

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta



**Syntetické studie vedoucí k syntéze
fragmentu A Voratinu A a B**

Kryštof Jeníček

Bakalářská práce

Obor: Chemie

Vedoucí práce: doc. RNDr. Jiří Pospíšil, Ph.D.

Olomouc 2024

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení autora:	Kryštof Jeníček
Název práce:	Syntetické studie vedoucí k syntéze fragmentu A Voratinu A a B
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Katedra Organické chemie, Přírodovědecké fakulta, Palackého Univerzita v Olomouci
Školitel:	doc. RNDr. Jiří Pospíšil, Ph.D.
Rok obhajoby:	2024

Abstrakt: Předkládaná práce se zabývá přírodními látkami, voratinem A a B, respektive syntetickými studiemi, jež by měly v konečném důsledku vést k syntéze jejich fragmentu A. Obecně voratiny patří do skupiny alkaloidů, živočišných sekundárních metabolitů, jež byly nedávno izolovány z mořských bičíkovců a u nichž byla zjištěna zajímavá biologická aktivita. V teoretické části je pak tato práce zaměřena na popis vybraných sekundárních metabolitů s hlavním důrazem na spirocyklické sloučeniny, jejich syntézu a biologickou aktivitu.

Klíčová slova:	sekundární metabolity; syntéza; enzymatické reakce; alkaloidy
Počet stran:	71
Počet stran příloh:	7
Počet příloh:	1
Jazyk:	čeština

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Kryštof Jeníček

Title: Synthetic studies leading to fragment A of Voratin A and B synthesis

Type of thesis: Bachelor

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

Advisor: Assoc. Prof. Jiří Pospíšil, Ph.D.

The year of presentation: 2024

Abstract: The present work deals with natural substances, voratin A and B, respectively synthetic studies that should ultimately lead to the synthesis of their fragment A. In general, voratins belong to the group of alkaloids, animal secondary metabolites that have recently been isolated from marine flagellates and have been found to have interesting biological activity. The theoretical part then focuses on the description of selected secondary metabolites with the main focus on spirocyclic compounds, their synthesis and biological activity.

Key words: secondary metabolites; synthesis; enzymatic reactions; alkaloids

Number of pages: 71

Number of appendix pages: 7

Number of appendices: 1

Language: Czech

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem předloženou práci vypracoval samostatně pod vedením doc. RNDr. Jiřího Pospíšila, Ph.D, a že jsem využil zdroje, které cituji v seznamu použité literatury.

V Olomouci dne:

.....

Kryštof Jeníček

Poděkování

Nejdříve bych chtěl poděkovat vedoucímu této práce, doc. RNDr. Jiřímu Pospíšilovi, PhD., za skvělé vedení, veškerý mně věnovaný čas, cenné rady, připomínky, vstřícný přístup a možnost pracovat v jeho PospisilL²ab. Dále nesmím opomenout poděkovat Mgr. Josefu Kristkovi za jeho trpělivost a veškerou pomoc nejen v laboratoři. Taktéž bych chtěl poděkovat Mgr. Danieli Chrenkovi za pomoc s vývojem HPLC metod a Mgr. Lucii Rárové, Ph.D. za vedení v průběhu biologického testování. Poděkovat bych chtěl také celé skupině PospisilL²ab a ostatním kolegům, kteří vytvářeli příjemnou pracovní atmosféru. Na závěr děkuji své rodině a přátelům za podporu během celého studia.

Tato práce vznikla za finanční podpory Interní Grantové Agentury Univerzity Palackého IGA_PrF_2024_028.

Obsah

1 Úvod	1
1.1 Cíle práce.....	2
2 Teoretická část.....	3
2.1 Sekundární metabolity.....	3
2.1.1 Alkaloidy	4
2.1.2 Terpeny	5
2.1.3 Fenolické látky.....	6
2.1.4 Zajímavé sekundární metabolity mořského původu.....	10
2.2 Voratin A-C	11
2.2.1 <i>Effrenium Voratum</i>	11
2.2.2 Obecné informace o voratinových sloučeninách.....	13
2.2.2.1 Obecné informace	13
2.2.2.2 Určení struktury voratinů A-C.....	13
2.2.2.3 Biologická aktivita voratinů A-C.....	15
2.3 Spirocyclické systémy	17
2.3.1 Obecné informace.....	17
2.3.2 Obecná syntéza spirocyklů	17
3 Výsledky a diskuze.....	20
3.1 Retrosyntéza Voratinů A a B.....	20
3.2 Retrosyntéza fragmentu A.....	21
3.3 Syntéza vedoucí k fragmentu A	23
3.3.1 Adice propionitrilu.....	23
3.3.2 Hydrolýza nitrilu.....	24
3.3.3 Redukce karboxylové kyseliny 46 na alkohol <i>rac</i> -45	25
3.3.3.1 Mechanismus redukce karboxylové kyseliny založený na využití $\text{BH}_3\cdot\text{NH}_3$ komplexu jako redukčního činidla a TiCl_4 jako katalyzátoru.....	27
3.3.4 Enzymatická rezoluce.....	28
3.3.4.1 Rezoluce hydrolýzou	31
3.3.5 Určení absolutní konfigurace alkoholu (<i>R</i>)-45 pomocí Mosherovy analýzy	32
3.8 Biologické testování	35

4 Závěr	36
5 Experimentální část	37
5.1 Obecné informace.....	37
5.2 Biologické testování	39
5.3 Organická syntéza	40
5.3.1 Syntéza nitrilu (47)	40
5.3.2 Syntéza karboxylové kyseliny (46)	41
5.3.3 Syntéza alkoholu (<i>rac</i> -45)	42
5.3.4 Syntéza methylesteru (Me-46).....	43
5.4 Enzymatická rezoluce.....	44
5.4.1 Příprava acylovaného alkoholu (<i>rac</i> -Ac-45).....	44
5.4.2 Rezoluce hydrolýzou	45
5.5 Určení absolutní konfigurace	46
5.5.1 Příprava S-MTPA esteru (<i>S</i>)-50.....	46
5.5.2 Příprava R-MTPA esteru (<i>R</i>)-50.....	46
6 Použitá literatura.....	47
7 Přílohy	56
7.1 ¹ H a ¹³ C NMR spektra látky 47	56
7.2 ¹ H a ¹³ C NMR spektra látky 46	57
7.3 ¹ H a ¹³ C NMR spektra látky 45	58
7.4 ¹ H a ¹³ C NMR spektra látky Me-46	59
7.5 ¹ H a ¹³ C NMR spektra látky <i>rac</i> -Ac-45	60
7.6 ¹ H a ¹³ C NMR spektra látky (<i>S</i>)-Ac-45	61
7.7 ¹ H a ¹³ C NMR spektra látky (<i>R</i>)-45.....	62

Seznam zkratek

AcO ₂	Acetanhydrid
AR	Androgenní receptory
AI	Umělá inteligence (<i>Artificial Intelligence</i>)
BPH	Benigní hyperplazie prostaty (<i>Benign prostatic hyperplasia</i>)
COSY	Korelační spektroskopie (<i>Corelation spectroscopy</i>)
DCM	Dichlormethan
DDQ	2,3-dichlor-5,6-dikyano-1,4-benzochinon
DIBAL-H	Diisobutylaluminiumhydrid
DMEM	Kultivační médium (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
ECD	Elektronový cirkulární dichroismus (<i>Electron circular dichroism</i>)
EtOAc	Ethyl-acetát
Et ₂ O	Diethylether
HCl	Kyselina chlorovodíková
H ₂ SO ₄	Kyselina sírová
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie (<i>high-performance liquid chromatography</i>)
HRESMIS	Hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením s elektrosprejovou ionizací (<i>High-resolution electrospray ionisation mass spectrometry</i>)
HSQC	Heteronukleární jednoduché kvantové koherence (<i>Heteronuclear single quantum coherence</i>)
IR	Infračervené (<i>infrared</i>)
K ₂ CO ₃	Uhličitan draselný
KHMDS	Bis(trimethylsilyl)amid draselný
KMnO ₄	Manganistan draselný
KOH	Hydroxid draselný
LiAlH ₄	Tetrahydridohlinitan lithný
MRSA	Meticilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
NaOH	Hydroxid sodný

NaHCO ₃	Hydrogenuhličitan sodný
Na ₂ SO ₄	Síran sodný
NH ₄ Cl	Chlorid amonný
NMR	Nukleární magnetická rezonance
PMB	<i>p</i> -methoxybenzyl
PPh ₃	Trifenylfosfin
PPTS	Pyridinium <i>p</i> -toluensulfonát
ROESY	Spektroskopie s Overhauserovým efektem v rotujícím rámu (<i>Rotating-frame nuclear Overhauser effect spectroscopy</i>)
ROS	Reaktivní formy kyslíku (<i>Reactive oxygen species</i>)
RT	Laboratorní teplota (<i>room temperature</i>)
RVO	Rotační vakuová odparka
SiO ₂	Oxid křemičitý
TBAF	tetra- <i>n</i> -butylamoniumfluorid
THF	tetrahydrofuran
TLC	Tenkvrstevná chromatografie (<i>thin layer chromatography</i>)
tBuLi	<i>terc</i> -butyllithium
t _R	Retenční čas
UV	Ultrafialové (<i>ultraviolet</i>)
5AR2	5- α -reduktáza typu 2

1 Úvod

V dnešní době nabývá ve farmaceutickém průmyslu značné pozornosti honba za novými biologicky aktivními molekulami s doposud nepopsanými 3D strukturami, jež jsou inspirovány přírodními zdroji. Cílem je inspirace novými strukturálními motivy, které by díky jejich unikátní 3D struktuře, doposud nepopsané či nevyužívané ve farmakologickém průmyslu (tzv. nové molekuly pro tzv. chemický prostor biologicky aktivních látek), měly nové anebo lepší vlastnosti z pohledu jejich biologických aktivit vůči již známým molekulárním cílům anebo by mohly pomoci při nalezení nových molekulárních cílů v rámci zkoumaných biologických systémů. Cílem je tedy nejen zlepšit léčbu (snížení vedlejších účinků léků), ale také objevit léčbu pro doposud efektivně neléčené nemoci. [1] A zde se přírodní látky ukázaly být bohatým zdrojem nových sloučenin a nových molekulárních struktur vykazujících často velmi překvapivé biologické aktivity. Díky jejich rozmanitým a komplexním chemickým strukturám často vykazují biologickou aktivitu s vysokou selektivitou vůči různým biologickým systémům. Od 60. let 20. století začal také průzkum mořského prostředí, u kterého se očekávalo, že by mohlo posloužit jako nový zdroj zcela unikátních strukturálních motivů a k izolaci nových doposud nenavržených sloučenin. Původně se výzkum zaměřoval na makroskopické organismy (rostliny, sasanky atd.) avšak později byl rozšířen i o mikroorganismy, které jsou snadno obnovitelným zdrojem a zároveň poskytují mnoho nových typů látek díky jejich snadné genetické modifikovatelnosti. [2]

Má bakalářská práce vychází z nedávné (2022) [3] publikace, jež popisuje izolaci tří nových pyridinových alkaloidů ze symbiotické mořské obrněnky *Effrenium voratum*, u kterých bylo zjištěno, že vykazují terapeutické účinky vůči benigní hyperplazii prostaty (BPH). Díky této překvapivé aktivitě jsou tyto voratinové sloučeniny slibnými molekulárními skelety pro výzkum látek vhodných k vývoji léčiv s BPH aktivitou. [3] Toto onemocnění se vyskytuje u většiny stárnoucích mužů počínaje 45. rokem života. Ačkoli není smrtelnou patologií, tak je pro pacienty značně nepříjemná, neboť významně snižuje kvalitu jejich života. Existuje tudíž silná poptávka po terapeutických možnostech, jak tuto patologii léčit. [4]

Studium a syntéza malých organických sloučenin je primárním cílem vědního oboru organická chemie. Klíčovou roli v tomto oboru v případě syntézy komplexních cílových molekul, např. přírodních látek, pak sehrává retrosyntéza – postup, jehož úkolem je komplexní molekulu analyzovat, rozložit na snadno připravitelné fragmenty, a nakonec navrhnout

syntetickou cestu k těmto fragmentům a následně ke kýžené molekule. Toto vyžaduje rozsáhlé chemické encyklopedické znalosti v oboru. S nedávnými rychlými pokroky v oblasti umělé inteligence (AI) se taky nabídl využití této technologie v retrosyntéze. Mnoho přístupů založených čistě na datech zkombinovaných s AI již ukázaly uspokojivé výsledky. Na druhou stranu se také ukazuje, že AI vedený retrosyntetický přístup k syntéze nevykazuje žádné „progresivní“ postupy a zůstává ukotven ve využití již známých postupů či jejich extrapolací. Zdá se tedy, že AI řízený přístup v retrosyntéze ještě není na obzoru z pohledu inovativního kreativního přístupu, o který se v rámci své bakalářské práce snažím. [5,6]

1.1 Cíle práce

Ve své bakalářské práci se v rámci teoretické části zabývám úvodem do oblasti sekundárních metabolitů mořských organismů s hlavním důrazem na spirocyklické systémy. V experimentální části se poté zaměřuji na syntézu přírodních látek Voratin A a B, konkrétně na jejich z retrosyntézy vzešlý fragment A. Cíle této práce tedy jsou:

1. Literární rešerše na téma: sekundární metabolity z mořských jednobuněčných organismů. Jejich struktura a reaktivita.
2. Vývoj syntetických metod vedoucích k syntéze fragmentu A voratinů A a B.
3. Charakterizace připravených látek pomocí dostupných fyzikálně-chemických metod.

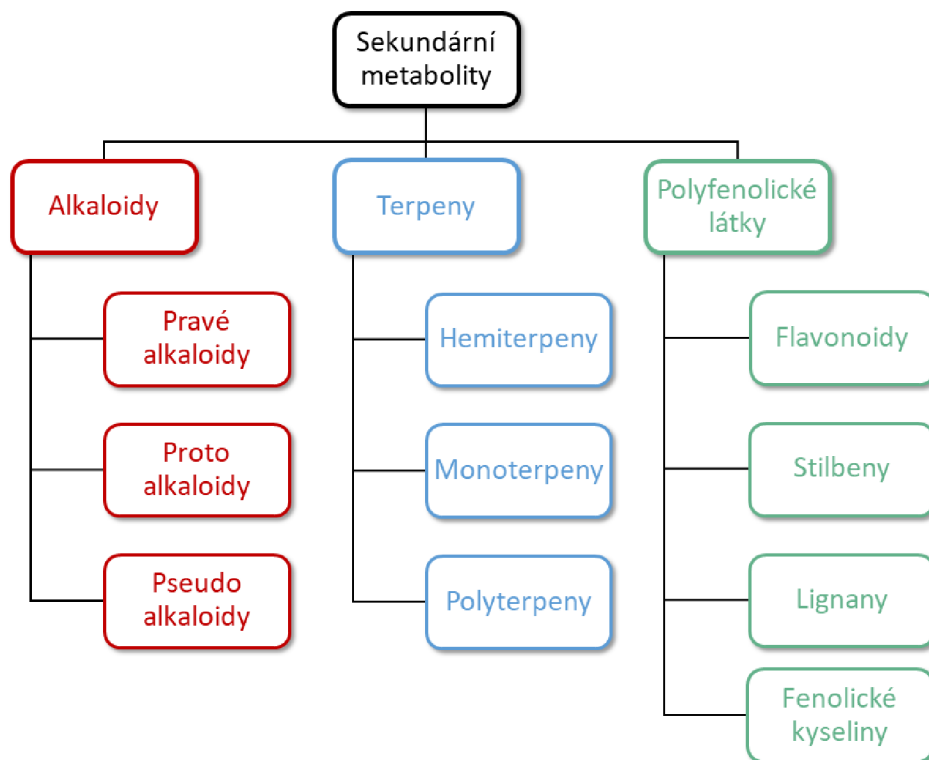
2 Teoretická část

2.1 Sekundární metabolity

Živé organismy produkují nejrůznější organické látky. Některé z nich, jako např. sacharidy, proteiny a aminokyseliny jsou nezbytné k přežití organismu. Takovým látkám se říká primární metabolity. Ostatní látky, které k vývoji a reprodukci nezbytné nejsou, ale mají vliv na kvalitu života organismu, se řadí mezi sekundární metabolity. Obecně se všechny tyto látky nazývají přírodními produkty, i když v obecné rovině slovním spojením „přírodní produkty“ odkazujeme spíše na sekundární metabolity.

Sekundární metabolity obecně prokazují biologickou a farmakologickou aktivitu. Nejstarší známé a nejvíce probádané sekundární metabolity pocházejí historicky z rostlin. Existují důkazy o používání léčivých účinků máku nebo mandragory již u Sumerů přibližně před 5000 lety. Vědecky izolovány a charakterizovány byly sekundární metabolity však až v 19. století. Velký rozmach využití mikroorganismů, jako zdrojů těchto přírodních produktů, začal po objevu penicilinu, jež se váže na známý Flemingův příběh o identifikaci prvního antibiotika. Pokročilejší životní formy, jako jsou mořští živočichové, mají rozmanitější metabolismus než rostliny, díky čemuž je i struktura z nich pocházejících sekundárních metabolitů značně komplexnější.

