ochranu před okusem. Jeden z velmi aktuálních a často diskutovaných problémů, nárůst koncentrace oxidu uhličitého v atmosféře, by však mohl biosyntézu těchto látek ovlivnit.

Hladina moří a oceánů pokrývá více jak 2/3 povrchu Země a atmosférický oxid uhličitý má tak možnost se do vody ve velké míře vstřebávat. Ve vodním prostředí pak částečně přechází na hydrogenuhličitany, jež způsobují snižování pH vody. Dochází tak mimo jiné i ke snižování dostupnosti uhličitánu vápenatého pro kalcifikující organismy.<sup>29</sup>

Obecně se má za to, že u suchozemských rostlin vede zvýšená koncentrace oxidu uhličitého k akumulaci fenolických látek.<sup>30</sup> To však tak úplně nemusí platit pro mořské rostliny. Bylo zjištěno, že rostliny žijící poblíž podmořských průduchů, v prostředí s několikanásobně vyšší koncentrací oxidu uhličitého a sníženým pH, vykazují snížený obsah fenylypropanoidů (Obr. 7). Tato skutečnost je pravděpodobně příčinou zvýšené úrovně pastvy mořských herbivorů na těchto rostlinách, který byl původním podnětem k výzkumu.<sup>30</sup>

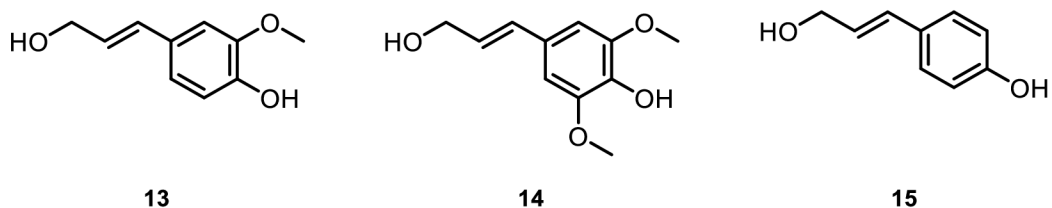
V současnosti není zřejmé, jaký mechanismus stojí za vlivy vedoucími ke změně při biosyntéze fenolických látek v souvislosti se zvýšenou koncentrací oxidu uhličitého pozorovanou u mořských a suchozemských rostlin. Předpokládá se ale, že zvyšující se míra emisí oxidu uhličitého by v budoucnu mohla mít dopad na obsah ochranných látek v mořských rostlinách, což by mohlo vést ke změnám v ekosystému.<sup>29,30</sup>



Obr. 7. Piktogram zachycující vliv zvýšené koncentrace oxidu uhličitého na mořské a suchozemské rostliny.<sup>30</sup>

### 2.2.3. Lignin

Ačkoliv se v případě ligninu, druhé nejrozšířenější organické látky na světě<sup>31</sup>, nejedná o sekundární metabolit, v rámci látek odvozených od fenylylpropanoidu jej nelze nezmínit. Tato amorfnní polymerní látka s komplexní nejednotnou strukturou<sup>31</sup> vzniká náhodnou polymerací tří látek odvozených od meziproductů fenylylpropanoidové dráhy. Jedná se o koniferylalkohol (**13**), sinapylalkohol (**14**) a v menší míře i *p*-kumarylalkohol (**15**) (Obr. 8). Proces polymerizace probíhá v buněčné stěně pomocí radikálové dimerizace za účasti oxidáz a lakkáz. Tento dimer následně podléhá dalším radikálovým oxidacím.<sup>32</sup>



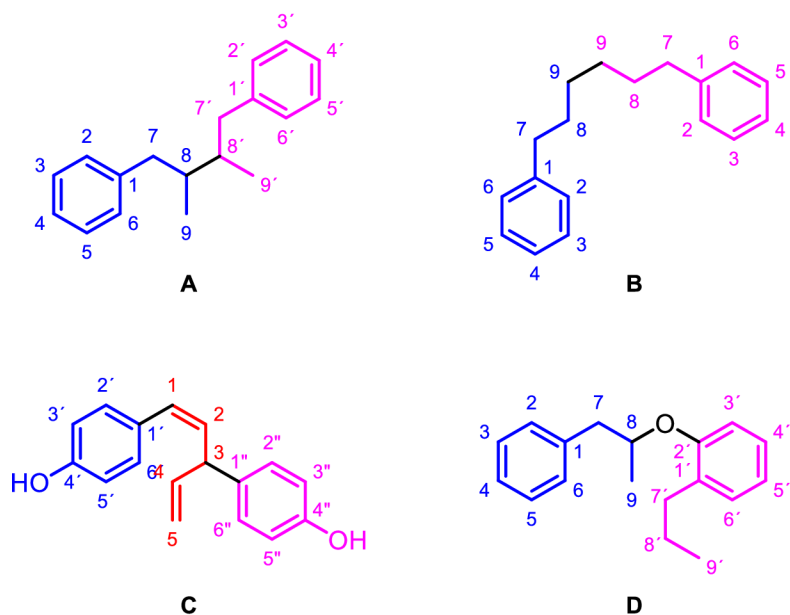
Obr. 8. Struktura koniferylalkoholu (**13**), sinapylalkoholu (**14**) a *p*-kumarylalkoholu (**15**).

Lignin je hlavní strukturní látka zodpovědná za schopnost rostlin držet tvar a usnadnit tak jednak přístup zelených částí rostlin ke slunečnímu záření a také vytvořit oporu pro žilní svazky, jež umožňují transport živin a vody napříč rostlinným tělem.<sup>27,32</sup> Je tak velmi pravděpodobné, že právě vznik fenylylpropanoidové biosyntetické dráhy byl nezbytný pro vývoj suchozemských rostlin. U zelených řas, považovaných za předchůdce evolučně vyspělejších cévnatých rostlin, se fenylylpropanoidová dráha nevyskytuje.<sup>27</sup> Jejich buněčné stěny neobsahují látky, které by je zpevňovaly a řasy jsou tak závislé na okolním vodním prostředí, poskytujícím jak živiny, tak i tělesnou oporu. Primitivní obdoba fenylylpropanoidové dráhy se objevuje u mechorostů a hub,

kde dává vzniknout látkám poskytujícím podobné vlastnosti jako lignin.<sup>33</sup> Za zásadní krok v evoluci fenylypropanoidové dráhy je považována syntéza kyseliny ferulové, která vzniká místně specifickou metylací kyseliny kávové. Touto schopností disponují hlavně semenné rostliny, ačkoliv některé deriváty ligninu byly zaznamenány také u výtrusných rostlin.<sup>33</sup> Díky tomuto kroku pak mohly rostliny kromě dalších fenolických SM, jako jsou lignany a neolignany, syntetizovat lignin. Získaly tak prostředky pro úplnou kolonizaci pevninského prostředí, což vedlo ke vzniku závratného počtu rozmanitých rostlinných druhů, jaký známe dnes.

## 2.3. Lignany a neolignany

Fenylypropanoidové podjednotky mohou tvořit dimery, a to buď spojením C-8 uhlíků obou molekul (v takovém případě se jedná o lignany (**A**)), nebo přes ostatní uhlíky (pak se jedná o neolignany (**B**)) (Obr. 9).<sup>34</sup> Je však možné se však setkat i s dalšími definicemi pojmů lignan a neolignan, kde například lignany byly považovány za produkty dimerizace dvou molekul cinnamylalkoholu a jako neolignany se označovaly látky vzniklé dimerizací dvou molekul allyl- a propenylfenolů.<sup>24</sup> Krátce po zveřejnění tohoto termínu, okolo roku 1940, bylo navrženo definovat lignany jako veškeré přírodní látky, které vznikly dimerizací dvou *p*-hydroxyfenylypropenových podjednotek.<sup>35</sup> Dnes se však tato definice ukazuje jako zcela nedostačující. Spolu s lignany a neolignany se většinou v rostlinách vyskytují také norlignany, 16-ti či 17-tiuhlíkaté látky obsahující C6-C5-C6 kostru (**C**), tedy dva fenoly spojené 5-ti uhlíkatým řetězcem<sup>36,37</sup>, a oxyneolignany (**D**), vznikající propojením fenylypropanoidových podjednotek přes atom kyslíku.<sup>38</sup> Obecně jsou tedy tyto látky považovány za dimery základních fenylypropanoidů, ale je možné se setkat i s trimery či tetramery.<sup>39</sup>



Obr. 9. Příklad koster lignanu (**A**), neolignanů (**B**), norlignanů (**C**) a oxynolignanů (**D**).<sup>34,36</sup>

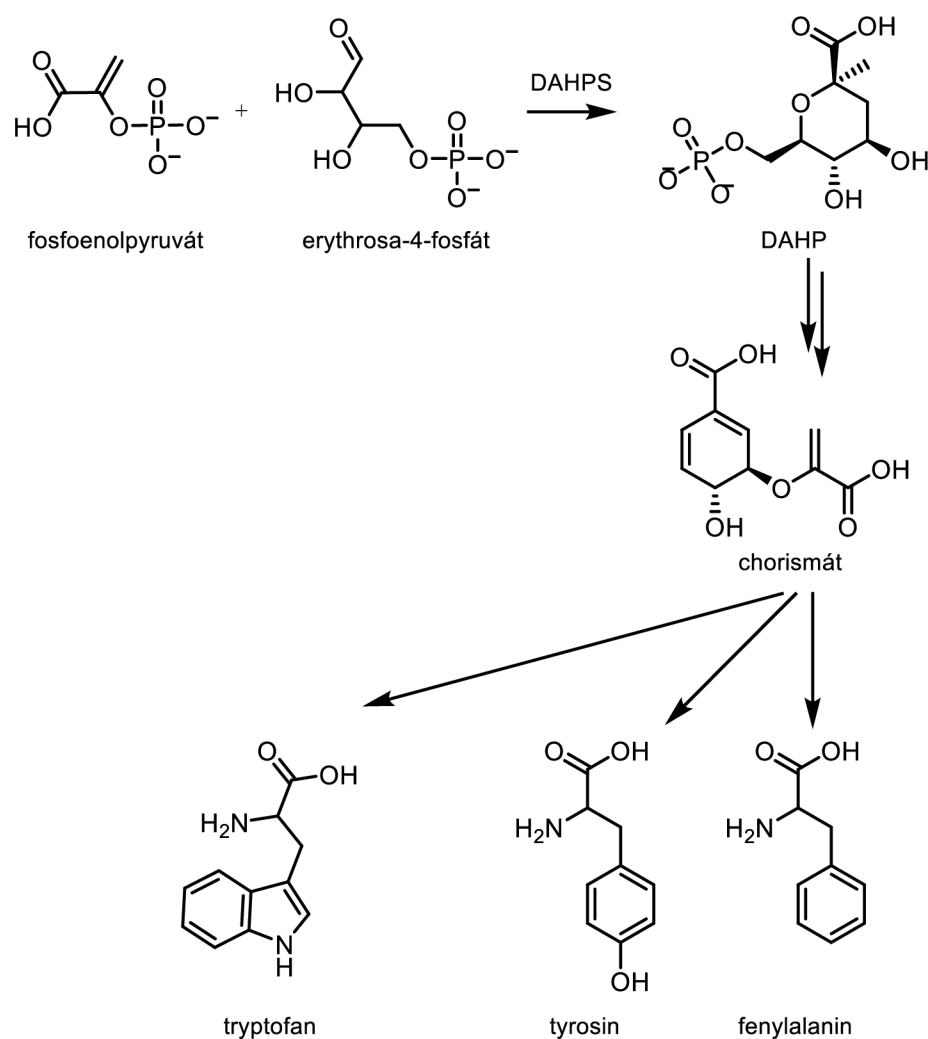
Lignany a neolignany se hojně nachází zejména v jádrovém dřevě jehličnanů, na což také poukazuje jejich název (z latinského *lignum* = dřevo).<sup>40</sup> Nalézt je však samozřejmě můžeme napříč celou rostlinnou říší, tedy i v bylinách či řasách.

### 2.3.1. Biosyntéza

Při biosyntéze lignanů a neolignanů se nejvýznamněji uplatňuje šikimátová dráha, což je sled metabolických dějů probíhajících v houbách, bakteriích a rostlinách za účelem tvorby prekurzorů aromatických aminokyselin (Obr. 10).<sup>41</sup> Na rozdíl od bakterií, využívajících tuto dráhu zejména pro syntézu aminokyselin, má pro vyšší rostliny šikimátová dráha daleko rozsáhlejší význam, a to právě díky syntéze prekurzorů valné většiny sekundárních metabolitů obsahujících aromatický kruh. Takto vznikají například kyselina salicylová, alkaloidy, flavonoidy a samozřejmě také lignany či neolignany.<sup>41</sup> Zatímco regulace průběhu reakcí této dráhy je u bakterií závislá pouze na koncentracích aromatických kyselin, u vyšších rostlin jsou mechanismy regulace závislé hlavně na okolních vlivech a stresových faktorech.<sup>41–43</sup>

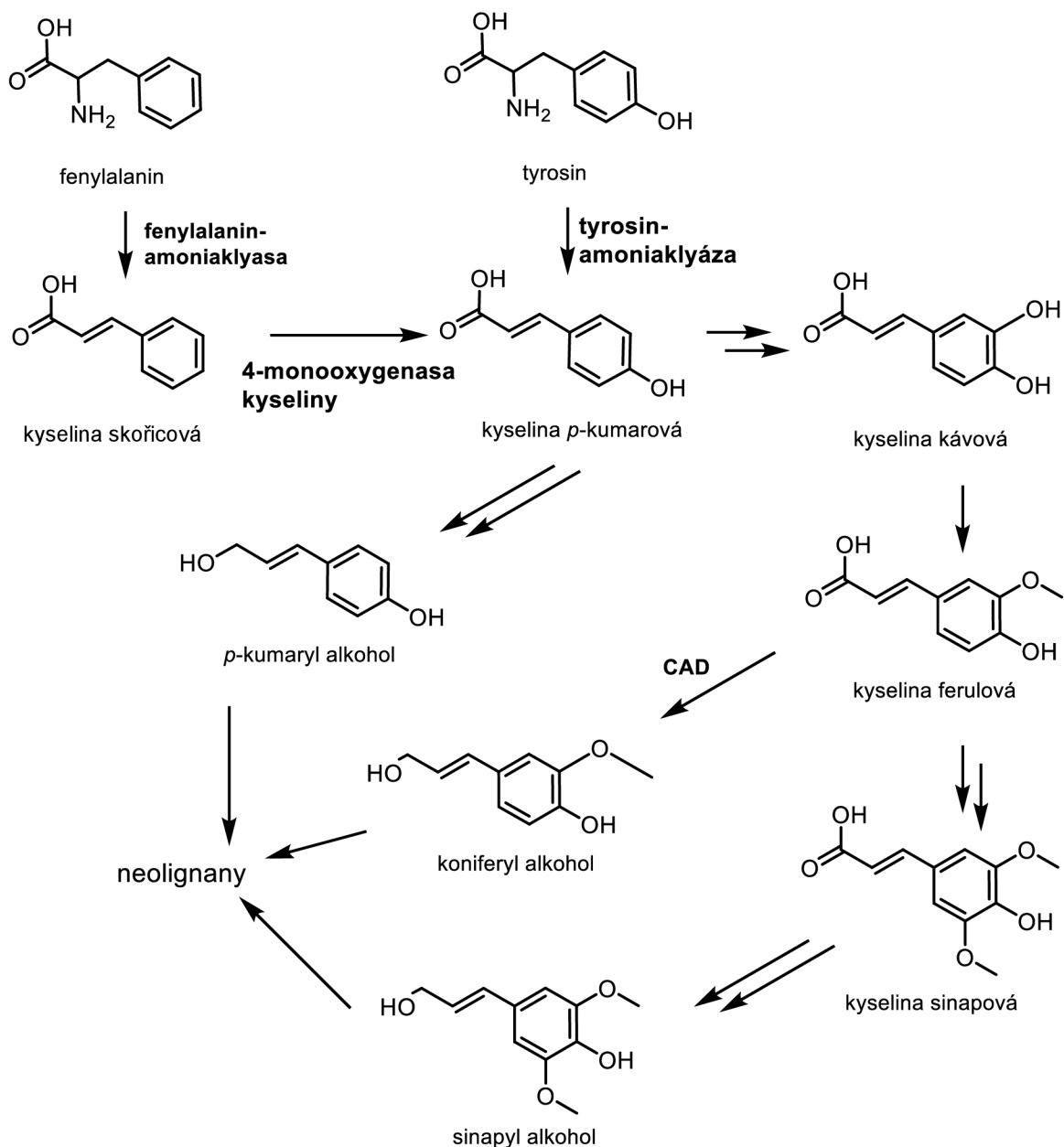
Rostliny s bakteriemi však sdílí mnohé detaily týkající se šikimátové dráhy, zejména strukturu enzymů.<sup>41</sup> Na rozdíl od hub, využívajících komplexní polyfunkční enzymy, rostliny i bakterie využívají monofunkční enzymy. Pokud spojíme tento fakt s poznatkem, že šikimátová dráha v rostlinách probíhá hlavně v plastidech, dojdeme k závěru, že zde můžeme aplikovat endosymbiotickou hypotézu. Geny pro enzymy podílející se na této dráze tedy pravděpodobně mají prokaryotický původ.<sup>41</sup>

Do šikimátové dráhy vstupuje molekula fosfoenolpyruvátu a erythrosa 4-fosfátu, které následně kondenzují za tvorby 3-deoxy-D-arabino-heptulosonát-7-fosfátu (zkráceně DAHP). Následuje sled reakcí vedoucích k molekule chorismátu, jedním z meziproduktů je právě šikimát, který dal název této metabolické dráze. Chorismát je velmi důležitý meziprodukt, protože mimo biosyntézu *p*-amino a *p*-hydroxy kyselin benzoových, ze kterých následně vzniká například kyselina listová, z něj totiž vznikají aminokyseliny tyrosin, tryptofan a fenylalanin.<sup>41,42</sup>



Obr. 10. Zjednodušené schéma šikimátové dráhy. Modifikováno dle ref.<sup>41</sup>

Fenylalanin slouží jako prekurzor pro řadu dalších látek, nezbytných pro následnou syntézu sekundárních metabolit, jako jsou například kyselina skořicová, *p*-kumarová, ferulová a sinapová, jež vznikají již zmíněnou fenylypropanoidovou dráhou (Obr. 11).<sup>42,43</sup>



Obr. 11. Zjednodušené schéma fenylpropanoidové dráhy. Modifikováno dle ref.<sup>27,34</sup>

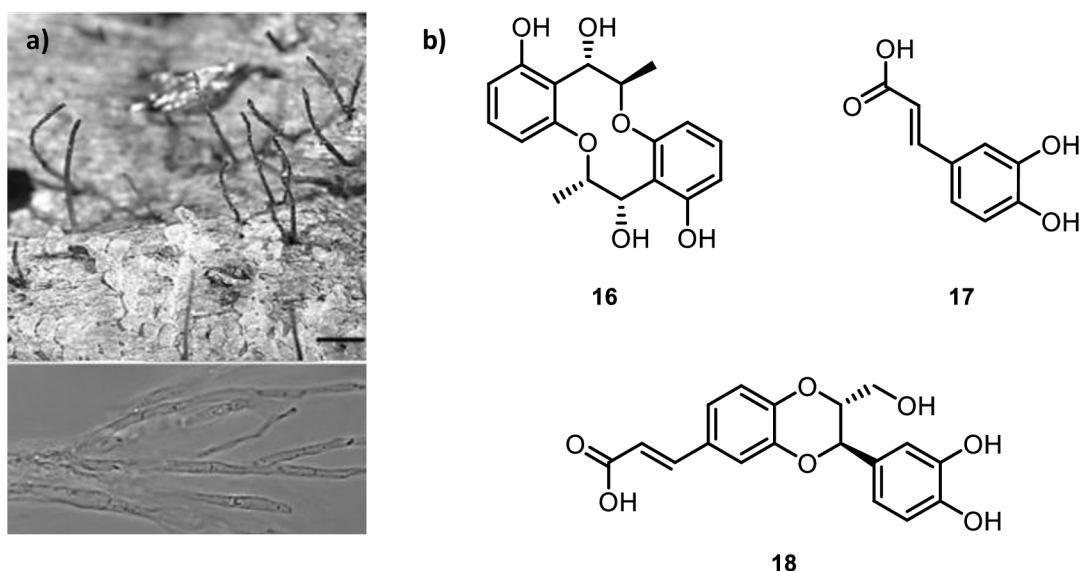
Kyselina *p*-kumarová vzniká hydroxylací kyseliny skořicové a její deriváty, ke kterým patří mimo jiné právě kyselina ferulová a sinapová, slouží jako základní monomery pro následnou syntézu lignanů a neolignanů. Neolignanové podjednotky mohou dimerizovat různými způsoby, což spolu s postsyntetickými modifikacemi přispívá k vysoké strukturní diverzitě těchto látek.<sup>34</sup>

Při dimerizaci některých neolignanových monomerů obsahujících hydroxylovou skupinu na uhlíku C-9 dochází ke glykosylaci vzniklého dimeru. Vznik těchto konjugátů vede ke snížení biodostupnosti molekul a ke zvýšení jejich rozpustnosti ve vodě. Takto vzniklé konjugáty pak slouží jako „zásobárny“ fenylpropanoidů v rostlině.<sup>37</sup>

## 2.3.2. Příklady vybraných neolignanů

### 2.3.2.1. Neolignany přítomné v „nerostlinných“ organismech

Ačkoliv jsou z hlediska výskytu neolignanů rostliny nepopíratelně nejvýznamnějším zástupcem, je nutné poukázat na to, že mnohé neolignany se vyskytují i v říši hub. Zájem o látky potenciálně využitelné v lékařství či v zemědělství ve spojitosti s možnými odlišnostmi v biosyntéze způsobenými prostředím vedly k izolaci například neolignanů ophiocerolu (**16**) ze sladkovodní houby *Ophioceras dolichostomum* (Obr. 12a).<sup>44</sup> Tato mikroskopická houba, jejíž nepatrný výskyt byl zaznamenán hlavně v oblasti Střední Ameriky, Jižní Asie a Austrálie, je jedním z mnoha zástupců vřeckovýtrusých hub<sup>45</sup> a mimo zmíněný neolignan z ní byla izolována například i kyselina kávová (**17**) a isoamerikánová (**18**).<sup>44</sup>



Obr. 12. (a) Plodnice *Ophioceras dolichostomum*<sup>46</sup> a (b) struktura fenolů izolovaných z této houby<sup>44</sup>

Ophiocerol (**16**), pojmenován podle organismu, ze kterého byl izolován, je opticky aktivní látka, která nebyla nikdy dříve izolována z žádných rostlin. Strukturně se jedná o zajímavý dibenzo-1,6-dioxacyklodekanový skelet, který i přes vysokou strukturní rozmanitost neolignanů nebyl doposud popsán.<sup>44</sup>



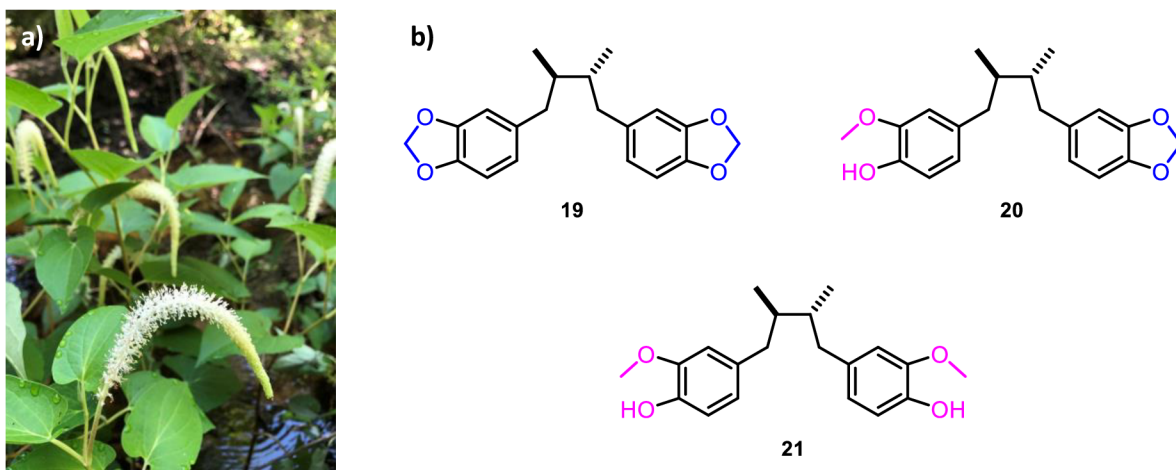
### 2.3.2.2. Neolignany jako potenciální léčiva

Využívání rostlinných extraktů v lidovém lékařství vedlo a vede ke zvýšenému zájmu o izolaci a studium látek nacházejících se v rostlinách, a to zejména kvůli zjevnému potenciálu jejich využití v moderní medicíně. Snaha o nalezení nových biologicky aktivních přírodních látek je poháněna také faktem, že léčiva, běžně používaná proti některým nemocem, vykazují zásadní nedostatky jako například vedlejší účinky či vznik rezistence.

Jedním z případů problematických onemocnění je Chagasova choroba, jež je způsobena parazitickým prvokem *Trypanosoma cruzi*.<sup>47</sup> Benznidazol a nifurtimox, jediná momentálně využívaná léčiva k léčbě této potenciálně smrtelné nemoci, způsobují díky své toxicitě poměrně vážné vedlejší účinky, jako je hypersenzitivita či trávicí obtíže.<sup>47</sup>

V rámci hledání netoxických přírodních látek, které by mohly tato léčiva nahradit, byl na trypanocidní aktivitu testován například extrakt z listů rostliny *Saururus cernuus*. *Saururus cernuus* je hygryfytická rostlina (Obr. 13a) žijící v mokřadních oblastech napříč východní Amerikou. V lidovém lékařství byla odedávna využívána zejména pro svoji schopnost léčit záněty prsou a močových cest.<sup>43,44</sup>

Z více než 20 známých látek lignanového typu, produkovaných rostlinou *S. cernuus*<sup>48</sup>, byly izolovány tři neolignany s dibenzylbutanovým skeletem, které byly testovány na účinnost proti *T. cruzi*.<sup>49</sup>



Obr. 13. (a) Reprezentativní obrázek *Saururus cernuus*<sup>50</sup> a (b) neolignany izolované z této rostliny: threo-austrobailignan (**19**), threo-austrobailignan-6 (**20**) a threo-dihydroguaiaretová kyselina (**21**).<sup>49</sup>

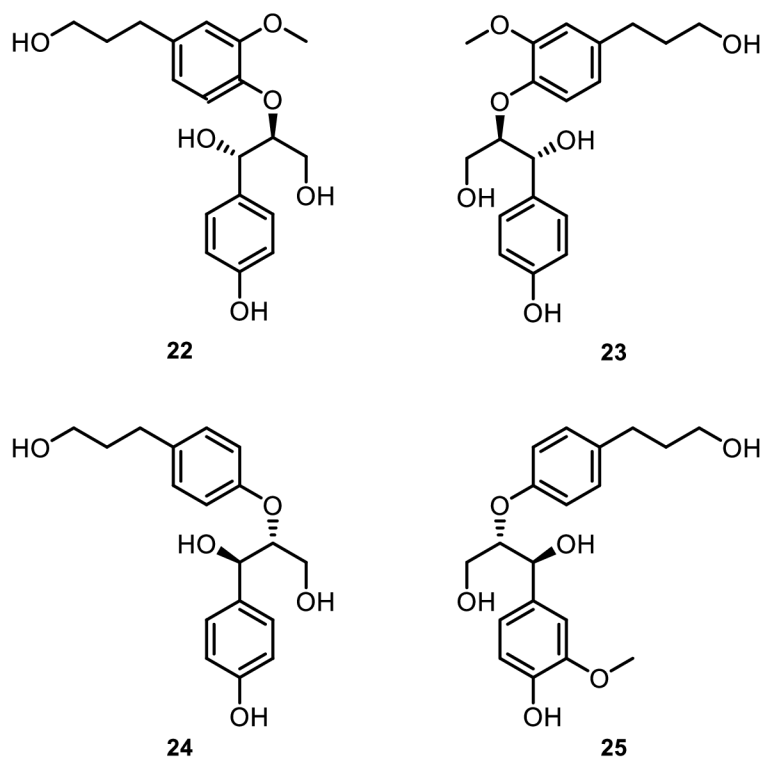
Z těchto tří látek byly v rámci trypanocidní aktivity účinné pouze látky **20** a **21** a látka **20** jako jediná vykazovala toxicitu.<sup>49</sup> Lze se tedy domnívat, že právě přítomnost methoxylových a hydroxylových skupin je zodpovědná za schopnost látek působit negativně na daného parazita.

Další z nemocí, problematických ve smyslu dostupnosti léčiv, je Alzheimerova choroba. Tato neurodegenerativní nemoc, vyznačující se ztrátou kognitivních schopností, sužuje mnoho lidí, nejen pokročilého věku. Komplikované a poměrně málo pochopené mechanismy jejího vzniku jsou hlavními viníky toho, že tato nemoc je v současné době neléčitelná. Ačkoliv existují léky na zmírnění příznaků či zpomalení progresu nemoci, snaha Alzheimerovu chorobu vyléčit či zastavit její postup se zatím neseťkává s úspěchem.<sup>51</sup>

Jedním z nemoc způsobujících procesů, na které je výzkum léčebných metod cílen, je tvorba proteinových plaků tvořících se v mozku.<sup>51</sup> V současnosti je oxidační stres považován za jednu z příčin agregace těchto plaků, jejichž hlavní složkou je špatně poskládaný protein Amyloid- $\beta$ .<sup>52</sup> Zde opět přichází na řadu pátrání po přírodních látkách, které by byly schopné nahradit potenciálně škodlivá syntetická léčiva.<sup>53</sup> Jak již bylo zmíněno, mnoho SM působí jako antioxidanty a mohly by tak podpořit léčbu této choroby. Je však známo i několik látek, které mají mimo výborné antioxidační vlastnosti také schopnost inhibovat samovolnou tvorbu plaků způsobenou agregací Amyloid- $\beta$  jednotek<sup>53</sup>, což z nich dělá nadějně adepty pro bezpečné léky proti Alzheimerově chorobě.

*Rubus idaeus*, rostlina patřící do čeledi *Rosaceae*, tvoří drobné plody známé jako maliny, které jsou jedním z nejoblíbenějších a velmi chutných druhů ovoce. Obsahuje velké množství tzv. mikronutrientů.<sup>54</sup> Mikronutrienty v této plodině v podobě vitamínů a minerálů pak působí blahodárně na odstranění následků oxidativního stresu v organismu.

Z pohledu biologické aktivity byly identifikovány 4 neolignanů **22-25** (Obr. 14), jež se vyskytují v plodech *Rubus idaeus*. Látky byly izolovány a následně otestovány na neuroprotektivní a Amyloid- $\beta$  agregaci inhibující schopnosti. Z těchto 4 izolovaných neolignanů měly látky **22**, **23** a **24** významnou inhibiční aktivitu a látky **22**, **23** a **25** vykazovaly neuroprotektivní vlastnosti. Jedná se tedy o neolignanů potenciálně významné v boji proti tomuto neurodegenerativnímu onemocnění. Za povšimnutí stojí, že významné rozdíly v biologické aktivitě může způsobit pouhé prostorové uspořádání molekuly. Látky **22** a **24** vykazovaly významnou biologickou aktivitu, zatímco jejich enantiomery, tedy zrcadlově obrácené struktury **23** a **25**, byly výrazně méně biologicky aktivní.<sup>53</sup>



Obr. 14. Neolignany izolované z *R. idaeus*.<sup>53</sup>

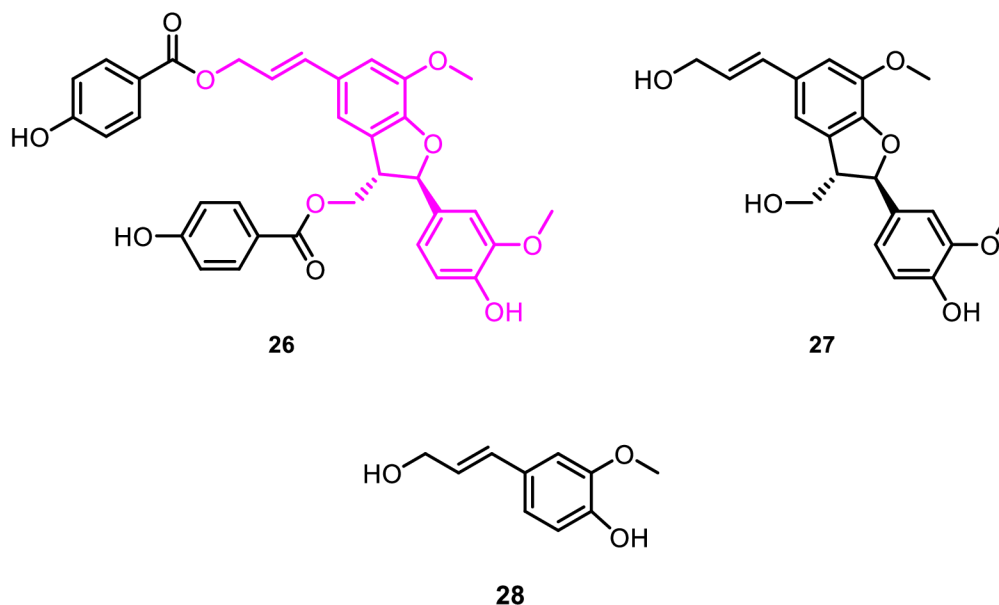
### 2.3.2.3. Quiquesetinerviusin A (26) a látky s podobnou strukturou

Náplní mé bakalářské práce je syntéza látek sdílejících neolignanovou kostru quiquesetinerviusinu A (26) a otestování biologické aktivity těchto látek, proto se v následující části budu věnovat právě neolignanům s podobnou kostrou.