Většina sekundárních metabolitů má nějakou více či méně důležitou biologickou aktivitu, a tak některé z nich našly uplatnění ve farmaceutickém průmyslu. Další využití pak našly jako barviva, polymery, lepidla, ochucovadla či parfémy. Obecně se jedná o strukturně značně rozmanité molekuly, jež lze dle jejich chemické povahy rozdělit na tři základní skupiny: alkaloidy, terpeny a (poly)fenolické látky (**Obr. 1**). [7–9] V následujících podkapitolách budou všechny tři skupiny přiblíženy.



Obr. 1. Grafické znázornění dělení sekundárních metabolitů.

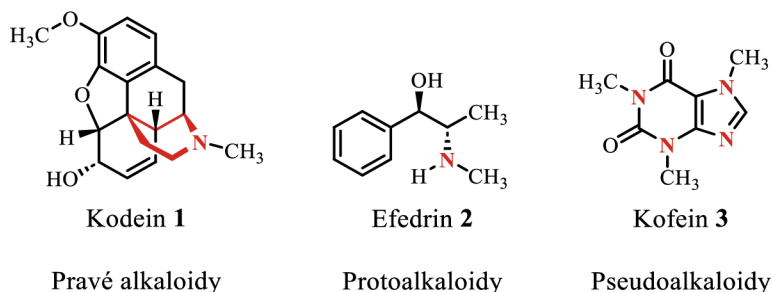
2.1.1 Alkaloidy

Poprvé přišel s termínem alkaloid německý vědec Wilhelm Carl Meißner roku 1819. Vychází z latinského „*alkali*“, které je odvozeno z arabského „*al-qalwī*“, což se dá volně přeložit jako „popel rostlin“ a řecké přípony „*-οειδής*“ [-*oeidís*], znamenající „jako“. Název tedy vystihuje jejich bazickou povahu.

Z pohledu výskytu se alkaloidy nachází nejen v rostlinách, jak by mohl napovídat jejich název, ale i v dalších typech organismů. Většinou je jejich funkce spojená s ochranou daného organismu proti různým patogenům nebo škůdcům. U některých mikroorganismů mají například za úkol odpudit jiné živočichy před jejich konzumací. Z pohledu farmakologických účinků alkaloidy pak vykazují široké spektrum vlastností, jež se pohybují od analgetických, antipyretických, protinádorových až po protizánětlivé. Těchto vlastností se pak využívá jak v tradiční, tak i v moderní medicíně. Některé alkaloidy bývají zneužívány jako drogy, jiné pro svou toxickou povahu jako jedy.

Strukturně se jedná o rozmanité látky, jejichž jediným společným znakem je přítomnost atomu dusíku v rámci jejich struktury. Kvůli jejich velké strukturní diverzitě však neexistuje žádný jiný spolehlivý způsob jejich klasifikace. Nejčastěji se však dělí do tří skupin. První z nich jsou pravé alkaloidy, pocházející z aminokyselin, které mají dusík zakomponován v heterocyklickém kruhu. Mezi ně patří například kodein **1** (Obr. 2).

Druhým typem jsou protoalkaloidy, jednoduché aminy, které jsou deriváty aminokyselin, ale dusík u nich není součástí heterocyklu (např. efedrin **2**). Poslední skupinou jsou pak pseudoalkaloidy. Látky, které nejsou přímými deriváty aminokyselin, ale disponují vlastnostmi odpovídajícím pravým alkaloidům (např. kofein **3**). [7,8,10]

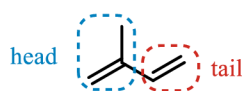


Obr. 2. Struktury vybraných alkaloidů a jejich podtřídy.

2.1.2 Terpeny

Nejrozsáhlejší skupinou sekundárních metabolitů, k dnešnímu datu čítající přibližně 55 000 zástupců [11], jsou terpeny. Tento typ látek se hojně vyskytuje zejména ve vyšších rostlinách, kde hraje roli převážně při jejich ochraně vůči škůdcům a herbivorům. Z pohledu biologických vlastností tyto látky vykazují převážně antivirové, antimikrobiální, antimykotické a antiparazitické vlastnosti. Využívají se nejen ve farmaceutickém odvětví, ale také zejména v potravinářském a kosmetickém průmyslu. Z pohledu aktuálních trendů pak nelze nezmínit výzkum těkavých terpenů, jako možného alternativního zdroje energie. [11]

Základní stavební jednotkou terpenů je isopren **4** (**Obr. 3**). Na základě počtu molekul isoprenu ve skeletu se následně terpeny dělí na několik dalších skupin. Nejjednodušší jsou hemiterpeny (jedna podjednotka isoprenu) a monoterpeny (dvě isoprenové jednotky). Seskviterpeny poté mají tři izoprenové podjednotky, diterpeny čtyři, triterpeny šest a tetraterpeny osm. Vlastní isopren má pak ještě navíc dvě části nazývané *head* (hlava) a *tail* (ocas). Valná většina terpenů obsahuje izoprenové podjednotky spojené tzv. vazbou *head-tail* (**Obr. 4A**). Jedinou výjimkou jsou tetraterpeny, kde jsou jednotlivé podjednotky spojeny vazbou *tail-tail*. (**Obr. 4B**). Různými modifikacemi terpenů, jako je například oxidace, hydrogenace, či přidání funkčních skupin, vznikají terpenoidy. [11–13]



Isopren 4

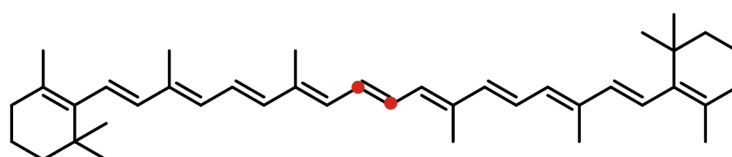
Obr. 3. Struktura isoprenu s vyznačenými částmi **head** a **tail**.

A. Head-tail vazba mezi isoprenovými podjednotkami



Myrcen 5

B. Tail-tail vazba mezi isoprenovými podjednotkami



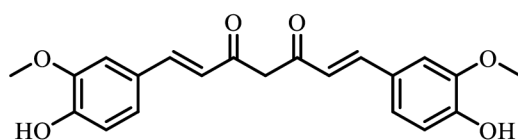
Betakaroten 6

Obr. 4. Znázornění dvou možných spojení izoprenových podjednotek v terpenech.
(A) **head-tail** a (B) **tail-tail**.

2.1.3 Fenolické látky

Ze strukturního pohledu (poly)fenolické látky musí vždy obsahovat alespoň jednu hydroxy (anebo methoxy) skupinu na aromatickém kruhu. [14] Z hlediska komplexity mohou být fenolické látky jednoduché (jeden aromatický kruh), ale také značně komplexní (např. oligomery složené z několika fenylypropanidových monomerů). Obecně jsou fenoly biologicky aktivní sekundární metabolity vesměs rostlinného původu, které rostlinám slouží k ochraně před vnějšími vlivy (stres), a proti nejrůznějším škůdcům a parazitům. U některých druhů jsou zodpovědné za jejich zbarvení a aroma, čímž se podílí i na vábení opylovačů. Oproti dříve zmíněným skupinám je počet jejich doposud izolovaných zástupců menší. Izolováno a popsáno bylo doposud „pouze“ něco přes 8000 molekul spadajících do této kategorie. Z pohledu biologických vlastností jsou tyto látky velmi zajímavé. U některých z nich (např. kurkumin 7) (**Obr. 5**), byly zjištěny prospěšné účinky na mozek u lidí v pokročilejším věku. [15]

Dále se prokázalo, že tento typ látek zlepšuje paměť, kognitivní funkce a snižuje riziko vzniku demence či jiných neurodegenerativních onemocnění. [15] Z pohledu systematického dělení dělíme fenoly na základě jejich chemické struktury na flavonoidy, stilbeny, lignany a neolignany, a fenolické kyseliny. [14–16]

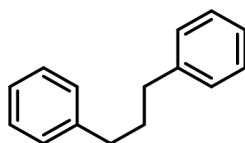


Kurkumin (7)

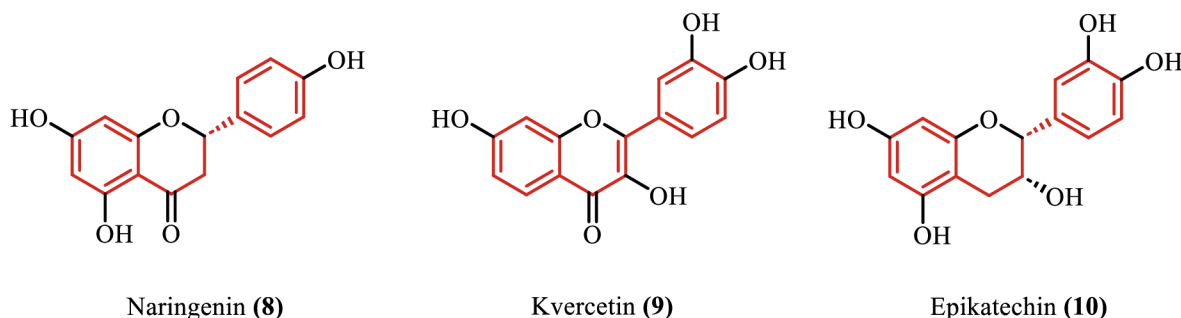
Obr. 5. Struktura kurkuminu.

Flavonoidy

Základní struktura flavonoidů se skládá ze dvou benzenových jader zpravidla spojených propanidovou spojkou (**Obr. 6**). Tento motiv ($C_6-C_3-C_6$) je následně zformován jako lineární anebo podléhá následným cyklizačním reakcím za tvorby di- či tri- cyklů. V závislosti na následné polysubstituci a oxidačním stavu jednotlivých atomů uhlíku ve spojce dělíme flavonoidy na flavony, isoflavony, chalkony atd. Z pohledu jejich biologické aktivity má tento typ látek na lidský organismus nezanedbatelné množství blahodárných účinků, neboť jsou tyto látky schopny modulovat některé klíčové funkce enzymů a taky vykazují různé antioxidační, antimutagenní a antikarcinogenní vlastnosti. Mezi zástupce patří naringenin **8**, nacházející se v citrusových plodech, kvercetin **9** či epikatechin **10** (**Obr. 7**). [7,16–20]



Obr. 6. Základní struktura flavonoidů.



Naringenin (8)

Kvercetin (9)

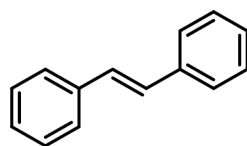
Epikatechin (10)

Obr. 7. Struktury vybraných příkladů flavonoidů s červeně vyznačenou základní strukturou.

Stilbeny

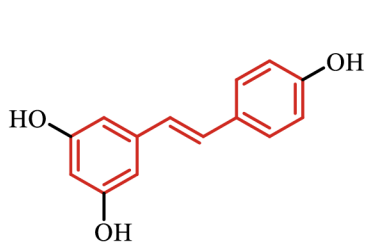
Stilbeny, taktéž označované jako stilbenoidy vychází ze základní molekuly stilbenu (1,2-difenylethenu) **11** (**Obr. 8**). Jejich základní skelet obsahuje dva aromatické kruhy oddělené ethen-1,2-diylovou spojkou ($C_6-C_2-C_6$). Jejich produkce v rámci rostlin je obecně spuštěna jako reakce na vnější stresovou situaci (patogen, sucho, salinita, atd.). Z pohledu biologické aktivity vykazují některé stilbeny antimikrobiální, antimykotické či protinádorové účinky. Nejznámějším zástupcem této skupiny látek je resveratrol **12**, známý zejména díky

své přítomnosti v červeném víně (**Obr. 9**). [21] Dalším zástupcem je strukturně komplexnější schweinfurthin A (**13**), který vykazuje protirakovinné účinky (**Obr. 9**). [15,22–25]

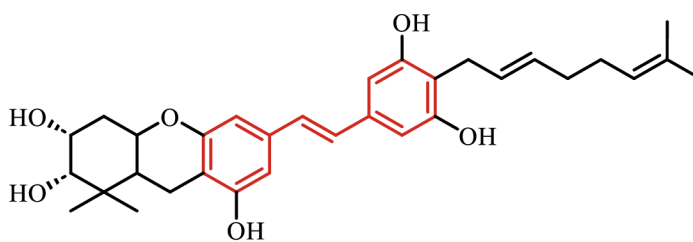


Stilben (**11**)

Obr. 8. Základní skelet stilbenů.



Resveratrol (**12**)

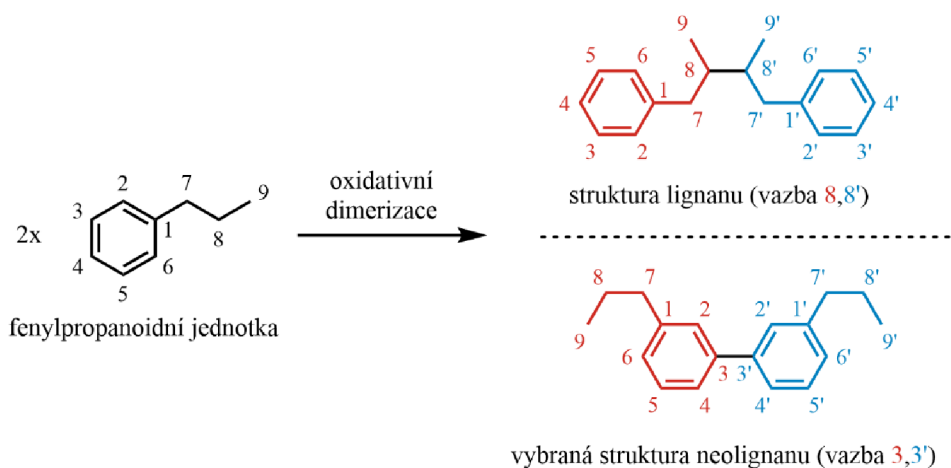


Schweinfurthin A (**13**)

Obr. 9. Vybrané příklady stilbenů s červeně zvýrazněnou základní stilbenoidní strukturou.

Lignany a neolignany

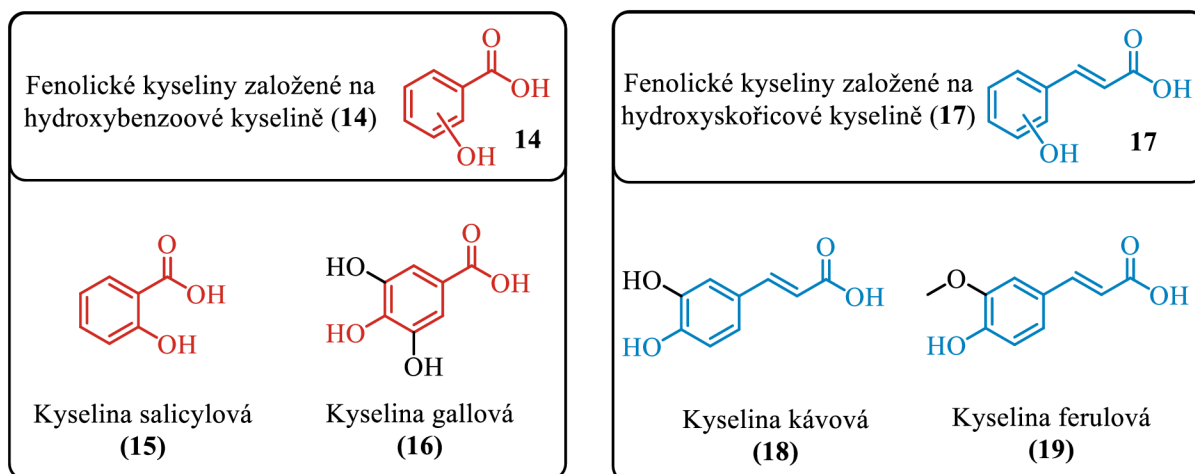
Lignany a neolignany jsou strukturně komplexní molekuly, jež vznikají oxidativní dimerizací dvou fenylpropanoidních podjednotek. [26] Co se týče výskytu, představují lignany, 8,8'-dimery fenylpropanoidů, mnohem početnější skupinu derivátů, než neolignany (všechny ostatní typy dimerů, 14 skeletálních typů) (**Obr. 10**). Lignany (cca 75 % dosud popsaných struktur lignanového a neolignanového typu) jsou tak mnohem více prozkoumanou a popsanou skupinou fenylpropanoidových derivátů. U těchto typů látek byla pozorována různorodá biologická aktivita, jež se pohybovala od antioxidačních a protinádorových přes protivirové, až po protizánětlivé účinky. Některé z těchto látek také vykazují antiparazitické vlastnosti. [22,27,28]



Obr. 10. Schéma vzniku základního skeletu lignanu a vybraného příkladu neolignanu z 14 možných základních strukturních motivů.

Fenoly

Základní skelet fenolických kyselin se skládá z hydroxy skupinou substituovaného aromatického kruhu C₆, který je buďto přímo (deriváty benzoové kyseliny **14** – např. kyselina salicylová **15** a kyselina gallová **16**) nebo nepřímo přes C₂ podjednotku (deriváty kyseliny skořicové **17** – např. kyselina kávová **18** a kyselina ferulová **19**) spojen s karboxylovou funkční skupinou (**Obr. 11**). [15,29–33]

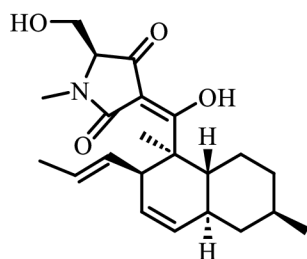


Obr. 11. Základní strukturní vzorce fenolických karboxylových kyselin a jejich příklady s barevně vyznačenými základními strukturními motivy.

2.1.4 Zajímavé sekundární metabolity mořského původu

Značná část mořských sekundárních metabolitů je totožná anebo úzce příbuzná s těmi produkovanými terestriálními organismy. Některé z nich však představují zcela nový typ strukturních motivů neznámých v případě suchozemských organismů (např. mořské steroly). V následujících několika odstavcích, předtím, než budu popisovat látky klíčové pro svou bakalářskou práci, voratiny A a B, bych chtěl zmínit tři přírodní látky mořského původu.

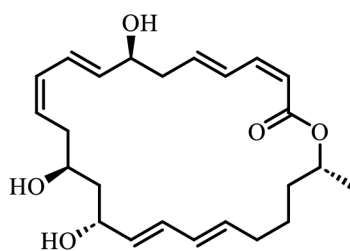
První z nich je equisetin (**20**), sekundární metabolit mořského původu, jež efektivně eliminuje meticilin-rezistentní bakterie *Staphylococcus aureus* a prokázal svoji efektivitu i na myších modelech (**Obr. 12**). Tato látka byla původně izolována z mořské houby *Fusarium equiseti* a její aktivita proti MRSA rezistentním bakteriím je přisuzována mechanismu založeném na vyvolávání autofagie hostitele v napadené buňce tvorbou reaktivních forem kyslíku ROS (reactive oxygen species). [34,35]



Equisetin (**20**)

Obr. 12. Struktura molekuly equisetinu (**20**).

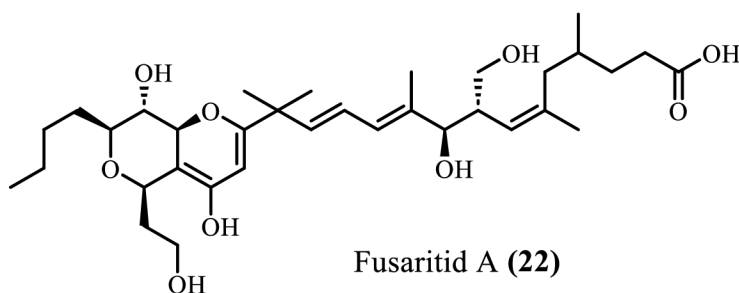
Macrolaktiny jsou další skupinou sekundárních metabolitů vykazujících důležité biologické aktivity vůči viru *herpes simplex* a HIV, či cytotoxicitu proti rakovinovým buňkám myšího melanomu. Tento typ látek byl poprvé izolován z mořské bakterie rodu *Bacillus*. V současnosti je známo 26 zástupců této rodiny (např. macrolaktiny A-S), které jsou charakteristické výskytem tří a více dienových podjednotek v makrocyklu. *E/Z* izomerie jednotlivých násobných vazeb je pak zodpovědná za pozorované rozdíly v bioaktivitě těchto molekul. Macrolactin A (**21**) (**Obr. 13**), vybraný zástupce této třídy látek, se pak ukázal jako účinný při inhibici virů *herpes simplex* a HIV. [36]



Macrolactin A (21)

Obr. 13. Struktura macrolactinu A (20).

Polyketidy jsou obsáhlou skupinou bioaktivních látek pocházejících z mořských organismů. Z pohledu jejich struktury, jež je typově značně rozmanitá, pak vynikají některé specifické typy látek se značně komplexní strukturou, kde je polyketidická část úzce skloubena s fenolickou. Mezi typické příklady bychom tak mohli zařadit např. Fusaritid A (22) (Obr. 14). U této látky, která byla izolována z kmene mořské houby *Fusarium verticillioide*, byla zjištěna silná tendence ke snížení hladiny cholesterolu v krvi. [37,38]



Fusaritid A (22)

Obr. 14. Struktura vybraného polyketidu fusaritidinu A (22).

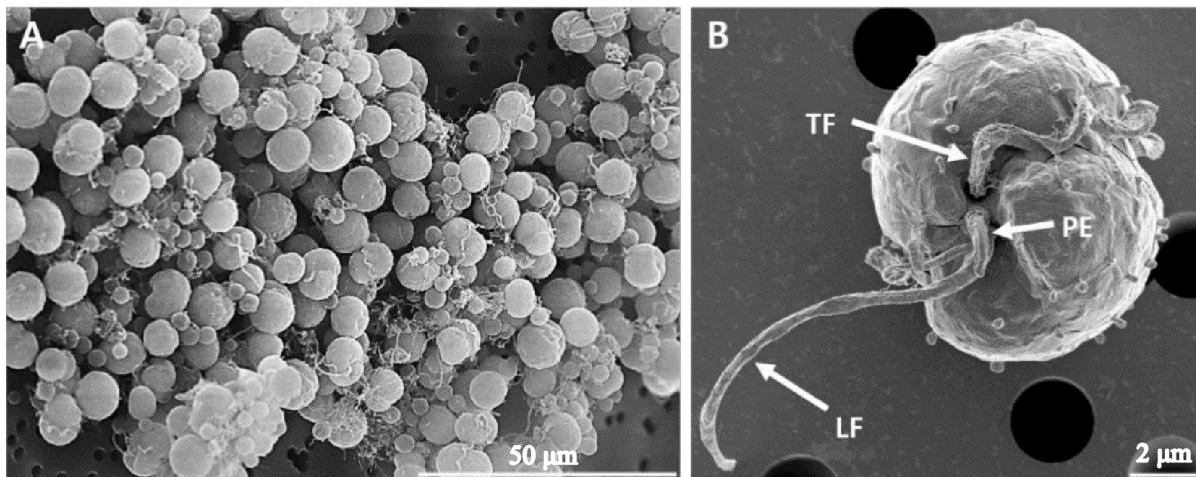
2.2 Voratin A-C

2.2.1 *Effrenium Voratum*

Mořské obrněnky jsou živočišný kmen, vyznačující se produkcí strukturně složitých biologicky aktivních látek. Jakožto kosmopolitní druh se vyskytují po celém světě a jsou zdrojem molekul obsahujících jedinečné „shluky uhlíkatých řetězců“, jež jsou poskládány v plejádě nejrůznějších cyklů. K obrněnkám patří i rod *Symbiodinium*, který, jak již název napovídá, žije v moři převážně jako symbiont bezobratlých živočichů. Volně žijící obrněnky jsou pak nedílnou součástí ekosystémů korálových útesů a z pohledu medicínské chemie i slibnými zdroji neočekávaných molekul s překvapivou biologickou aktivitou, jako jsou toxiny izolované z obrněnek ze skupiny *Zooxanthellae*. [39] Navzdory jejich značnému významu pro mořské ekosystémy je jejich klasifikace z pohledu biologie značně nejasná.

Hlavním důvodem tohoto stavu je jejich obtížná kultivace a nesnadnost pozorování (využití elektronových mikroskopů je nezbytné). Z tohoto důvodu je tedy jejich popis a zároveň i kontrolovaná kultivace, jež by umožnila snazší přístup k jejich sekundárním metabolitům, v tomto okamžiku nemožný. [3,40,41]

Obrněnky *Effrenium voratum*, dříve nazývané *Symbiodinium voratum*, patří do rodu *Symbiodinium* (**Obr. 15**). Jedná se o jednobuněčné, volně žijící bičíkovce, a jejich rodové jméno „*effrenium*“ vychází z latinského adjektiva „*effrenis*“, které znamená „nеспoutaný“. Pojmenování tedy poukazuje na skutečnost, že ačkoli většina rodu *Symbiodinium* žije symbioticky, tento druh žije volně. Je to jediný taxonomicky uznávaný druh ve skupině *Effrenium*. Druhové jméno „*voratum*“ pochází z latinského „*vorare*“, což se dá přeložit jako „hltat“ a odkazuje tím na fagotropní povahu tohoto organismu v přítomnosti bakterií a jiných eukaryotických mikrořas. Výskyt *Effrenium Voratum* byl potvrzen v Tichém oceánu, Atlantiku a Středozemním moři. Nalezen byl ale také v Cookově průlivu poblíž Nového Zélandu, u ostrovů Jeju a Dokdo v Jižní Koreji a u ostrova Tsushima v Japonsku. [40,41]

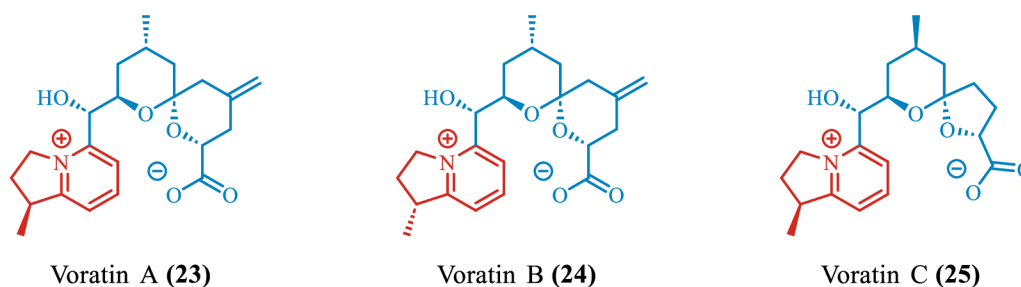


Obr. 15. Mikrofotografie buněk *E. voratum*. (A) Různé tvary a velikosti buněk *E. voratum*. (B) Ventrální pohled znázorňující zaoblený kuželovitý episom a elipsoidní hyposom, podélný bičík (LF), stopku (PE) a příčný bičík (TF). Měřítko: A= 50 µm, B = 2 µm. Převzato a upraveno z ref. [40].

2.2.2 Obecné informace o voratinových sloučeninách

2.2.2.1 Obecné informace

Voratin A (**23**), voratin B (**24**) a voratin C (**25**) (**Obr. 16**) jsou sekundární metabolity, které můžeme na základě jejich struktury řadit do skupiny alkaloidů. Pocházejí z již dříve zmíněného bičíkovce *Effrenium voratum*. Jejich molekuly by se daly rozdělit na dva různé fragmenty: dihydroindoliziniový kruh (červeně) a spiroketalovou část (modře). [3]

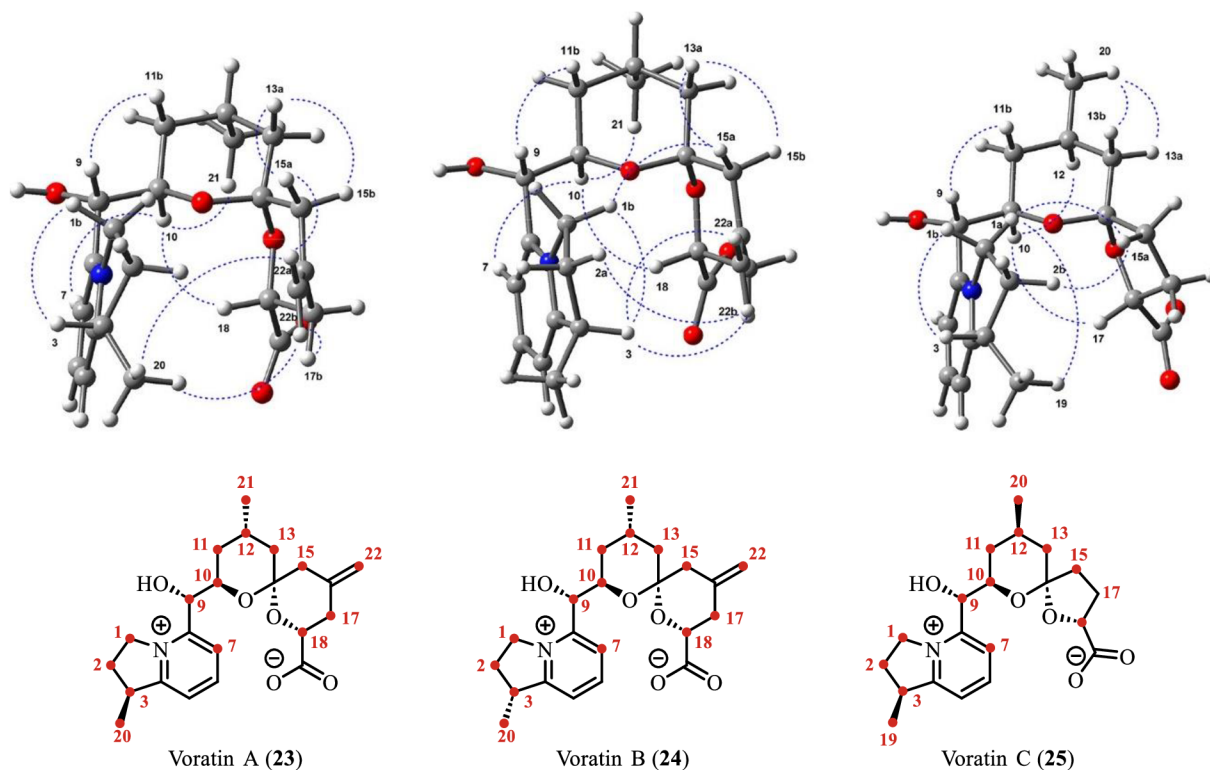


Obr. 16. Struktury voratinů A-C.

2.2.2.2 Určení struktury voratinů A-C

Molekulový vzorec voratinu A byl určen ze vzorku na základě HRESMIS jako $C_{22}H_{29}NO_5$. S pomocí infračervené spektroskopie byla následně v této molekule potvrzena přítomnost karbonylových a hydroxylových skupin. Měření 1H NMR spekter ukázalo, že molekula obsahuje dvě methylové skupiny a ze ^{13}C NMR spektra bylo možné vyčíst počet atomů uhlíku, které se nacházely v izolované molekule. Díky HSQC a ^{13}C NMR spektrům, bylo identifikováno pět uhlíků jako kvartérních, sedm methylenových, dva sp^3 -hybridizované methiny, tři aromatické methiny a tři oxymethiny. COSY korelační spektra také naznačila, že se molekula dá rozdělit na čtyři spinové fragmenty. Na základě absorpčního pásu UV (272 nm) a díky chemickým posunům měřených 1H NMR spekter byla struktura jedné z částí molekuly identifikována jako pyridinium. Dále bylo díky změně chemických posunů změřených na základě deuteriem indukovaných izotopových efektů navrženo, že v molekule je přítomna acetalová funkční skupina O-C-O, což naznačovalo přítomnost spiroketalové struktury. Následné ROESY 2D NMR korelace podpořili tuto domněnku (**Obr. 17**) a navíc umožnily následně určit relativní konfiguraci na spiroacetalovém stereogenním centru. Vzájemné korelace relativní konfigurace na tomto centru s centry ostatními vedly k určení relativní konfigurace mezi všemi chirálními centry na atomech uhlíku této molekuly. Absolutní konfigurace pak byla určena díky C-9 hydroxylové skupině na základě tzv. Mosherovy metody. [42] Identifikace absolutní konfigurace na atomu C-9 pak následně umožnilo určit absolutní konfiguraci i na všech ostatních stereogenních centrech této molekuly. V rámci dalšího

stanovování struktury bylo pomocí IR spektroskopie prokázáno, že karboxylová kyselina je přítomna ve formě aniontu a tedy, že molekula je zwitterionické povahy.

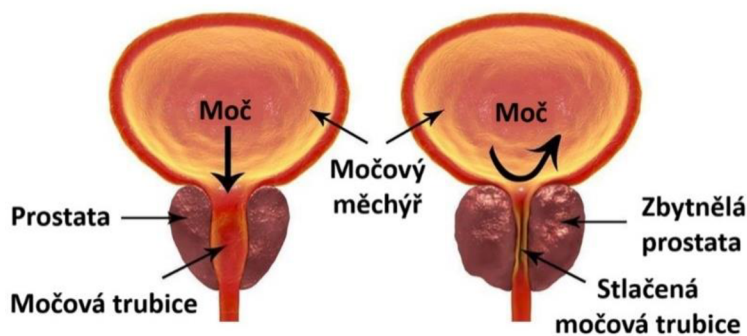


Obr. 17. Klíčové ROESY korelace voratinů A-C (23-25) [3].