Quiquesetinerviusin A (26) je rostlinný sekundární metabolit, strukturně odvozený od dehydrodikoniferyl alkoholu (27), což je derivát koniferyl alkoholu (28), jednoho z produktů fenylypropanoidové dráhy. Jeho struktura byla popsána v roce 2010, kdy byl izolován ze sušených nadzemních částí rostliny *Calamus quiquesetinervius* z čeledi *Arecaceae*, po které získal svůj název. Spolu s dalšími nově objevenými neolignany izolovanými z této rostliny, což jsou látky quiquesetinerviusid A - E a quiquesetinerviusin A - C, byl neúspěšně otestován na antioxidační aktivitu. Projevil však silné antiinflamační vlastnosti v rámci inhibice produkce oxidu dusného stimulovanou lipopolysacharidy.<sup>55</sup>

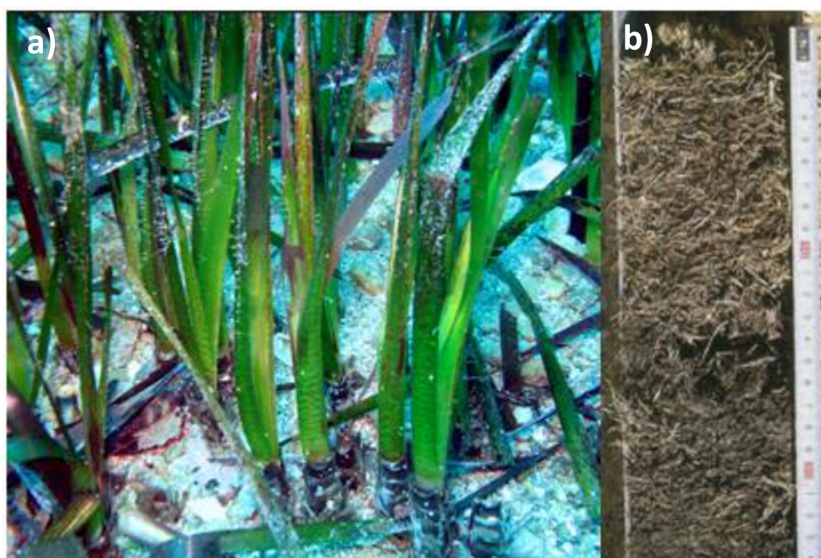
Dehydrodikoniferyl alkohol (27), tvořící součást kostry quiquesetinerviusinu A (26) (Obr. 15), se přirozeně vyskytuje ve více rostlinných druzích, izolován byl například z natě *Cucurbita moschata*<sup>56</sup>, nebo z listů a větví *Cinnamomum bejolghota*<sup>57</sup>.

Uměle syntetizovaný dehydrodikoniferyl alkohol (**27**) byl úspěšně otestován na antiobezitní účinky a na inhibici adipogeneze a lipogeneze. Výsledky naznačují, že by tato látka mohla představovat bezpečný přírodní lék proti obezitě.<sup>56</sup>



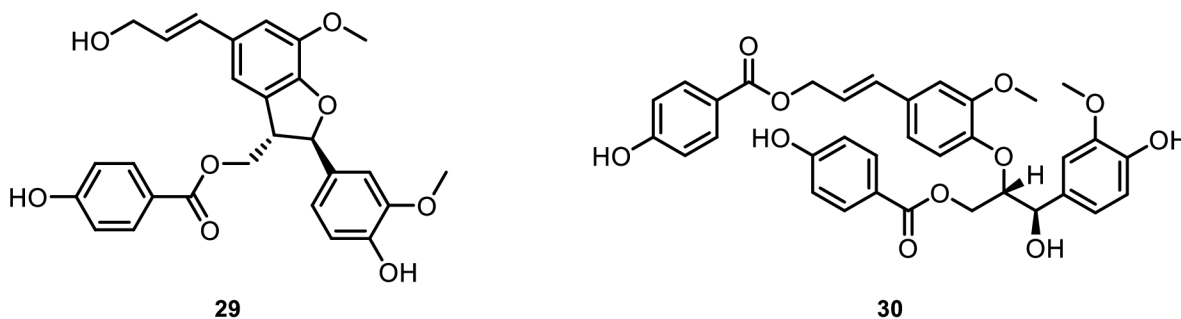
Obr. 15. Struktura quiquesetinerviusinu A (**26**)<sup>55</sup> se zvýrazněnou dehydrodikoniferyl alkoholovou kostrou, struktura dehydrodikoniferyl alkoholu (**27**)<sup>56</sup> a koniferyl alkoholu (**28**).

Quiquesetinerviusin A (**26**) byl poprvé izolován ze suchozemské rostliny, jedná se však o jeden ze sekundárních metabolitů produkovaných zejména rostlinami mořskými, konkrétně rostlinnou *Posidonia oceanica*.<sup>58</sup> Tato endemická mořská tráva, kolonizující výhradně pobřežní vody v oblasti Středomoří, hraje významnou roli ve středomořském ekosystému jako zdroj obživy a úkrytu pro mnohé živočichy (Obr. 16a). Zbytky odumřelých částí rostlin, tvořící usazeniny na mořském dně, obsahují biologický materiál starý i několik stovek let<sup>59</sup> (Obr. 16b). Tato ložiska tak mohou sloužit jako archiv organických molekul, jejichž složení může napovědět mnohé o změnách životního prostředí, kterými rostliny v průběhu let procházely.



Obr. 16. (a) *P. oceanica*<sup>60</sup> a (b) průřez usazeninou tvořenou odumřelými částmi *P. oceanica*.<sup>59</sup>

Z ethanolového extraktu z listů *P. oceanica* bylo mimo jiné izolováno přes 20 jednoduchých fenolických sloučenin, přičemž jejich složení se mírně lišilo v závislosti na lokaci sběru rostliny.<sup>61</sup> Z acetonového extraktu oddenků *P. oceanica* byly včetně quiquesetinerviusinu A (**26**) izolovány čtyři různé neolignany, ve dvou případech se jednalo o nově objevené látky **29** a **30** (Obr. 17).<sup>58</sup>

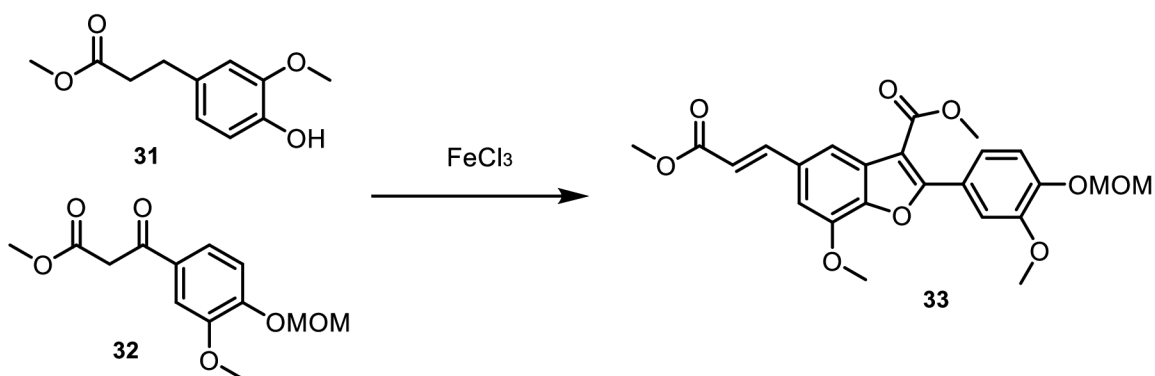


Obr. 17. Struktura dvou nově objevených neolignanů izolovaných z *P. oceanica*.<sup>58</sup>

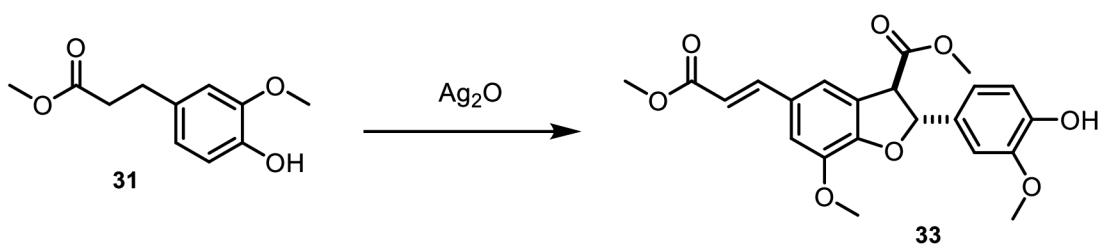
Ačkoliv byla struktura těchto látek popsána a určena na základě dostupných fyzikálně chemických metod, otestování jejich biologické aktivity ani absolutní určení stereochemie nebylo provedeno. Některé studie naznačují, že látky s neolignanovou kostrou obdobnou quiquesetinerviusinu A (**26**) by mohly mít zajímavé biologické vlastnosti<sup>55</sup> a právě to bylo ideálním výchozím bodem pro zpracování mé bakalářské práce.

### 2.3.3. Předcházející syntéza neolignanů v rámci naší výzkumné skupiny

Jedním z předních zájmů naší výzkumné skupiny je syntéza rostlinných lignanů, neolignanů a jejich derivátů. Dlouhodobým cílem je nalezení cesty k syntéze benzofuranového skeletu jako výchozí látky pro následnou syntézu neolignanů s tímto skeletem. Optimalizaci syntézy benzofuranového skeletu cestou radikálového couplingu a oxidativního homocouplingu se věnovala například Mgr. Zuzana Barbuščáková<sup>62</sup> (Obr. 18), avšak s nízkým výtěžkem reakcí. Oxidativním homocouplingem se dále zabýval Mgr. Daniel Chrenko během své doktorské práce, který optimalizoval podmínky a výtěžek této syntézy zvýšil (Obr. 19). Tento optimalizovaný postup jsem ve své práci použila.



Obr. 18. Syntéza benzofuranového skeletu cestou radikálového couplingu katalyzovaná železitým kationtem.<sup>62</sup>

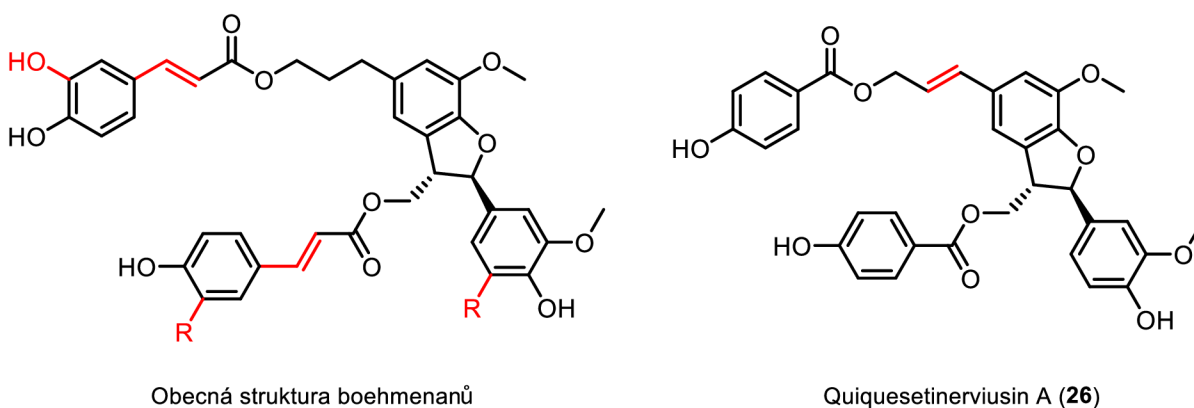


Obr. 19. Optimalizovaná syntéza benzofuranového skeletu cestou oxidativního homocouplingu.<sup>62</sup>

Dále se naše výzkumná skupina zabývá syntézou přírodních neolignanů vykazujících biologickou aktivitu a jejich derivátů, které jsou na biologickou aktivitu také následně testovány. Jedná se především o skupinu boehmenanů, což jsou neolignany vyskytující se mimo jiné v rostlině *Hibiscus cannabinus* vykazující cytotoxické vlastnosti.<sup>63</sup> Biologická aktivita boehmenanů byla podnětem pro snahu o

syntézu těchto látek a jejich případných derivátů. Například o syntézu boehmanu D se neúspěšně pokusil Bc. Pavol Tuna.<sup>64</sup>

Není náhodou, že látka, jejíž syntézu jsem si zvolila jako cíl mé bakalářské práce, sdílí s boehmany nejen benzofuranovou kostru, ale je jim celkově strukturně velmi podobná (Obr. 20). Tato podobnost vedla k předpokladu, že by tato látka a její deriváty taktéž mohly vykazovat biologickou aktivitu.



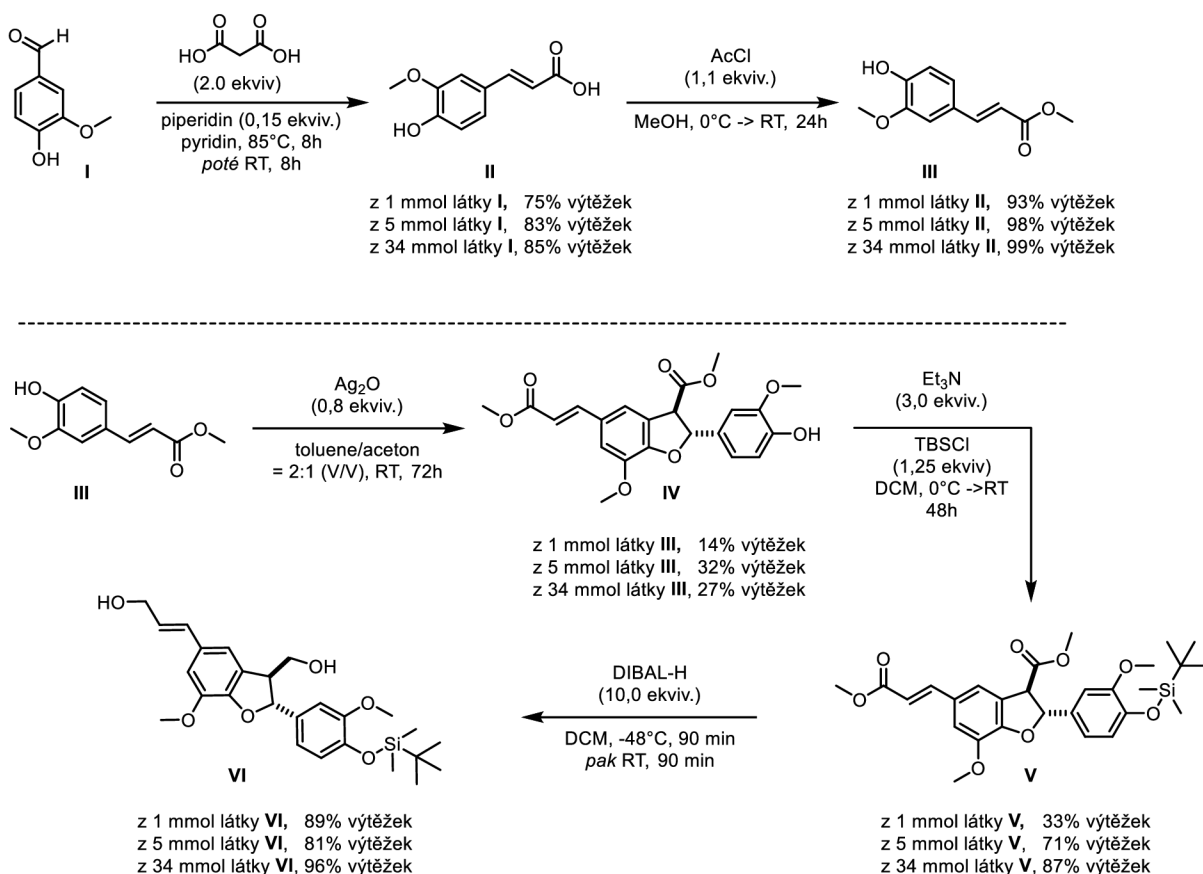
Obr. 20. Obecná struktura doposud známých boehmenanů<sup>64</sup> a struktura quiquesetinerviusinu A (**26**) s vyznačenými rozdíly mezi molekulami.

# 3. Výsledky

V této kapitole představím postupně dosažené výsledky, které jsem obdržela v průběhu své bakalářské práce, jež budou ve svém kontextu diskutovány v kapitole 4. Diskuse. Zoptimalizované reakční protokoly, jež slouží k reprodukovatelné přípravě jednotlivých látek připravených v rámci této bakalářské práce, respektive k provedení biologických experimentů provedených v rámci této bakalářské práce, se nachází v kapitole 6. Experimentální část.

## 3.1. Syntéza benzofuranového intermediátu VI

Intermediát VI byl připraven z vanilinu I přes čtyři intermediáty pomocí standartně využívané metody vyvinuté v naší skupině (Obr. 21).<sup>65,66</sup>



Obr. 21. Příprava benzofuranového skeletu VI dle ve skupině optimalizovaných podmínek

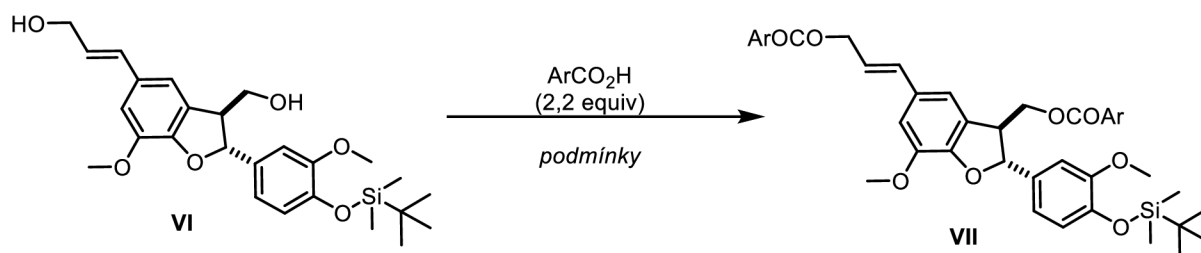


## 3.2. Esterifikační reakce

Připravený intermediát **VI** byl následně podroben řadě esterifikačních reakcí s cílem zavedení benzoylové, *p*-methoxybenzoylové a *p*-hydroxybenzoylové skupiny.

### 3.2.1. Přímá esterifikace vycházející z karboxylových kyselin

Tabulka 1. Esterifikační reakce mezi diolem **VI** a arylkarboxylovými kyselinami.



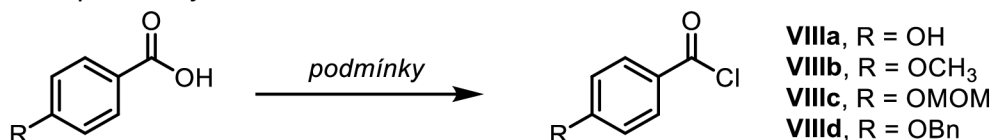
Řádek	Ar	Podmínky	Výtěžek <sup>a)</sup>
1	4-HO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CO <sub>2</sub> H	PPh <sub>3</sub> (3,0 ekvív), DIAD (3,0 ekvív), THF, 0°C pak RT, 12h	<5%
2	4-HO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CO <sub>2</sub> H	PPh <sub>3</sub> (3,0 ekvív), DIAD (3,0 ekvív), THF, $\mu\text{W}$ , 300W, 60°C, 30 min,	<5%
3	4-HO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CO <sub>2</sub> H	PPh <sub>3</sub> (3,0 ekvív), DIAD (3,0 ekvív), toluen, 0°C pak RT, 12h	<5%
4	4-HO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CO <sub>2</sub> H	PPh <sub>3</sub> (3,0 ekvív), DIAD (3,0 ekvív), toluen, $\mu\text{W}$ , 300W, 60°C, 30 min,	<5%
5	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CO <sub>2</sub> H	PPh <sub>3</sub> (3,0 ekvív), DIAD (3,0 ekvív), THF, 0°C pak RT, 12h	<5%
6	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CO <sub>2</sub> H	PPh <sub>3</sub> (3,0 ekvív), DIAD (3,0 ekvív), THF, $\mu\text{W}$ , 300W, 60°C, 30 min,	<5%
7	4-HO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CO <sub>2</sub> H	DMAP (1,6 ekvív), EDCI (2,2 ekvív), DCM, RT, 24h	<5%

<sup>a)</sup> Určeno dle analýzy spektra <sup>1</sup>H NMR surové reakční směsi

## 3.2.2. Nepřímá esterifikace vycházející z derivátů karboxylových kyselin

### 3.2.2.1. Příprava derivátů karboxylových kyselin

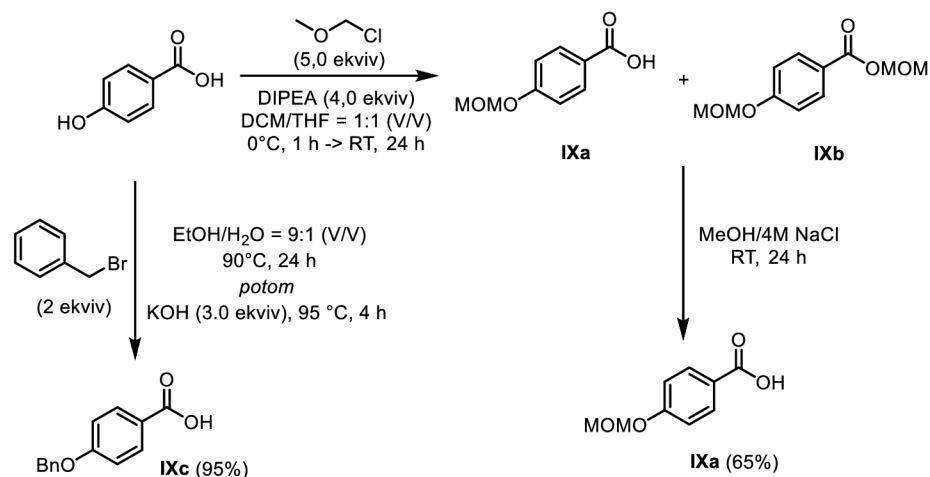
Tabulka 2. Příprava acyl chloridů VIII



Řádek	R	Podmínky	Produkt	Výtěžek <sup>a)</sup>
1	OH	(COCl) <sub>2</sub> (1,2 ekviv), DMF, RT	VIIIa	<5%
2	OH	(COCl) <sub>2</sub> (2,4 ekviv), DMF, RT	VIIIa	<5%
3	OH	(COCl) <sub>2</sub> (2,4 ekviv), DMF, 40°C	VIIIa	<5%
4	OH	(COCl) <sub>2</sub> (2,4 ekviv), CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , 40°C	VIIIa	<5%
5	OMOM	(COCl) <sub>2</sub> (1,2 ekviv), DMF, RT	VIIIc	<5%
6	OMOM	(COCl) <sub>2</sub> (2,4 ekviv), DMF, RT	VIIIc	<5%
7	OMOM	SOCl <sub>2</sub> (2,4 ekviv), DMF, RT	VIIIc	<5%
8	OMOM	(COCl) <sub>2</sub> (1,2 ekviv), DCM, RT	VIIIc	<5%
9	OMOM	(COCl) <sub>2</sub> (2,4 ekviv), DCM, RT	VIIIc	<5%
10	OMOM	SOCl <sub>2</sub> (2,4 ekviv), DCM, RT	VIIIc	<5%
11	OMOM	SOCl <sub>2</sub> (2,4 ekviv), 80°C	VIIIc	<5%
12	OBn	(COCl) <sub>2</sub> (1,2 ekviv), DCM, RT	VIII d	<5%
13	OBn	(COCl) <sub>2</sub> (2,4 ekviv), DCM, RT	VIII d	<5%
14	OBn	SOCl <sub>2</sub> (2,4 ekviv), DCM, RT	VIII d	<5%
15	OBn	SOCl <sub>2</sub> (2,4 ekviv), 80°C	VIII d	95%
16	OMe	SOCl <sub>2</sub> (2,4 ekviv), 80°C	VIIIb	95%

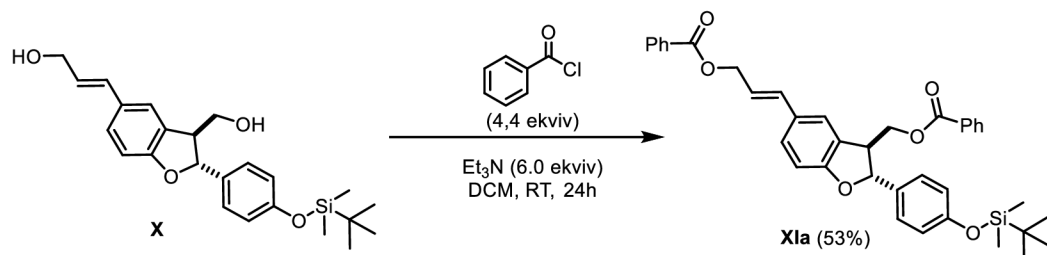
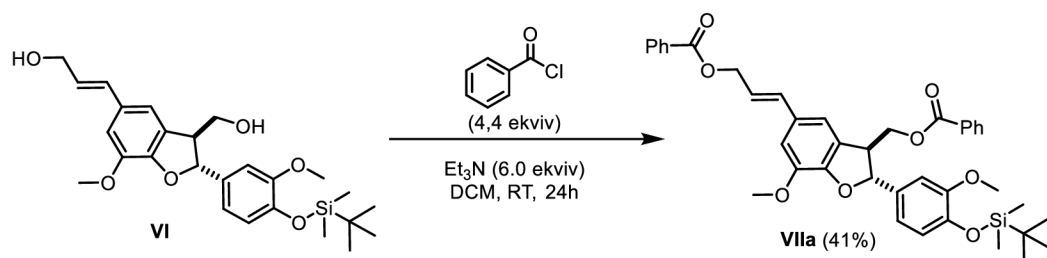
<sup>a)</sup> Určeno dle analýzy spektra <sup>1</sup>H NMR surové reakční směsi

Příprava MOM a Bn chráněné karboxylové kyseliny nezbytné pro přípravu odpovídajícího acyl chloridu VIIIc a d (Obr. 22).

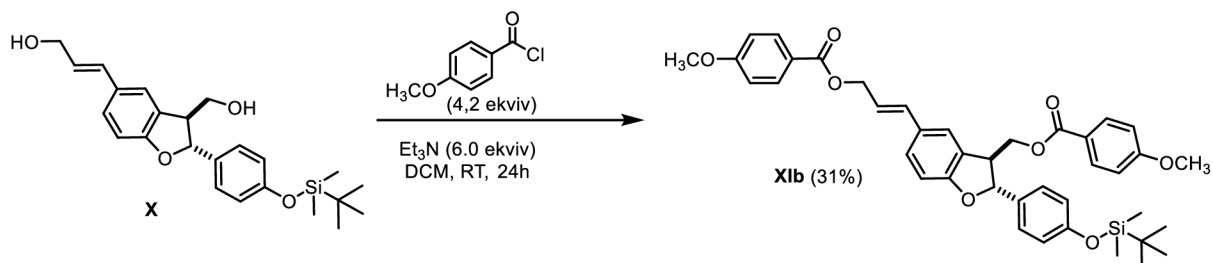
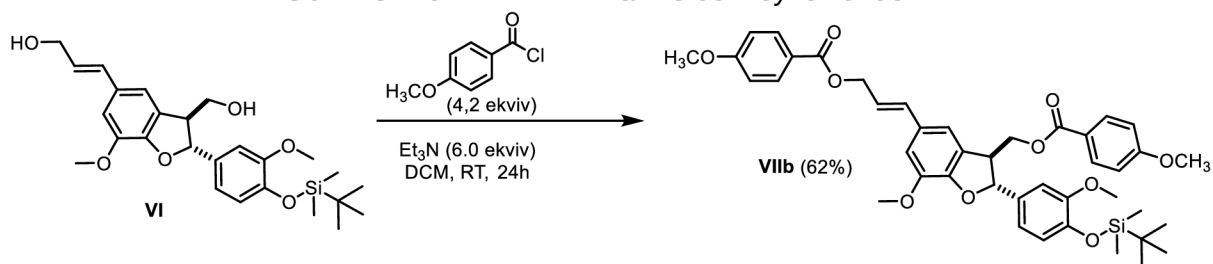


Obr. 22. Syntéza karboxylových kyselin IXa a c.

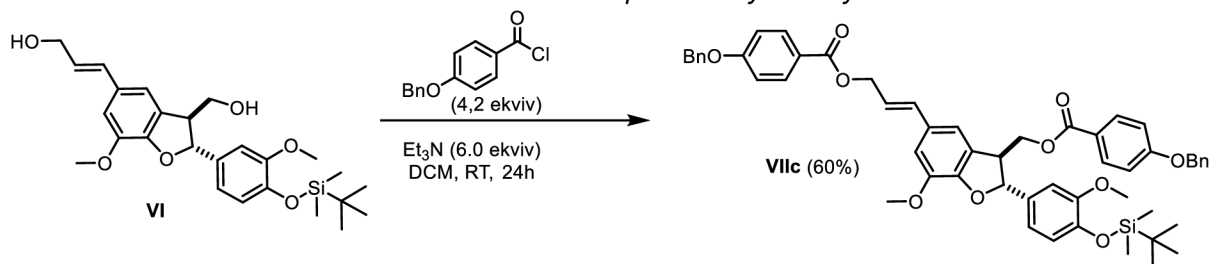
### 3.2.2.2. Reakce acyl chloridů s diolem VI a X



Obr. 23. Reakce diolů **VI** a **X** s benzoyl chloridem.

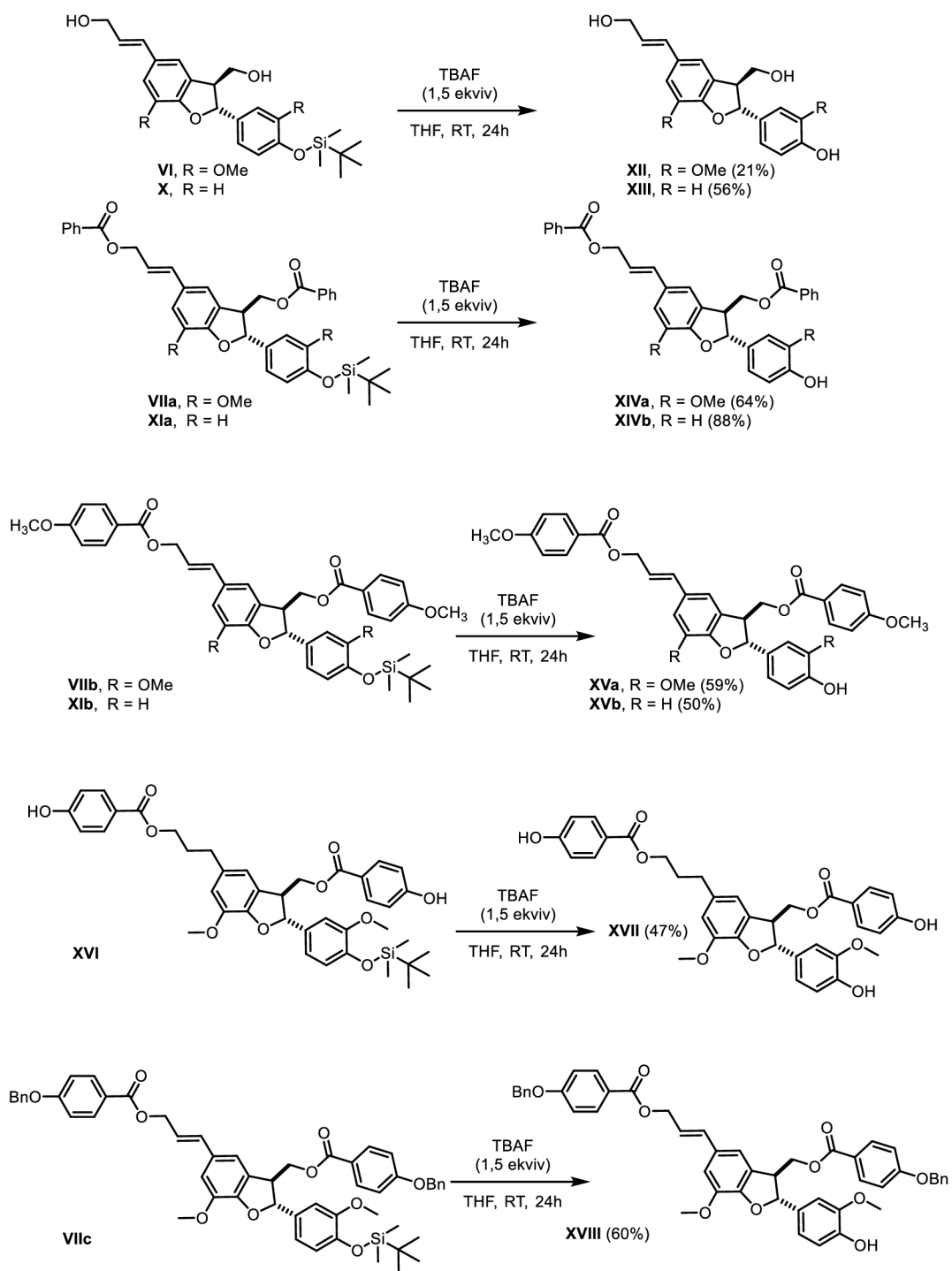


Obr. 24. Reakce diolů **VI** a **X** s *p*-methoxybenzoyl chloridem.