Struktura druhé sloučeniny, voratinu B (24), potom byla určena jako *3R-epimer*-voratinu A (23). Molekulový vzorec voratinu C (25) postrádal oproti molekulovým vzorcům voratinů A a B jednu methylenovou podjednotku (-CH₂-). Následné studium struktury pomocí pokročilých 2D NMR experimentů pak ukázalo, že tato podjednotka chybí ve spiroketalové části molekuly (**Obr. 17**). Na závěr stojí za zmínku, že ačkoliv se voratiny A a B liší pouze v konfiguraci na jednom stereogenním centru (uhlík C-9) a jsou tedy diastereoizomery, jejich ECD spektra vykazují pouze velmi malé odchylky. [3,43]

2.2.2.3 Biologická aktivita voratinů A-C

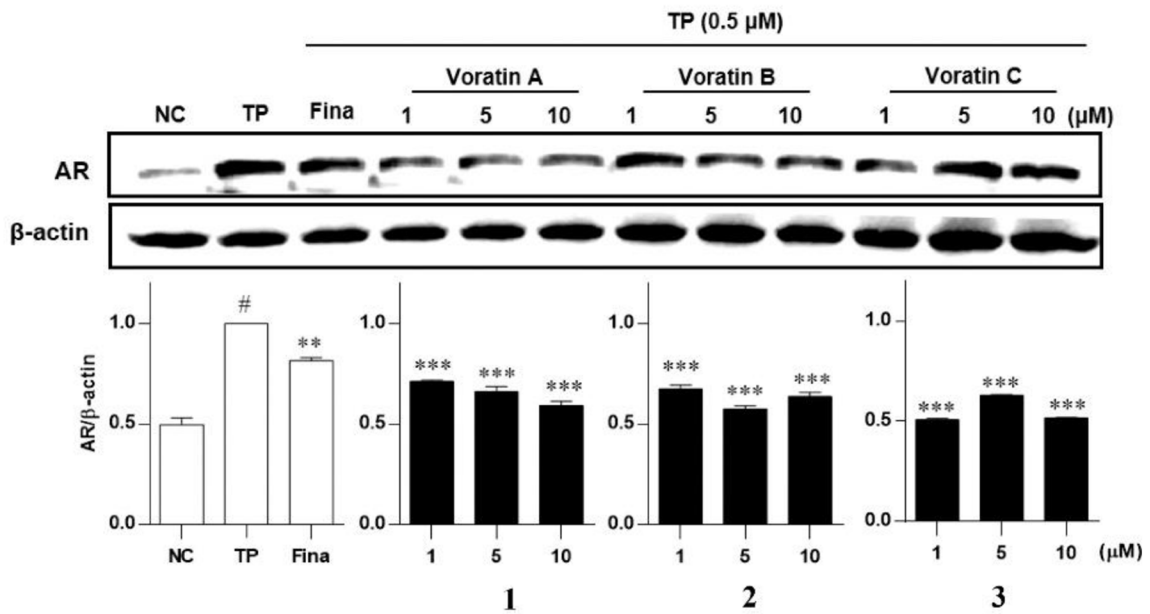
Častým onemocněním, celosvětově postihujícím přes 200 milionů mužů, je benigní hyperplazie prostaty (**Obr. 18**). Přibližně 50 % mužů okolo 60 let a 90 % mužů přesahujících věkovou hranici 80 let trpí tímto problémem. [4] Jedná se o histologický proces, při němž dochází ke zvětšování předstojné žlázy prostaty. Následná obstrukce vývodu močového měchýře pak není ojedinělým projevem tohoto onemocnění. Neléčená BPH může vyústit v nepříjemnosti při vyprazdňování, snížení průtoku moči či dokonce k retenci moči. Obvykle se k léčbě využívá inhibitorů 5- α reduktázy (5AR2) a α -blokátorů. [44] První typ léčiv zmenšuje objem prostaty. Druhá skupina léčiv jsou antagonisty α -androgenních receptorů (AR). [45,46] Snižují tedy tonus hladkého svalstva předstojné žlázy a hrdla močového měchýře, což vede ke zlepšení mikce. [4,47,48]



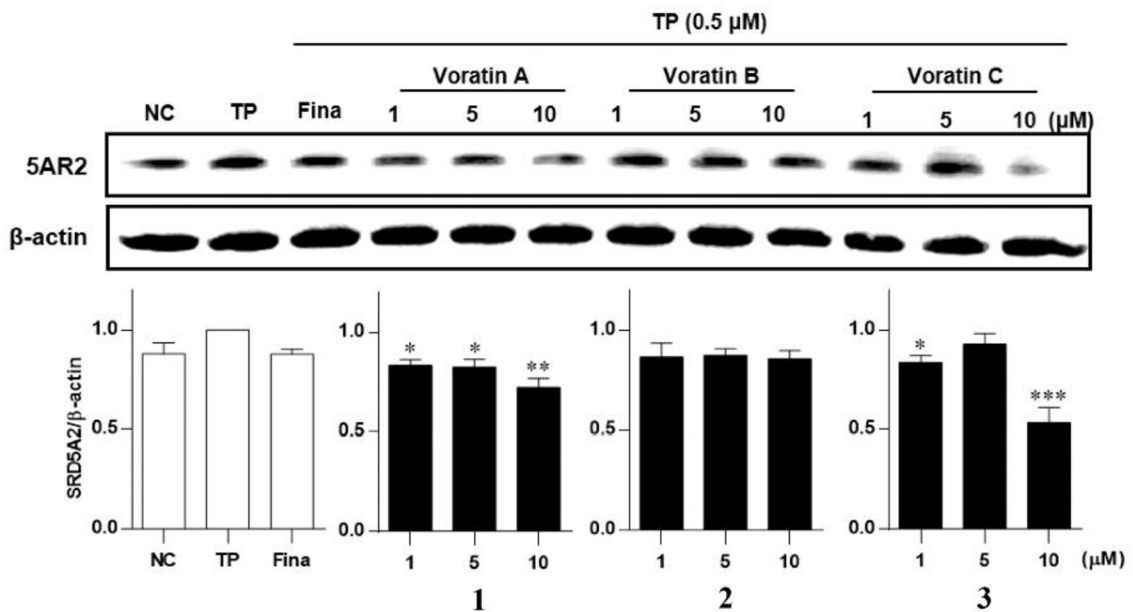
Obr. 18. Znázornění BPH, upraveno z ref. [49].

Biologická aktivita voratinů A-C byla testována na lidských prostatických buněčných liniích RWPE-1 a LNCap, kde při koncentracích 0,1 – 10 μ M byla pozorována cytotoxicita pouze u voratinu A (**23**) a voratinu B (**24**) při aplikacích na LNCap buňky (**Obr. 19**). [3] Aplikace voratinu C (**25**) při koncentraci 10 μ M vedla k významné inhibici 5- α reduktáz. Hladina tohoto proteinu byla snížena o 53 %. U LNCap linie byla pozorována značná inhibice androgenních receptorů (AR) všemi třemi látkami. Tyto slibné aktivity naznačují možné využití voratinů, jakožto nových léčiv benigní hyperplazie prostaty. [3]

(A)



(B)



Obr. 19. Inhibiční efekty Voratinů A-C (**23-25**) na hladiny koncentrace AR (A) a 5AR2 (B) a v buněčných liniích LNCap. Buňky byly ošetřeny testosteron-propionátem (TP, 0,5 μ M) a **23**, **24** nebo **25** (1, 5 a 10 μ M) po dobu 24 h. Hladiny proteinů AR a 5AR2 byly analyzovány metodou Western blotting. Výsledky jsou prezentovány jako průměr \pm směrodatná odchylka (n = 3); #p < 0,01 ve srovnání s neošetřenou kontrolou (NC), *p < 0,05, **p < 0,01 a ***p < 0,001 ve srovnání s buňkami ošetřenými TP. Převzato a upraveno z ref. [3].

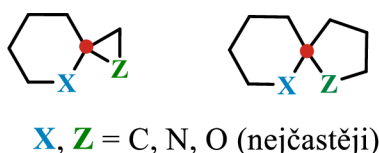
2.3 Spirocyclické systémy

V této části bych se rád věnoval stručnému úvodu do popisu a nástinu syntézy spirocyclických systémů, které jsou velmi často přítomny v rámci mnohých přírodních látek polyketalového typu a velmi často jsou díky své rigidní prostorové orientaci zodpovědné za pozorovanou biologickou aktivitu.

2.3.1 Obecné informace

Jako spirocyclické jsou označovány sloučeniny obsahující nejméně dva kruhy (může být i více), které jsou spojeny přes jeden atom uhlíku v sp^3 hybridizaci. Tento atom uhlíku se nazývá spiroatom, je plně substituován a musí tedy patřit oběma kruhům spirocyklu (**Obr. 20**). Spirosloučeniny byly izolovány z rostlin a zvířat a mnohé z nich vykazují různé zajímavé biologické aktivity. Za zmínku stojí například sedativní a hypnotické účinky spirobarbiturátů. [50,51] Tento typ sloučenin pak nachází uplatnění jak ve farmaceutickém průmyslu, tak i v zemědělství. [52,53] Díky svému širokému využití se pak spirocyclické systémy nacházejí i v centru pozornosti značného množství syntetických organických chemiků. [54–56]

Z pohledu medicínální chemie je význam těchto molekul dvojnásobný. Rigidní struktura spirocyklů zajišťuje (1) velmi dobře definované pokrytí chemického prostoru a vede tedy k menší konformační flexibilitě, a (2) sterické pnutí zejména u menších (3–4členné) kruhů spirocyklů umožňuje jejich aplikaci jako latentní kovalentní inhibitory. [57]

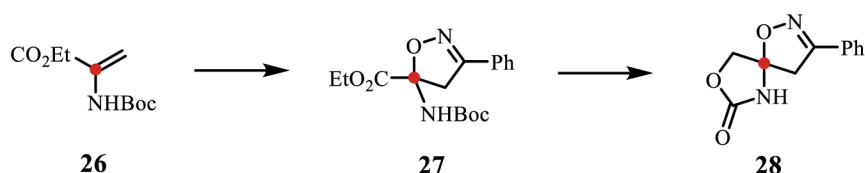


Obr. 20. Dva příklady obecných struktur spirocyklů s červeně vyznačeným spiroatomem.

2.3.2 Obecná syntéza spirocyklů

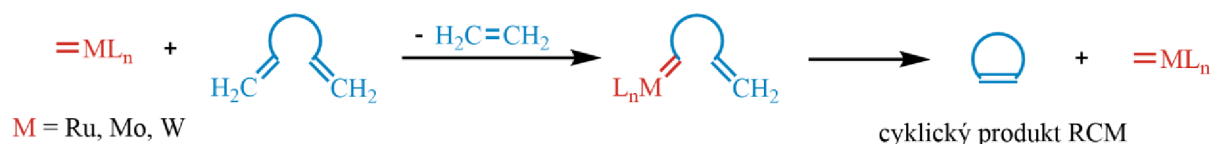
Tvorba spirocyclických systémů je poměrně složitou záležitostí. Hlavním úskalím je samotný spiroatom, který je zároveň chirálním centrem molekuly. Jejich stereoselektivní syntéza je tedy velmi náročným úkolem, neboť spolu s kvarterním spiroatomem uhlíku při syntéze zároveň zvyšuje celkovou rigiditu systému. Často používanými metodami syntézy spirosloučenin jsou tak z pohledu stereoselektivity velmi dobře definované reakce jako cykloadice sekundárně ve spojení s dalšími reakcemi jako například Fischerova syntéza aldolů, Claisenův přesmyk, Suzuki coupling či metathese. [55,58]

Pokud se zaměříme na nejčastěji využívané syntézy spirosloučenin, pak nejvíce využívaným přístupem jsou cykloadiční reakce. A těchto přístupů je poměrně hodně. [59–61] Jeden z nich například vychází z nenasycených 1,1-disubstituovaných alkenů. Jejich reakce s vhodnými např. 1,3-dipóly (**Obr. 21**) pak vede ke vzniku heterocyklů (např. **27**) u kterých je následně využita původní 1,1-disubstituce alkenu **26** k tvorbě nového cyklu **28**. Spiroatom uhlíku je pak tedy uhlík **C1** původního alkenu **26**. [58]



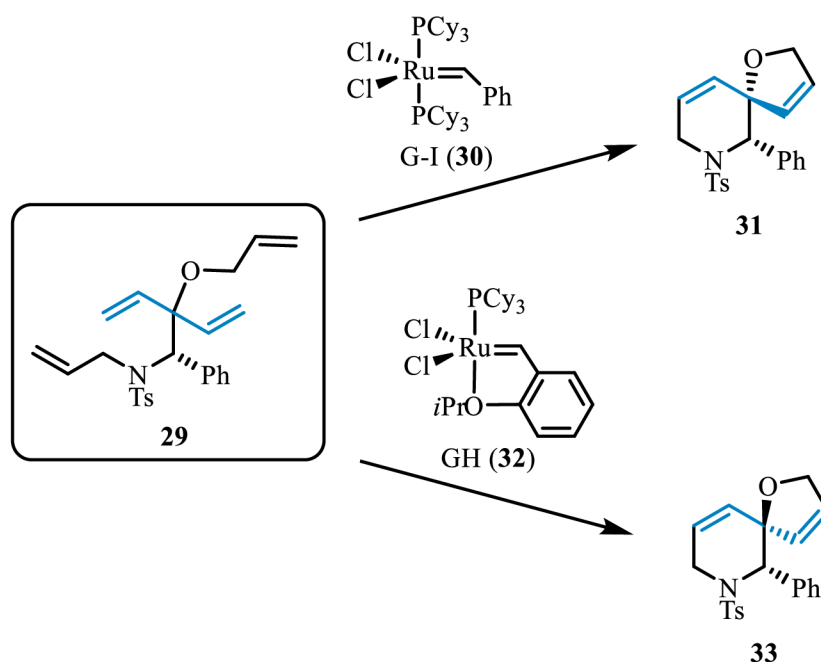
Obr. 21. Příklad tvorby spirosloučeniny založený na cykloadičním přístupu. Spiroatom uhlíku **C1** je označen **červeně**.

Druhým příkladem syntézy je pak přístup založený na metathesi. Jedním typem je metathese uzavírající kruh (RCM = *ring-closing metathesis*). Obecně se jedná o reakci, při níž dochází ke spojení dvou nenasycených uhlíkatých řetězců pomocí jejich terminálních dvojných vazeb v jeden kruh (**Obr. 22**). Jako katalyzátory jsou nejčastěji používány komplexy přechodných kovů (wolfram, molybden) stabilizované pomocí karbenů anebo fosfinů. Zvolený typ katalyzátoru může ovlivnit výslednou podobu produktu. [62,63]



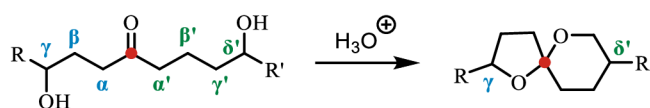
Obr. 22. Obecné schématické znázornění RCM reakce.

Například syntéza spirocyklických sloučenin **31** a **33** je založena na dvou metathetických reakcích látky **29** (**Obr. 23**). Při použití katalyzátoru **30** (Grubbsův katalyzátor první generace = G-I) došlo přednostně ke vzniku produktu **31**. Naopak s katalyzátorem **32** (Grubbsův-Hoveydův katalyzátor = GH) v reakční směsi primárně vzniká spiro-epimerický isomer **33**. [64]



Obr. 23. Schématické znázornění dvou kruh uzavírajících metathesi látky **29**.

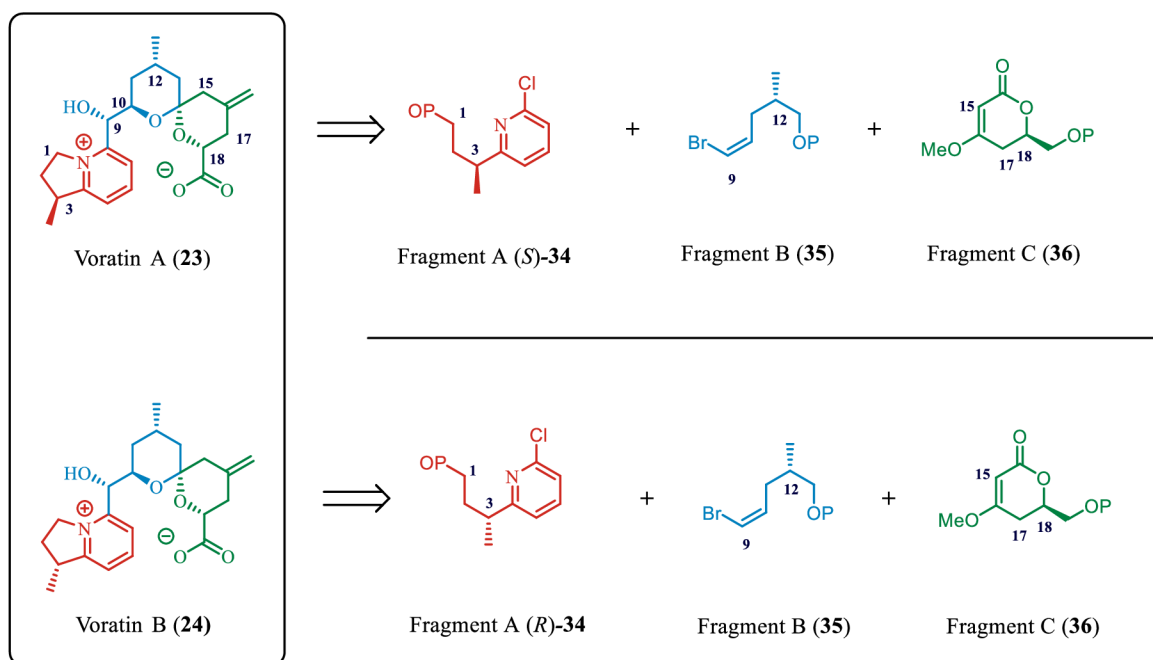
Na závěr bych chtěl vyzdvihnout biomimetický přístup k syntéze spirosloučenin acetalového typu. Tento přístup je uplatnitelný v případě sloučenin obsahujících keto funkční skupinu a dvě hydroxylové skupiny v postranních řetězcích v pozicích γ a γ' (tvorba 5,5-spirocyklů), γ a δ' (tvorba 5,6-spirocyklů) anebo δ a δ' (tvorba 6,6-spirocyklů). Tento typ substrátů v přítomnosti H_3O^+ iontů následně podléhá sérii cyklizačních reakcí (intramolekulární tvorba acetalu) za vzniku termodynamicky nejstabilnějšího acetalu. [65,66]



Obr. 24. Příklad obecné tvorby 5,6-spirosloučeniny acetalového typu.

3 Výsledky a diskuze

Jak již bylo zmíněno, náplní této práce je vývoj syntetických metod vedoucích k fragmentu A molekuly Voratinu A (**23**). Následující část shrnuje mé dosavadní dosažené výsledky. V podkapitole 3.1 nejprve vysvětluji zvolenou retrosyntézu voratinů A (**23**) a B (**24**). Zjednodušený přehled pak je zachycen níže (**Obr. 25**). Podkapitola 3.2 se pak zabývá retrosyntézou samotného fragmentu A (**34**), jež bude připraven v obou optických antipodech (*S*)-**34** a (*R*)-**34**. Podkapitola 3.3 se pak věnuje syntéze fragmentu A (**34**) a podkapitola 3.4 výsledkům biologického testování.



Obr. 25. Retrosyntéza jednotlivých voratinů A a B.

3.1 Retrosyntéza Voratinů A a B

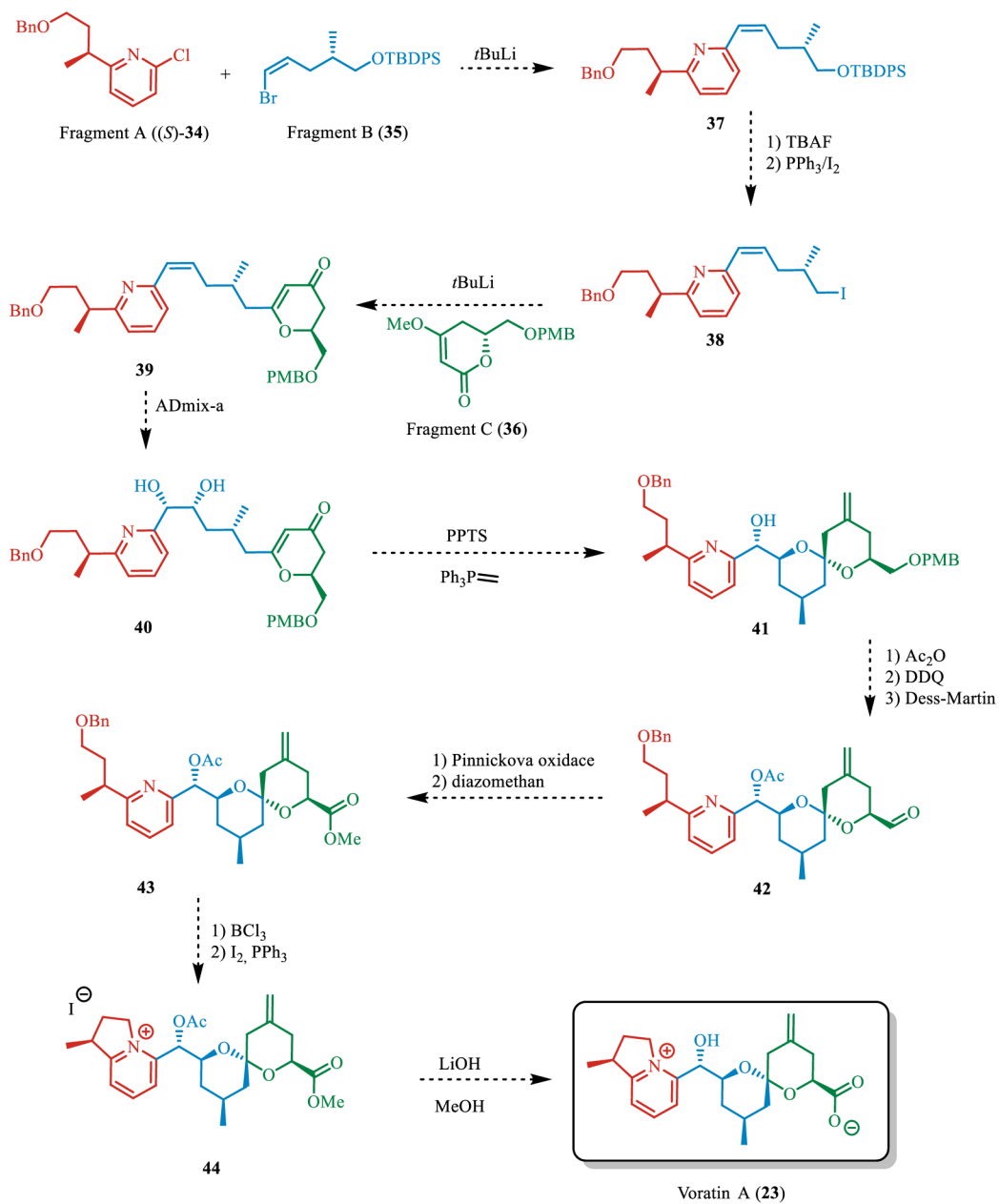
Retrosyntéza (**Obr. 25**) vychází z pomyslného rozdělení molekuly voratinu A (**23**) resp. voratinu B (**24**) na tři části: fragment A (**34**), fragment B (**35**) a fragment C (**36**). Jediným rozdílem, jímž se sloučeniny **23** a **24** liší, je absolutní konfigurace na atomu uhlíku C3 dihydroindoliziniového kruhu. Pro voratin A (**23**) tedy budeme připravovat fragment A s C3 konfigurací *S* ((*S*)-**34**). Obdobnou cestou pak můžeme připravit také fragment B s konfigurací *R* ((*R*)-**34**).

Syntéza voratinu A (**23**) je pak navržena jako konvergentní (není lineární syntézou) a je založena na postupném spojení tří pokročilých intermediátů (**Obr. 26**). Dle našeho návrhu by se nejprve měl spojit fragment A (*S*)-**34** s Fragmentem B (**35**) (adice *in situ* generovaného vinylového aniontu na chlorpyridinový skelet) za vzniku molekuly **37**. Transformace aduktu **37**

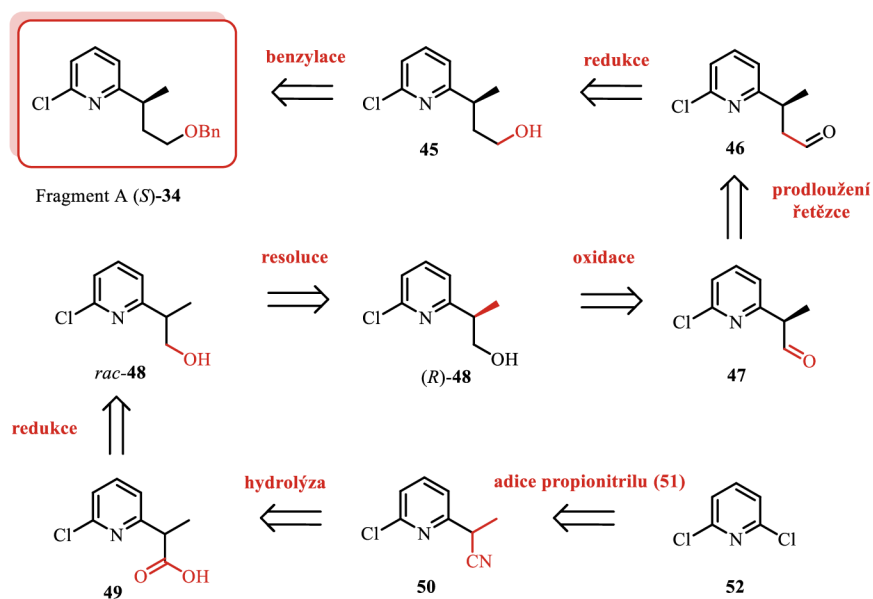
na odpovídající halogen derivát **38** bude uskutečněna pomocí dvoukrokové sekvence (TBAF deprotektce následovaná PPh_3/I_2 transformací alkoholu na jododerivát). Transformace alkyl jodidu **38** na odpovídající organolithnou sloučeninu následovaná její adicí na lakton **36** (fragment C) poskytne enon **39**. Instalace dihydroxy skupiny pomocí Sharplesovy dihydroxylace (ADmix- α) poskytne spirocyklizační prekurzor **40**, jenž v přítomnosti H_3O^+ poskytne cílovou spiro-sloučeninu. Transformace ketonu na *exo*-olefin pomocí Wittigova reagentu pak poskytne téměř finální produkt **41**. Terminální modifikace spiro-umístěné karboxylové skupiny a finální cyklizace, tvořící dihydroindolizinový kruh, zakončí syntézu voratinu A (**23**).

3.2. Retrosyntéza fragmentu A

Z pohledu detailní retrosyntézy jsme navrhli syntézu dle následujících kroků (**Obr. 27**): Uvažovali jsme, že kýžená molekula (*S*)-**34** může být připravena benzylací alkoholu **45**, jenž lze získat redukcí aldehydu **46**, jehož syntéza je založena na reakci aldehydu **47** s Wittigovým reagentem designovaným pro CH_2 prolongaci systému. Výchozí aldehyd **47** lze potom získat oxidací alkoholu (*S*)-**48**. Syntéza chirálně obohaceného alkoholu (*S*)-**48** byla pak založena na kinetické enzymatické resoluci alkoholu *rac*-**48**. Tento alkohol pak lze připravit z odpovídající karboxylové kyseliny **49**, jež vznikne hydrolyzou nitrilu **50**. Nitril **50** pak lze připravit monoadicí aniontu generovaného z propionitrilu **51** na dichloropyridin **52**.



Obr. 26. Schématické znázornění retrosyntézy voratinu A (23).

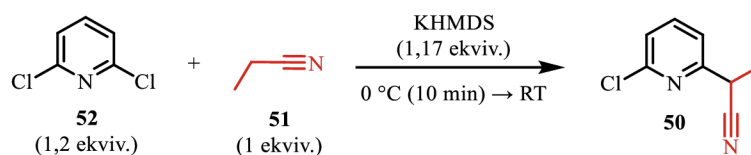


Obr. 27. Schématické zobrazení retrosyntézy fragmentu A.

3.3 Syntéza vedoucí k fragmentu A

3.3.1 Adice propionitrilu

Prvním krokem syntézy je příprava nitrilu **50**. Výchozí látkou zde byl komerčně dostupný 2,6-dichlorpyridin **52**, který v přítomnosti báze KHMDS reagoval s propionitrilem **51**[67]. Cílem této reakce je nechat zreagovat generovaný draselný aniont právě jednou (monoaddice) s dichlorpyridinem **52**. Na základě dříve publikovaného protokolu [67] jsme tedy ponechali zreagovat generovaný aniont nitrilu **51** (1,0 ekviv.) s nadbytkem dichlorpyridinu **52** (**Tab. 1**). Nejprve jsme ke generaci aniontu využívali KHMDS roztok v toluenu (řádek 1), který po skončení reakce (reakce dále neprobíhala, detekce progresu reakce pomocí TLC a HPLC/MS) poskytl kýžený produkt **50** v 53% výtěžku. Prodloužení reakční doby nevedlo ke zvýšení výtěžku reakce (řádek 2). Abychom zvýšili výtěžek reakce, přistoupili jsme ke změně rozpouštědla. Nepochopitelně toluen byl zaměněn za polární THF (řádek 3). Rozhodli jsme se tedy změnit rozpouštědlo z nepolárního (toluen) na polární (THF) ze dvou důvodů: (1) očekávali jsme, že struktura KHMDS v rámci rozpouštědla (THF vs. Toluén) bude jiná (dimery či trimery oproti monomerům očekávaných v rámci toluenu) a (2) předpokládali jsme, že i rozpustnost produktů, resp. výchozích látek může být v závislosti na rozpouštědle rozdílná. Ukázalo se, že THF jako rozpouštědlo nemělo na průběh reakce zásadní vliv (řádek 3). Použití THF jako rozpouštědla, v němž byl dodáván komerčně dostupný KHMDS roztok, naopak vliv na reakci mělo a očekávaný monoaddukt **50** byl izolován ve výtěžku ~85 % (řádek 4, surový produkt) resp. 76 % čistého produktu, pakliže byla reakce provedena v 50mmol měřítku (řádek 5).

Tab. 1. Reakční podmínky přípravy nitrilu **50**.

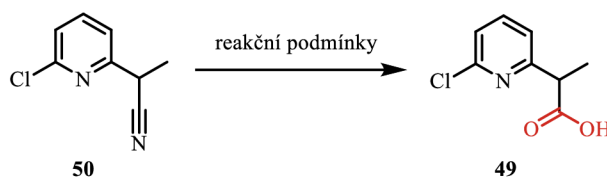
	Látka 52 [mmol]	Báze	Podmínky	Výtěžek ^{a)} [%]
1	2,5 mmol	1.0 M KHMDS v toluenu	Toluen (0,2M), 1 h	53 %
2	2,5 mmol	1.0 M KHMDS v toluenu	toluen (0,2M), 2 h	52 %
3	2,5 mmol	1.0 M KHMDS v THF	THF (0,2M), 2 h	56 %
4	2,5 mmol	1.0 M KHMDS v THF	toluen (0,2M), 2 h	99 % ^{b)}
5	50 mmol	1.0 M KHMDS v THF	toluen (0,2M), 2 h	76 %^{c)}

^{a)} Pro čistou (>98% dle HPLC) izolovanou látku. ^{b)} Nepurifikováno. Výtěžek surového produktu o čistotě 84% dle HPLC/MS.

^{c)} Reprodukovatelný výtěžek. Reakce prováděna 4x za stejných podmínek s výtěžky 76-84%.

3.3.2 Hydrolýza nitrilu

Dalším krokem byla transformace nitrilu **50** na karboxylovou kyselinu **49** (Tab. 2). Nejprve jsme se rozhodli provést tuto hydrolýzu pomocí kyselých (Brønstedova kyselina) podmínek, neboť jsme se obávali možných nežádoucích vedlejších reakcí, které by mohly nastat při bazické hydrolýze (adice hydroxidového aniontu na pyridinový kruh). Dle první podmínky jsme tedy ponechali hydrolyzovat nitril **50** v přítomnosti 37% aq. HCl (řádek 1). [68] Avšak po dvou hodinách při zvýšené teplotě (100 °C) nebyl při této reakci pozorován žádný úbytek výchozí látky. Tato situace se nezměnila ani po delší reakční době (řádek 2). Zvýšení ekvivalentů kyseliny (řádek 3) ani výměna HCl za H₂SO₄ (řádek 4) [69] nevedla k tvorbě ani stop produktu **49**. Od kyselé hydrolýzy bylo tedy opuštěno a dalším postupem se stala bazická hydrolýza za pomoci KOH.[70] Při použití hydroxidu o koncentraci 0,2M (1,1 ekvív., řádek 5) se již nitril **50** začal po 24h hydrolyzovat a kýžená kyselina **49** mohla být izolována, i když pouze v nízkém 27% výtěžku. Rozhodli jsme se tedy provést reakci s koncentrovanějším roztokem KOH (2M aq.) za vyšší teploty. Za těchto podmínek (řádek 6) byl cílový produkt izolován v 55% výtěžku. Další optimalizace reakce spojená s ohodnocením vlivu teploty a množství báze na reakční výtěžek vedlo k izolaci cílového produktu **49** v uspokojivých 85 % (řádek 9).

Tab. 2. Optimalizace hydrolyzy nitrilu **50** na karboxylovou kyselinu **49**.

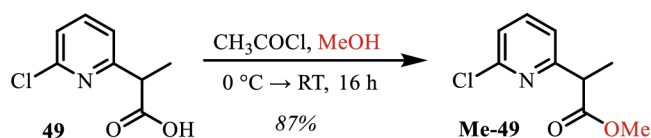
	Reagent [ekviv]	Reakční podmínky	Výtěžek [%] ^{a)}
1	37% HCl [35 ekviv.]	100 °C, 2 h	n.r. ^{b)}
2	37% HCl [30 ekviv.]	100 °C, 24 h	n.r. ^{b)}
3	37% HCl [63 ekviv.]	100 °C, 2 h	n.r. ^{b)}
4	98% H ₂ SO ₄ [20 ekviv.]	100 °C, 4 h	n.r. ^{b)}
5	0,2M KOH [1,1 ekviv.]	100 °C, 24 h	27 %
6	2M KOH [2,2 ekviv.]	120 °C, 24 h	55 %
7	2M KOH [1,1 ekviv.]	150 °C, 24 h	85 %
8	2M KOH [1,1 ekviv.]	120 °C, 24 h	92 % ^{c)}
9	2M KOH [2,2 ekviv.]	120 °C, 24 h	80 %

^{a)} Pro čistou (>98% dle HPLC) izolovanou látku. ^{b)} n.r. = žádná reakce (*no reaction*), dle ¹H NMR spektra surové reakční směsi.