Obr. 25. Reakce diol **VI** s *p*-benzyloxybenzoyl chloridem.

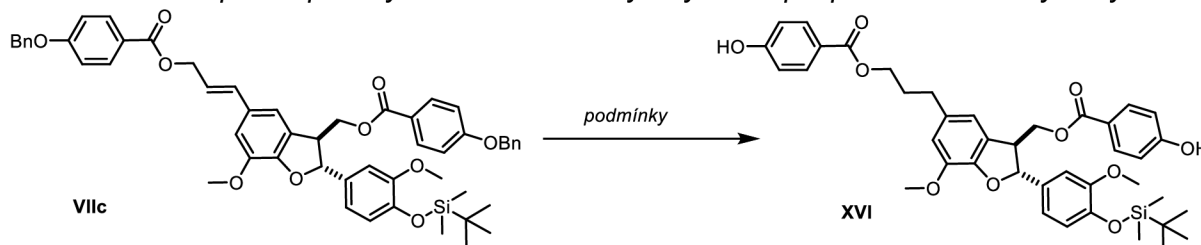
### 3.3. Desilylační reakce



Obr. 26. Odstranění TBS chránící skupiny z látek VI, VII, X, XI a XVI.

### 3.4. Odstranění benzylických chránících skupin pomocí Lewisových kyselin

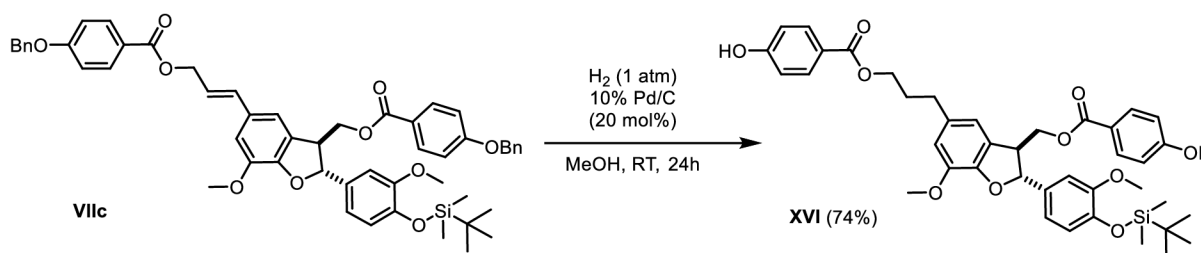
Tabulka 3. Neúspěšné pokusy ochránění benzylických skupin pomocí Lewisových kyselin



Řádek	Podmínky	Ukončení reakce	Výtěžek <sup>a)</sup>	Poznámka
1	BCl <sub>3</sub> (3,5 ekviv), DCM, -78°C -> RT, 2h	MeOH	<5%	degradace
2	BCl <sub>3</sub> (3,5 ekviv), DCM, -78°C, 2h	H <sub>2</sub> O	<5%	degradace
3	BCl <sub>3</sub> (2,5 ekviv), DCM, -78°C -> RT, 1h	DCM/MeOH = 4:1 (V/V)	<5%	degradace
4	BBr <sub>3</sub> (2,5 ekviv), DCM, -78°C, 1h	NH <sub>4</sub> Cl	<5%	degradace

<sup>a)</sup> Určeno dle analýzy spektra <sup>1</sup>H NMR surové reakční směsi

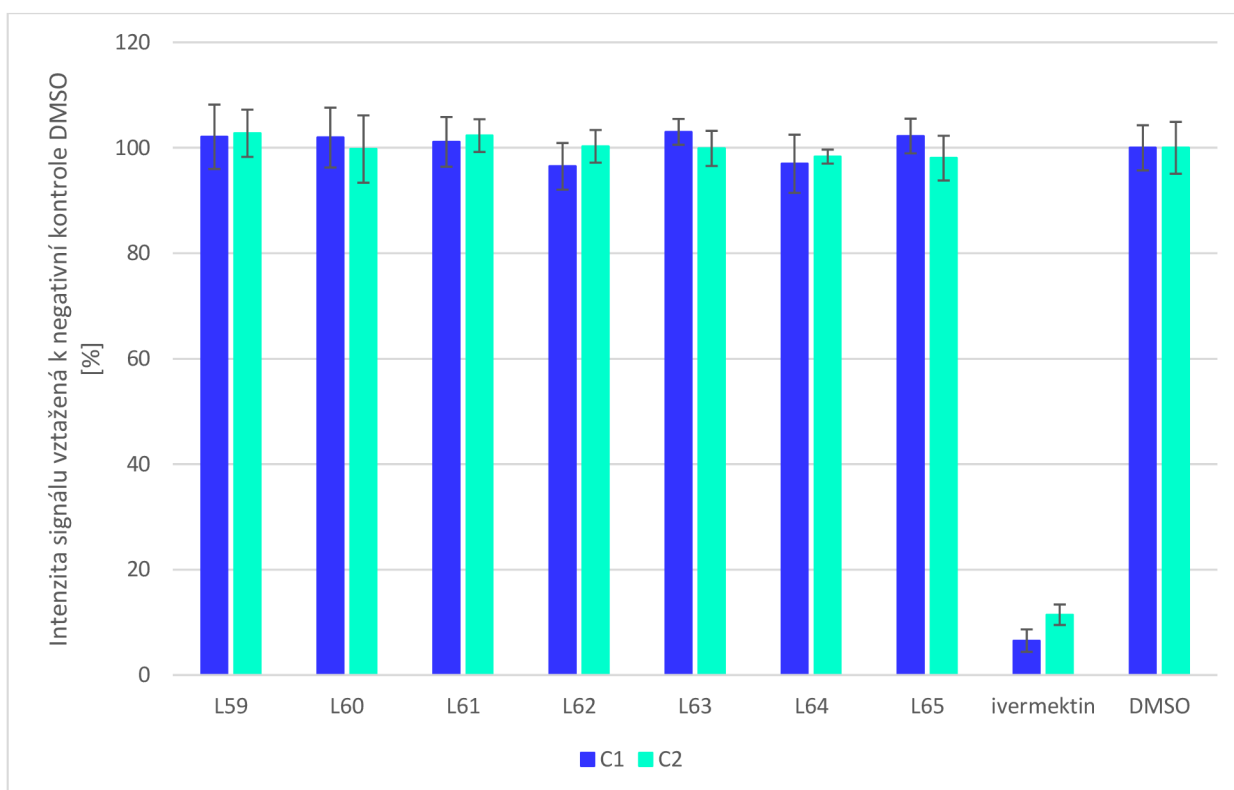
### 3.5. Odstranění benzylických chránících skupin hydrogenací



Obr. 27. Hydrogenační odstranění benzylických skupin na **VIIc** vedoucí i k redukcí olefinu v rámci molekuly.

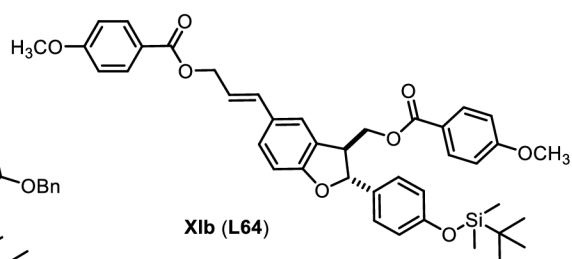
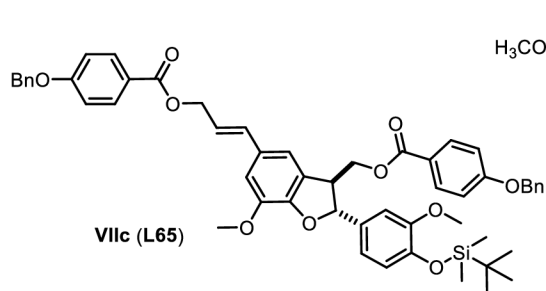
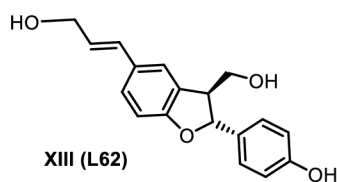
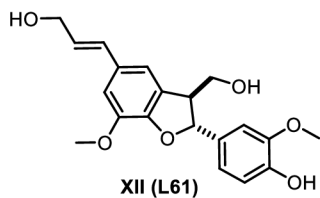
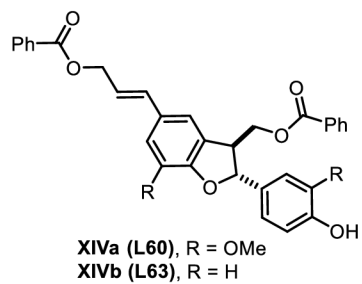
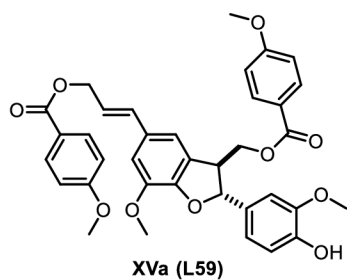
### 3.6. Biologické testování vybraných látek na jejich anthelmintickou aktivitu

Chitinasový test je založen na měření intenzity signálu fluorescence vznikajícího při zpracování fluorogenního substrátu 4-methylumbelliferyl  $\beta$ -D-N,N',N''-triacetylchitotriosidu chitinasou. Chitinas je enzym tvořící se při líhnutí embryí červů. Obsah chitiny v jamkách byl tedy přímo úměrný reprodukční kapacitě populace v dané jamce. Anthelmintické vlastnosti testovaných látek by vývoj, a tedy i reprodukci červů tlumily, což by se projevilo jako nízký obsah chitiny, a tedy i jako nízká intenzita fluorescence. Je však patrné (Obr. 28), že žádná z připravených látek výrazně neovlivnila vývoj červů, a tedy ani míru produkce chitiny.



Obr. 28. Procentuální intenzita fluorescence vztažená k negativní kontrole (DMSO) způsobená chitinasovou aktivitou měřenou v populacích *C. elegans*, na kterých byly testovány připravené látky. Látky včetně negativní kontroly byly testovány o koncentracích C1 = 50  $\mu\text{mol/l}$  (ivermektin o koncentraci 1  $\mu\text{mol/l}$ ) a C2 = 5  $\mu\text{mol/l}$  (ivermektin o koncentraci 0,1  $\mu\text{mol/l}$ ). Jedná se o průměr ze dvou experimentů.

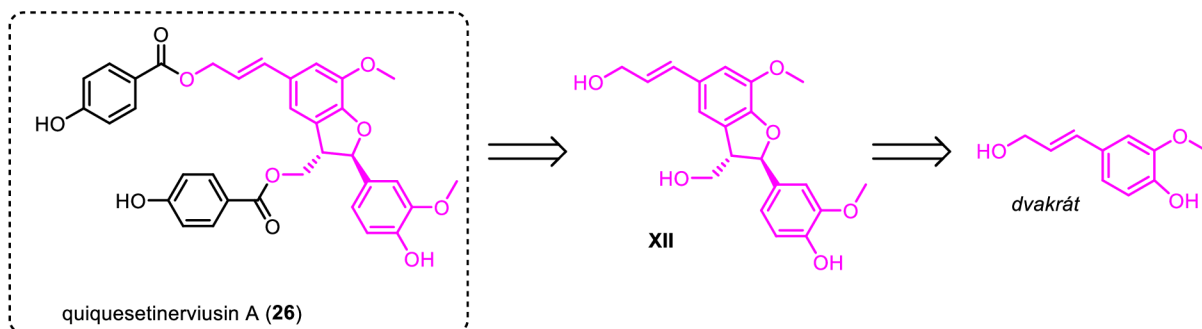
Testované látky byly označeny alternativním kódem, který jim byl přidělen v rámci biologického testování (Obr. 29).



Obr. 29. Struktury testovaných látek a jejich značení v rámci testu (**LXX**, kde XX je celé přirozené číslo).

## 4. Diskuse

Příprava cílové přírodní látky, quiquesetinerviusinu A (**26**)<sup>55</sup> byla založena na předcházejících studiích na obdobných strukturních modelech prováděných v naší výzkumné skupině v uplynulých 10 letech.<sup>34,62,65–67</sup>



Obr. 30. Retrosyntéza quiquesetinerviusinu A (**26**).

Cílový přírodní produkt **26** tak lze retrosynteticky velmi elegantně rozpojit pomocí dvou retro-esterifikačních reakcí na diol **XII** a dva benzoátové zbytky, diol **XII** pak lze lehce vystopovat ke koniferyl alkoholu. Dimerizací koniferyl alkoholu v rostlinách vzniká kýžený dimer, benzofuranový intermediát **XII**. Tato reakce, jež je obecně katalyzována pomocí peroxidáz, se bohužel ukazuje jako neefektivní z pohledu preparativní přípravy, a to ať již při použití enzymatických systémů<sup>62,68</sup>, tak i v případě kovy-mediovaných radikálových couplingů<sup>62,65,68</sup>. Bylo tedy využito derivátu koniferyl alkoholu ve vyšším oxidačním stavu, jež umožňuje snazší oxidaci na radikál vhodný k dimerizační reakci látky **III** (Obr. 21).<sup>62,68</sup>

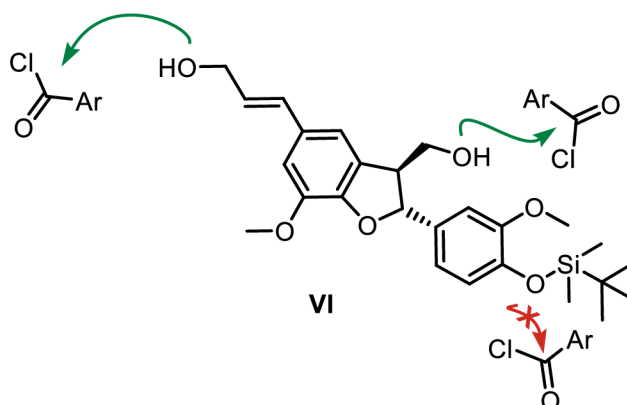
Příprava esteru **III** byla již v naší skupině několikrát popsána, a tedy její příprava podle dostupných reakčních protokolů nebyla příliš obtížná.<sup>34</sup> Následně jsem přistoupila k dimerizaci esteru **III** za pomoci stříbrných iontů ( $\text{Ag}_2\text{O}$ ) dle optimalizovaného protokolu, jenž vyvinul v rámci své doktorské práce Mgr. Chrenko (Obr. 21).<sup>65</sup> Všechny reakční kroky probíhaly bez větších problémů a mohly být provedeny v několika různých navážkách čítajících od stovky miligramů až do cca 5g substrátu. Podle postupů vyvinutých Mgr. Chrenkem jsem tak byla schopna připravit cílovou látku **VI** v multigramovém (celkově ~10 g) množství.

Pakliže rozepíši tuto sekvenci poněkud více podrobněji pak mohu pouze konstatovat, že fenolická skupina v připraveném dimeru **IV** byla ochráněna ve formě TBS etheru (látky **V**) a obě esterové funkční skupiny byly zredukovány pomocí DIBAL-H na odpovídající alkoholy, čímž daly vniknout klíčovému intermediátu **VI**.



## 4.1. Syntéza esterifikovaných derivátů pocházejících z diolů VI a X – klíčový krok syntézy

Když jsem měla v ruce klíčový intermediát **IV**, tak jsem mohla přistoupit k esterifikaci obou volných hydroxylových skupin. Z tohoto pohledu bylo více než klíčové, abychom využili takových reakčních podmínek, které (a) umožní převedení obou diolů na estery a (b) zároveň neumožní možnou kompetitivní esterifikaci fenolické skupiny (Obr. 31). Z tohoto důvodu bylo využito intermediátu **VI** opatřeného TBS-ochránící skupinou jako výchozího substrátu. Alternativně jsem později použila i diol **X**, který jsem však nepřipravovala. Tato látka mi byla předána k dalšímu zpracování Mgr. D. Chrenkem. Cílem využití tohoto analoga diolu **VI** (dvě arylové methoxy skupiny jsou nahrazeny vodíkovým atomem), bylo zjistit (a) rozdíl v reaktivitě (jiná elektronová hustota na jádře)<sup>69</sup> vůči esterifikaci a (b) prozkoumat anthelmintickou aktivitu následně připravených látek.



Obr. 31. Schéma zahrnující dva typy reakcí: **zelenou** znázorněná esterifikační reakce, jež by vedla k instalaci obou klíčových esterových funkčních skupin u cílové přírodní látky, a **červenou** barvou znázorněný typ interakce, které mělo být zamezeno.

Nejprve jsem se zaměřila na přímou esterifikační reakci vybraných arylkarboxylových kyselin s diolem **VI** (

Tabulka 1) pomocí Mitsunobu reakce (řádky 1-6).<sup>70</sup> Různé reakční podmínky byly vyzkoušeny, a to včetně různých karboxylových sloučenin, ale bohužel v žádném případě nebyla pozorována formace produktu **VII**. Zpočátku jsme si mysleli, že je toto způsobeno malou reaktivitou *in situ* generovaného karboxylátu vůči aktivovanému alkoholu. K iniciaci reakce tedy byly využity termicky modifikované podmínky založené na použití mikrovláknového záření.<sup>71,72</sup> Bohužel i za těchto podmínek (řádky 2,

4, a 6) nebyl cílový produkt detekován. Předpokládáme, že toto by mohlo být způsobeno nižší reaktivitou aktivovaných alkoholů, jež za daných podmínek s velkou pravděpodobností odmítají v dané reakční směsi podléhat reakcím s přítomnou karboxylovou kyselinou z důvodu nižší reaktivity (nižší parciální náboj na atomu uhlíku aktivovaného alkoholu).

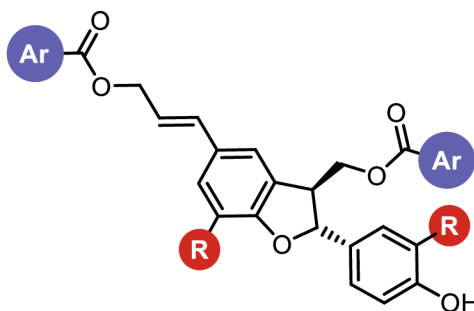
Z tohoto důvodu jsme se tedy rozhodli přejít na aktivaci karboxylové kyseliny a takto aktivovaný komplex následně ponechat reagovat s alkoholy. Reakce diolu **VI** s odpovídající karboxylovou kyselinou v přítomnosti EDCI bohužel také nevedla k tvorbě očekávaného produktu (řádek 7). Předpokládáme, že tento stav byl způsoben nedostatečnou nukleofilicitou generovaných alkoholů vůči aktivované karboxylové kyselině. Z tohoto důvodu jsme se tedy zaměřili na přípravu ještě více aktivovaných karboxylových kyselin (

Tabulka 2). Z experimentálního pohledu se nám povedlo připravit k použití, mimo komerčně dostupného benzoyl chloridu další dva acyl chloridy **VIII** ( Tabulka 2). Bohužel se ukázalo, že ne všechny chránící skupiny, jež jsme používali na volnou fenolickou funkční skupinu (přímá reakce nefungovala také), byly stabilní za zvolených reakčních podmínek. Pouze v případě benzylické (odpovídající acyl chlorid – **VIIIc**) a methoxy (**VIIIb**) skupiny mohly být cílové acyl chloridy **VIIIb** a **c** připraveny, a to dokonce v 95% výtěžku. Myslíme si, že v ostatních případech došlo k proteolýze chránících skupin, resp. k degradaci vytvořeného acyl chloridu.

Připravené acyl chloridy byly následně ponechány reagovat s připraveným diolem **VI** a také s diolem **X**, který připravil Mgr. Chrenko v rámci své doktorské práce.<sup>65</sup> Nejprve jsem se zaměřila na reakce diolů **VI** a **X** s komerčním benzoyl chloridem (Obr. 23). Ukázalo se, že v tomto případě stačí použít standardní protokol (použití báze Et<sub>3</sub>N v DCM jako rozpouštědla) a cílové produkty **VIIa** a **XIa** mohly být izolovány v dobrém výtěžku a excelentní čistotě. Obdobně pak reagovaly dioly **VI** a **X** se zbývajícími dvěma acyl chloridy (Obr. 24 a Obr. 25). I v těchto případech byly cílové produkty izolovány v dobrých až velmi dobrých výtěžcích a vysoké čistotě.

## 4.2. Deprotekce chránících skupin

V dalším kroku jsem pak mohla přistoupit k přípravě derivátů quiquesetinerviusinu A (**26**) ze silylovaných prekurzorů **VI**, **VII**, **X**, **XI** a **XVI**. (Obr. 26). Cílem těchto reakcí bylo připravit deriváty, jež se od cílového quiquesetinerviusinu A (**26**) budou lišit (a) substitucí na aromatickém kruhu (přítomnost vodíkového atomu místo methoxy skupiny) a (b) jiným typem esterové funkční skupiny (benzylová, p-methoxybenzylová místo hydroxy skupiny) (Obr. 32). Reakce probíhaly dle očekávání a cílové produkty byly získány v dobrých výtěžcích a chemické čistotě.



Obr. 32. Místa základního skeletu odvozeného od quiquesetinerviusinu A (**26**), jež byla podrobena modifikaci.

Abychom následně získali navrženou strukturu quiquesetinerviusinu A (**26**), tak již pouze stačilo u látky **VIIc** odstranit dvě benzylové chránící skupiny a jednu silylovou. Avšak ukázalo se, že tento úkol je složitější, než se očekávalo. Naším záměrem bylo odstranit nejprve obě benzylické skupiny pomocí Lewisových kyselin.<sup>73</sup> Tímto postupem jsme kýžených výsledků nedosáhli, neboť při použití standartních protokolů<sup>74</sup> docházelo pouze k degradaci výchozí látky (Tabulka 3). Alternativně jsem tedy vyzkoušela hydrogenační postup, ačkoliv tento postup skýtal skryté nebezpečí redukce násobné vazby styrenového typu. Naše obava, která tento postup v prvním kole vyřadila jako možný postup při řešení tohoto problému, se bohužel potvrdila a výchozí dibenzylický produkt **VIIc** byl při hydrogenační debenzylaci nejenom konvertován na očekávaný p-hydroxybenzoylovaný adukt, ale bohužel také hydrogenován na styrylické násobné vazbě. Cílový silylovaný adukt **XVI** tak poté v přítomnosti TBAF poskytl ne očekávaný quiquesetinerviusin A (**26**), ale pouze jeho dihydro derivát **XVII**. Z nedostatku času a nedostatku výchozí látky **VIIc** jsem pak nemohla testovat další reakční podmínky, jež by umožnily připravit přímo quiquesetinerviusin A. Ale i tak jsem měla dostatečné množství látek, jež jsem následně mohla testovat na jejich anthelmintickou aktivitu.

## 4.3. Biologické testování

Testování antihelmintické aktivity vybraných látek (Obr. 29 **Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**) bylo provedeno na wild-type linii *Caenorhabditis elegans* N2. Připravené látky byly testovány v koncentracích 50  $\mu\text{mol/l}$  a 5  $\mu\text{mol/l}$ . Jako negativní kontrola byl použit DMSO, jako pozitivní kontrola byl použit ivermektin. Testování proběhlo pod odborným dohledem Mgr. Aleny Kadlecové, PhD. Bohužel ani jedna z testovaných látek nevykazovala antihelmintickou aktivitu. Je však možné, že budoucí testy odhalí jiný druh přínosné biologické aktivity.

Vizuální hodnocení červů podle kritérií uvedených v kapitole 6.5.3 neodhalilo výraznou antihelmintickou aktivitu žádné z testovaných látek. Všechny jamky s testovanými látkami byly hodnoceny jako „populace je v pořádku“. Pro objektivní výsledky byl proveden chitinasový test.

### 4.3.1. Vyhodnocení chitinasového testu

Chitinasový test je založen na měření intenzity signálu fluorescence vznikajícího při zpracování fluorogenního substrátu 4-methylumbelliferyl  $\beta$ -D-N,N',N''-triacetylchitotriosidu chitinasou. Chitinasa je enzym tvořící se při líhnutí červích embryí z vajíček. Obsah chitinasy v jamkách byl tedy přímo úměrný reprodukční kapacitě, a tedy i životaschopnosti populace v dané jamce. Antihelmintické vlastnosti testovaných látek by vývoj červů tlumily, což by se projevilo jako nízký obsah chitinasy a tedy i jako nízká intenzita fluorescence. Je však patrné (Obr. 28), že žádná z připravených látek výrazně neovlivnila vývoj červů, a tedy ani míru produkce chitinasy.

## 5. Závěr

V této práci jsem se zabývala syntézou neolignanů quiquesetinerviusinu A, nacházejícího se mimo jiné v rostlině *Posidonia oceanica*, a jeho derivátů. V teoretické části jsem se pak zaměřila na sekundární metabolity, a to zejména na metabolity fenylypropanoidového typu a neolignany, dále jsem se věnovala výskytu sekundárních metabolitů ve vodních rostlinách.

Během práce na syntéze cílové látky jsem využila optimalizovaný oxidativní coupling pro syntézu benzofuranového intermediátu, což mi oproti předchozím pokusům o syntézu podobných látek výrazně usnadnilo práci. Dále jsem optimalizovala protekci a následnou chloraci kyseliny 4-hydroxybenzoové tak, aby mohla být použita při esterifikaci.

Ačkoliv se mi nepodařilo syntetizovat přímo quiquesetinerviusin A, dostala jsem se k této látce velmi blízko, a to strukturou lišící se od původního cíle přítomností pouhých dvou vodíkových atomů, tedy dihydrogen quiquesetinerviusinem A. Kritickým bodem syntézy byla deprotekce benzylové protekční skupiny, při níž docházelo k nasycení dvojnásobné vazby. Tento krok ale může být v budoucnu ještě optimalizován, neboť ve své práci jsem používala pouze standardní Lewisovy kyseliny, jež se v kontextu mých substrátů ukázaly jako velmi reaktivní.

Kromě této látky jsem připravila i řadu strukturně obdobných derivátů této látky a následně jsem připravené deriváty otestovala na antihelmintickou aktivitu. Ani jedna z testovaných látek výraznou antihelmintickou aktivitu nevykazovala. Příprava těchto látek a přiřazení jejich struktur k NMR a HRMS spektrům v budoucnu usnadní identifikaci organických molekul přítomných v rašelinových ložiskách tvořených hlavně odumřelými rostlinami *P. oceanica*, ve kterých se tyto látky mohou přirozeně nacházet. To může přispět k celkovému pochopení vlivu změn klimatu na produkci sekundárních metabolitů v průběhu času.

# 6. Experimentální část

## 6.1. Obecné informace

Veškeré reakce byly prováděny, pokudliže není uvedeno jinak, v bezvodém prostředí. Aparatury byly žíhány plamenem pod pozitivním tlakem inertního plynu (argon). Veškerá rozpouštědla použitá pro reakce byla, jestli není uvedeno jinak, zbavena přítomné vlhkosti pomocí standardních 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 ( $^1\text{H}$ ) a 100.53 MHz ( $^{13}\text{C}$ ). Měření byla prováděna za laboratorní teploty, přičemž vzorky byly rozpuštěny a následně měřeny v jednom z následujících rozpouštědel,  $\text{CDCl}_3$  nebo aceton- $d_6$ . Chemické posuny zbytkového signálu nedeuterovaného, resp. ne zcela deuterovaného rozpouštědla sloužily ke kalibraci měřených  $^1\text{H}$  NMR spekter. Chemický posun zbytkového nedeuterovaného resp. částečně nedeuterovaného rozpouštědla v daném rozpouštědle je  $\text{CDCl}_3$  (7.27 ppm). Ve spektrech  $^{13}\text{C}$  bylo využito ke kalibraci charakteristického signálu atomu  $^{13}\text{C}$  substituovaného atomem vodíku  $^2\text{H}$ . Chemické posuny jsou následující:  $\text{CDCl}_3$  (77.23 ppm, prostřední signál) a aceton- $d$  (29.84). 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). 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.

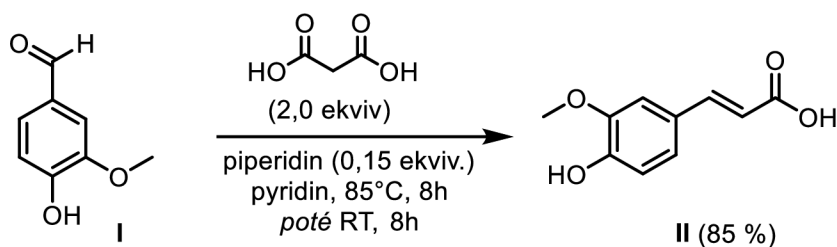
## 6.1.1. Vizualizační roztoky pro TLC

Metody přípravy:

- Zásaditý roztok  $\text{KMnO}_4$  byl připraven rozpuštěním 9 g  $\text{KMnO}_4$  a 20 g  $\text{K}_2\text{CO}_3$  ve 150 mL 10 %  $\text{NaOH}$ .
- Vanilinový roztok byl připraven rozpuštěním 2 g vanilinu ve 100 mL ethanolu obsahující 1 mL koncentrované  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .
- Hannesianův vizualizační roztok byl připraven rozpuštěním 12 g kyseliny fosfomolybdenové v 250 mL ethanolu.

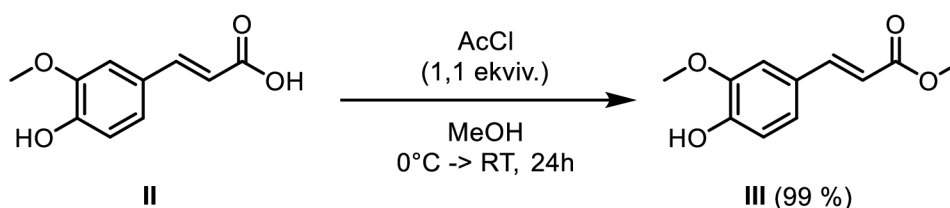
## 6.2. Syntéza výchozího benzofuranového skeletu

### 6.2.1. Syntéza kyseliny *trans*-ferulové (II)



Byl připraven roztok vanilinu I (5,13 g, 33,7 mmol, 1 ekviv.) a malonové kyseliny (5,27 g, 50,6 mmol, 1,5 ekviv) v pyridinu (10 mL, 3,5M). Roztok byl míchán při pokojové teplotě po dobu 5 minut. Následně byl přidán piperidin (0,58 mL, 5,1 mmol, 0,15 ekviv) a výsledný roztok byl míchán při 85 °C po dobu 8 h a při pokojové teplotě po dalších 8 h. Reakční směs byla vylita do ledové lázně a okyselena na pH = 3 pomocí 2,0 M aq. HCl. Vodní fáze byla extrahována pomocí EtOAc (3x250 mL) a spojené organické extrakty byly odpařeny na RVO za vzniku surového produktu II (5,56 g, 85 %).

## 6.2.2. Methylace kyseliny *trans*-ferulové



Kyselina *trans*-ferulová II (10 g, 50,5 mmol, 1 ekv.) byla rozpuštěna v methanolu (252 mL, 0,2M). Reakční směs byla ochlazena na 0 °C v ledové lázni. Za stálého chlazení byl do směsi po kapkách přidáván AcCl (1,0 mL, 56 mmol, 1.1 ekv.). Reakční směs byla ponechána ohřát na RT a reagovat 24 h. Poté bylo provedeno kontrolní TLC (PE:EtOAc = 1:1, PMA) a reakce byla ukončena odpařením rozpouštědla pomocí RVO. Odparek byl čištěn pomocí sloupcové chromatografie (SiO<sub>2</sub>; petroleum ether/EtOAc, 4:1 → 2:1 → 1:1) a poskytl ester III (10,0 g, 99 %; E/Z, >95:1).