^{c)} Nepurifikováno. Výtěžek surového produktu o čistotě 84% dle HPLC/MS.

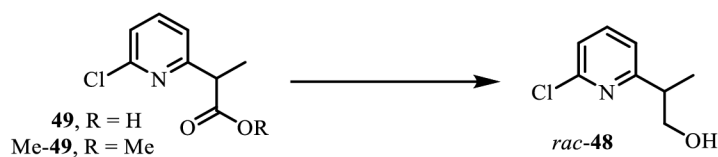
3.3.3 Redukce karboxylové kyseliny **49** na alkohol *rac*-**48**

Alkohol *rac*-**48** se dá získat redukcí karboxylové kyseliny **49** (Tab. 3). Již od začátku jsme uvažovali nad tím provést tuto reakci dvěma různými způsoby. Pakliže totiž reakci provádíme přímo z karboxylové kyseliny, obvykle jsou potřeba vyšší reakční teploty a silná redukční činidla. Podmínky, jež mohou potenciálně vést k degradaci našeho substrátu (redukce chloropyridinové podskupiny) anebo ke snížení výtěžků reakce z důvodu vysokých ztrát při izolaci vzniklého alkoholu (vznik solí, jež mají vysokou afinitu ke vzniklému alkoholu). Rozhodli jsme se tedy nejprve vyzkoušet redukcí methyl esteru **Me-49** připraveného přímo z kyseliny **49** za podmínek Fischerovy esterifikace (H₃O⁺ katalyzovaná esterifikace, kde HCl (zdroj H₃O⁺) je generován *in situ* reakcí MeOH s acetylchloridem) (Obr. 28). Cílový ester **Me-49** byl izolován ve výtěžku 87 %.



Obr. 28. Příprava methylesteru **Me-49**.

Redukce esteru **Me-49** (**Tab. 3**, řádek 1) pomocí nadbytku DIBAL-H probíhala jednoduše a poskytla alkohol *rac-48* v 78 % výtěžku. Pakliže byla tato reakce provedena za stejných reakčních podmínek ale s využitím karboxylové kyseliny **49** jako výchozí látky, žádná tvorba produktu nebyla pozorována a z reakční směsi byla izolována pouze výchozí látka (kyselina **49**) (řádek 2). DIBAL-H tedy není dostatečně silným redukčním činidlem pro tuto transformaci. [71] Museli jsme tedy pro tuto reakci zvolit silnější redukční činidlo a naše volba padla na LiAlH_4 . Pokud byl LiAlH_4 použit k redukci esteru **Me-49**, reakce probíhala s výtěžkem 52 resp. 50 % v závislosti na množství výchozí látky a snadnosti izolace (řádky 3 a 4). [72] Aplikace LiAlH_4 na reakci s kyselinou **49** pak vedla k mírnému snížení výtěžku reakce (řádky 5 a 6). Relativně nízká schopnost izolovat čistý produkt *rac-48* z těchto reakčních směsí nás vedla k tomu hledat alternativní reagent k LiAlH_4 . Naše volba padla na nedávno publikovaný protokol, jenž využívá k redukci komplex boranu a amoniaku ($\text{BH}_3\cdot\text{NH}_3$) jako redukční činidlo a probíhá za katalýzy TiCl_4 . [73] Tato metoda slibovala čistou a rychlou redukci karboxylové skupiny přímo na alkohol. Ukázalo se, že již přímá aplikace publikovaných podmínek je nám schopna poskytnout kýžený alkohol *rac-48* v 53 % výtěžku (řádek 7). Mírné zvýšení množství katalyzátoru (z 10 mol % na 20 mol %) pak vedlo k dramatickému nárůstu výtěžku reakce na 82 % (řádek 8). Navíc se ukázalo, že tento typ reakce můžeme velmi snadno provádět i s využitím většího množství výchozí látky (řádek 9) bez pozorovaného vlivu na reakční výtěžek (83 %). Mechanismus této zajímavé reakce je detailněji diskutován v podkapitole 3.3.3.1.

Tab. 3. Optimalizace přípravy alkoholu *rac*-48.

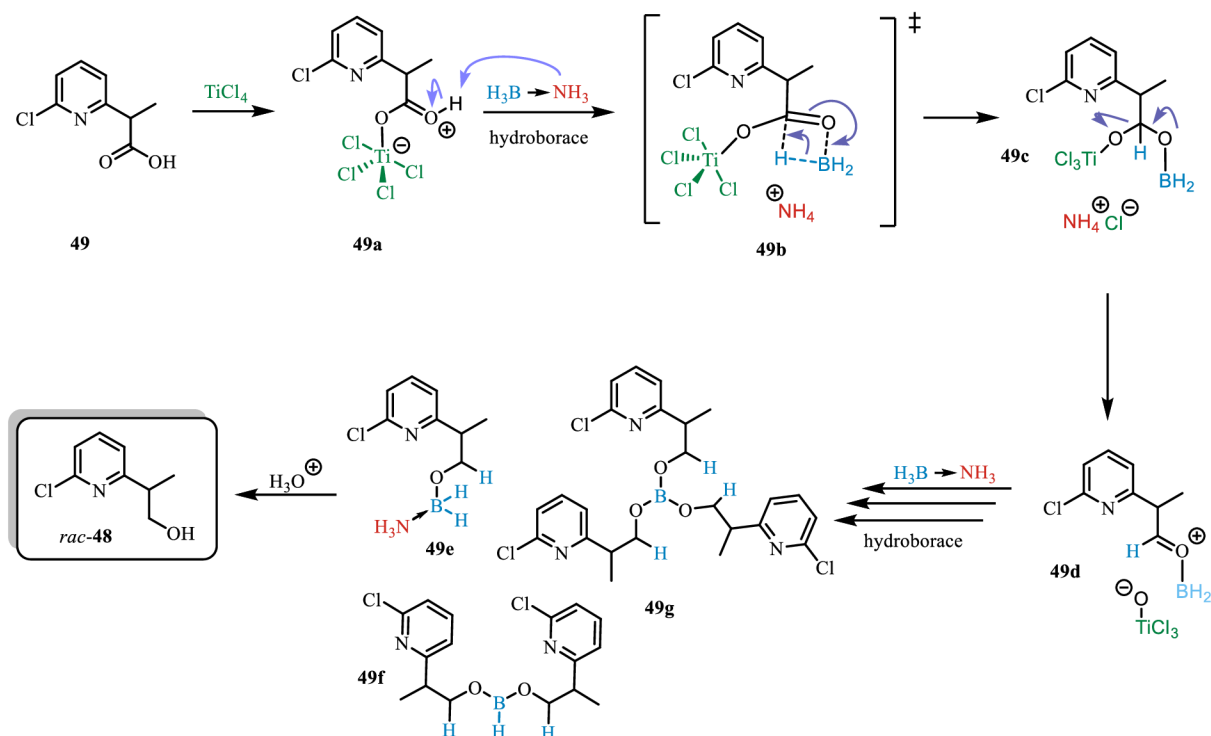
	Výchozí látka [mmol]	Redukční činidlo [ekviv.]	Podmínky	Výtěžek ^{a)} [%]
1	Me-49 (2 mmol)	DIBAL-H (2,5 ekviv.)	-78 °C (30 min) → RT, 8 h	83 %
2	49 (2 mmol)	DIBAL-H [2,5 ekviv.]	-78 °C (30 min) → RT, 24 h	n.r. ^{b)}
3	Me-49 (2 mmol)	LiAlH ₄ [1,1 ekviv.]	RT; 1 h	52 %
4	Me-49 (10 mmol)	LiAlH ₄ [1,2 ekviv.]	RT; 1 h	50 %
5	49 (2 mmol)	LiAlH ₄ [1,2 ekviv.]	RT; 1 h	49 %
6	49 (2 mmol)	LiAlH ₄ [1,2 ekviv.]	RT; 1 h	51 %
7	49 (2 mmol)	BH ₃ .NH ₃ [2 ekviv.], TiCl ₄ [0,1 ekviv.]	0 °C → RT; 4 h	53 %
8	49 (2 mmol)	BH ₃ .NH ₃ [2 ekviv.], TiCl ₄ [0,2 ekviv.]	0 °C → RT; 4 h	82 %
9	49 (5 mmol)	BH ₃ .NH ₃ [2 ekviv.], TiCl ₄ [0,2 ekviv.]	0 °C → RT; 4 h	83 %

^{a)} Pro čistou (>98% dle HPLC) izolovanou látku. ^{b)} n.r. = žádná reakce (*no reaction*), dle ¹H NMR spektra surové reakční směsi.

3.3.3.1 Mechanismus redukce karboxylové kyseliny založený na využití BH₃.NH₃ komplexu jako redukčního činidla a TiCl₄ jako katalyzátoru

komplexu jako redukčního činidla a TiCl₄ jako katalyzátoru

Přesný mechanismus reakce není doposud detailně znám. Předpokládaný reakční mechanismus, jenž jsme navrhli na základě experimentů popsaných v literatuře, je přiblížen na **Obr. 29** [73]. V něm se nejprve TiCl₄ (silná oxofilní Lewisova kyselina) koordinuje na karbonylový kyslík karboxylové kyseliny. Následuje hydroborace aktivovaného karbonylu pomocí boranu (cyklický tranzitní stav), jenž dává vzniknout tetraedrickému meziprojektu **49c**. Následná, sterickým pnutím (kvarterní centrum) hnaná, eliminace pak dá vzniknout aldehydu **49d**. Následná redukce aldehydu na alkohol dá vzniknout široké plejádě boranových komplexů, které při reakčním work-upu uvolní izolovaný alkohol *rac*-48.



Obr. 29. Navržený reakční mechanismus redukce kyseliny **49** pomocí $\text{TiCl}_4/\text{BH}_3\cdot\text{NH}_3$ komplexem.

3.3.4 Enzymatická rezoluce

V tomto okamžiku jsme se tedy dostali do bodu, kdy jsme měli snadný přístup k oběma antipodům alkoholu *rac*-**48**, a mohli jsme tedy přistoupit k jejich separaci. K tomuto účelu jsme se rozhodli využít kinetické enzymatické rezoluce. Jako enzym byla na základě literárních poznatků zvolena prasečí lipáza (**Obr. 30**). [74]

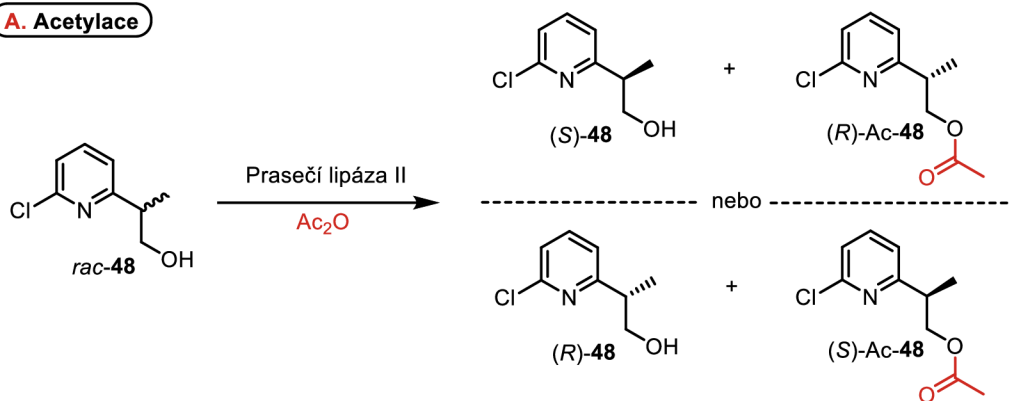
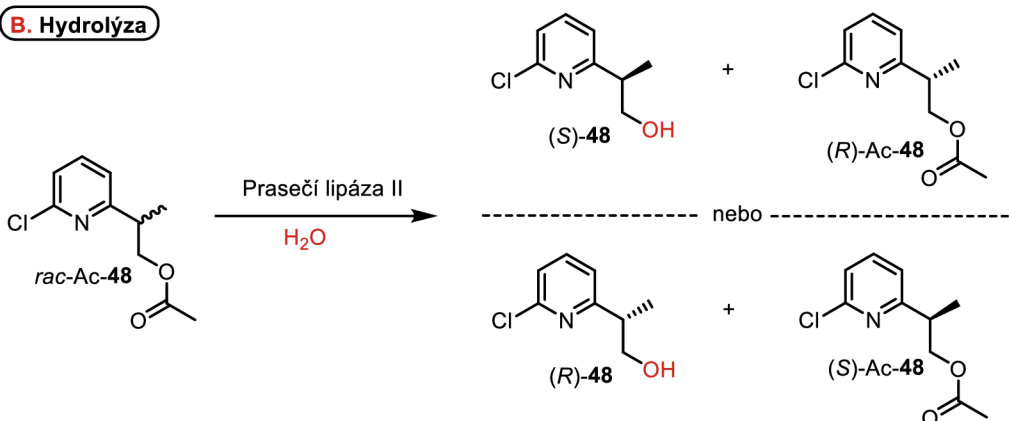


Obr. 30. Struktura prasečí lipázy. [74]

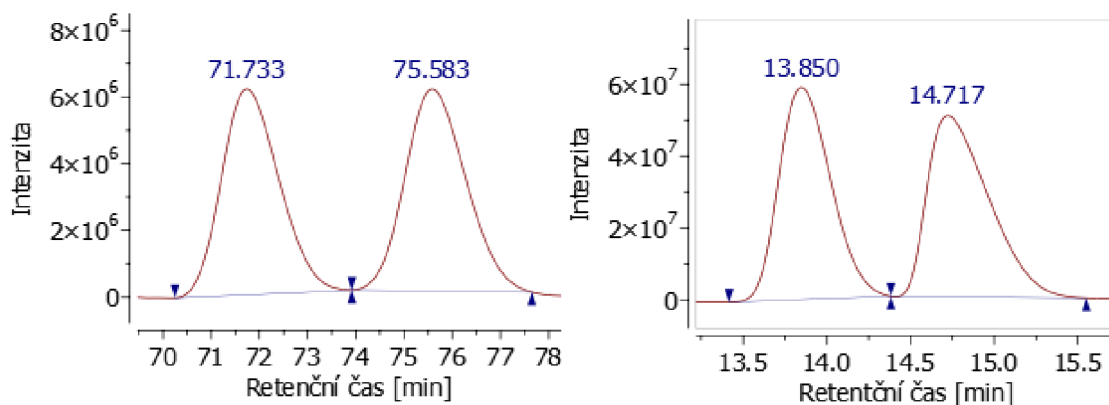
Abychom maximalizovali naše šance na získání co nejvíce opticky čistého alkoholu, bylo rozhodnuto, že budou testovány dva různé přístupy k enzymatické rezoluci. První spočívá v tom, že prasečí lipáza bude ponechána reagovat s alkoholem *rac*-**48** v přítomnosti anhydridu

kyseliny octové. Na základě známé struktury prasečí lipázy II (resp. na základě znalosti struktury jeho vazebného místa) by se měl s velkou pravděpodobností jeden z alkoholů acylovat rychleji než ten druhý. Odhad toho, jestli bude přednostně acylován alkohol (*S*)-**48** anebo (*R*)-**48** je poněkud obtížný, neboť chirální centrum je v β poloze vůči acylované hydroxy skupině (**Obr. 31A**). Pakliže nedojde k úspěšné rezoluci, bude proveden opačný přístup, založený na hydrolýze esteru *rac*-Ac-**48** (lipázami mediovaná esterifikace je reverzibilní reakce) (**Obr. 31B**). Efektivita rezolučního kroku bude určena pomocí HPLC chromatografie využívající chirálních stacionárních fází (tzv. „chirálních“ kolon). Absolutní stereokonfigurace na C3 atomu uhlíku pak bude určena na základě analýzy ^1H NMR spekter pomocí tzv. Mosherových esterů.

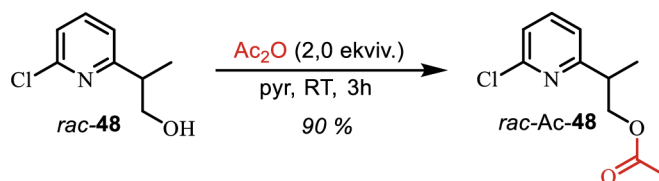
Abychom tedy mohli přistoupit k efektivní optimalizaci kinetické rezoluce, nejprve jsme museli vyvinout efektivní metodu, jež by nám umožnila separovat oba enantiomery alkoholu *rac*-**48** a esteru *rac*-Ac-**48**. Po dlouhém hledání podmínek (kolony a mobilní systémy) se nám povedlo separovat oba enantiomery *rac*-**48** alkoholu (**Obr. 32A**) pomocí CHIRALCEL[®] OZ-H kolony s využitím mobilní fáze *n*-hexan:isopropanol = 99:1 v isokratickém módu ($t_{R1} = 71,13$ min; $t_{R2} = 75,58$ min). Oba enantiomery acylovaného alkoholu *rac*-Ac-**48** (**Obr. 32B**) pak byly separovány pomocí CHIRAL ART Amylose-SA kolony s využitím mobilní fáze *n*-hexan:isopropanol = 99:1 v isokratickém módu ($t_{R1} = 13,85$ min; $t_{R2} = 14,72$ min). Požadovaný acylovaný alkohol *rac*-Ac-**48** byl připraven acylací alkoholu *rac*-**48** pomocí standardního protokolu (**Obr. 33**).

A. Acetylace**B. Hydrolyzá**

Obr. 31. Schématické znázornění principu dělení enantiomerů založených na kinetické enzymatické rezoluci.



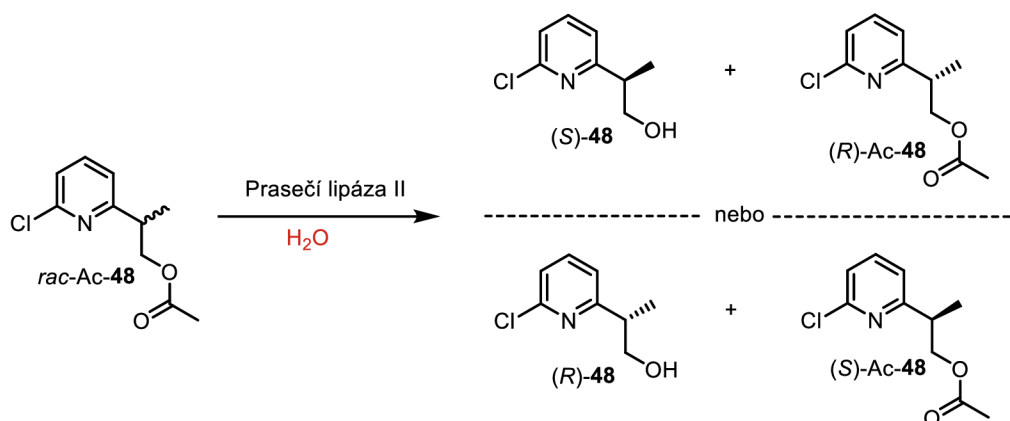
Obr. 32. Chromatogramy zobrazující rozdělení píků enantiomerů látek *rac*-48 (vlevo) a *rac*-Ac-48 (vpravo).



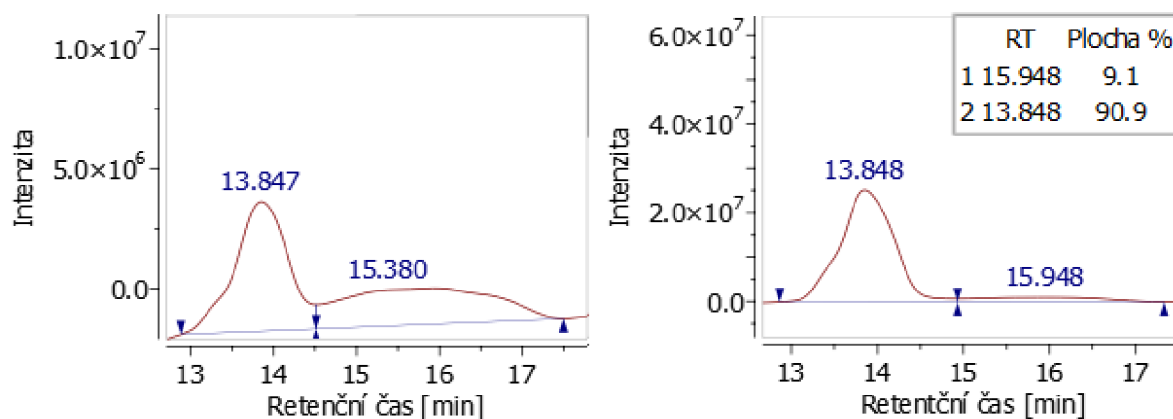
Obr. 33. Reakční schéma přípravy acetyl esteru *rac*-Ac-48.

3.3.4.1 Rezoluce hydrolyzou

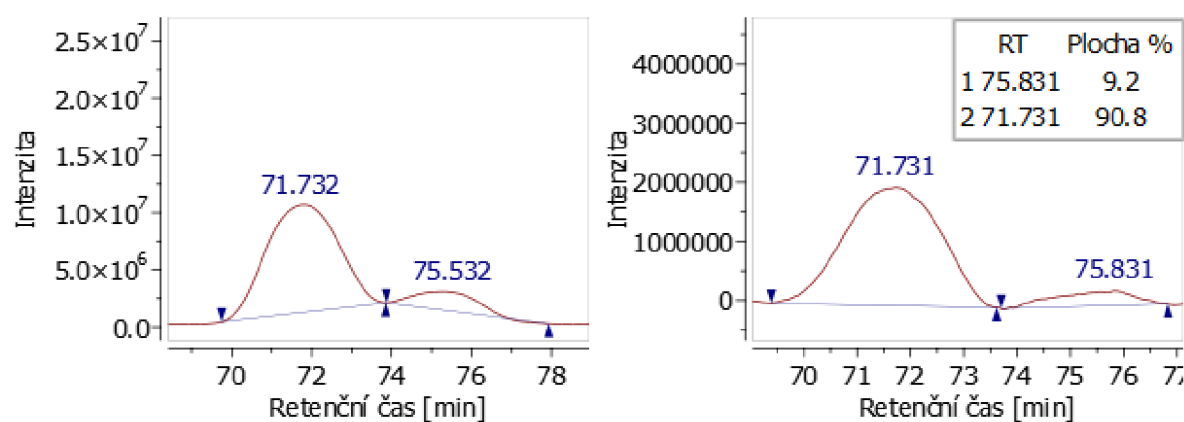
Po několika experimentech, kdy jsme se pokoušeli o enzymatickou kinetickou rezoluci jak pomocí esterifikace (**Obr. 31A**), tak hydrolyzy (**Obr. 31B**), jsme se zaměřili na optimalizaci rezoluce s využitím hydrolyzy esteru *rac*-Ac-48 v přítomnosti prasečí lipázy (**Obr. 34**). S využitím standartního protokolu, jež používáme při lipázami mediovaných reakcích v naší skupině, jsme vyzkoušeli hydrolyzu esteru pomocí fosfátového pufru (pH = 7) při teplotě 37 °C. Reakce byla monitorována v průběhu času pomocí HPLC a byl sledován úbytek jednotlivých enantiomerů Ac-48 či přírůstek jednotlivých enantiomerů alkoholu 48. V průběhu času docházelo k přednostní konverzi jednoho ze dvou enantiomerů Ac-48 (enantiomer s $t_R = 14,72$ min) (**Obr. 35**). Po jeho úplném vymizení došlo k ukončení reakce. Taktéž byl pozorován přírůstek jednoho enantiomeru alkoholu 48 (**Obr. 36**). Výsledné produkty (alkohol 48 s $t_R = 71,73$ min a ester Ac-48 s $t_R = 13,85$ min) byly izolovány s 39% a 35% výtěžkem. Jejich optická čistota byla určena na základě HPLC analýzy jako *e.r.* = 91:9 pro alkohol 48 s $t_R = 71,73$ min, a *e.r.* = 91:9 pro Ac-48 s $t_R = 13,85$ min.



Obr. 34. Schématické znázornění hydrolytické rezoluce esteru *rac*-Ac-48.



Obr. 35. Chromatogramy zobrazující úbytek jednoho enantiomeru ($t_R = 15,38$ (15,95) min) látky Ac-**48** v průběhu reakce v čase 80 min (vlevo) a po 120 min (vpravo) od začátku reakce.



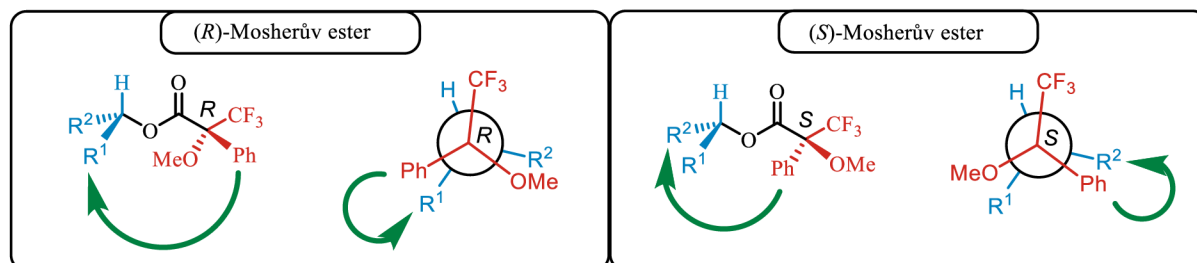
Obr. 36. Chromatogramy zobrazující přírůstek jednoho enantiomeru ($t_R = 71,73$ min) látky **48** v průběhu reakce v čase 80 min (vlevo) a 120 min (vpravo) od začátku reakce.

3.3.5 Určení absolutní konfigurace alkoholu (*R*)-**48** pomocí Mosherovy analýzy

O kterou konfiguraci (*R* nebo *S*) se u obou látek (*rac*-**48** a *rac*-Ac-**48**) jedná, je možné zjistit pomocí tzv. Mosherovy analýzy. Jedná se o často využívaný způsob určení neznámé konfigurace na stereogenním centru sekundárních alkoholů. Je možné ji ovšem použít, i pokud se chirální uhlík nachází vůči hydroxylové skupině v poloze β , jak je tomu v případě mnou analyzovaných molekul. Další užitečnou informací, kterou je možné touto analýzou získat, je enantiomerní přebytek. Ten vyjadřuje poměr dvou enantiomerů ve vzorku.

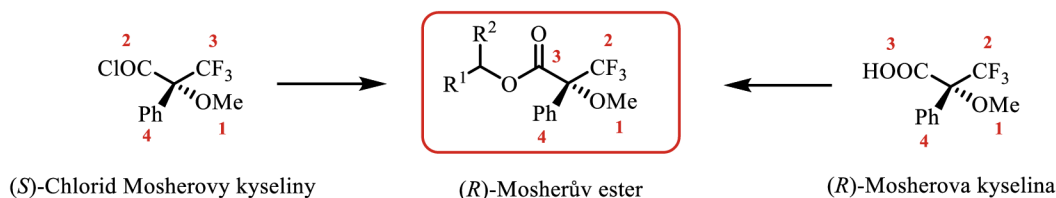
Tato metoda určení absolutní konfigurace vychází z poznatku, že protony diastereoizomerních esterů Mosherovy kyseliny mají v ^1H NMR spektrech rozdílné chemické posuny, jež jsou způsobeny sterickými efekty. Fenylová skupina Mosherovy kyseliny má anizotropní magnetický stínící efekt vůči protonům vyskytujícím se nad nebo pod rovinou tohoto kruhu, což vede k vyšším chemickým posunům δ (= menší hodnoty ppm) těchto

stíněných protonů (**Obr. 37**). Protony R^1 skupiny, vyskytující se v blízkosti fenylové skupiny, jsou v případě R konfigurace stíněny, a mají tedy vyšší hodnoty chemického posunu. Pokud by se jednalo naopak o konfiguraci S , byly by tyto hodnoty nižší.



Obr. 37. Schématické znázornění stínícího efektu fenylové skupiny (zeleně).

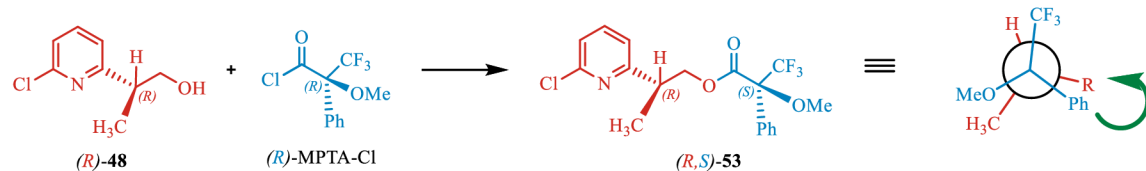
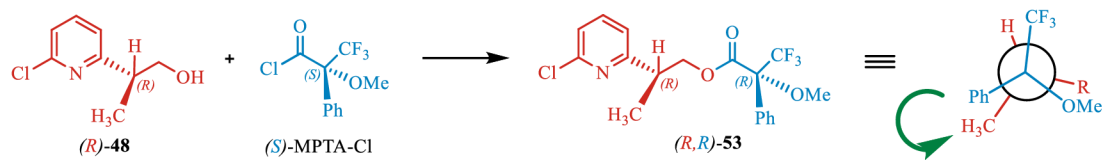
Praktikovaným postupem je tedy syntetizovat jak oba enantiomery Mosherova esteru alkoholu, u něhož chceme zjistit absolutní konfiguraci, a porovnat jejich chemické posuny v ^1H NMR spektrech. V praxi se častěji používají halogenidy Mosherovy kyseliny, zejména chloridy, protože v tomto případě není potřeba přidávat acylační činidlo, jako je tomu v případě kyselin. Navíc jsou chloridy Mosherových kyselin (oba enantiomery) komerčně dostupné. Při použití chloridů kyseliny je nutné mít na paměti, že přítomností chloru v molekule se mění její konfigurace, jelikož priorita při určování je pro COCl větší, než pro CF_3 . Je-li tedy použit S chlorid Mosherovy kyseliny, produktem je ester konfigurace R a naopak (**Obr. 38**). [42,75,76]



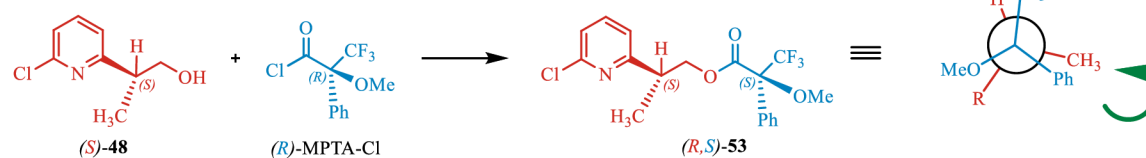
Obr. 38. Tvorba Mosherova esteru z kyseliny a chloridu s vyznačenými prioritami.

Pro určení absolutní konfigurace tedy z alkoholu (R)-**48** (zde již předbímám a využívám následně určené konfigurace na stereogenním centru látky **48**) byly připraveny oba Mosherovy estery: látky (R,R)-**53** a (R,S)-**53**. Možné kombinace jsou zobrazeny na schématu níže (**Obr. 39**). Po změření ^1H spekter byly porovnány chemické posuny, na jejichž základech byla určena konfigurace alkoholu **48**, získaného resolucí hydrolyzou pomocí prasečí lipázy, jako R : Chemický posun píku methylové skupiny činí v případě esteru (R,R)-**53** 1,31 ppm a v případě esteru (R,S)-**53** 1,32 ppm. Nižší hodnoty posunu naznačují vyšší zastínění methylové skupiny fenylovou skupinou, a tudíž je methylová skupina v případě esteru (R,R)-**53** blíže k fenylové skupině, z čehož vyplývá, že alkohol **48** je v konfiguraci R .

Pokud je alkohol **48** *R*-isomer



Pokud je alkohol **48** *S*-isomer

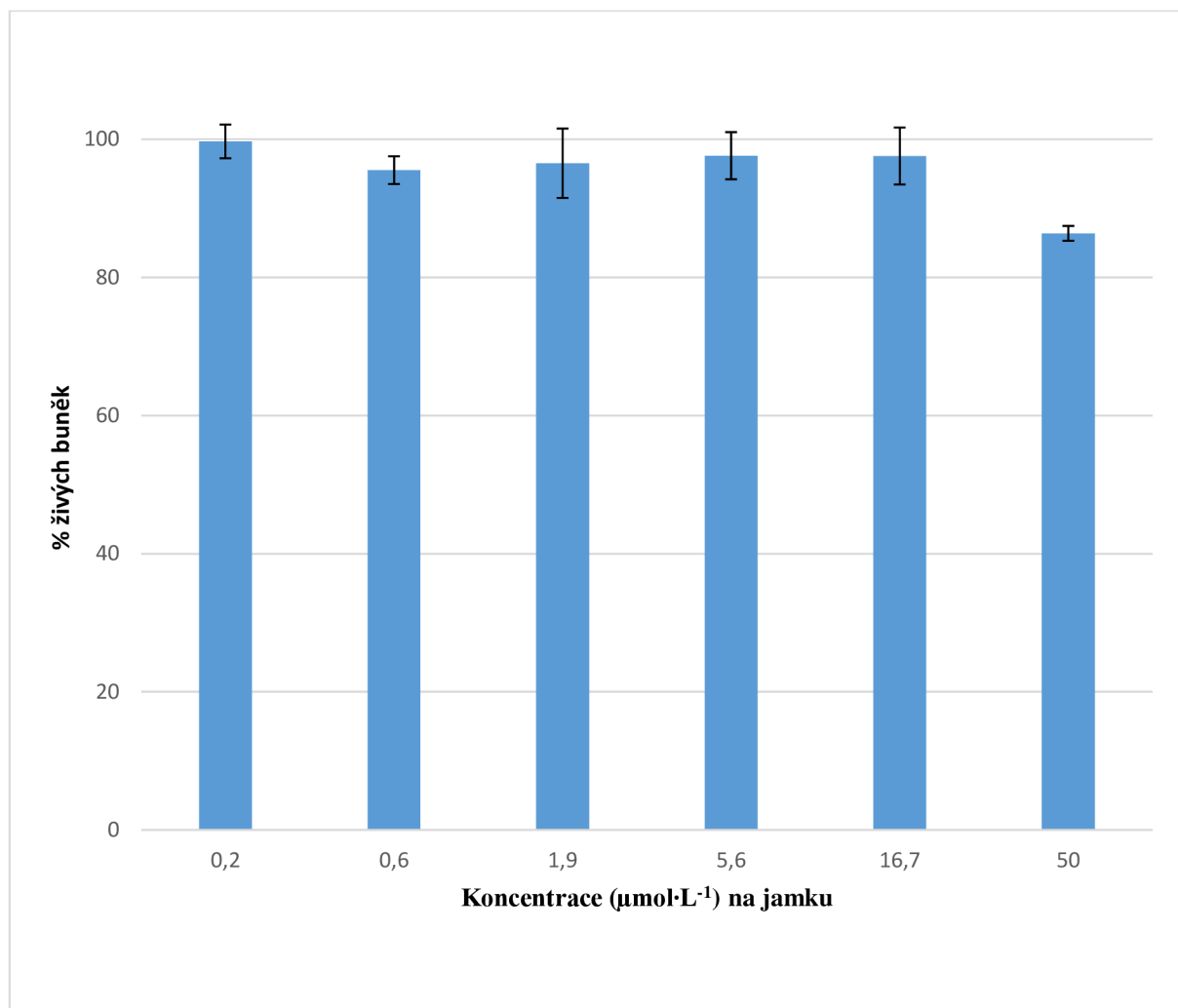


Obr. 39. Možné kombinace vzniku Mosherových esterů **53** s alkoholem **48**.