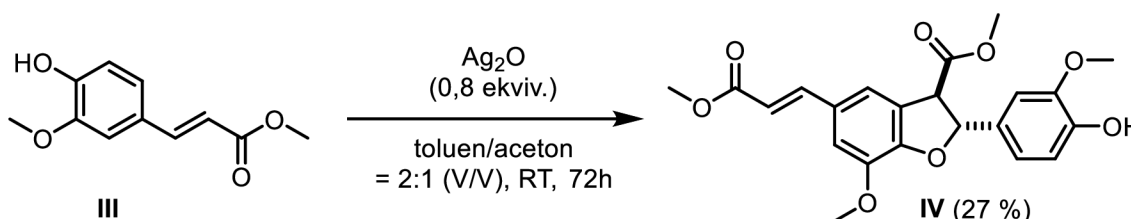
<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm): 7.60 (d, *J* = 16.0 Hz, 1 H), 7.03 (ddd, *J* = 16.2, 7.9, 1.9 Hz, 2 H), 6.90 (d, *J* = 8.2 Hz, 1 H), 6.27 (d, *J* = 15.9 Hz, 1 H), 6.15–5.98 (m, 1 H), 3.89 (s, 3 H), 3.78 (s, 3 H).

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm): 167.92, 148.10, 146.89, 145.11, 126.98, 123.13, 115.15, 114.87, 109.48, 56.00, 51.74.

MS (ESI), *m/z* (%): 209 [M + H]<sup>+</sup>.

HRMS (ESI) vypočítáno pro C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>O<sub>4</sub> [M + H]<sup>+</sup>: 209.0814, nalezeno 209.0815.

## 6.2.3. Oxidativní coupling látky III



K methyl ferulátu III (10 g, 48 mmol, 1 ekv.) byla přidána za stálého míchání směs toluenu (200 mL, 0,5M) a acetonu (96 mL, 0,5M). Baňka byla obalena hliníkovou fólií a ke směsi byl přidán Ag<sub>2</sub>O (8,87 g, 38,4 mmol, 0,8 ekv.). Směs byla míchána za nepřístupu světla za RT po dobu 72 h. Reakce byla ukončena filtrací přes Celite®. Filtrační koláč byl promyt pomocí acetonu (3x250 mL) a spojené organické vrstvy byly promyty pomocí vody (100 mL) a solanky (100 mL), sušeny nad MgSO<sub>4</sub> a odpařeny



na RVO. Výsledný surový produkt byl čištěn pomocí sloupcové chromatografie (SiO<sub>2</sub>; petroleum ether/EtOAc, 4:1 → 2:1) a poskytl dimer **IV** (2,69 g, 27 %; *trans/cis* = >95:1).

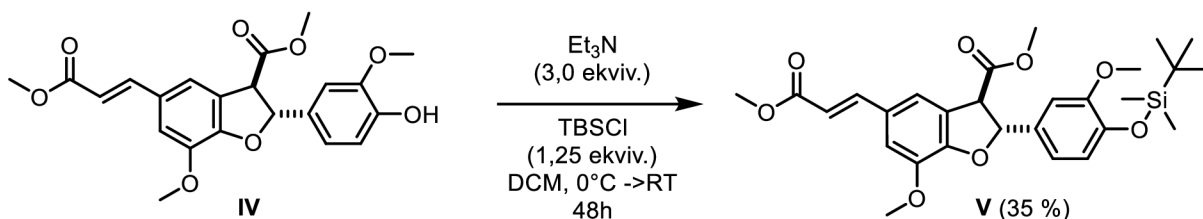
<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm): 3.50 (s, 3H), 3.94 (s, 3 H), 3.96 (s, 3 H), 4.02 (s, 3 H), 4.04 (s, 3H), 5.06 (s, 2 H), 6.41 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 6.95 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.23 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 7.44 (dd, *J* = 8.4, 1.6 Hz, 1H), 7.56 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 7.76 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H), 7.80 (s, 1 H).

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm): 51.2, 52.4, 54.2, 56.4, 58.9, 92.7, 110.0, 111.5, 111.6, 114.5, 115.6, 116.2, 121.2, 122.9, 128.1, 131.2, 143.3, 146.4, 146.6, 148.9, 149.9, 160.4, 167.5, 167.9.

MS (ESI) *m/z* (%): 415 [M+H]<sup>+</sup> (100).

HRMS (ESI) vypočítáno pro C<sub>22</sub>H<sub>23</sub>O<sub>8</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 415.1387, nalezeno 415.1391.

## 6.2.4. Ochránění hydroxylové skupiny látky **IV**

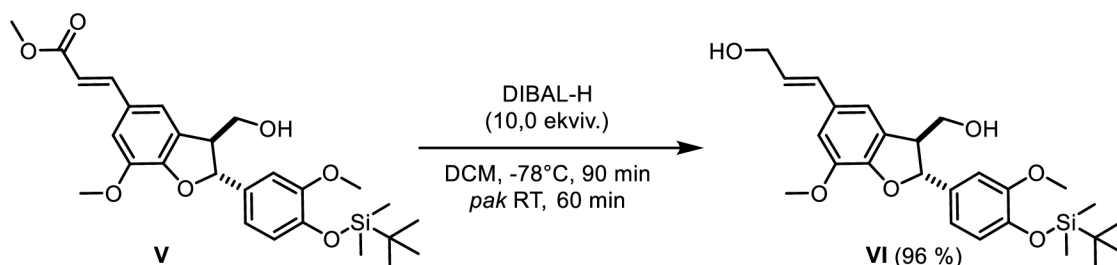


Látka **IV** (10 g, 23,9 mmol, 1 ekviv) byla rozpuštěna v DCM (119 mL, 0,2M) a směs byla ochlazena na 0 °C. Byl přidán TEA (1,1 mL, 71,7 mmol, 3 ekviv) a po 5 minutách byl přidán TBSCl (5,23 mL, 29,9 mmol, 1,25 ekviv). Po 15 minutách byla reakční směs ohřáta na pokojovou teplotu a míchána po dobu 48 h. Reakce byla ukončena přidáním 50 mL nasyceného roztoku NaCl a směs byla extrahována do DCM (3x50 mL). Organická fáze byla promyta 25 mL nasyceného roztoku NaCl a následně vysušena nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Rozpouštědlo bylo odstraněno pomocí RVO a odparek byl purifikován pomocí sloupcové chromatografie (SiO<sub>2</sub>, Hex:EtOAc = 4:1 → 2:1), která poskytla produkt **V** (4,41 g, 35 %).

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm): 0.13 (s, 6H), 0.96 (s, 9H), 3.81 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 3.87 (s, 3H), 3.93 (s, 3H), 4.35 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 6.14 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 6.33 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 6.92 (dd, *J* = 12.0, 2.5 Hz, 1H), 6.95 (s, 2H), 7.03 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 7.13 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.19 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H), 7.65 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H).

$^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  (ppm): -4.5, 19.1, 25.8, 53.1, 55.6, 56.2, 56.3, 56.4, 87.4, 109.8, 112.3, 115.8, 116.5, 118.1, 118.9, 125.8, 128.8, 133.8, 144.9, 146.9, 150.1, 150.1, 167.8, 170.9.

## 6.2.5. Redukce látky V



Roztok látky **V** (4,41 g, 8,34 mmol, 1 ekviv) v THF (33,4 mL, 0,25M) byl ochlazen na -78 °C a po kapkách byl do směsi přidán DIBAL (50 mL, 50 mmol, 6 ekviv). Směs byla za stálého chlazení míchána po dobu 30 minut a po 1 h míchání za RT byl opět po kapkách přidán DIBAL. Po další hodině míchání za RT byla reakční směs ochlazena na -78 °C a reakce byla ukončena přidáním 100 mL roztoku Rochelovy soli. Celá směs byla extrahována pomocí EtOAc (3x 50 mL) a spojené organické fáze byly promyty pomocí 50 mL nasyceného roztoku NaCl, vysušeny nad  $\text{MgSO}_4$ , filtrovány a zahuštěny na RVO. Surový produkt byl purifikován pomocí sloupcové chromatografie ( $\text{SiO}_2$ , Hex:EtOAc = 2:1 -> 1:1) a poskytl produkt **VI** (3,78 g, 96 %).

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  (ppm): 0.12 (s, 6 H) 0.98 (s, 9 H) 2.84 - 3.05 (m, 2 H) 3.43 - 3.52 (m, 1 H) 3.71 (s, 3 H) 3.84 (d,  $J=6.11$  Hz, 2 H) 3.89 - 3.91 (m, 3 H) 4.30 (dd,  $J=5.96, 1.38$  Hz, 2 H) 6.12 - 6.26 (m, 1 H) 6.44 - 6.54 (m, 1 H) 6.54 - 6.64 (m, 2 H) 6.69 - 6.73 (m, 1 H) 6.74 - 6.79 (m, 1 H) 6.81 - 6.84 (m, 1 H).

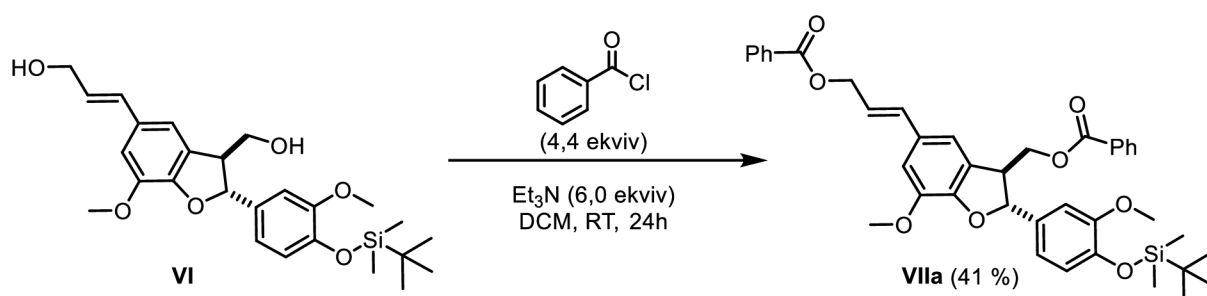
MS (ESI)  $m/z$  (%): 357  $[\text{M}-\text{H}]^-$  (100).

HRMS (ESI) vypočítáno pro  $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{O}_6$   $[\text{M}-\text{H}]^-$ : 357.1333, nalezeno 357.1338.

## 6.3. Syntéza derivátů quiquesetinerviusinu A

### 6.3.1. Syntéza esteru látky VI a kyseliny benzoové

#### 6.3.1.1. Esterifikace intermediátu VI benzoyl chloridem

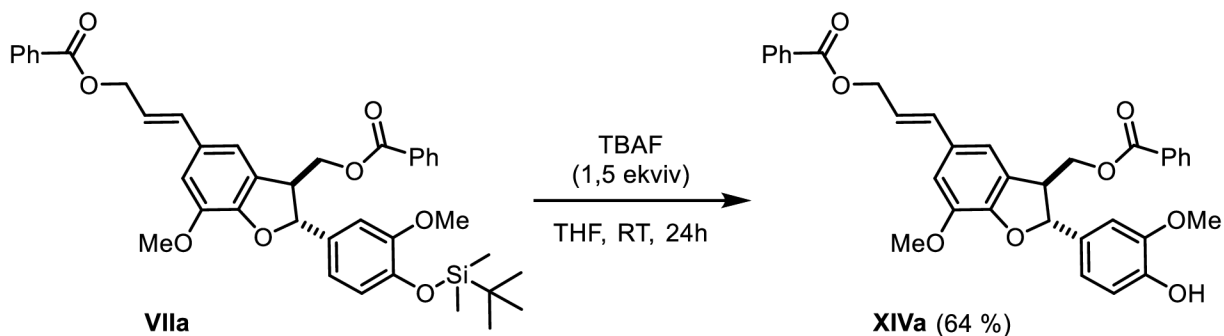


Intermediát **VI** (300 mg, 0,628 mmol, 1 ekviv) byl rozpuštěn v DCM (3,14 mL, 0,2M) a do směsi byl přidán benzoyl chlorid (0,31 mL, 2,76 mmol, 4,4 ekviv). Následně byl přidán TEA (0,53 mL, 3,77 mmol, 6 ekviv). Směs byla míchána za RT po dobu 24 h. Poté byla reakce ukončena přidáním 5 mL H<sub>2</sub>O. Byla provedena extrakce pomocí DCM (3x 10 mL) a spojené organická fáze byly promyty nasyceným roztokem NaCl (10 mL) a vysušeny nad MgSO<sub>4</sub>. Rozpouštědla byla odpařena pomocí RVO a odparek byl purifikován pomocí sloupcové chromatografie (SiO<sub>2</sub>, Hex:EtOAc = 6:1 -> 4:1 -> 2:1) za vzniku produktu **VIIa** (0,176 g, 41 %).

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm): 8.10 – 8.07 (m, 2H), 7.96 – 7.93 (m, 2H), 7.59 – 7.54 (m, 2H), 7.46 – 7.39 (m, 4H), 6.99 – 6.97 (m, 1H), 6.92 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 6.87 – 6.84 (m, 2H), 6.80 – 6.77 (m, 1H), 6.71 – 6.66 (m, 1H), 6.27 (dt, *J* = 15.7, 6.5 Hz, 1H), 5.59 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 4.97 (dd, *J* = 6.6, 1.2 Hz, 2H), 4.71 (dd, *J* = 11.2, 5.4 Hz, 1H), 4.54 (dd, *J* = 11.1, 7.9 Hz, 1H), 3.99 – 3.95 (m, 1H), 3.92 (s, 3H), 3.70 (s, 3H), 0.98 (s, 9H), 0.12 (s, 6H).

MS (ESI) *m/z* (%): 680 [M+H]<sup>+</sup> (100).

### 6.3.1.2. Odchránění TBS skupiny látky VIIa



Látka **VIIa** (500 mg, 0,727 mmol, 1 ekvív) byla rozpuštěna v THF (7,27 mL, 0,1M). Do roztoku byl přidán TBAF (1,09 mL, 1,09 mmol, 1,5 ekvív) a reakční směs byla míchána za RT po dobu 24 h. Poté byla reakce ukončena přidáním 10 mL NH<sub>4</sub>Cl a extrahována pomocí EtOAc (3x 10 mL). Spojené organické fáze byly promyty 10 mL nasyceného roztoku NaCl a vysušeny nad MgSO<sub>4</sub>. Rozpouštědlo bylo odpařeno pomocí RVO a odparek byl purifikován pomocí sloupcové chromatografie (SiO<sub>2</sub>, Hex:EtOAc = 4:1 -> 2:1) za vzniku produktu **XIVa** (0,264 g, 64 %).

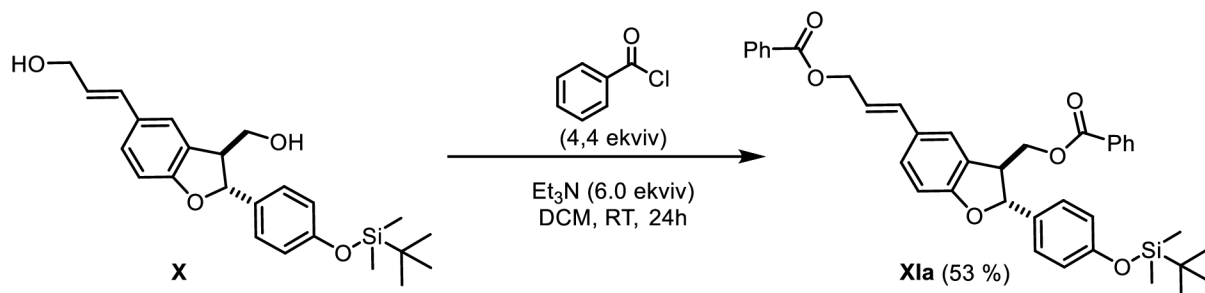
<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm): 8.26 – 8.18 (m, 2H), 8.14 – 8.06 (m, 2H), 8.03 – 7.92 (m, 1H), 7.66 – 7.61 (m, 1H), 7.60 – 7.55 (m, 1H), 7.54 – 7.49 (m, 2H), 7.49 – 7.43 (m, 3H), 7.13 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.05 (dd, *J* = 10.1, 2.5 Hz, 1H), 7.00 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H), 6.95 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 6.70 (dd, *J* = 15.7, 1.3 Hz, 1H), 6.29 (dt, *J* = 15.8, 6.5 Hz, 1H), 5.71 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H), 4.98 (dd, *J* = 6.6, 1.3 Hz, 2H), 4.75 (dd, *J* = 11.2, 5.2 Hz, 1H), 4.57 (dd, *J* = 11.2, 8.1 Hz, 1H), 4.00 (ddd, *J* = 9.6, 7.6, 4.1 Hz, 1H), 3.96 (s, 3H), 3.71 (s, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm): 166.68, 166.52, 164.84, 151.74, 148.47, 144.70, 140.11, 139.69, 134.49, 133.95, 133.73, 133.55, 133.23, 131.03, 130.53, 130.41, 129.88, 129.79, 129.50, 128.76, 128.73, 128.60, 127.42, 123.33, 121.63, 118.46, 115.65, 110.96, 110.27, 88.71, 66.31, 65.89, 56.30, 56.06, 50.99.

MS (ESI) *m/z* (%): 567 [M+H]<sup>+</sup> (100).

## 6.3.2. Syntéza esteru látky X a kyseliny benzoové

### 6.3.2.1. Esterifikace intermediátu X benzoyl chloridem



Intermediát **X** (250 mg, 0,606 mmol, 1 ekvív) byl rozpuštěn v DCM (6,06 mL, 0,1M) a do směsi byl přidán benzoyl chlorid (0,31 mL, 2,67 mmol, 4,4 ekvív). Následně byl přidán TEA (0,51 mL, 3,64 mmol, 6 ekvív). Směs byla míchána za RT po dobu 24 h a poté byla reakce ukončena přidáním 5 mL H<sub>2</sub>O. Byla provedena extrakce pomocí DCM (3x 10 mL) a spojené organické fáze byly promyty nasyceným roztokem NaCl (10 mL) a vysušeny nad MgSO<sub>4</sub>. Rozpouštědla byla odpařena pomocí RVO a odparek byl purifikován pomocí sloupcové chromatografie (SiO<sub>2</sub>, Hex:EtOAc = 15:1 -> 9:1 -> 7:1) za vzniku produktu **X1a** (0,2 g, 53 %).

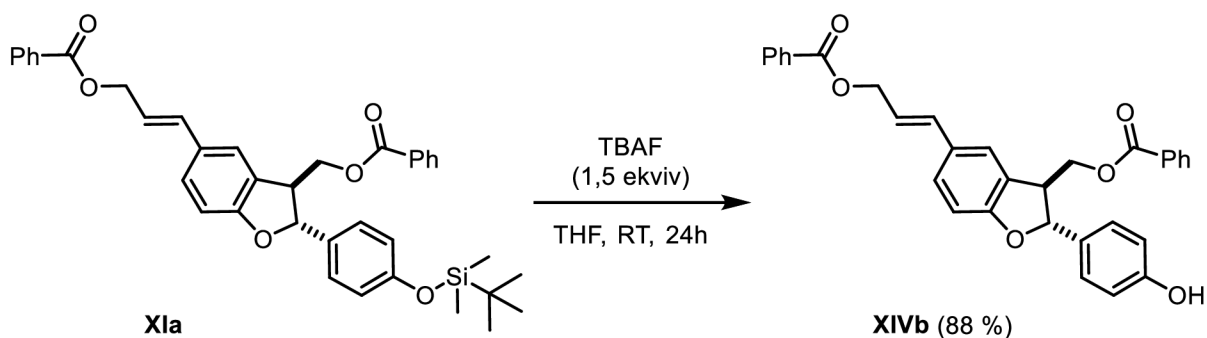
<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm): = 7.99 – 7.94 (m, 2H), 7.88 (dd, *J* = 8.3, 1.3 Hz, 2H), 7.65 – 7.60 (m, 2H), 7.47 – 7.43 (m, 3H), 7.38 (td, *J* = 7.7, 6.0 Hz, 4H), 7.23 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 6.91 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.75 (s, 1H), 6.72 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 6.63 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 6.35 (dt, *J* = 15.9, 6.3 Hz, 1H), 5.11 (s, 2H), 4.97 (dd, *J* = 6.4, 1.4 Hz, 2H), 0.94 (s, 9H), 0.15 (s, 6H).

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm): = 171.69, 166.49, 164.75, 155.57, 148.32, 134.82, 133.70, 133.28, 133.15, 133.13, 132.31, 132.13, 130.56, 130.43, 130.40, 130.33, 129.92, 129.85, 129.41, 129.35, 129.22, 129.16, 127.31, 124.02, 123.56, 120.01, 69.89, 65.58, 29.92, 25.84, 18.40, -4.24.

MS (ESI) *m/z* (%): 620 [M+H]<sup>+</sup> (100).

HRMS (ESI) vypočítáno pro C<sub>38</sub>H<sub>44</sub>NO<sub>6</sub>Si [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>: 638.2932, nalezeno 638.2947.

### 6.3.2.2. Odchránění TBS skupiny u látky **XIa**



Látka **XIa** (196 mg, 0,313 mmol, 1 ekvív) byla rozpuštěna v THF (3,13 mL, 0,1M). Do roztoku byl přidán TBAF · 3 H<sub>2</sub>O (125 mg, 0,469 mmol, 1,5 ekvív) a reakční směs byla míchána za RT po dobu 24 h. Poté byla reakce ukončena přidáním 5 mL NH<sub>4</sub>Cl a extrahována pomocí EtOAc (3x 10 mL). Spojené organické fáze byly promyty 10 mL nasyceného roztoku NaCl a vysušeny nad MgSO<sub>4</sub>. Rozpouštědla byla odpařena pomocí RVO a odparek byl purifikován pomocí sloupcové chromatografie (SiO<sub>2</sub>, Hex:EtOAc = 2:1) za vzniku produktu **XIVb** (0,14 g, 88 %).

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm): 8.09 – 8.06 (m, 2H), 7.96 – 7.93 (m, 2H), 7.56 (q, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.47 – 7.41 (m, 4H), 7.37 (s, 1H), 7.30 – 7.27 (m, 1H), 7.26 (d, *J* = 5.0 Hz, 2H), 6.86 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 6.83 – 6.79 (m, 2H), 6.70 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H), 6.25 (dt, *J* = 15.9, 6.6 Hz, 1H), 5.55 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H), 5.12 (s, 1H), 4.96 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H), 4.69 (dd, *J* = 11.1, 5.5 Hz, 1H), 4.54 (dd, *J* = 11.1, 7.8 Hz, 1H).

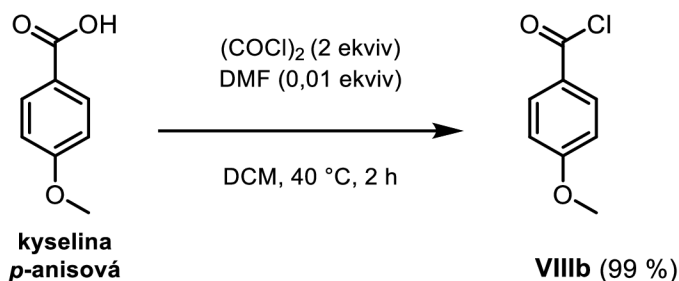
<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm): 166.6, 166.5, 160.0, 156.0, 134.3, 133.4, 133.1, 133.1, 130.4, 129.8, 129.8, 128.7, 128.6, 128.5, 127.7, 127.0, 122.9, 121.0, 115.7, 109.9, 88.1, 68.1, 66.3, 65.9, 50.1, 25.7.

MS (ESI) *m/z* (%): 506 [M+H]<sup>+</sup> (100).

HRMS (ESI) vypočítáno pro C<sub>32</sub>H<sub>30</sub>NO<sub>6</sub> [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>: 524.2068, nalezeno 524.2072.

## 6.3.3. Syntéza esteru látky VI a kyseliny *p*-anisové

### 6.3.3.1. Příprava *p*-anisoyl chloridu



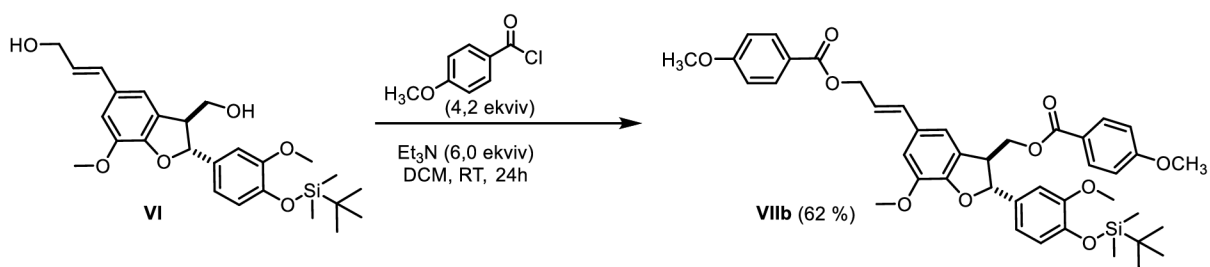
Kyselina *p*-anisová (1 g, 6,57 mmol, 1 ekviv) byla rozpuštěna v DCM (6,57 mL, 1M). Do roztoku byl za stálého míchání přidán  $(\text{COCl})_2$  (1,13 mL, 13,1 mmol, 2 ekviv) a DMF (5  $\mu\text{L}$ , 0,066  $\mu\text{mol}$ , 0,01 ekviv). Reakční směs byla po dobu 2 h refluxována při 40  $^\circ\text{C}$  a reakce byla ukončena odpařením rozpouštědla na RVO. Odparek obsahoval cílový chlorid **VIIIb** (1,11 g, 99 %) jež byl použit v dalším reakčním kroku bez další purifikace.

$^1\text{H NMR}$  (500 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  (ppm): 8.08 (dd,  $J = 8.9, 1.9$  Hz, 2H), 6.99 – 6.93 (m, 2H), 3.90 (s, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$  (126 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  (ppm): 167.3, 165.5, 134.2, 125.6, 114.4, 55.9.

MS (ESI)  $m/z$  (%): 170  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (100).

### 6.3.3.2. Esterifikace intermediátu VI *p*-anisoyl chloridem



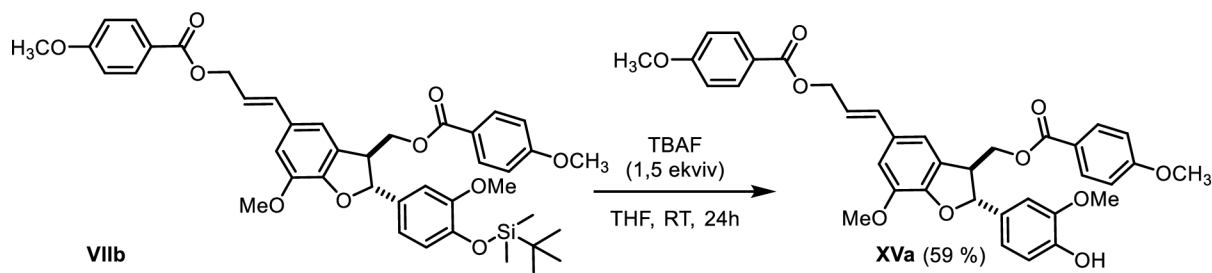
Látka **VI** (200 mg, 0,419 mmol, 1 ekviv) byla rozpuštěna v DCM (4,19 mL, 0,1M). Do roztoku byl přidán TEA (353  $\mu\text{L}$ , 2,51 mmol, 6 ekviv) a poté byl přidán *p*-anisoyl chlorid **VIIIb** (303 mg, 1,76 mmol, 4,2 ekviv). Reakční směs byla míchána za RT po dobu 24 h. Reakce byla poté ukončena přidáním 10 mL  $(\text{NH})_4\text{Cl}$  a byla provedena extrakce do DCM (3x 10 mL). Spojené organická fáze byly promyty nasyceným roztokem NaCl (10 mL) a vysušeny nad  $\text{MgSO}_4$ . Těkavé složky byly odstraněny pomocí RVO a surový produkt byl purifikován pomocí sloupcové chromatografie ( $\text{SiO}_2$ , Hex:EtOAc = 6:1  $\rightarrow$  3:1) za vzniku látky **VIIb** (0,193 g, 62 %).

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  (ppm): 8.05 – 8.02 (m, 2H), 7.91 – 7.87 (m, 2H), 7.00 – 6.95 (m, 2H), 6.95 – 6.91 (m, 3H), 6.90 – 6.87 (m, 2H), 6.87 – 6.84 (m, 2H), 6.79 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H), 6.69 – 6.64 (m, 1H), 6.26 (dt,  $J = 15.8, 6.5$  Hz, 1H), 5.57 (d,  $J = 7.3$  Hz, 1H), 4.93 (dd,  $J = 6.6, 1.3$  Hz, 2H), 4.68 (dd,  $J = 11.1, 5.3$  Hz, 1H), 4.50 (dd,  $J = 11.1, 8.0$  Hz, 1H), 3.92 (s, 3H), 3.87 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 3.70 (s, 3H), 0.98 (s, 9H), 0.12 (s, 6H).

$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  (ppm): 166.4, 166.2, 163.7, 163.5, 151.2, 148.5, 145.4, 144.6, 134.3, 133.9, 133.0, 132.5, 131.8, 130.7, 127.9, 122.8, 122.2, 121.6, 121.0, 119.1, 115.5, 114.3, 113.9, 113.8, 113.8, 110.6, 110.3, 89.5, 66.0, 65.6, 56.1, 55.7, 55.6, 55.5, 50.6, 29.8, 25.8, 18.6, -4.5.

MS (ESI)  $m/z$  (%): 740  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (100).

### 6.3.3.3. Odchránění TBS skupiny u látky VIIb



Látka **VIIb** (185 mg, 0,247 mmol, 1 ekvív) byla rozpuštěna v THF (2,47 mL, 0,1M). Do roztoku byl přidán TBAF (0,371 mL, 0,371 mmol, 1,5 ekvív) a reakční směs byla míchána za RT po dobu 24 h. Poté byla reakce ukončena přidáním 5 mL  $\text{NH}_4\text{Cl}$  a extrahována pomocí EtOAc (3x 10 mL). Spojené organické fáze byly promyty 10 mL nasyceného roztoku NaCl a vysušeny nad  $\text{MgSO}_4$ . Těkavé složky byly odstraněny pomocí RVO a surový produkt byl purifikován pomocí sloupcové chromatografie ( $\text{SiO}_2$ , Hex:EtOAc = 4:1 -> 2:1 -> 1:1) za vzniku látky **XVa** (0,092 g, 59 %).

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  (ppm): 8.05 – 8.02 (m, 2H), 7.90 – 7.86 (m, 2H), 6.97 (d,  $J = 1.4$  Hz, 1H), 6.95 – 6.85 (m, 9H), 6.67 (d,  $J = 15.8$  Hz, 1H), 6.30 – 6.24 (m, 1H), 5.61 (s, 1H), 5.57 (d,  $J = 7.4$  Hz, 1H), 4.93 (dd,  $J = 6.6, 1.3$  Hz, 2H), 4.68 (dd,  $J = 11.2, 5.4$  Hz, 1H), 4.50 (dd,  $J = 11.1, 7.9$  Hz, 1H), 3.92 (s, 3H), 3.87 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 3.79 (s, 3H).

$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  (ppm): 166.36, 166.18, 163.72, 163.53, 148.39, 146.79, 145.94, 144.57, 134.28, 132.43, 132.40, 131.84, 130.73, 127.82, 122.76,



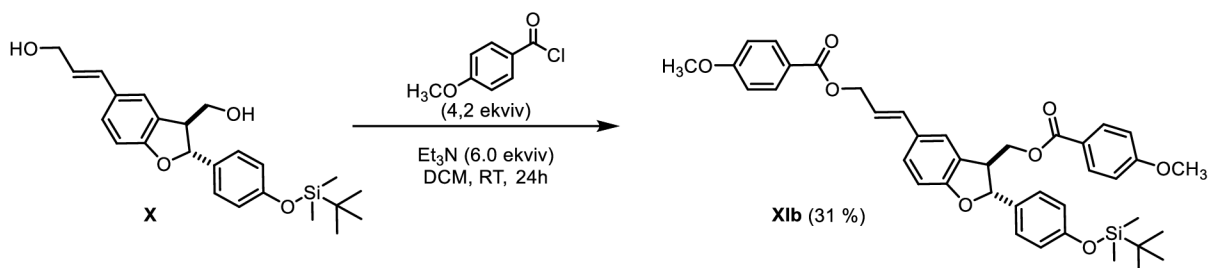
122.13, 121.66, 119.76, 115.48, 114.43, 113.93, 113.91, 113.83, 113.75, 110.65, 108.79, 89.40, 65.91, 65.55, 56.15, 56.01, 55.61, 55.58, 50.66.

MS (ESI)  $m/z$  (%): 627  $[M+H]^+$  (100).

HRMS (ESI) vypočítáno pro  $C_{36}H_{38}NO_{10}$   $[M+NH_4]^+$ : 644.2490, nalezeno 644.2504.

## 6.3.4. Syntéza esteru látky **X** a kyseliny *p*-anisové

### 6.3.4.1. Esterifikace intermediátu **X** *p*-anisoyl chloridem



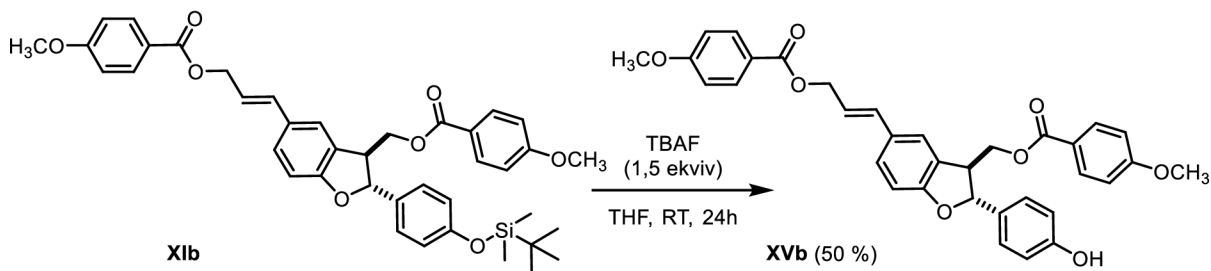
Intermediát **X** (216 mg, 0,524 mmol, 1 ekvív) byl rozpuštěn v DCM (5,24 mL, 0,1M). Do roztoku byl přidán TEA (441  $\mu$ L, 3,14 mmol, 6 ekvív) a poté byl přidán *p*-anisoyl chlorid **VIIIb** (379 mg, 2,2 mmol, 4,2 ekvív). Reakční směs byla míchána za RT po dobu 24 h. Reakce byla poté ukončena přidáním 10 mL  $(NH)_4Cl$  a byla provedena extrakce pomocí DCM (3x 10 mL). Spojené organické fáze byly promyty 10 mL nasyceného roztoku NaCl a vysušeny nad  $MgSO_4$ . Těkavé složky byly odstraněny pomocí RVO a surový produkt byl purifikován pomocí sloupcové chromatografie ( $SiO_2$ , Hex:EtOAc = 100:1 -> 50:1 -> 30:1) za vzniku produktu **X1b** (0,112 g, 31 %).

$^1H$  NMR (500 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  (ppm): 8.04 – 8.02 (m, 2H), 7.92 – 7.87 (m, 2H), 7.38 – 7.35 (m, 1H), 7.28 (dd,  $J$  = 8.3, 1.9 Hz, 1H), 7.25 – 7.22 (m, 2H), 6.93 – 6.89 (m, 4H), 6.85 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 1H), 6.82 – 6.78 (m, 2H), 6.68 (dd,  $J$  = 15.9, 1.4 Hz, 1H), 6.25 (dt,  $J$  = 15.9, 6.6 Hz, 1H), 5.55 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 1H), 4.92 (dd,  $J$  = 6.6, 1.3 Hz, 2H), 4.66 (dd,  $J$  = 11.0, 5.5 Hz, 1H), 4.51 (dd,  $J$  = 11.1, 7.8 Hz, 1H), 3.86 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 0.97 (s, 9H), 0.18 (s, 6H).

$^{13}C$  NMR (126 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  (ppm): 166.4, 166.2, 163.7, 163.5, 160.0, 156.0, 134.1, 133.6, 133.0, 132.5, 131.8, 129.8, 128.6, 127.4, 127.2, 122.9, 122.8, 122.2, 121.2, 120.4, 114.3, 113.9, 113.7, 109.9, 88.3, 66.1, 65.7, 55.6, 50.2, 32.1, 31.6, 30.4, 30.3, 29.9, 27.0, 25.8, 22.8, 18.3, 14.3, -4.3.

MS (ESI)  $m/z$  (%): 680  $[M+H]^+$  (100).

### 6.3.4.2. Odchránění TBS skupiny látky **XIb**



Látka **X** (94 mg, 0,137 mmol, 1 ekvív) byla rozpuštěna v THF (1,37 mL, 0,1M). Do roztoku byl přidán TBAF · 3 H<sub>2</sub>O (54,7 mg, 0,205 mmol, 1,5 ekvív) a reakční směs byla míchána za RT po dobu 24 h. Poté byla reakce ukončena přidáním 5 mL NH<sub>4</sub>Cl a extrahována pomocí EtOAc (3x 5 mL). Spojené organické fáze byly promyty 5 mL nasyceného roztoku NaCl a vysušeny nad MgSO<sub>4</sub>. Těkávé složky byly odstraněny pomocí RVO a surový produkt byl purifikován pomocí sloupcové chromatografie (SiO<sub>2</sub>, Hex:EtOAc = 3:1 -> 2:1) za vzniku produktu **XVb** (0,039 g, 50 %).

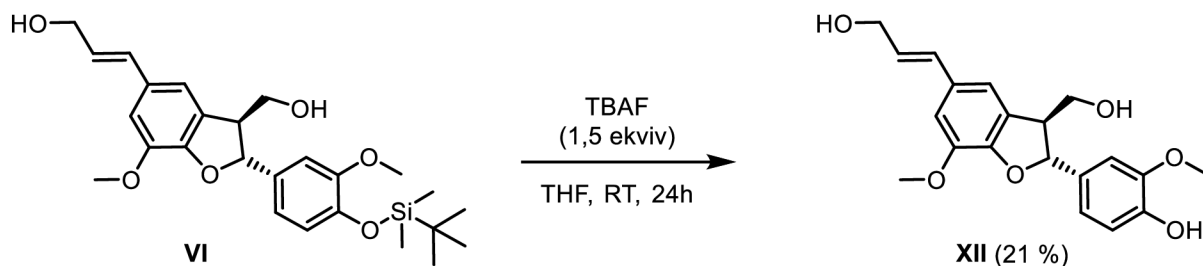
<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm): 8.03 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.90 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.36 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 7.30 – 7.24 (m, 3H), 6.92 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 6.90 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 6.85 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 6.81 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.68 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H), 6.25 (dt, *J* = 15.8, 6.5 Hz, 1H), 5.55 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H), 4.92 (dd, *J* = 6.6, 1.2 Hz, 2H), 4.76 (s, 1H), 4.66 (dd, *J* = 11.0, 5.5 Hz, 1H), 4.51 (dd, *J* = 11.0, 7.8 Hz, 1H), 3.86 (s, 3H), 3.86 (s, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm): 166.4, 166.3, 163.7, 163.5, 160.0, 155.9, 134.1, 133.1, 131.8, 129.8, 128.6, 127.7, 127.1, 122.9, 122.8, 122.1, 121.2, 115.7, 113.9, 113.7, 109.9, 88.1, 66.1, 65.7, 55.6, 55.6, 50.2, 29.8.

MS (ESI) *m/z* (%): 567 [M+H]<sup>+</sup> (100).

HRMS (ESI) vypočítáno pro C<sub>34</sub>H<sub>34</sub>NO<sub>8</sub> [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>: 586.2279, nalezeno 584.2282.

### 6.3.5. Odchránění TBS skupiny intermediátu **VI**



Intermediát **VI** (250 mg, 0,524 mmol, 1 ekvív) byl rozpuštěna v THF (5,24 mL, 0,1M). Do roztoku byl přidán TBAF (0,23 mL, 0,785 mmol, 1,5 ekvív) a reakční směs byla míchána za RT po dobu 24 h. Poté byla reakce ukončena přidáním 10 mL NH<sub>4</sub>Cl a

extrahována pomocí EtOAc (3x 10 mL). Spojené organické fáze byly promyty 20 mL nasyceného roztoku NaCl a vysušeny nad MgSO<sub>4</sub>. Těkavé složky byly odstraněny pomocí RVO a surový produkt byl purifikován pomocí sloupcové chromatografie (SiO<sub>2</sub>, DCM:EtOAc = 1:1 -> 1:2) za vzniku dehydrodikoniferylalkoholu **XII** (0,040 g, 21 %).

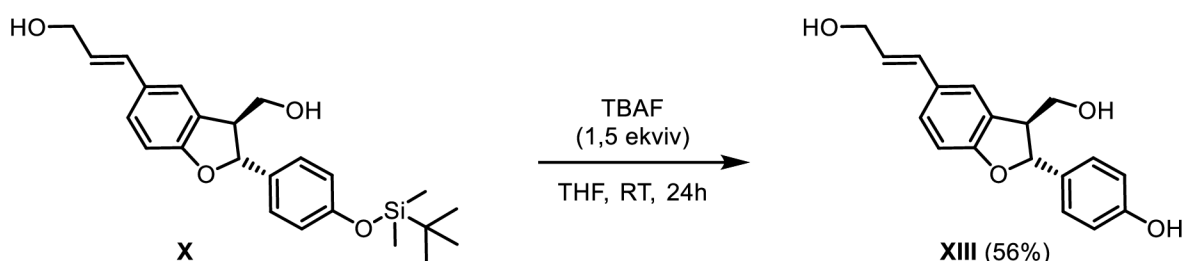
<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, Acetone-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 7.03 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.97 (t, *J* = 1.2 Hz, 1H), 6.94 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H), 6.87 (dd, *J* = 8.1, 2.0 Hz, 1H), 6.80 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 6.52 (dt, *J* = 15.9, 1.7 Hz, 1H), 6.24 (dt, *J* = 15.8, 5.6 Hz, 1H), 5.56 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H), 4.19 (dd, *J* = 5.6, 1.6 Hz, 2H), 3.95 – 3.82 (m, 2H), 3.85 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 3.53 (q, *J* = 6.4 Hz, 1H).

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, Acetone-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 148.84, 148.27, 147.13, 145.07, 134.26, 131.82, 130.50, 130.31, 128.23, 119.50, 116.01, 115.60, 111.54, 110.38, 88.45, 69.32, 69.20, 64.39, 63.19, 56.29, 56.18, 54.64.

MS (ESI) *m/z* (%): 357 [M-H]<sup>-</sup> (100).

HRMS (ESI) vypočítáno pro C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>O<sub>6</sub> [M-H]<sup>-</sup>: 357.1333, nalezeno 357.1338.

### 6.3.6. Odchránění TBS skupiny intermediátu X



Intermediát **X** (200 mg, 0,485 mmol, 1 ekvív) byl rozpuštěn v THF (4,85 mL, 0,1M). Do roztoku byl přidán TBAF (0,22 mL, 0,727 mmol, 1,5 ekvív) a reakční směs byla míchána za RT po dobu 24 h. Poté byla reakce ukončena přidáním 10 mL NH<sub>4</sub>Cl a extrahována pomocí EtOAc (3x 10 mL). Spojené organické fáze byly promyty 20 mL nasyceného roztoku NaCl a vysušeny nad MgSO<sub>4</sub>. Těkavé složky byly odstraněny pomocí RVO a surový produkt byl purifikován pomocí sloupcové chromatografie (SiO<sub>2</sub>, DCM:MeOH = 19:1 -> 14:1) za vzniku dehydrodikoniferylalkoholu **XII** (0,081 g, 56 %).

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm): 7.41 – 7.39 (m, 1H), 7.26 – 7.20 (m, 3H), 6.84 – 6.80 (m, 2H), 6.74 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 6.54 (dt, *J* = 15.8, 1.7 Hz, 1H), 6.23 (dt, *J* = 15.8, 5.6 Hz, 1H), 5.55 (d, *J* = 6.1 Hz, 1H), 4.21 – 4.18 (m, 2H), 3.88 (dd, *J* = 10.8, 5.6 Hz, 1H), 3.85 – 3.80 (m, 1H), 3.48 (q, *J* = 6.2 Hz, 1H), 2.86 (d, *J* = 16.0 Hz, 3H).

$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  (ppm): 160.5, 158.1, 134.1, 131.0, 130.3, 129.5, 128.2, 128.1, 128.1, 123.5, 116.1, 109.7, 88.0, 64.8, 64.7, 63.4, 63.3, 54.4.

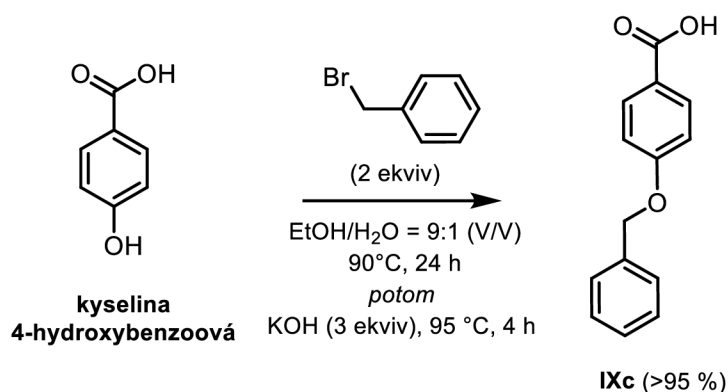
MS (ESI)  $m/z$  (%): 297  $[\text{M}-\text{H}]^-$  (100).

HRMS (ESI) vypočítáno pro  $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{O}_4$   $[\text{M}-\text{H}]^-$ : 297.1121, nalezeno 297.1126.

## 6.4. Syntéza dihydroquiquesetinerviusinu A (XVII)

### 6.4.1. Ochrana OH skupiny kyseliny *p*-hydroxybenzoové a příprava jejího chloridu

#### 6.4.1.1. Ochrana OH skupiny kyseliny *p*-hydroxybenzoové pomocí benzylbromidu



Kyselina 4-hydroxybenzoová (4 g, 28,9 mmol, 1 ekvív) byla rozpuštěna v EtOH (90 mL, 0,3M) a H<sub>2</sub>O (10 mL, 3M). Do roztoku byl přidán KOH (4,87 g, 86,7 mmol, 3 ekvív) a směs byla refluxována při 90 °C po dobu 24 h. Poté bylo do směsi přidáno 20 mL 20% roztoku KOH a směs byla refluxována při 95 °C po dobu 4 h. Poté byla směs naředěna 60 mL H<sub>2</sub>O a okyselena přidáváním 2M HCl, dokud nevznikla sraženina. 4-(benzyloxy)benzoová kyselina **IXc** (6,60 g, 99 %) ve formě bílé sraženiny byla následně odfiltrována a promyta vodou a hexanem.

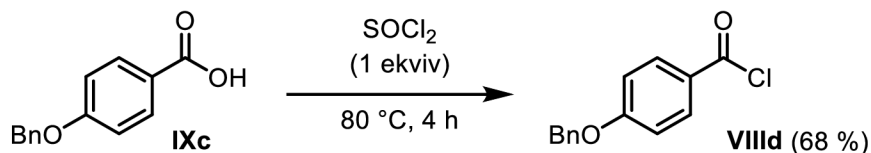
$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm): 7.47 – 7.40 (m, 2H), 7.04 – 6.99 (m, 2H), 6.99 – 6.92 (m, 2H), 6.91 – 6.87 (m, 1H), 6.68 – 6.62 (m, 2H), 4.73 (s, 2H).

$^{13}\text{C}$  { $^1\text{H}$ } NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): 167.0, 162.0, 136.6, 131.4, 128.5, 128.1, 127.9, 123.2, 114.6, 69.5.

MS (ESI)  $m/z$  (%): 228  $[M+H]^+$  (100).

HRMS (ESI) vypočítáno pro  $C_{14}H_{13}O_3$   $[M+NH_4]^+$ : 229.0859, nalezeno 229.0861.

#### 6.4.1.2. Chlorace 4-(benzyloxy)benzoové kyseliny



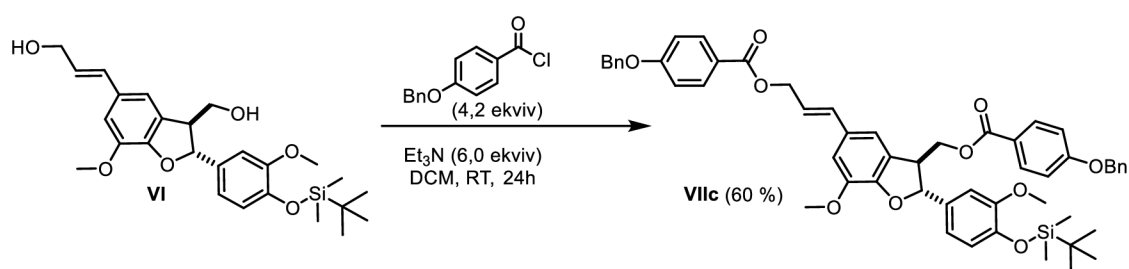
Ke 4-(benzyloxy)benzoové kyselině **IXc** (500 mg, 2,17 mmol, 1 ekvív) byl za RT přidán thionyl chlorid (2,17 mL, 1 mol/l). Následně byla reakční směs zahřáta na  $80\text{ }^\circ\text{C}$  a za této teploty byla ponechána reagovat po dobu 4 h. Poté byla reakce ukončena přidáním 5 mL  $H_2O$  a extrahována pomocí EtOAc (3x 10 mL). Organická fáze byla promyta 10 mL nasyceného roztoku NaCl a vysušena nad  $MgSO_4$ . Těkavé složky byly odstraněny pomocí RVO a odparek obsahoval produkt **VIII d** (0,365 g, 68 %) a byl použit v dalším kroku bez další purifikace.

$^1H$  NMR (500 MHz, Chloroform- $d$ )  $\delta$  (ppm): 8.12 – 8.06 (m, 2H), 7.47 – 7.40 (m, 4H), 7.06 – 7.01 (m, 2H), 5.16 (s, 2H).

$^{13}C$  NMR (126 MHz, Chloroform- $d$ )  $\delta$  (ppm): 167.3, 164.6, 135.7, 134.2, 128.9, 128.6, 127.7, 125.8, 115.2, 70.6.

MS (ESI)  $m/z$  (%): 245  $[M-H]^-$  (100).

#### 6.4.2. Esterifikace intermediátu VI 4-(benzyloxy)benzoyl chloridem



Intermediát **VI** (500 mg, 1,05 mmol, 1 ekvív) byl rozpuštěna v DCM (10,5 mL, 0,1M). Do roztoku byl přidán TEA (0,88 mL, 6,28 mmol, 6 ekvív) a poté byl přidán 4-(benzyloxy)benzoyl chlorid **VIII d** (1,15 g, 4,61 mmol, 4,2 ekvív). Reakční směs byla míchána za RT po dobu 24 h. Reakce byla poté ukončena přidáním 10 mL  $H_2O$  a byla provedena extrakce pomocí DCM (3x 10 mL). Organická fáze byla promyta nasyceným roztokem NaCl a vysušena nad  $MgSO_4$ . Těkavé složky byly odstraněny

pomocí RVO a surová reakční směs byla purifikována pomocí sloupcové chromatografie (SiO<sub>2</sub>, Hex:EtOAc = 10:1 -> 7:1 -> 5:1 -> 2:1) za vzniku cílového produktu **VIIc** (0,545 g, 60 %).

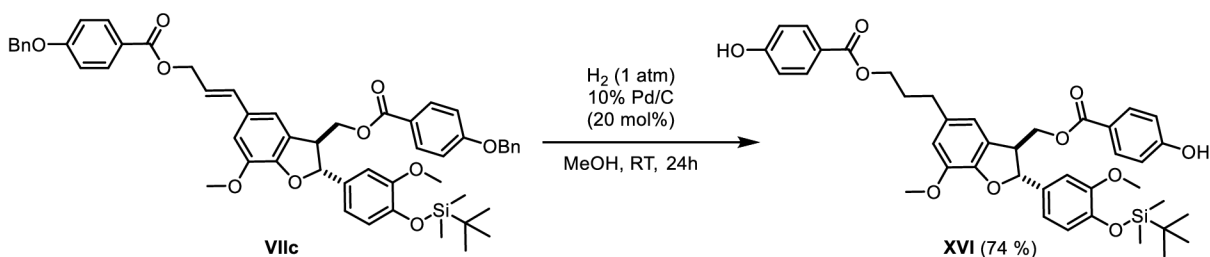
<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm): 8.04 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.90 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.47 – 7.33 (m, 10H), 7.03 – 6.95 (m, 6H), 6.92 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 6.87 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H), 6.85 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.80 (dt, *J* = 7.8, 0.8 Hz, 1H), 6.67 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 6.27 (dt, *J* = 15.9, 6.5 Hz, 1H), 5.12 (d, *J* = 3.3 Hz, 4H), 4.94 (dd, *J* = 6.6, 1.3 Hz, 2H), 4.69 (dd, *J* = 11.1, 5.3 Hz, 1H), 4.51 (dd, *J* = 11.1, 7.9 Hz, 1H), 3.97 (dd, *J* = 13.0, 7.6 Hz, 1H), 3.93 (s, 3H), 3.70 (s, 3H), 0.99 (s, 9H), 0.13 (s, 6H).

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm): 166.37, 166.21, 162.91, 162.74, 151.30, 148.52, 145.42, 144.61, 136.41, 136.34, 134.42, 133.99, 132.03, 131.93, 130.73, 128.91, 128.90, 128.46, 128.44, 127.90, 127.72, 127.70, 123.05, 122.45, 121.64, 121.08, 119.12, 115.56, 114.75, 114.68, 114.59, 110.69, 110.29, 89.48, 70.29, 66.09, 65.65, 60.62, 56.20, 55.59, 50.68, 25.92, 25.89, 18.65, 14.41, -4.44.

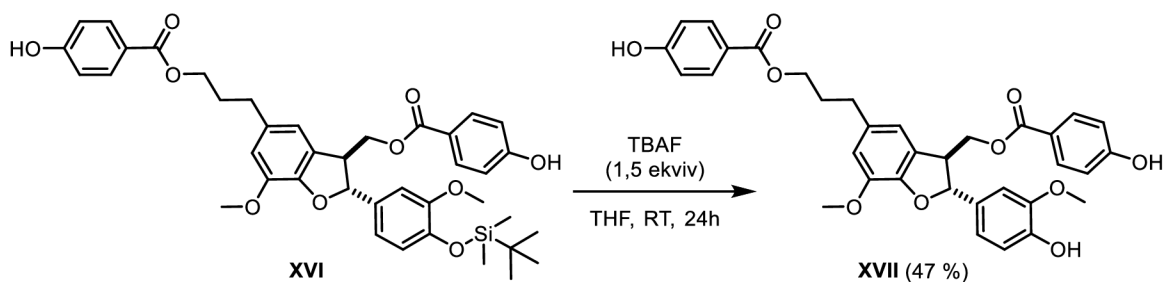
MS (ESI) *m/z* (%): 893 [M+H]<sup>+</sup> (100).

### 6.4.3. Odchránění protekčních skupin látky VIIc

#### 6.4.3.1. Odchránění benzylové skupiny látky VIIc a hydrogenace dvojně vazby



Látka **VIIc** (113 mg, 0,127 mmol, 1 ekviv) byla rozpuštěna v MeOH (2,53 mL, 0,05M) a k reakční směsi bylo pod argonovou atmosférou přidán 10% Pd/C (26,9 mg, 25 μmol, 0,2 ekviv). Poté byla argonová atmosféra zaměněna za vodíkovou (1 atm) a směs byla ponechána reagovat za RT po dobu 24 h. Reakční směs byla následně přefiltrována přes křemelinu a promyta pomocí EtOAc (2x 10 mL). Těkavé složky byly odstraněny pomocí RVO a surová reakční směs byla purifikována pomocí sloupcové chromatografie (SiO<sub>2</sub>, Hex:EtOAc = 1:1) za vzniku produktu **XVI** (0,067 g, 74%). Všechny produkty byly použity v dalším kroku.



Látka **XV** (56 mg, 78  $\mu\text{mol}$ , 1 ekvív) byla rozpuštěna v THF (0,78 mL, 0,1M). Do roztoku byl přidán TBAF  $\cdot$  3 H<sub>2</sub>O (37,8 mg, 0,118 mmol, 1,5 ekvív) a reakční směs byla míchána za RT po dobu 24 h. Poté byla reakce ukončena přidáním 5 mL NH<sub>4</sub>Cl a extrahována pomocí EtOAc (3x 5 mL). Spojené organické fáze byly promyty 10 mL nasyceného roztoku NaCl a vysušeny nad MgSO<sub>4</sub>. Těkavé složky byly odstraněny pomocí RVO a surová reakční směs byla purifikována pomocí sloupcové chromatografie (SiO<sub>2</sub>, Hex:EtOAc = 2:1 -> 1:1 -> 1:2, 1% AcOH) za vzniku dihydro quiquesetinerviusinu A (**XVI**) (0,022 g, 47 %).

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  (ppm): 7.95 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 2H), 7.81 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 2H), 6.93 (dd,  $J$  = 9.6, 1.7 Hz, 1H), 6.91 (s, 1H), 6.89 – 6.83 (m, 3H), 6.80 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 2H), 6.71 (s, 1H), 6.68 (s, 1H), 5.51 (d,  $J$  = 7.4 Hz, 1H), 4.65 (dd,  $J$  = 11.0, 5.4 Hz, 1H), 4.48 (dd,  $J$  = 11.0, 7.9 Hz, 1H), 4.31 (t,  $J$  = 6.4 Hz, 2H), 3.91 (q,  $J$  = 8.8, 8.1 Hz, 1H), 3.88 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 2.73 (t,  $J$  = 7.5 Hz, 2H), 2.06 (p,  $J$  = 6.8 Hz, 2H).

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  (ppm): 166.40, 165.93, 159.72, 151.15, 146.70, 145.79, 144.27, 135.07, 134.31, 132.59, 132.10, 131.98, 127.47, 125.26, 122.44, 119.81, 116.30, 115.34, 115.31, 114.33, 112.59, 108.89, 66.00, 64.15, 56.10, 56.00, 50.82, 32.36, 30.77, 29.81.

MS (ESI)  $m/z$  (%): 602 [M+H]<sup>+</sup> (100).

## 6.5. Biologické testování

### 6.5.1. Základní informace

Testování antihelmintické aktivity bylo uskutečněno na wild-type linii *C. elegans* N2 pocházejících z Caenorhabditis genetic center. Červi byli před experimentem kultivováni na Petriho miskách s NGM osázeným bakteriemi *E. coli* a v průběhu experimentu v tekutém S-complete médiu. Bakterie *E. coli* OP50, pocházející taktéž z Caenorhabditis genetic center, byly kultivovány v tekutém LB médiu. Většina operací byla prováděna ve sterilním prostředí v horizontálním laminárním boxu Aura HZ 72 T od firmy BIOAIR. Pro centrifugaci suspenzí byly používány centrifugy Jouan BR4i a Thermofisher. Při věkové synchronizaci byla využita třepačka Mixing Block MB-102. Při pipetování byl použit pipetor Swiftpet a multikanálová pipeta Transferpette S-12. Při vizuálním hodnocení desek byl použit inverzní světelný mikroskop Olympus. Vyhodnocení chitinasového testu bylo provedeno pomocí přístroje Infinite M200 PRO od firmy Tecan. Použité chemikálie byly od firem LachNer, Merck a VWR.

#### 6.5.1.1. Příprava roztoků a médií

- **Promývací M9 médium:** Roztok byl připraven rozpuštěním 15 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ , 3 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5 g  $\text{NaCl}$ , 0,25 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  v ddH<sub>2</sub>O a následně doplněn ddH<sub>2</sub>O na objem 1 l. Výsledný roztok byl sterilizován v autoklávu.
- **S-basal médium:** Roztok byl připraven rozpuštěním 5,9 g  $\text{NaCl}$  v 50 mL fosfátového pufru (136 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  v 1 l ddH<sub>2</sub>O, pH 6.0), poté byl přidán 1 mL roztoku cholesterolu (5 mg/mL, EtOH) a následně bylo doplněno ddH<sub>2</sub>O na objem 1 l. Výsledný roztok byl sterilizován v autoklávu.
- **S-complete médium:** Do 1 l připraveného S-basal média bylo přidáno 10 mL sterilního citrátového pufru, 10 mL sterilního roztoku stopových prvků (1,86 g  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , 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  $\text{CuSO}_4$  v 1 l ddH<sub>2</sub>O), 3 mL sterilního 1M roztoku  $\text{CaCl}_2$  a 3 mL sterilního 1M roztoku  $\text{MgSO}_4$ .
- **NGM agar:** Roztok byl připraven rozpuštěním 1,2 g  $\text{NaCl}$ , 1 g peptonu a 7,8 g agaru v ddH<sub>2</sub>O a následně doplněn na objem 400 mL. Dále bylo přidáno 0,4 mL roztoku cholesterolu (5 mg/mL, EtOH) a výsledný roztok byl sterilizován v autoklávu. Po sterilizaci bylo přidáno 0,2 mL 1M sterilního roztoku  $\text{CaCl}_2$ , 0,4 mL 1M sterilního roztoku  $\text{MgSO}_4$  a 10 mL sterilního fosfátového pufru o pH 6.0.



- **LB médium:** Roztok byl připraven rozpuštěním 10 g tryptonu, 5 g kvasnicového extraktu a 10 g NaCl v ddH<sub>2</sub>O a bylo doplněno na objem 1 l. Výsledný roztok byl sterilizován v autoklávu.
- **Roztok pro věkovou synchronizaci:** 10 mL roztoku bylo připraveno smícháním 1,5 mL roztoku 14% NaClO, 0,5 mL 10M NaOH a 8 mL H<sub>2</sub>O.
- **Pufr na chitinasový test:** Zásaditý roztok byl připraven rozpuštěním 40 g NaOH a 75 g glycinu v H<sub>2</sub>O a následně byl doplněn na objem 1 l. Dále bylo upraveno pH roztoku na 10,6.

### 6.5.2. Kultivace a věková synchronizace *C. elegans*

Z udržovací Petriho misky s NGM osázeným bakteriemi *E. coli*, na které byla udržována početná populace červů, byl vyříznut čtverec média o velikosti zhruba 0,5 cm<sup>2</sup> a následně přenesen na již připravenou čerstvou misku s NGM, taktéž osázeným bakteriemi *E. coli*. Tato čerstvá miska byla inkubována při 20 °C po dobu 48 h, během této doby se populace *C. elegans* rozrostla.

Dále byla připravena suspenze bakterií *E. coli* v S-complete médiu. Do předvážené mikroskopické zkumavky bylo napipetováno 50 mL bakteriální suspenze v LB médiu a následně byla suspenze zcentrifugována (100 rpm, 15 min). Supernatant byl odstraněn a stěny zkumavky byly promyty S-basal médiem. Po vysušení peletu byla zkumavka zvážena a odečtením původní váhy byla získána hmotnost bakteriálního peletu. Ten byl resuspendován v S-complete médiu tak, aby výsledná koncentrace bakterií v roztoku byla 60 mg/mL.

Po inkubaci červů na misce s NGM byla populace z povrchu média smyta pomocí 2 mL M9 média, které bylo následně přepipetováno do mikroskopické zkumavky. Suspenze byla centrifugována přibližně 20 sekund tak, aby červi vytvořili na dně mikroskopické zkumavky pelet. Supernatant byl opatrně odstraněn a byl přidán 1 mL roztoku pro věkovou synchronizaci, mikroskopické zkumavky byly poté třepány v thermoshakeru (RT, 1500 rpm, 15 min). Poté byly mikroskopické zkumavky centrifugovány přibližně 15 sekund, supernatant byl odstraněn a byl přidán 1 mL M9 roztoku. Dále byla suspenze 2x promyta M9 roztokem tak, aby byl odstraněn všechen roztok pro věkovou synchronizaci. Po promytí byl pelet obsahující pouze nevylihnutá vajíčka přenesen do 15 mL zkumavky pomocí 5 mL S-complete média, kde byli červi inkubováni při 20 °C po dobu 24 h.

### **6.5.3. Testování antihelmintické aktivity**

Bylo spočítáno množství červů, kteří se během 24hodinové inkubace vylíhli, na objem 1 mL. Do S-complete média s čerstvě vylíhnutými červy bylo přidáno připravené S-complete médium s bakteriemi o koncentraci 60 mg/mL tak, aby výsledná koncentrace bakterií v médiu byla 3 mg/mL. Následně byla takto připravená suspenze napipetována do jamek 96 jamkové desky tak, aby v každé jamce bylo cca 20 červů.

Testované látky byly rozpuštěny v DMSO a následně přidány do jamek s červy, jejich finální koncentrace byly 50  $\mu\text{mol/l}$  a 5  $\mu\text{mol/l}$ . Jako negativní kontrola bylo použito DMSO o koncentracích 0,1 % a 0,01 %. Jako pozitivní kontrola byl použit ivermektin o koncentracích 1  $\mu\text{mol/l}$  a 0,1  $\mu\text{mol/l}$ . Pro obě koncentrace bylo vždy testování provedeno jako technický triplikát. Deska byla zalepena fólií a byla nechána inkubovat na třepačce při 150 rpm, při teplotě 20 °C po dobu 4 dnů.

Po inkubaci byly jamky pomocí mikroskopu vizuálně zhodnoceny a každé jamce bylo přiděleno skóre (mrtvá populace/úplné zastavení vývoje/zpomalení vývoje/zpomalený pohyb jedinců a méně potomstva/populace je v pořádku).

#### **6.5.3.1. Chitinasový test**

Do jamek byl po vizuálním zhodnocení napipetován substrát pro chitinasu – 1,5  $\mu\text{l}$  0,8 mM roztoku 4-methylumbelliferyl  $\beta$ -D-N,N',N''-triacetylchitotriosidu uchovávaného při -20 °C. Desky byly inkubovány při 37 °C po dobu 1 h. Poté bylo do každé jamky přidáno 50  $\mu\text{l}$  chitinasového pufru a pomocí readeru byla měřena fluorescence jamek při excitaci 360 nm a emisi 460 nm. Signály z jednotlivých replikátů byly zprůměrovány a procentuálně vztaženy k negativní kontrole.

## 7. Použitá literatura

- (1) Moore, B. D.; Andrew, R. L.; Külheim, C.; Foley, W. J. Explaining Intraspecific Diversity in Plant Secondary Metabolites in an Ecological Context. *New Phytologist* **2014**, *201* (3), 733–750. <https://doi.org/10.1111/nph.12526>.
- (2) Benkendorff, K. Molluscan Biological and Chemical Diversity: Secondary Metabolites and Medicinal Resources Produced by Marine Molluscs. *Biological Reviews* **2010**, *85* (4), 757–775. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2010.00124.x>.
- (3) Schmitz, R. Friedrich Wilhelm Sertürner and the Discovery of Morphine. *Pharmacy in history* **1985**, *27* (2), 61–74. <https://doi.org/41109546>.
- (4) Hadacek, F. Secondary Metabolites as Plant Traits: Current Assessment and Future Perspectives. *CRC Crit Rev Plant Sci* **2002**, *21* (4), 273–322. <https://doi.org/10.1080/0735-260291044269>.
- (5) 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>.
- (6) Cheng, A. X.; Lou, Y. G.; Mao, Y. B.; Lu, S.; Wang, L. J.; Chen, X. Y. Plant Terpenoids: Biosynthesis and Ecological Functions. *J Integr Plant Biol* **2007**, *49* (2), 179–186. <https://doi.org/10.1111/j.1672-9072.2006.00395.x>.
- (7) Ludwiczuk, A.; Skalicka-Woźniak, K.; Georgiev, M. I. Terpenoids. In *Pharmacognosy*; Elsevier, **2017**; pp 233–266. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802104-0.00011-1>.
- (8) Kabera, J. N.; Semana, E.; Mussa, A. R.; He, X. Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological Properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2014**, *2*, 377–392.
- (9) Article, R.; Kaur, R.; Arora, S. Alkaloids-important therapeutic secondary metabolites of plant origin. *J Crit Rev* **2015**, *2* (3), 1–8.
- (10) Kukula-Koch, W. A.; Widelski, J. Alkaloids. *Pharmacognosy: Fundamentals, Applications and Strategy* **2017**, 163–198. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802104-0.00009-3>.
- (11) von Linné, C. Biological Significance of Alkaloids. In *Alkaloids - Secrets of Life*; Elsevier, **2007**; pp 141–180. <https://doi.org/10.1016/B978-044452736-3/50005-2>.
- (12) *Papaver somniferum*. <https://www.flickr.com/photos/24102780@N03/3702843836> (accessed 2022-12-15).
- (13) Drewnowski, A. The Science and Complexity of Bitter Taste. *Nutr Rev* **2009**, *59* (6), 163–169. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2001.tb07007.x>.
- (14) Dai, J.; Mumper, R. J. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules* **2010**, *15* (10), 7313–7352. <https://doi.org/10.3390/molecules15107313>.
- (15) Levin, D. A. Plant Phenolics: An Ecological Perspective. *Am Nat* **1971**, *105* (942), 157–181. <https://doi.org/10.1086/282712>.

- (16) Prior, R. L.; Wu, X. Anthocyanins: Structural Characteristics That Result in Unique Metabolic Patterns and Biological Activities. *Free Radic Res* **2006**, *40* (10), 1014–1028. <https://doi.org/10.1080/10715760600758522>.
- (17) Aharoni, A.; Galili, G. Metabolic Engineering of the Plant Primary-Secondary Metabolism Interface. *Curr Opin Biotechnol* **2011**, *22* (2), 239–244. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.11.004>.
- (18) Khare, S.; Singh, N. B.; Singh, A.; Hussain, I.; Niharika, K.; Yadav, V.; Bano, C.; Yadav, R. K.; Amist, N. Plant Secondary Metabolites Synthesis and Their Regulations under Biotic and Abiotic Constraints. *Journal of Plant Biology* **2020**, *63* (3), 203–216. <https://doi.org/10.1007/s12374-020-09245-7>.
- (19) Verpoorte, R. Secondary Metabolism. In *Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolism*; Springer Netherlands: Dordrecht, **2000**; pp 1–29. [https://doi.org/10.1007/978-94-015-9423-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-94-015-9423-3_1).
- (20) Prinsloo, G.; Nogemane, N. The Effects of Season and Water Availability on Chemical Composition, Secondary Metabolites and Biological Activity in Plants. *Phytochemistry Reviews* **2018**, *17* (4), 889–902. <https://doi.org/10.1007/s11101-018-9567-z>.
- (21) Hay, M. E.; Fenical, W. Marine Plant-Herbivore Interactions: The Ecology of Chemical Defense. In *Source: Annual Review of Ecology and Systematics*; **1988**; Vol. 19, pp 111–156. <https://doi.org/2097150>.
- (22) Gross, E. M.; Bakker, E. S. The Role of Plant Secondary Metabolites in Freshwater Macrophyte–Herbivore Interactions. In *The Ecology of Plant Secondary Metabolites*; Cambridge University Press, **2012**; pp 154–169. <https://doi.org/10.1017/cbo9780511675751.009>.
- (23) Seigler, D. S. Phenylpropanoids. In *Plant Secondary Metabolism*; Springer US: Boston, MA, **1998**; pp 106–129. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4913-0\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4913-0_8).
- (24) Whiting, D. A. Ligans and Neolignans. *Nat Prod Rep* **1985**, *2* (3), 191–211. <https://doi.org/10.1039/np9850200191>.
- (25) Thomas, J.; Kuruvilla, K. M. Cinnamon. *Handbook of Herbs and Spices: Second Edition* **2012**, *1*, 182–196. <https://doi.org/10.1533/9780857095671.182>.
- (26) Sharma, U. K.; Sharma, A. K.; Pandey, A. K. Medicinal Attributes of Major Phenylpropanoids Present in Cinnamon. *BMC Complement Altern Med* **2016**, *16* (1). <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1147-4>.
- (27) Lewis, N. G.; Davin, L. B. Evolution of Lignan and Neolignan Biochemical Pathways; **1994**; pp 202–246. <https://doi.org/10.1021/bk-1994-0562.ch010>.
- (28) Solecka, D. Role of Phenylpropanoid Compounds in Plant Responses to Different Stress Factors. *Acta Physiol Plant* **1997**, *19* (3), 257–268. <https://doi.org/10.1007/s11738-997-0001-1>.
- (29) Doney, S. C.; Fabry, V. J.; Feely, R. A.; Kleypas, J. A. Ocean Acidification: The Other CO<sub>2</sub> Problem. *Ann Rev Mar Sci* **2009**, *1*, 169–192. <https://doi.org/10.1146/annurev.marine.010908.163834>.
- (30) Arnold, T.; Mealey, C.; Leahey, H.; Miller, A. W.; Hall-Spencer, J. M.; Milazzo, M.; Maers, K. Ocean Acidification and the Loss of Phenolic Substances in Marine Plants. *PLoS One* **2012**, *7* (4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035107>.

- (31) Abhilash, M.; Thomas, D. Biopolymers for Biocomposites and Chemical Sensor Applications. In *Biopolymer Composites in Electronics*; Elsevier Inc., **2017**; pp 405–435. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809261-3.00015-2>.
- (32) Vanholme, R.; Demedts, B.; Morreel, K.; Ralph, J.; Boerjan, W. Lignin Biosynthesis and Structure. *Plant Physiol* **2010**, *153* (3), 895–905. <https://doi.org/10.1104/pp.110.155119>.
- (33) Lewis, N. G.; Yamamoto, E. Lignin: Occurrence, Biogenesis and Biodegradation. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **1990**, *41* (1), 455–496. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.41.060190.002323>.
- (34) 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*. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104284>.
- (35) Gottlieb, O. R. Neolignans; **1978**; pp 1–72. [https://doi.org/10.1007/978-3-7091-8505-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-7091-8505-6_1).
- (36) Shiro Suzuki, T. U. \* and M. S. Norlignan Biosynthesis in *Asparagus Officinalis* L.: The Norlignan Originates from Two Non-Identical Phenylpropane Units. *J Chem Soc Perkin 1* **2001**, No. 24, 3252–3257. <https://doi.org/10.1039/b107949b>.
- (37) Teponno, R. B.; Kusari, S.; Spiteller, M. Recent Advances in Research on Lignans and Neolignans. *Nat Prod Rep* **2016**, *33* (9), 1044–1092. <https://doi.org/10.1039/c6np00021e>.
- (38) Li, Y.; Xie, S.; Ying, J.; Wei, W.; Gao, K. Chemical Structures of Lignans and Neolignans Isolated from Lauraceae. *Molecules* **2018**, *23* (12). <https://doi.org/10.3390/molecules23123164>.
- (39) Zhang, J.; Chen, J.; Liang, Z.; Zhao, C. New Lignans and Their Biological Activities. *Chem Biodivers* **2014**, *11* (1), 1–54. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201100433>.
- (40) Haworth, R. D. The Chemistry of the Lignan Group of Natural Products. *Journal of the Chemical Society (Resumed)* **1942**, *21*, 448–456. <https://doi.org/10.1039/jr9420000448>.
- (41) Weaver, L. M.; Herrmann, K. M. Dynamics of the Shikimate Pathway in Plants. *Trends Plant Sci* **1997**, *2* (9), 346–351. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(97\)84622-5](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(97)84622-5).
- (42) Herrmann, K. M. The Shikimate Pathway as an Entry to Aromatic Secondary Metabolism. *Plant Physiol* **1995**, *107* (1), 7–12. <https://doi.org/10.1104/pp.107.1.7>.
- (43) Herrmann, K. M.; Weaver, L. M. The Shikimate Pathway. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **1999**, *50* (1), 473–503. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.50.1.473>.
- (44) Dong, J. Y.; Wang, L.; Song, H. C.; Wang, L. M.; Shen, K. Z.; Sun, R.; Li, G. H.; Li, L.; Zhang, K. Q. Ophiocerosol, a Novel Macrocyclic Neolignan from the Aquatic Fungus *Ophioceras Dolichostomum* YMF1.00988. *Nat Prod Res* **2010**, *24* (11), 1004–1012. <https://doi.org/10.1080/14786410902854126>.
- (45) *Ophioceras dolichostomum*. <https://www.gbif.org/species/5486261> (accessed 2022-11-27).

- (46) Huhndorf, S. M.; Greif, M.; Mugambi, G. K.; Miller, A. N. Two New Genera in the Magnaporthaceae, a New Addition to Ceratosphaeria and Two New Species of Lentomitella. *Mycologia* **2008**, *100* (6), 940–955. <https://doi.org/10.3852/08-037>.
- (47) Bermudez, J.; Davies, C.; Simonazzi, A.; Pablo Real, J.; Palma, S. Current Drug Therapy and Pharmaceutical Challenges for Chagas Disease. *Acta Trop* **2016**, *156*, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.12.017>.
- (48) Kubanek, J.; Fenical, W.; Hay, M. E.; Brown, P. J.; Lindquist, N. Two Antifeedant Lignans from the Freshwater Macrophyte *Saururus Cernuus*. *Phytochemistry* **2000**, *54* (3), 281–287. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00076-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00076-5).
- (49) Brito, J. R.; da Costa-Silva, T. A.; Tempone, A. G.; Ferreira, E. A.; Lago, J. H. G. Dibenzylbutane Neolignans from *Saururus Cernuus* L. (Saururaceae) Displayed Anti-Trypanosoma Cruzi Activity via Alterations in the Mitochondrial Membrane Potential. *Fitoterapia* **2019**, *137*. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2019.104251>.
- (50) *Saururus cernuus*. <https://www.inaturalist.org/observations/73871771> (accessed 2022-11-28).
- (51) Mangialasche, F.; Solomon, A.; Winblad, B.; Mecocci, P.; Kivipelto, M. Alzheimer's Disease: Clinical Trials and Drug Development. *Lancet Neurol* **2010**, *9* (7), 702–716. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70119-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70119-8).
- (52) Gu, X.; Sun, J.; Li, S.; Wu, X.; Li, L. Oxidative Stress Induces DNA Demethylation and Histone Acetylation in SH-SY5Y Cells: Potential Epigenetic Mechanisms in Gene Transcription in A $\beta$  Production. *Neurobiol Aging* **2013**, *34* (4), 1069–1079. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2012.10.013>.
- (53) Zhou, L.; Lou, L. L.; Wang, W.; Lin, B.; Chen, J. N.; Wang, X. B.; Huang, X. X.; Song, S. J. Enantiomeric 8-O-4' Type Neolignans from Red Raspberry as Potential Inhibitors of  $\beta$ -Amyloid Aggregation. *J Funct Foods* **2017**, *37*, 322–329. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.08.007>.
- (54) *Mikronutrienty v R. idaeus*. <https://nutrientoptimiser.com/nutritional-value-raspberries-raw/> (accessed 2023-03-19).
- (55) Chang, C. L.; Zhang, L. J.; Chen, R. Y.; Kuo, L. M. Y.; Huang, J. P.; Huang, H. C.; Lee, K. H.; Wu, Y. C.; Kuo, Y. H. Antioxidant and Anti-Inflammatory Phenylpropanoid Derivatives from *Calamus Quiquesetinervius*. *J Nat Prod* **2010**, *73* (9), 1482–1488. <https://doi.org/10.1021/np100181c>.
- (56) Lee, J.; Kim, D.; Choi, J.; Choi, H.; Ryu, J. H.; Jeong, J.; Park, E. J.; Kim, S. H.; Kim, S. Dehydrodiconiferyl Alcohol Isolated from *Cucurbita Moschata* Shows Anti-Adipogenic and Anti-Lipogenic Effects in 3T3-L1 Cells and Primary Mouse Embryonic Fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry* **2012**, *287* (12), 8839–8851. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.263434>.
- (57) Rao, L.; You, Y. X.; Su, Y.; Fan, Y.; Liu, Y.; He, Q.; Chen, Y.; Meng, J.; Hu, L.; Li, Y.; Xu, Y. K.; Lin, B.; Zhang, C. R. Lignans and Neolignans with Antioxidant and Human Cancer Cell Proliferation Inhibitory Activities from *Cinnamomum Bejolghota* Confirm Its Functional Food Property. *J Agric Food Chem* **2020**, *68* (33), 8825–8835. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c02885>.

- (58) Bitam, F.; Ciavatta, M. L.; Manzo, E.; Villani, G.; Gavagnin, M. The First Record of Neolignans from the Marine Phanerogam *Posidonia Oceanica*. *Phytochem Lett* **2012**, *5* (4), 696–699. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2012.06.016>.
- (59) Kaal, J.; Serrano, O.; Nierop, K. G. J.; Schellekens, J.; Martínez Cortizas, A.; Mateo, M. Á. Molecular Composition of Plant Parts and Sediment Organic Matter in a Mediterranean Seagrass (*Posidonia Oceanica*) Mat. *Aquat Bot* **2016**, *133*, 50–61. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2016.05.009>.
- (60) *Posidonia oceanica*. <https://flic.kr/p/5p1B9B> (accessed 2022-12-16).
- (61) Heglmeier, A.; Zidorn, C. Secondary Metabolites of *Posidonia Oceanica* (Posidoniaceae). *Biochem Syst Ecol* **2010**, *38* (5), 964–970. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2010.07.001>.
- (62) Barbušćáková, Z.; Kozubíková, H.; Zálešák, F.; Doležal, K.; Pospíšil, J. General Approach to Neolignan-Core of the Boehmenan Natural Product Family. *Monatsh Chem* **2018**, *149* (4), 737–748. <https://doi.org/10.1007/s00706-017-2132-4>.
- (63) Moujir, L.; Seca, A. M. L.; Silva, A. M. S.; López, M. R.; Padilla, N.; Cavaleiro, J. A. S.; Neto, C. P. Cytotoxic Activity of Lignans from *Hibiscus Cannabinus*. *Fitoterapia* **2007**, *78* (5), 385–387. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2007.03.010>.
- (64) Tuna, P. Syntéza a Biologická Aktivita Fenylypropanoidových Derivátů: Vývoj Syntézy Boehmanu D, Universita Palackého v Olomouci, **2019**.
- (65) Chrenko, D.; Pospíšil, J. Unpublished Results, Palacky University, **2023**.
- (66) Pospíšil, J.; Konrádová, D.; Strnad, M. Antileishmanial Activity of Lignans, Neolignans, and Other Plant Phenols; **2021**; pp 115–176. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-64853-4\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-030-64853-4_3).
- (67) Vacek, J.; Zatloukalová, M.; Vrba, J.; De Vleeschouwer, F.; De Proft, F.; Obluková, M.; Sokolová, R.; Pospíšil, J. Diferulate: A Highly Effective Electron Donor. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2020**, 869, 113950. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2020.113950>.
- (68) 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>
- (69) Grúz, J.; Pospíšil, J.; Kozubíková, H.; Pospíšil, T.; Doležal, K.; Bunzel, M.; Strnad, M. Determination of Free Diferulic, Disinapic and Dicoumaric Acids in Plants and Foods. *Food Chem* **2015**, *171*, 280–286. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.131>.
- (70) Parr, R. G.; Yang, W. Density Functional Approach to the Frontier-Electron Theory of Chemical Reactivity. *J Am Chem Soc* **1984**, *106* (14), 4049–4050. <https://doi.org/10.1021/ja00326a036>.
- (71) Fletcher, S. The Mitsunobu Reaction in the 21st Century. *Organic Chemistry Frontiers* **2015**, *2* (6), 739–752. <https://doi.org/10.1039/C5QO00016E>.
- (72) Steinreiber, A.; Stadler, A.; Mayer, S. F.; Faber, K.; Kappe, C. O. High-Speed Microwave-Promoted Mitsunobu Inversions. Application toward the Deracemization of Sulcatol. *Tetrahedron Lett* **2001**, *42* (36), 6283–6286. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)01248-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)01248-5).

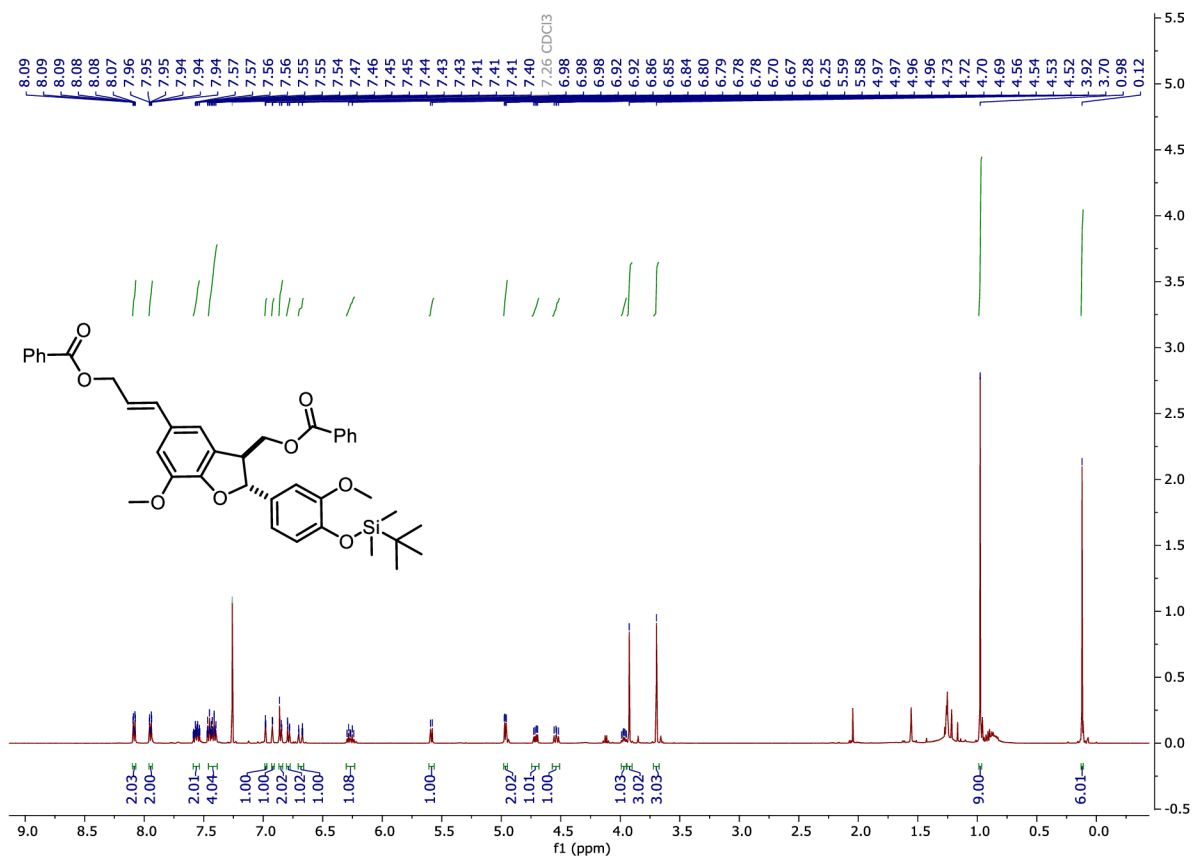
- (73) Manvar, A.; Shah, A. Subtle Mitsunobu Couplings under Super-Heating: The Role of High-Throughput Continuous Flow and Microwave Strategies. *Org Biomol Chem* **2014**, *12* (41), 8112–8124. <https://doi.org/10.1039/c4ob01432d>.
- (74) Hori, H.; Nishida, Y.; Ohri, H.; Meguro, H. Regioselective De-O-Benzoylation with Lewis Acids. *Journal of Organic Chemistry* **1989**, *54* (6), 1346–1353. <https://doi.org/10.1021/jo00267a022>.
- (75) Congreve, M. S.; Davison, E. C.; Fuhry, M. A. M.; Holmes, A. B.; Payne, A. N.; Robinson, R. A.; Ward, S. E. Selective Cleavage of Benzyl Ethers. *Synlett* **1993**, *1993* (09), 663–664. <https://doi.org/10.1055/s-1993-22563>.



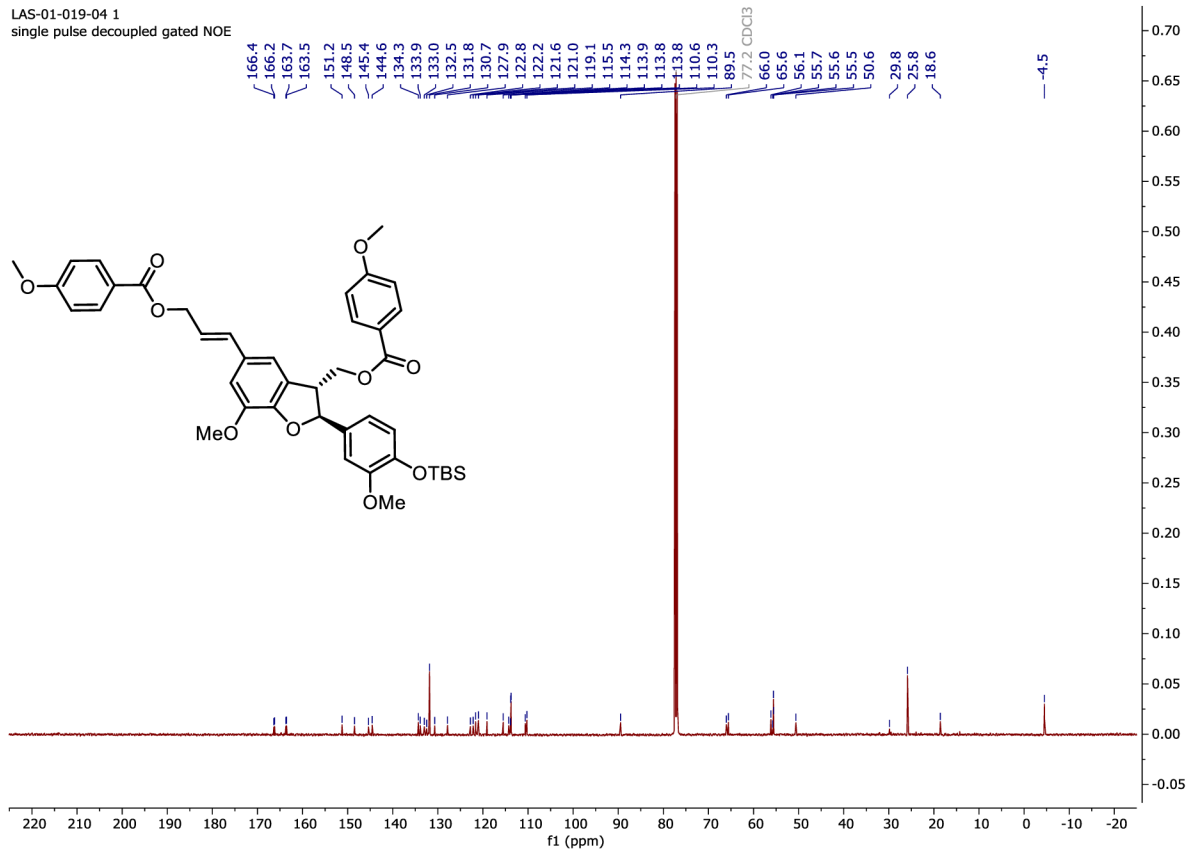
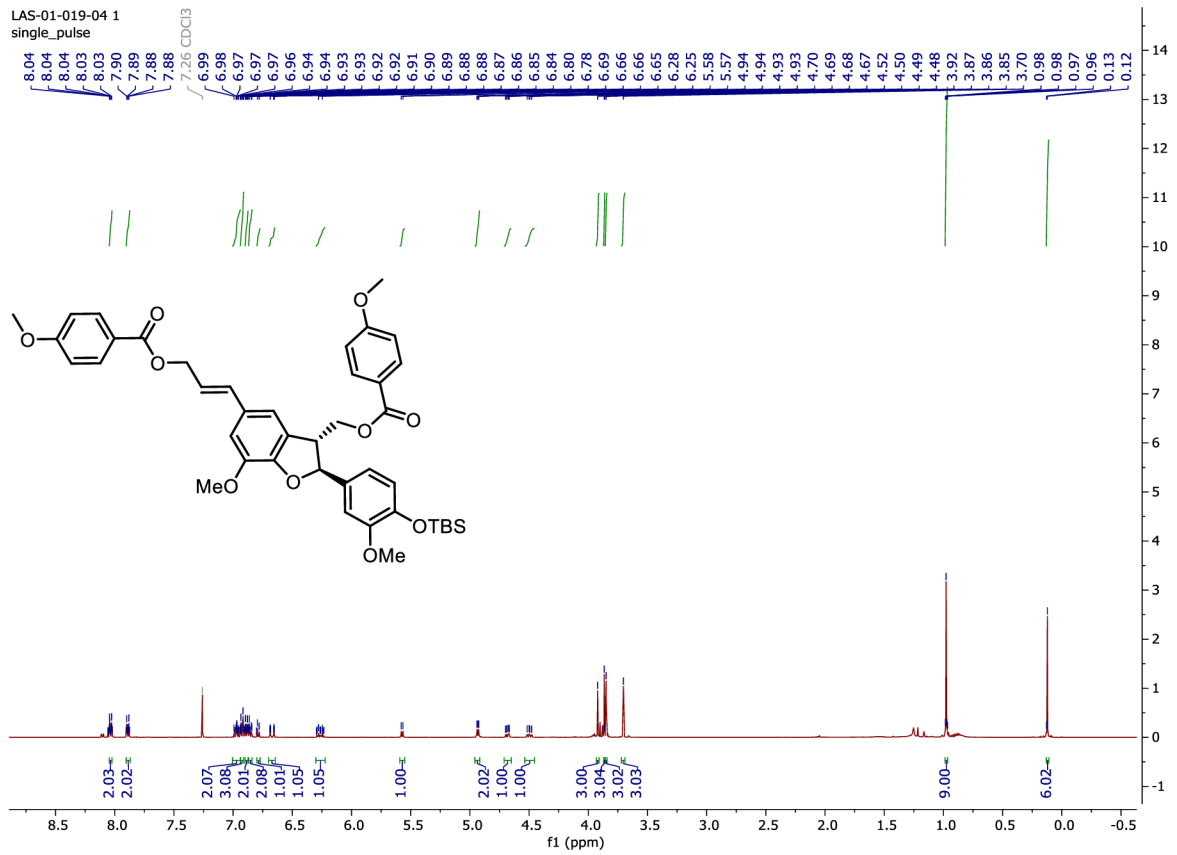
## 8. Přílohy

Kopie  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  spekter  
jednotlivých látek

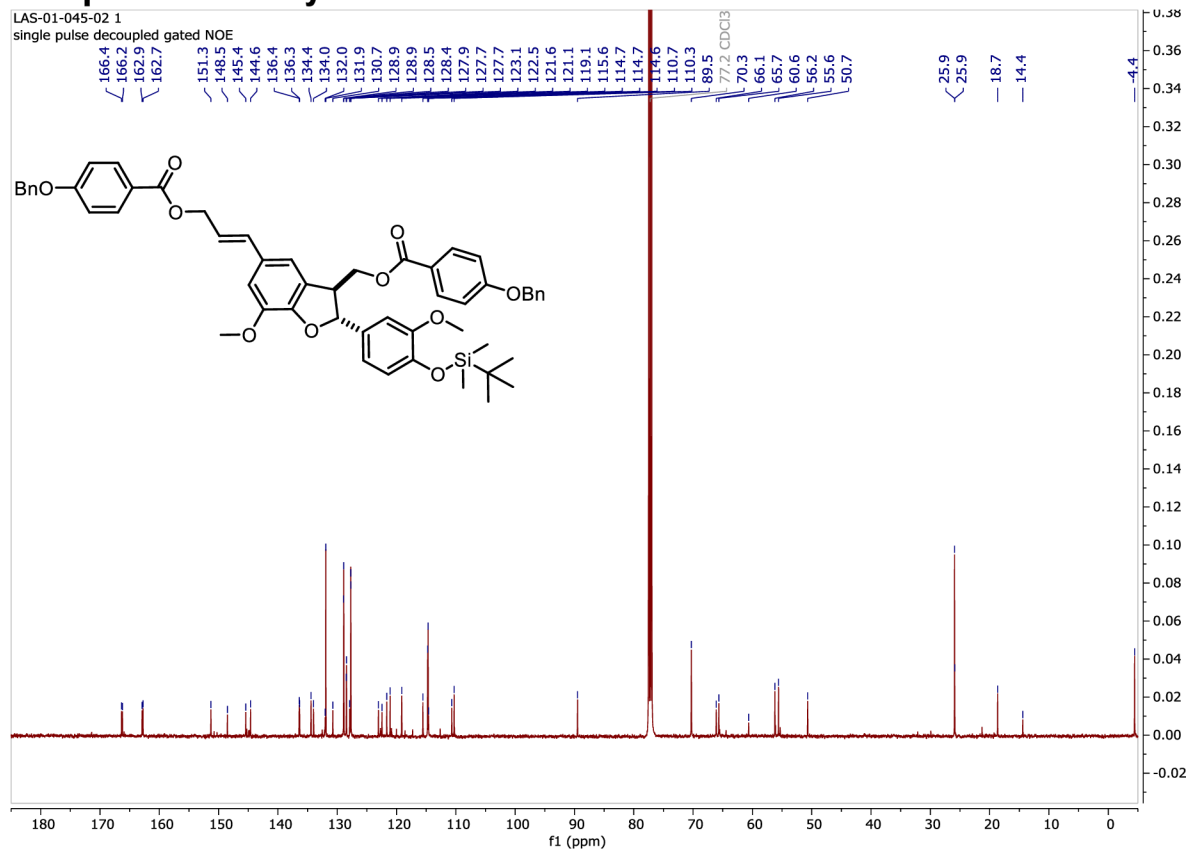
# <sup>1</sup>H spektrum látky VIIa



# $^1\text{H}$ a $^{13}\text{C}$ spektra látky VIIb

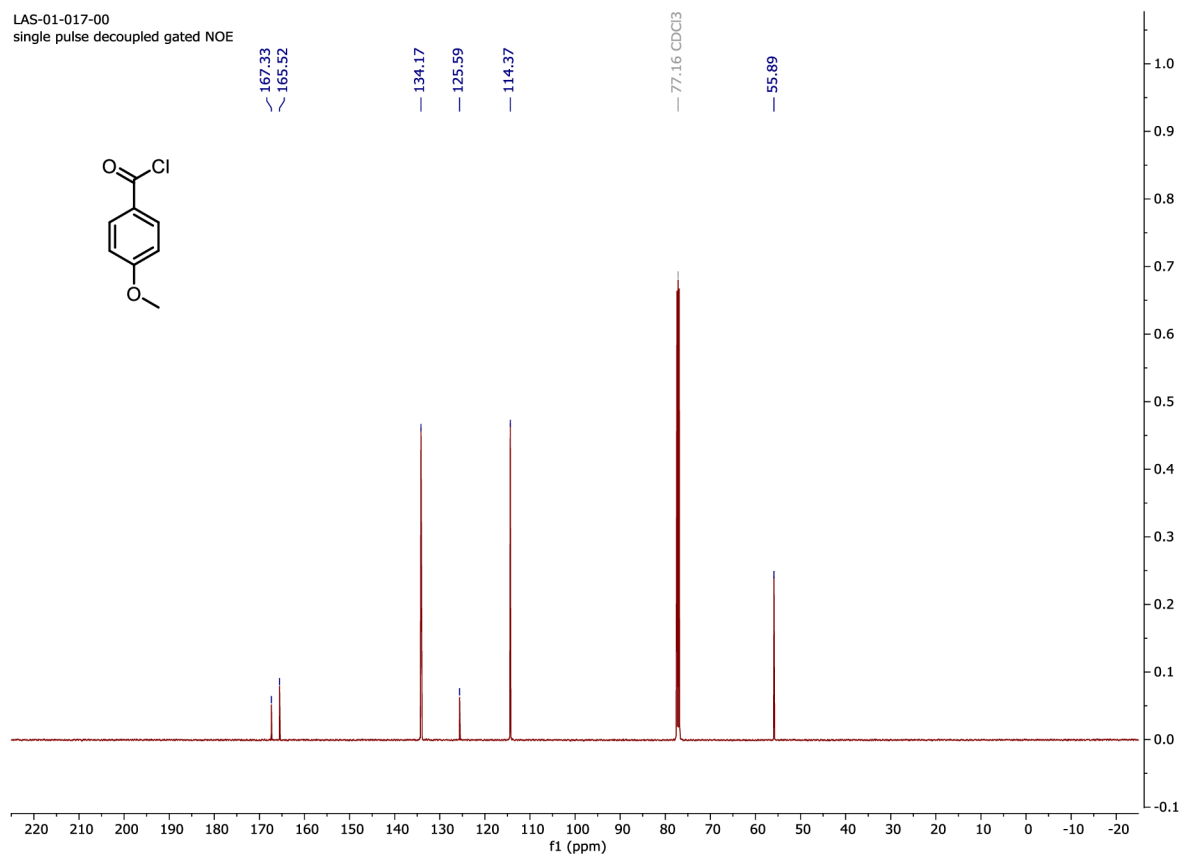


# <sup>13</sup>C NMR spectrum of compound VIIc

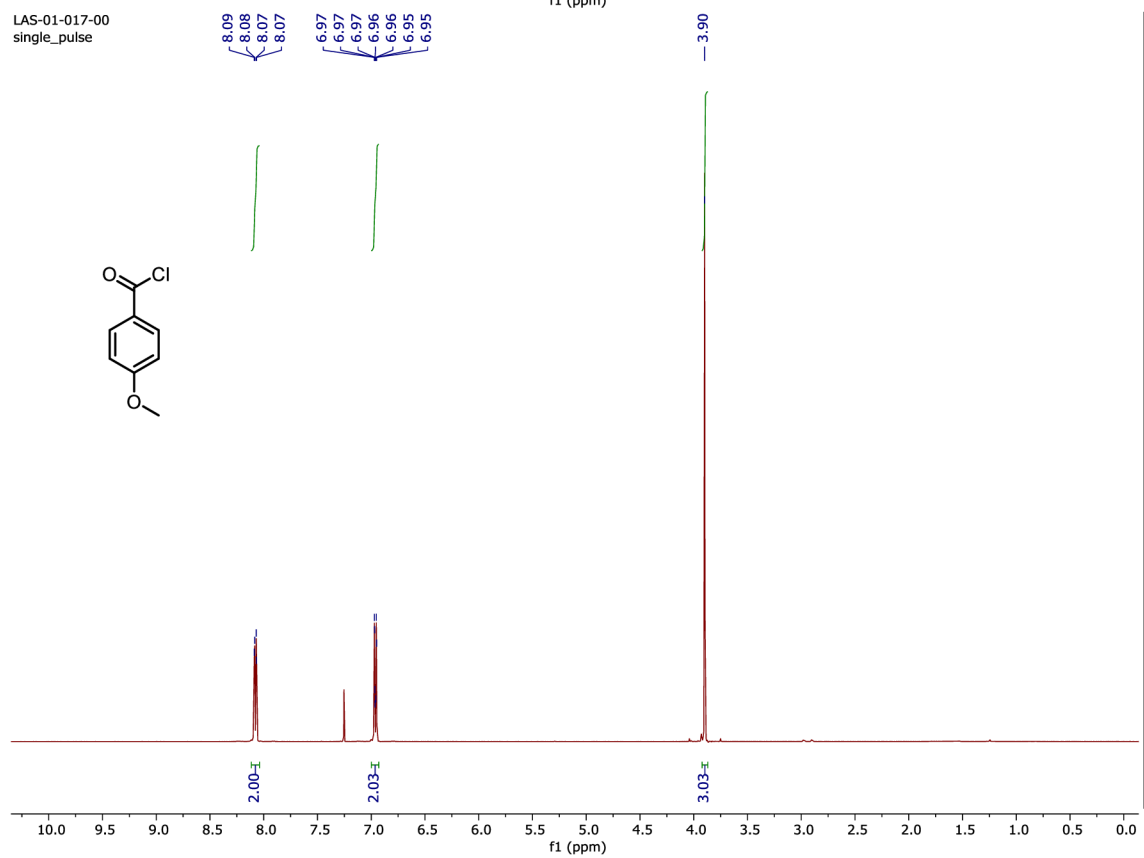


# $^1\text{H}$ a $^{13}\text{C}$ spektra látky VIIIb

LAS-01-017-00  
single pulse decoupled gated NOE

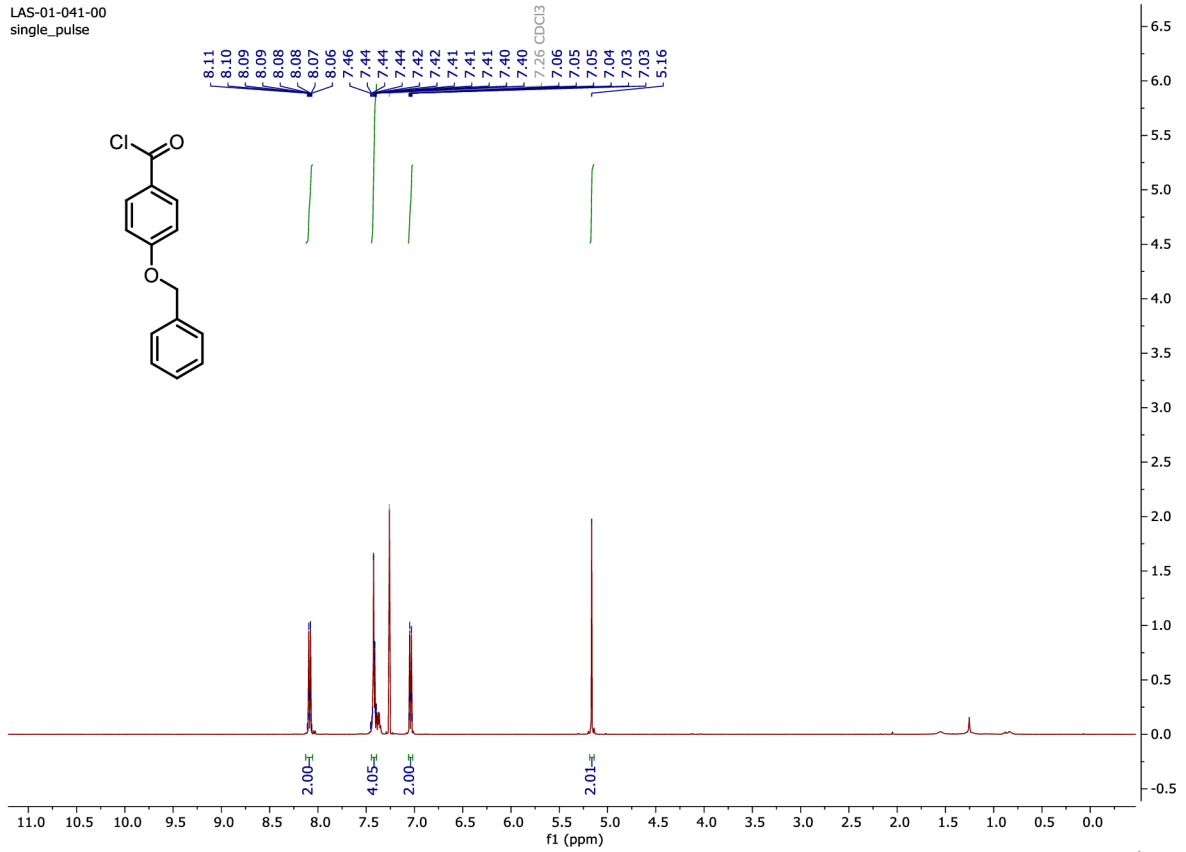


LAS-01-017-00  
single\_pulse

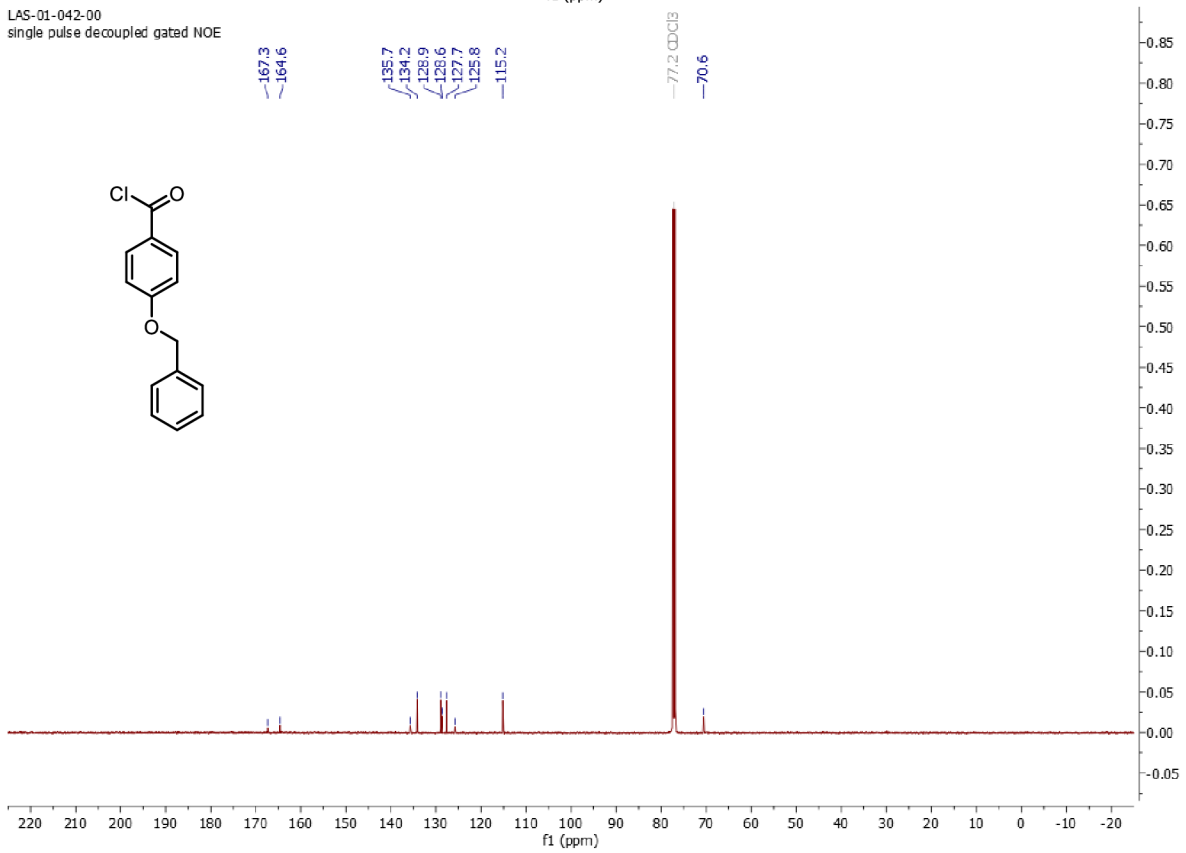


# $^1\text{H}$ a $^{13}\text{C}$ spektra látky VIIIId

LAS-01-041-00  
single\_pulse

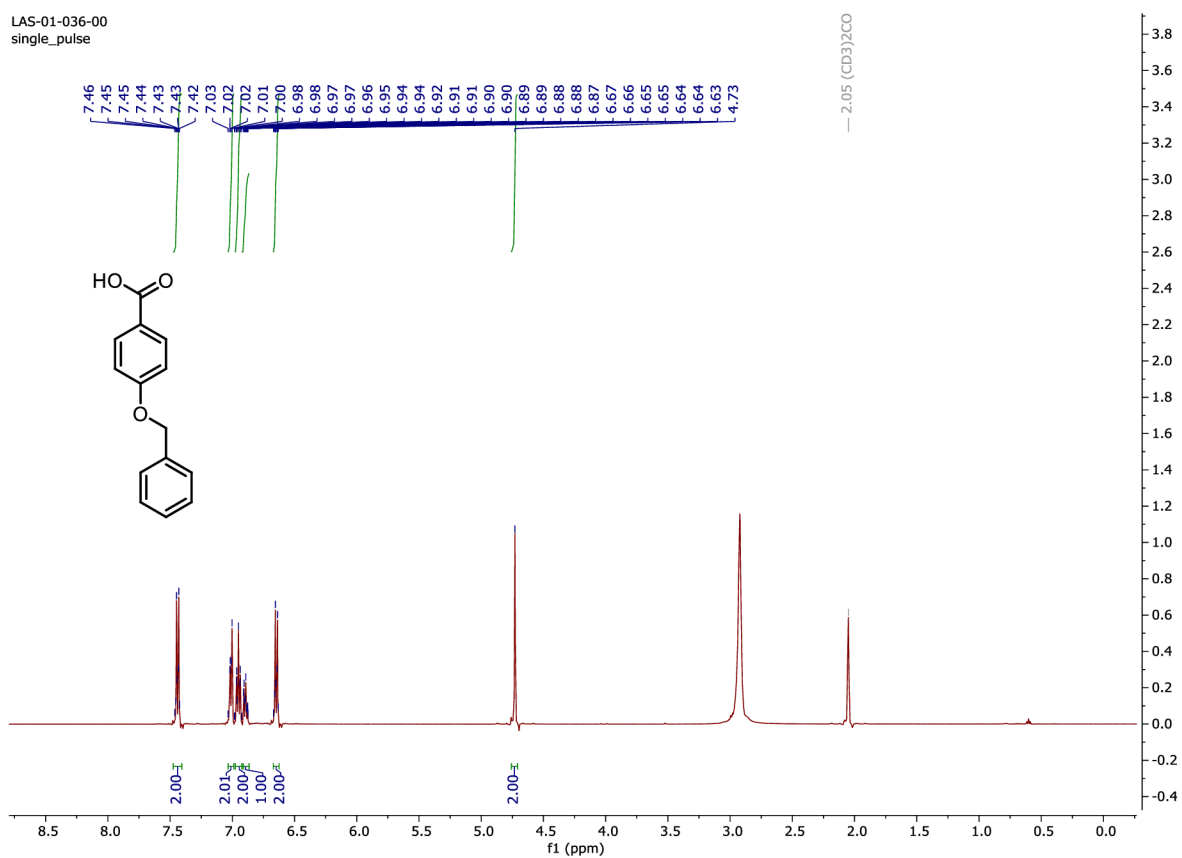


LAS-01-042-00  
single pulse decoupled gated NOE

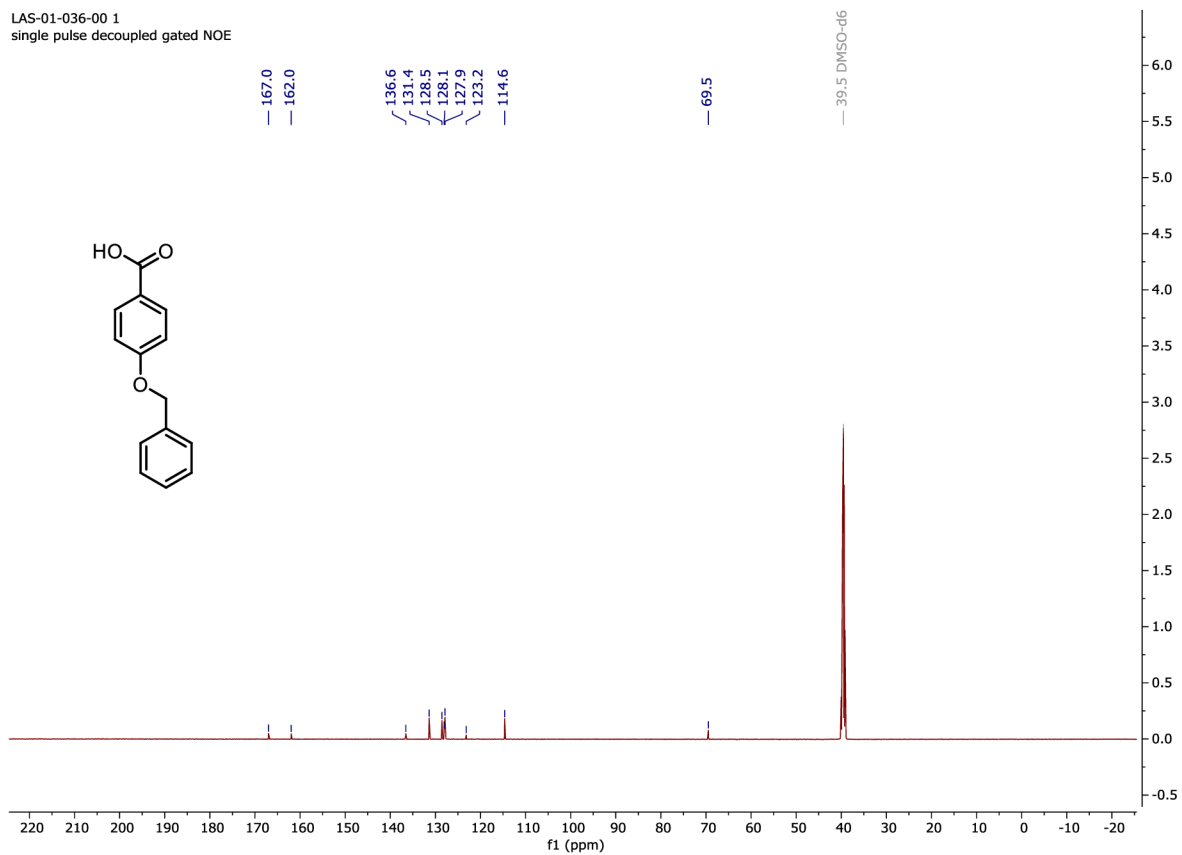


# $^1\text{H}$ a $^{13}\text{C}$ spektra látky IXc

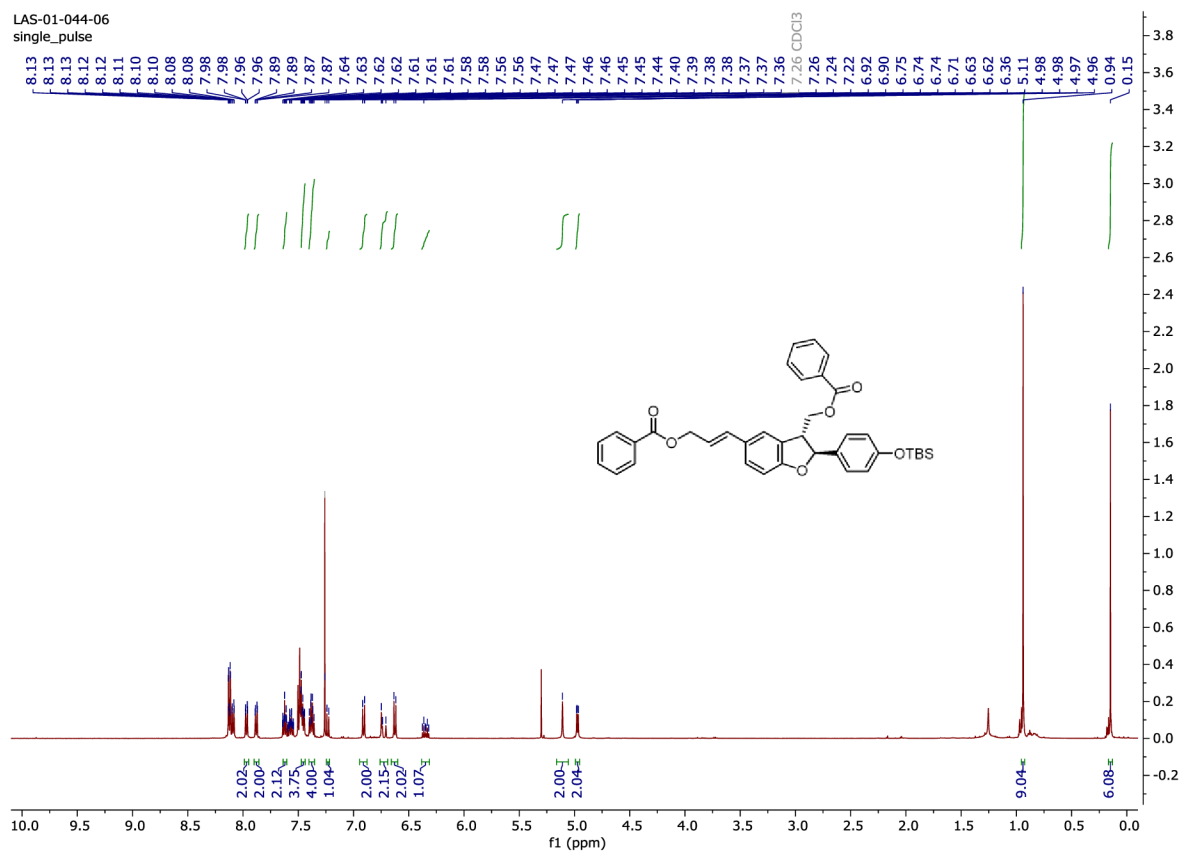
LAS-01-036-00  
single\_pulse



LAS-01-036-00 1  
single\_pulse decoupled gated NOE

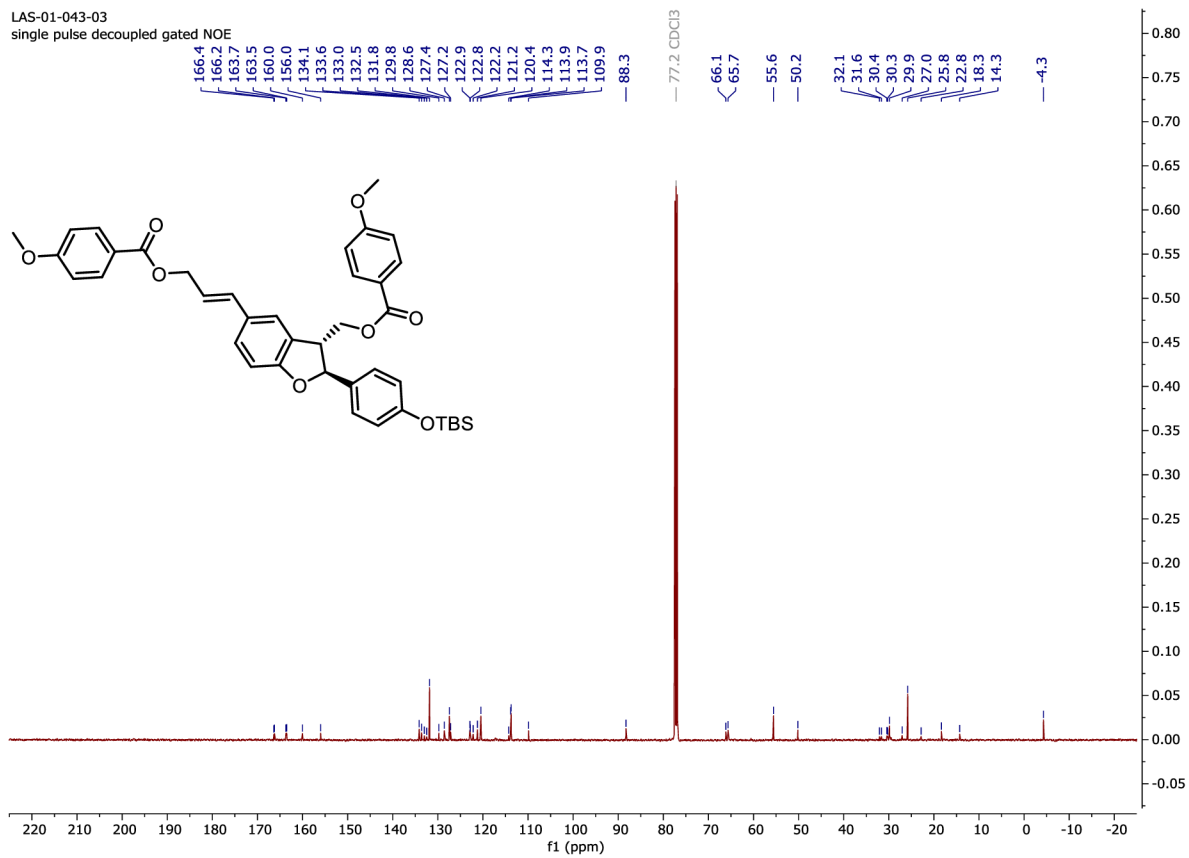
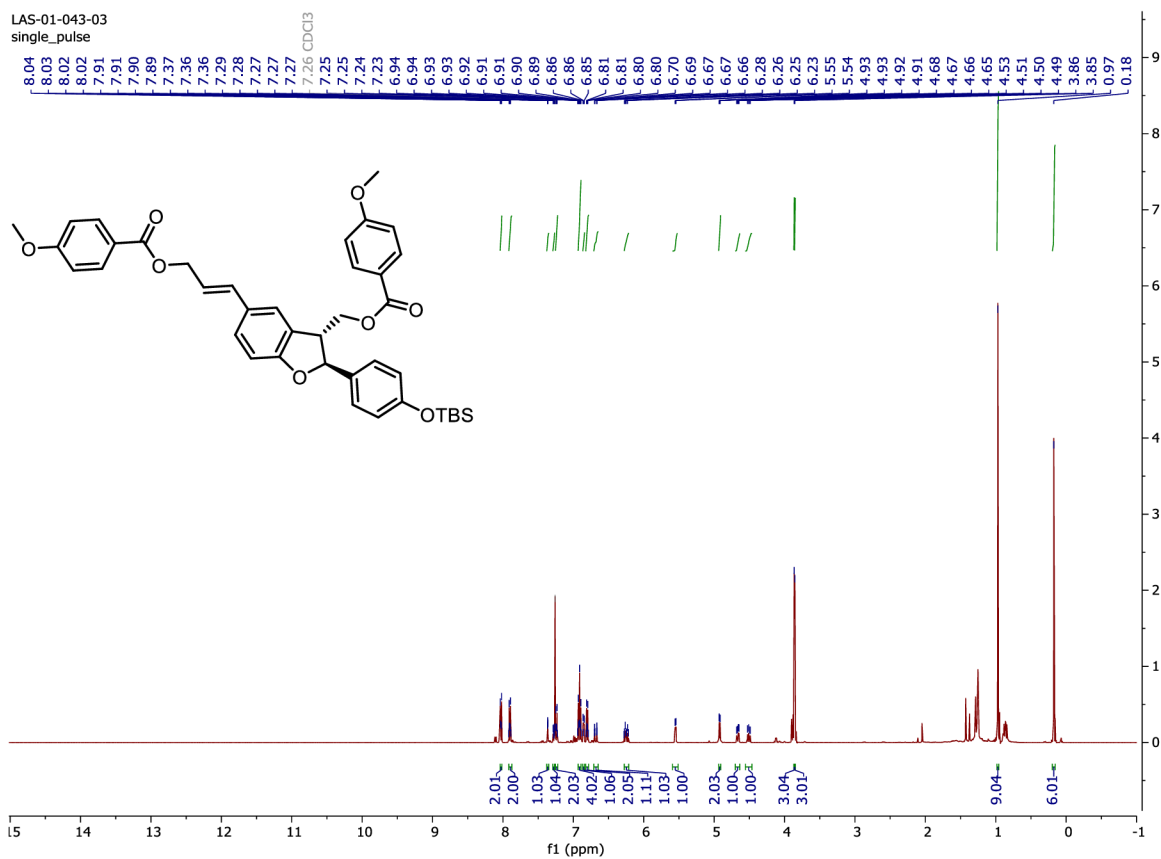


# <sup>1</sup>H spektrum látky XIa



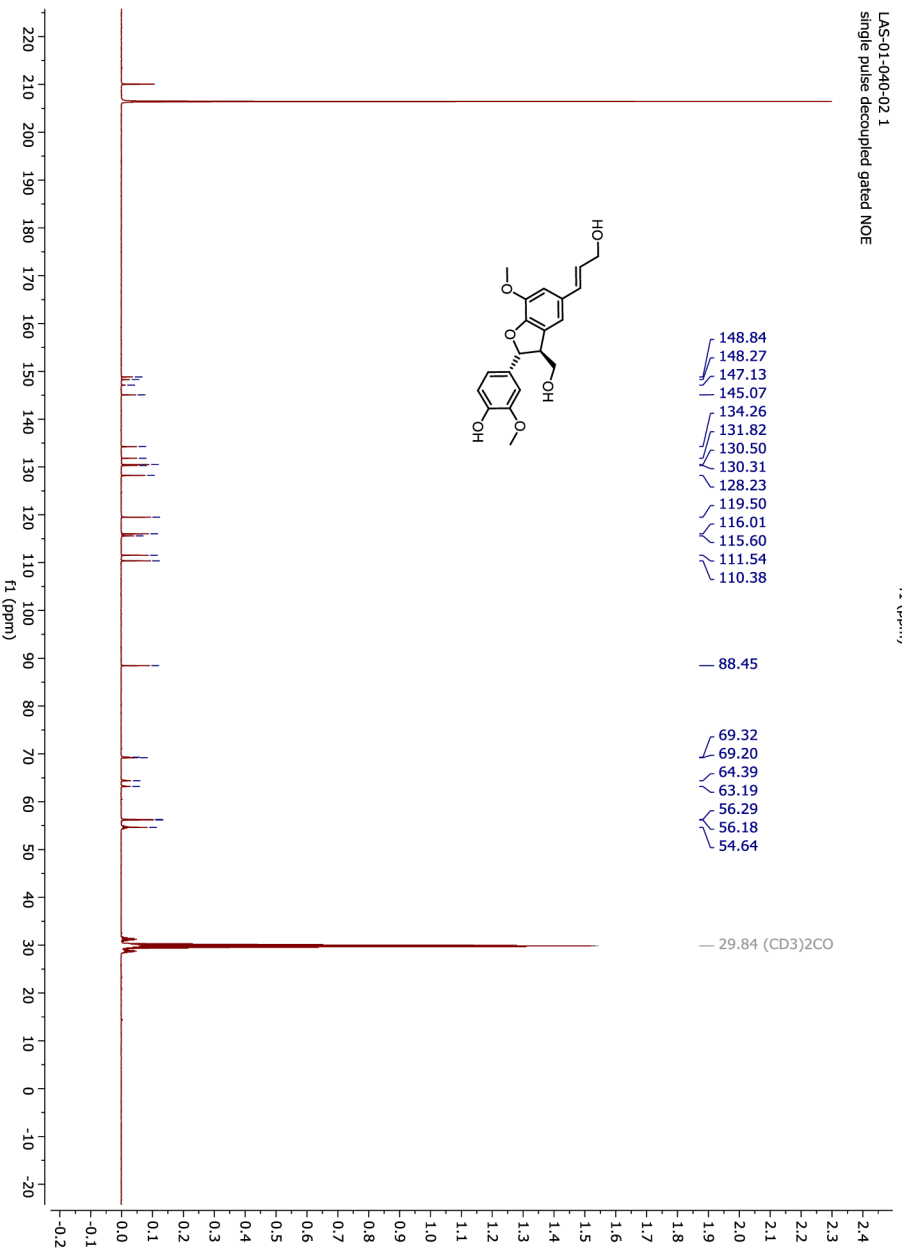
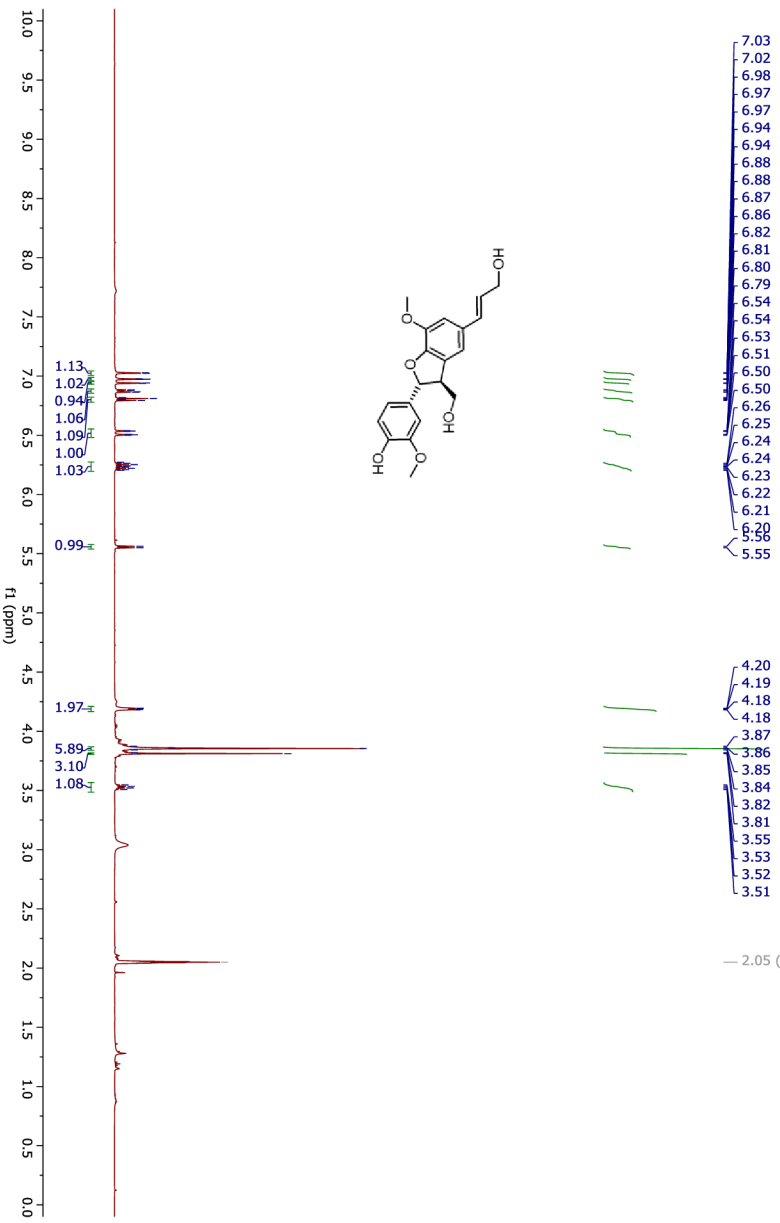


# $^1\text{H}$ a $^{13}\text{C}$ spektra látky XIb

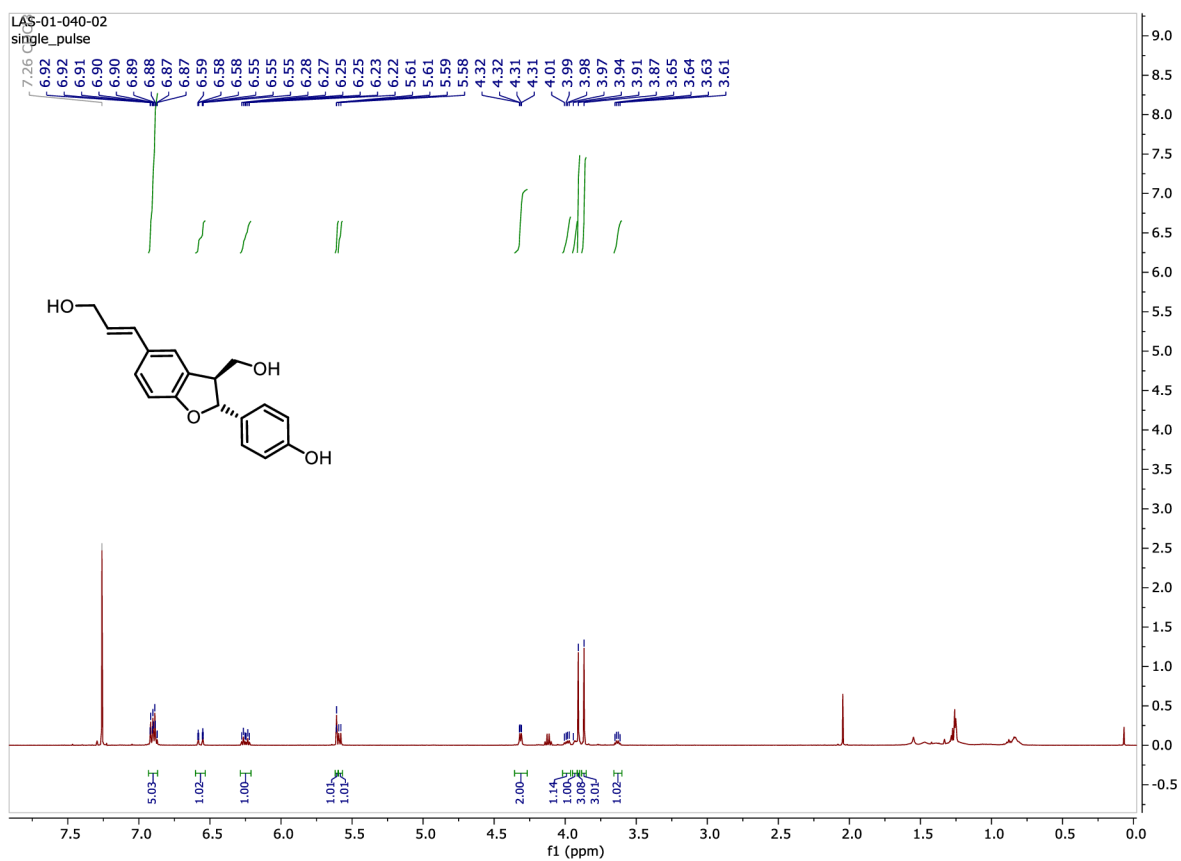


# <sup>1</sup>H & <sup>13</sup>C NMR spektra látky XII

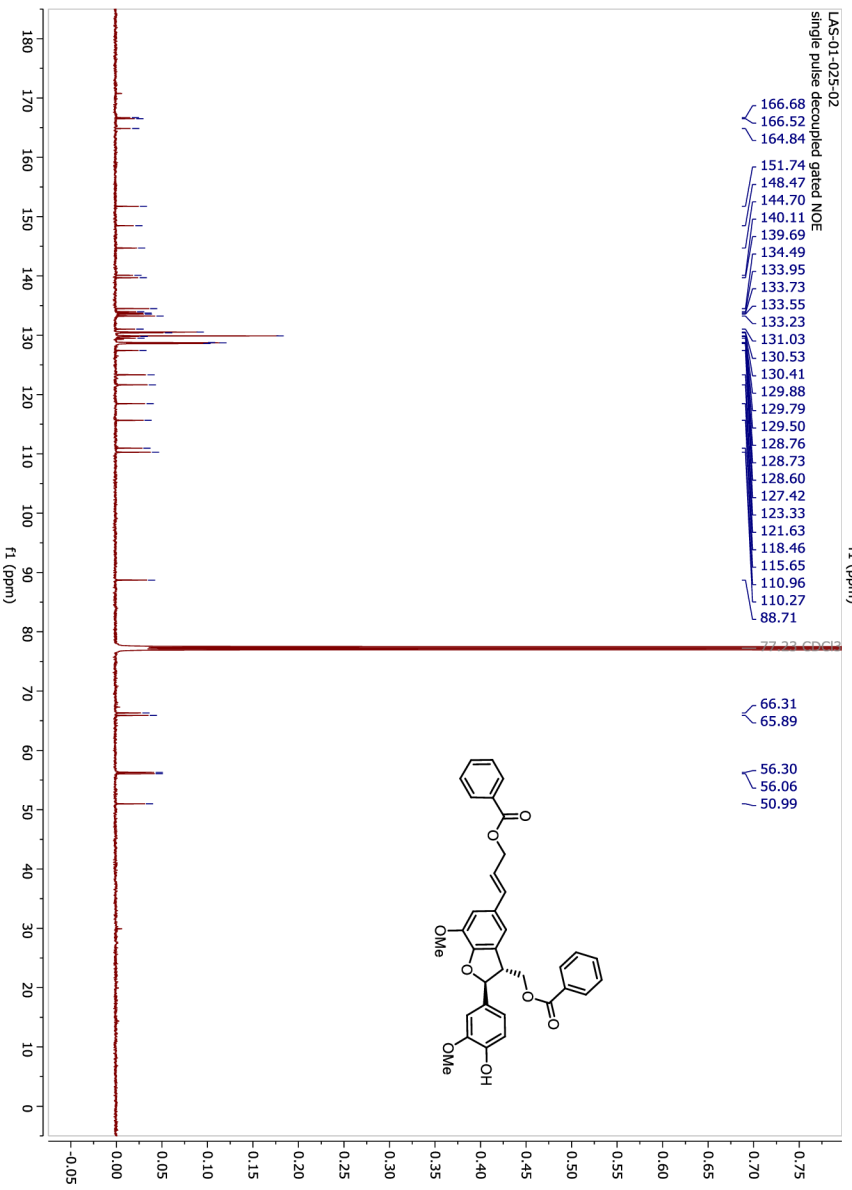
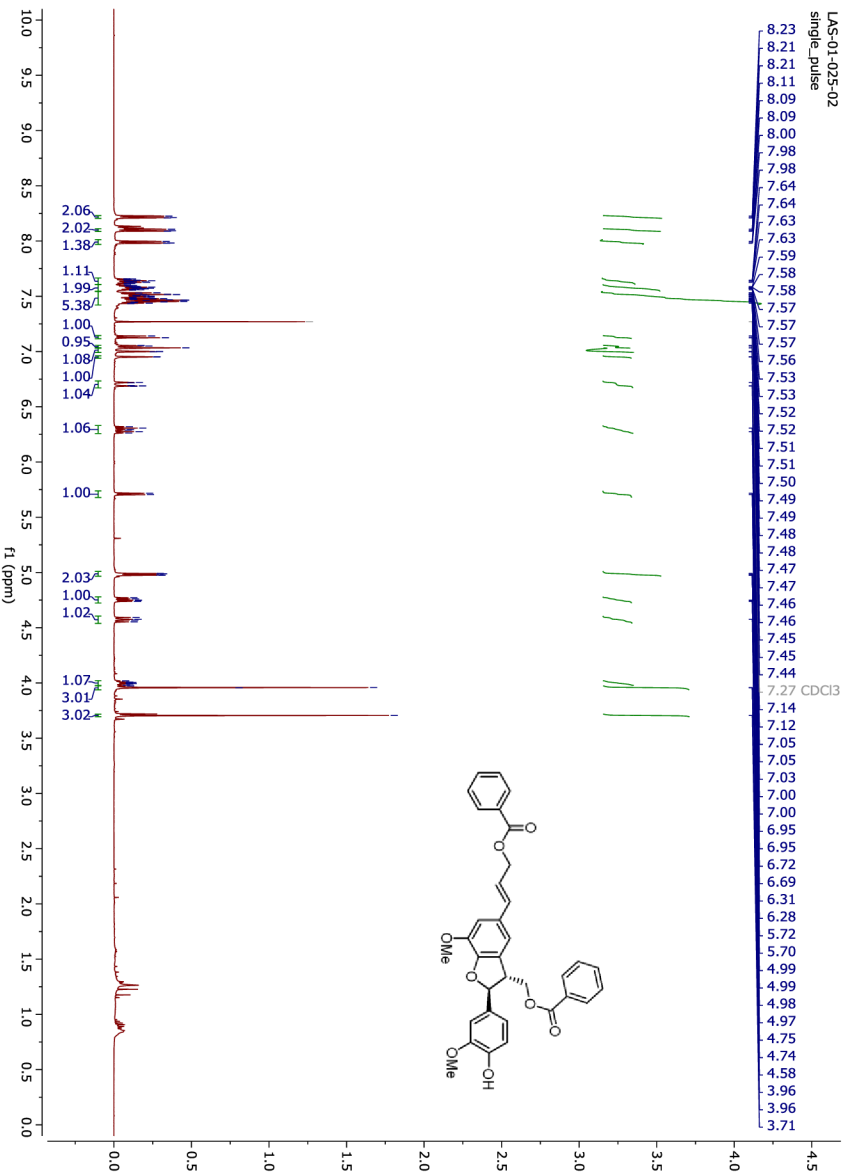
LAS-01-040-02 1  
single\_pulse



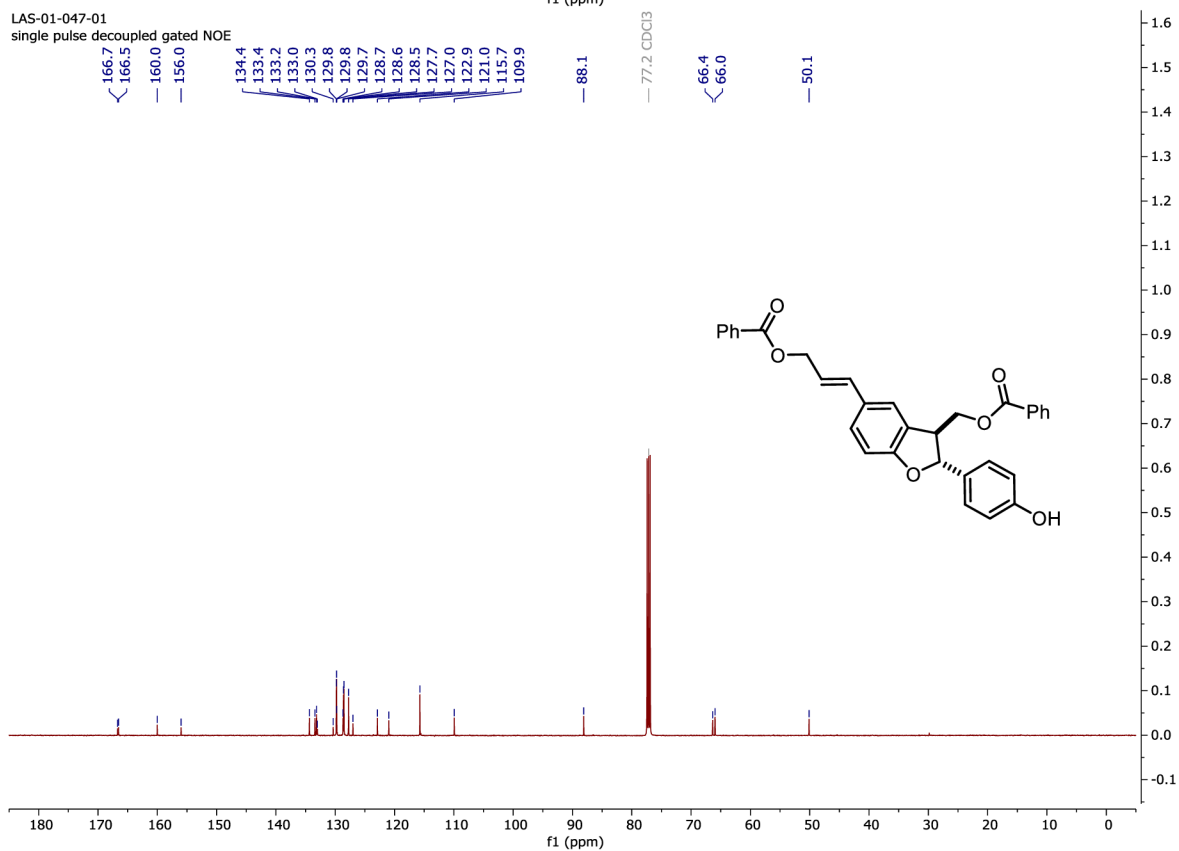
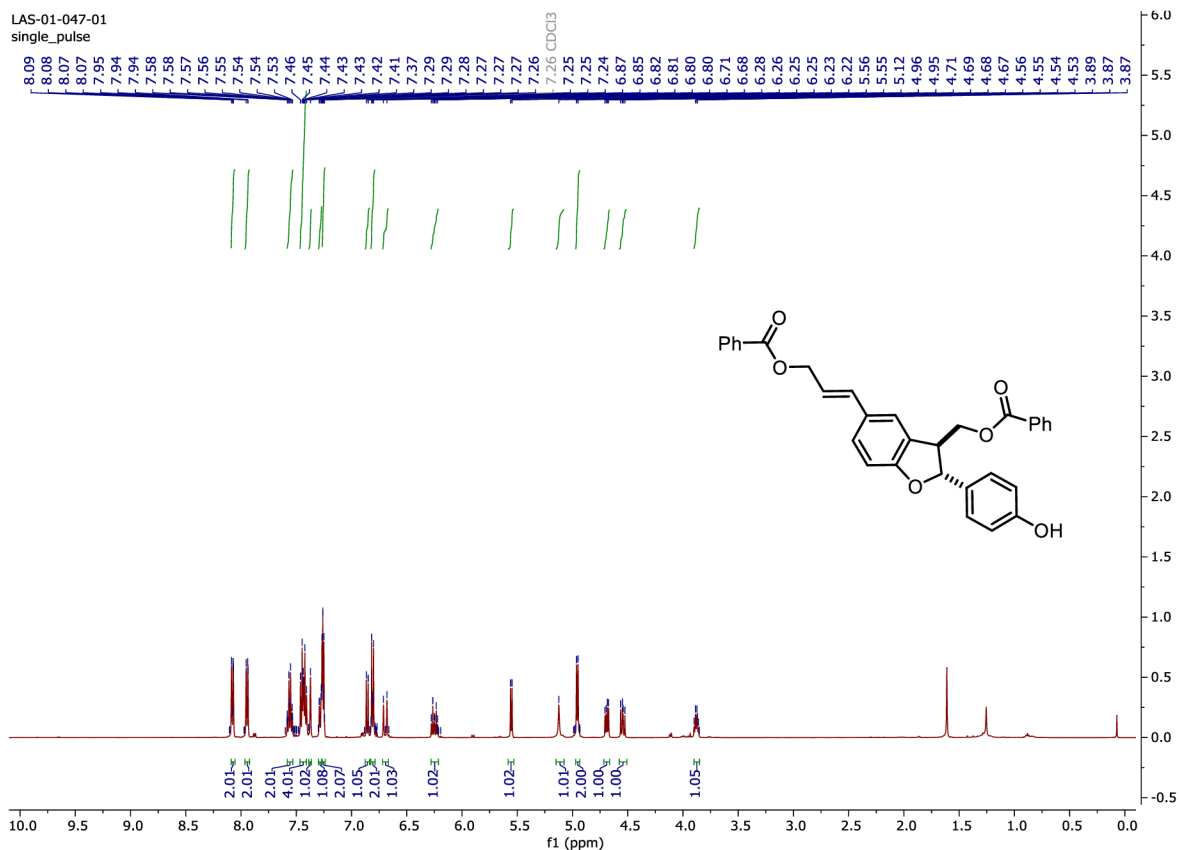
# <sup>1</sup>H spektrum látky XIII



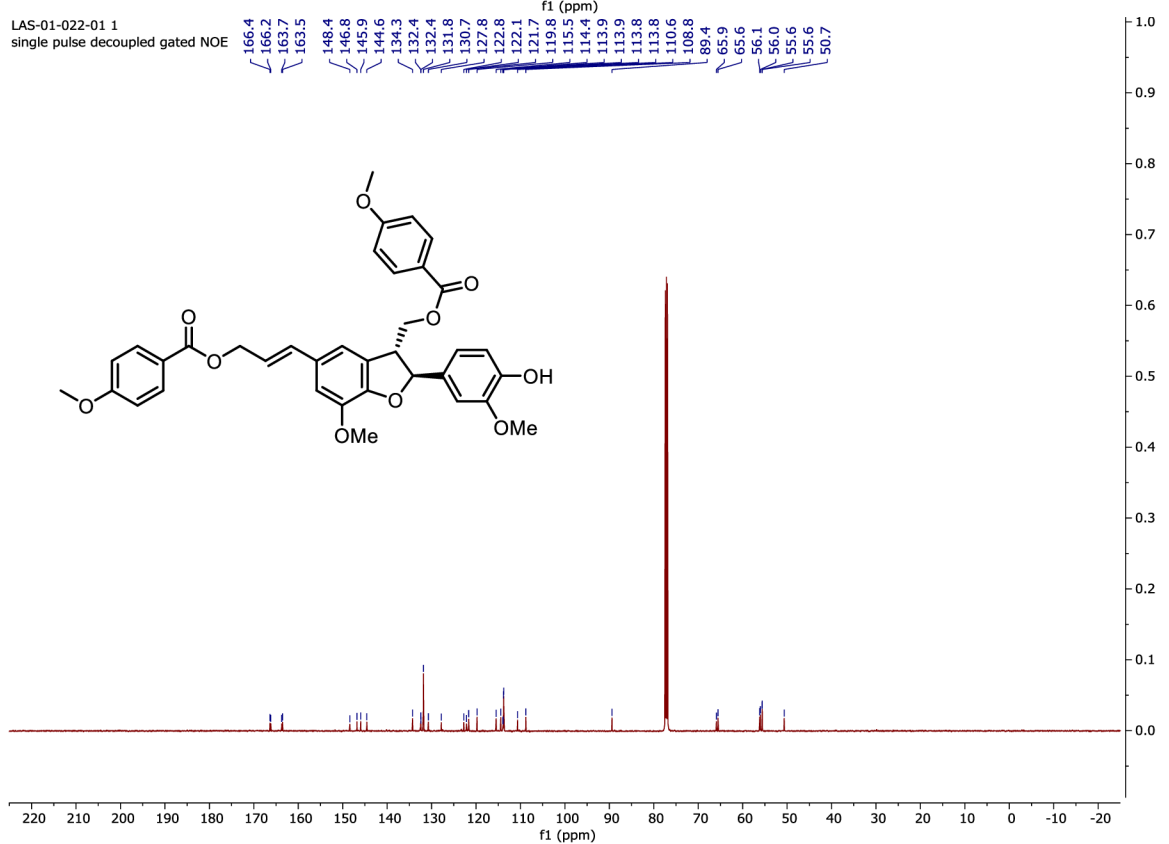
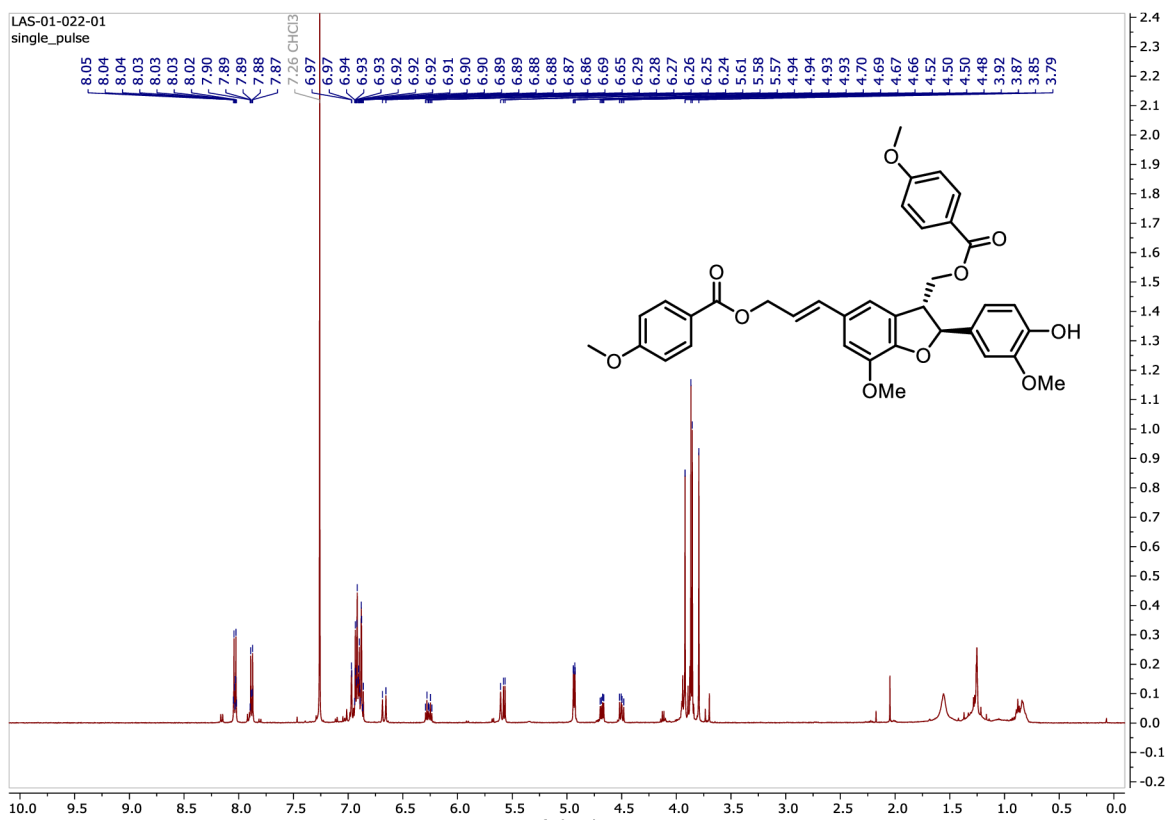
# <sup>1</sup>H a <sup>13</sup>C spektra látky XIVa



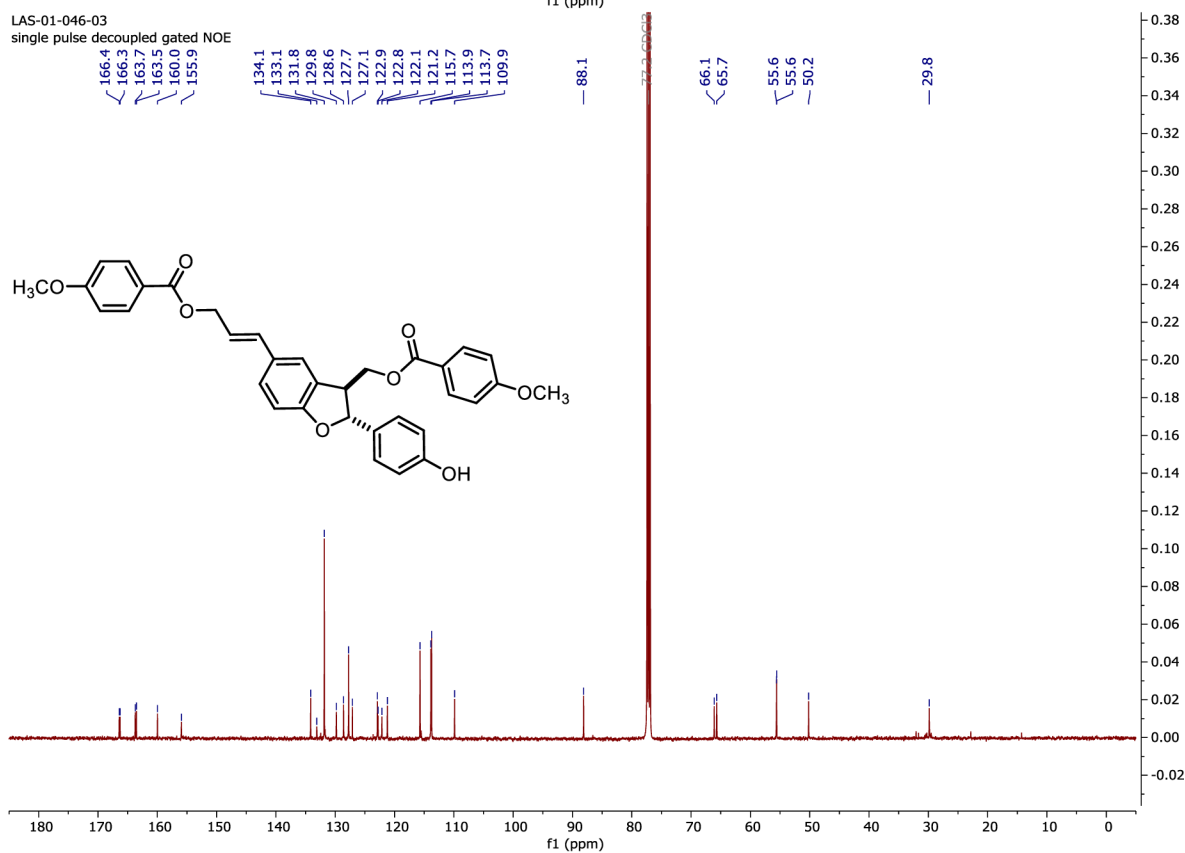
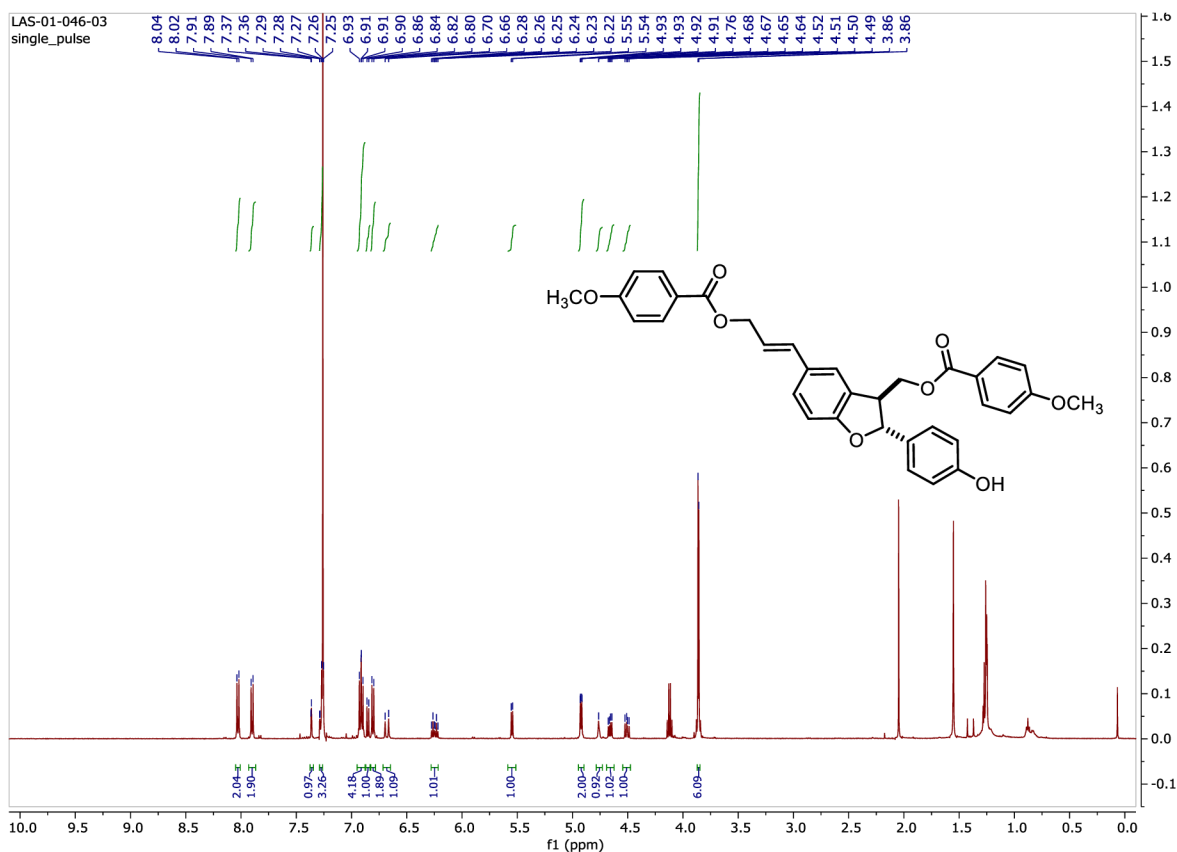
# <sup>1</sup>H a <sup>13</sup>C spektra látky XIVb



# <sup>1</sup>H a <sup>13</sup>C spektra látky XVa



# <sup>1</sup>H a <sup>13</sup>C spektra látky XVb



# <sup>1</sup>H spektrum látky XVIII

LAS-01-060-01  
single\_pulse