3.8 Biologické testování

Karboxylová kyselina **49** byla následně vybrána jako intermediát, u kterého byla *in vitro* otestována biologická aktivita (cytotoxicita) na nádorové buněčné linii lidských epitelových buněk maligního karcinomu děložního čípku HeLa. Látka však cytotoxicitu vůči těmto nádorovým buňkám nevykazovala, její hodnota IC_{50} byla zjištěna jako vyšší než $50 \mu\text{mol/L}$ v jamce (**Graf 1**).

Graf 1. Výsledek biologického testování látky **49**.



Směrodatná odchylka byla vypočtena ze tří různých hodnot viability, jelikož měření pro každou koncentraci bylo provedeno v triplikátu.

4. Závěr

V rámci své bakalářské práce jsem se v teoretické části zabýval problematikou sekundárních metabolitů s hlavním zaměřením na jejich strukturu a biologickou aktivitu. Zejména jsem se soustředil na přírodní látky alkaloidového typu, voratiny A-C, a to jak z pohledu jejich původu, tak i struktury a biologické aktivity vůči benigní hyperplasii prostaty. Nakonec jsem ve stručnosti v obecné rovině představil spirocyklické strukturní systémy, klíčový strukturní prvek voratinů, a zabýval jsem se stručně popisem jejich vybraných vlastností a zejména pak možností jejich syntézy.

V experimentální části jsem se pak věnoval syntéze fragmentu A molekuly voratinu A a B. Úspěšně se mi podařilo připravit klíčové syntetické intermediáty **50**, **49**, *rac*-**48** a (*R*)-**48**. Všechny reakce, které jsem prováděl byly řádně optimalizovány. Obzvláště příprava kyseliny **49**, jež se ukázala jako problematická, stojí za zmínku. Při její redukci na odpovídající alkohol jsem se pak musel uchýlit k využití doposud málo využívané metodě založené na využití systému $\text{BH}_3 \cdot \text{TiCl}_4$.

Připravený racemický alkohol *rac*-**48** jsem následně podrobil kinetické enzymatické resoluci s využitím prasečí lipázy II. Optimalizoval jsem tento enzymatický protokol a s využitím HPLC analýz na chirálních nosičích jsem byl schopen připravit cílový alkohol (*R*)-**48** s *e.r.* = 91:9 a 39% výtěžkem. Absolutní chiralita na stereogenním centru alkoholu **48** byla určena na základě ^1H NMR analýzy založené na tzv. Mosherově metodě. Optická čistota pak byla stanovena pomocí HPLC analýzy.

Jelikož voratiny A a B vykazovaly dle literatury slibnou biologickou aktivitu, byla kyselina **49** vybrána jako vhodný kandidát pro biologické testování na její cytotoxicitu vůči nádorové buněčné linii HeLa. Žádná cytotoxicita však nebyla pozorována.

Závěrem se dá říci, že touto bakalářskou prací byla „prošlapána část cesty“ vedoucí k totální syntéze fragmentu A. Dále je tedy možné v ní pokračovat, připravit tento fragment a věnovat se jeho sloučení s dalšími dvěma fragmenty (B a C) pro získání kýžených molekul voratinu A a voratinu B.

5. Experimentální část

5.1 Obecné informace

Všechny reakce citlivé na vzdušnou vlhkost byly prováděny v předem vyžiháných baňkách pod tlakem inertního plynu (argon). Použitá rozpouštědla byla komerční kvality a nebyla přečišťována.

Průběžné TLC analýzy (*thin layer chromatography* = chromatografie na tenké vrstvě) byly prováděny na hliníkových deskách pokrytých silikagelem 60 F₂₅₄ značky Merck. K detekci bylo využíváno UV záření ($\lambda = 256$ nm) a vizualizačních roztoků.

K čištění látek bylo využíváno sloupcové chromatografie s využitím silikagelu jako stacionární fáze a směsi hexan:EtOAc (V/V) jako mobilní fáze. Frakce byly eluovány pomocí koncentračního gradientu, který spočíval ve zvyšování procentuálního zastoupení polárnější složky směsi (EtOAc). Jednotlivé frakce byly sbírány do zkumavek, jejichž obsah byl monitorován pomocí TLC analýzy. Zkumavky obsahující stejné produkty byly spojené a přebytečné rozpouštědlo bylo odpařeno pomocí rotační vakuové odparky.

K měření NMR spekter byly použity spektrometry JEOL 400II (1H: 400 MHz; 13C: 101 MHz) a JEOL 500 JNM-ECA 500 MHz (1H: 500 MHz; 13C: 125 MHz). Vzorky byly rozpouštěny a měřeny buď v deuterovaném CDCl₃ či DMSO. Spektra byly kalibrována na střed signálu použitého zbytkového nedeuterovaného rozpouštědla (CDCl₃ 7,26 ppm pro ¹H; DMSO 2,50 ppm pro ¹H) nebo na střed použitého rozpouštědla (CDCl₃ 77,16 ppm pro ¹³C; DMSO 39,52 ppm pro ¹³C).[77]

Hmotnostní spektra byla měřena na spektrometru TSQ Quantum ACCES (Thermo Fisher Scientific, USA) s APCI jako ionizačním zdrojem. K měření HRMS byl použit spektrometr Agilent 6230 s ionizačním zdrojem Dual AJS ESI s módem Full scan v rozsahu 100-1700 *m/z*.

Pro HPLC analýzy bylo využito kapalinového chromatografu značky Waters (separační modul Waters 2695) s detektorem diodového pole (Waters 2996). Použité kolony byly: CHIRAL ART Amylose-SA S-5 μ m 250 X 4.6 mm I.D.; CHIRAL ART Cellulose-SB S-5 μ m 250 X 4.6 mm I.D.; CHIRALCEL® OJ-H S-5 μ m 4.6 mm I.D. X 250 mmL; CHIRALCEL® OJ-Z S-5 μ m 4.6 mm I.D. X 250 mmL; CHIRALCEL® OZ-H S-5 μ m 4.6 mm I.D. X 250 mmL; CHIRALCEL® OD-H S-5 μ m 4.6 mm I.D. X 250 mmL. Jako mobilní fáze byla používána isokratická směs hexan:isopropanol v poměrech 90:10; 95:5 a 99:1. Nejlepších výsledků pro rozdělení dvou enantiomerů látky *rac*-**48** byly dosaženo pomocí kolony CHIRALCEL® OZ-H S-5 μ m 4.6 mm I.D. X 250 mmL s použitou mobilní fází hexan:isopropanol = 99:1

v isokratickém módu, přičemž retenční časy byly 71,73 min a 75,58 min. Pro rozdělení dvou enantiomerů látky *rac*-Ac-48 byla nejlepší kolona CHIRAL ART Amylose-SA S-5 μm 250 X 4.6 mm I.D. s mobilní fází hexan:isopropanol = 99:1 v isokratickém módu, přičemž retenční časy byly 13,85 min a 14,72 min.

Vizualizační roztoky pro TLC

Metody přípravy:

- Zásaditý roztok KMnO_4 byl připraven rozpuštěním 9 g KMnO_4 a 20 g K_2CO_3 ve 150 ml 10% NaOH.
- Vanilinový roztok byl připraven rozpuštěním 2 g vanilinu ve 100 ml EtOH obsahující 1 ml koncentrované H_2SO_4 .

5.2 Biologické testování

Cytotoxicita vybrané látky byla testována *in vitro* na buněčné linii lidských epitelových buněk maligního karcinomu děložního čípku HeLa. Ty byly kultivovány v Petriho miskách s kultivačním médiem DMEM. Nejdříve byly promyty 3 ml EGTA a poté byl pro uvolnění buněk ze dna jamek přidán 1 ml roztoku enzymu trypsinu ($0,5 \text{ g.l}^{-1}$) v EGTA. Následně byly buňky propláchnuty médiem a poté přeneseny do zkumavky, ve které byly posléze při pokojové teplotě centrifugovány po dobu 5 minut při otáčkách 1200 rpm. Vzniklý supernatant byl odsán a usazený pelet, obsahující buňky, byl resuspendován pomocí 5 ml DMEM média. Dalším krokem bylo umístění buněk do Bürkerovy komůrky, ve které byly pod mikroskopem spočítány. Tato směs byla poté přenesena do 96jamkové mikrotitrační destičky v objemu $80 \mu\text{l}$ při přibližné koncentraci 5000 buněk na jamku. Následovala kontrola přítomnosti buněk pod světelným mikroskopem, načež byly destičky ponechány do dalšího dne v inkubátoru s 5% CO_2 atmosférou při teplotě $37,5 \text{ }^\circ\text{C}$.

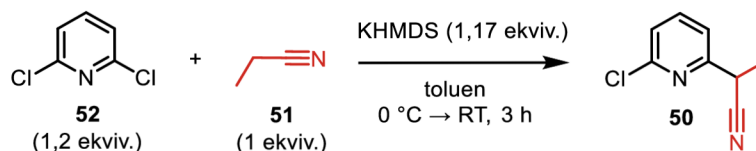
Následující den byla k buňkám přidána testovaná látka ve formě předem připravené sestupné koncentrační řady, jejíž jednotlivé koncentrace byly $50 \mu\text{M}$; $16,6 \mu\text{M}$; $5,5 \mu\text{M}$; $1,9 \mu\text{M}$; $0,6 \mu\text{M}$ a $0,2 \mu\text{M}$. Zásobní roztok látky, ze které byla tato řada připravena, měl koncentraci $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. Testování možných účinků bylo prováděno v triplicátu po dobu 72 hodin.

K vyhodnocení cytotoxicity bylo využito alamarBlue assay. Po uplynutí testovací doby bylo do jamek s buňkami přidáno $10 \mu\text{l}$ roztoku resazurinu (4 mg v 16 ml 10% DMEM). Resazurin, komerčním názvem alamarBlue, je modré nefluorescenční barvivo, které je živými buňkami oxidováno na růžový resorufin. Vzniklý resorufin je fluorescenční a po ozáření světlem o specifické vlnové délce emituje záření.

Mikrodestičky byly poté umístěny do inkubátoru a po třech hodinách byla měřena fluorescence pomocí spektrofotometru Tecan. Vlnové délky byly zvoleny jako 544 nm pro excitační spektrum a 590 nm pro emisní. K vyhodnocení hodnot IC_{50} byla použita získaná data a program Prism 8 (GraphPad Software, Kalifornie, USA).

5.3 Organická syntéza

5.3.1 Syntéza nitrilu (**50**) [67]



K azeotropní směsi propionitrilu **51** (6 ml; 84,5 mmol; 1,0 ekviv.) a 2,6-dichloropyridinu **52** (15 g; 101 mmol; 1,2 ekviv.) v toluenu (42,2 ml) byl při teplotě 0° C přikapán KHMDS (1M roztok v THF; 98,8 ml; 98,8 mmol; 1,17 ekviv.). Po 180 minutách míchání při RT byla reakční směs ukončena (quench) pomocí NH₄Cl na pH = 3. Následně byla směs extrahována EtOAc (3x 150 ml). Spojené organické vrstvy byly vysušeny bezvodým Na₂SO₄, přefiltrovány a organické rozpouštědlo bylo odpařeno na RVO. Výsledný surový produkt byl následně přečištěn pomocí sloupcové chromatografie (SiO₂, hexan:EtOAc = 15:1→10:1→5:1) a poskytl nitril **50** ve formě žlutého oleje (10,7 g; 76 %).

R_f = 0,45 (hexan:EtOAc = 3:1)

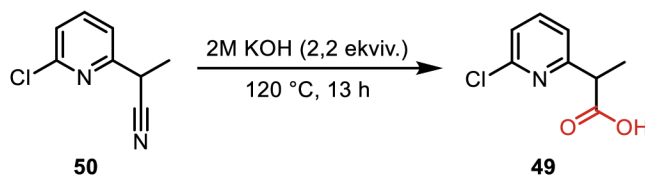
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.69 – 7.65 (m, 1H), 7.44 (dd, *J* = 7.6, 0.7 Hz, 1H), 7.33 – 7.29 (m, 1H), 4.04 (q, *J* = 7.3 Hz, 1H), 1.72 (d, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 158.4, 151.3, 140.0, 124.2, 120.3, 50.7, 25.4.

MS (ESI), *m/z* (%): [M+H]⁺: 167.0

HRMS vypočteno pro C₈H₈ClN₂⁺ [M+H]⁺: 167.0371; nalezeno 167.0376

5.3.2 Syntéza karboxylové kyseliny (49) [70]



Nitril **50** (10,7 g; 64,2 mmol; 1,0 ekviv.) byl rozpuštěn ve vodném roztoku 2M KOH (70,6 ml; 141 mmol; 2,2 ekviv.). Reakční směs byla zahřívána 13 hodin na 120 °C. Poté bylo pomocí 1M HCl upraveno pH na hodnotu 3. Následně byla směs extrahována DCM (3x 150 ml). Spojené organické vrstvy byly vysušeny bezvodým Na₂SO₄, přefiltrovány a organické rozpouštědlo bylo odpařeno na RVO. Výsledný surový produkt **49** byl získán ve formě oranžového oleje (9,6 g; 81 %). Ten byl následně bez purifikace použit do dalšího reakčního kroku.

R_f = 0,78 (hexan:EtOAc = 2:1)

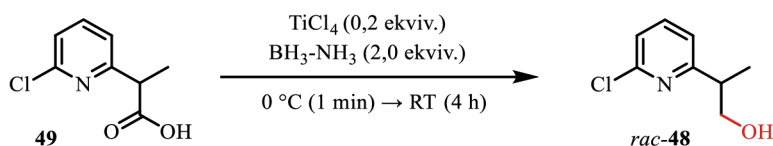
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 7.81 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.36 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 3.87 (q, *J* = 7.1 Hz, 1H), 1.38 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 177.1, 164.1, 160.3, 150.7, 139.8, 139.4, 123.1, 122.4, 121.2, 120.9, 49.1, 47.1, 20.0, 17.7. (*Spektrum obsahuje nejenom volnou kyselinu ale také její pyridiniovou vnitřní sůl. Proto jsou signály zdvojeny.*)

MS (ESI), m/z (%): [M+H]⁺: 186.0

HRMS vypočteno pro C₈H₉ClNO₂⁺ [M+H]⁺: 186.0316; nalezeno 186.0319

5.3.3 Syntéza alkoholu (*rac*-48) [73]



Ke kyselině **49** (1 g; 5,39 mmol; 1,0 ekvív.) byl přidán diethyl ether (16,3 ml; 5,39 mmol; 1,0 ekvív.) a směs byla ochlazena ledem na 0 °C. Poté byl po kapkách přidán chlorid titaničitý (1,08 ml; 1,08 mmol; 0,2 ekvív.). Následně byl pomalu přisypán BH₃.NH₃ (370 mg; 10,8 mmol, 2,0 ekvív.) a směs byla míchána 1 minutu při 0 °C. Poté byla 4 hodiny míchána při pokojové teplotě. Následně byla reakce při 0 °C ukončena (quench) pomalým přidavkem ochlazené 1M HCl (20 ml). Směs byla extrahována pomocí Et₂O (3x 50 ml). Spojené organické vrstvy byly promyty 1M NaOH (150 ml) a solankou (150 ml). Následně byla směs vysušena bezvodým síranem sodným a přefiltrována přes vat. Organické rozpouštědlo bylo poté odpařeno na RVO za vzniku produktu *rac*-**48** ve formě bílého oleje (767,3 mg, 83%). Ten byl následně bez purifikace použit do dalšího reakčního kroku.

R_f = 0,22 (hexan:EtOAc = 3:1)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.60 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.22 – 7.17 (m, 1H), 7.13 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 3.93 – 3.79 (m, 2H), 3.08 (pent, *J* = 6.8 Hz, 1H), 2.90 (broad s, 1H), 1.31 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H).

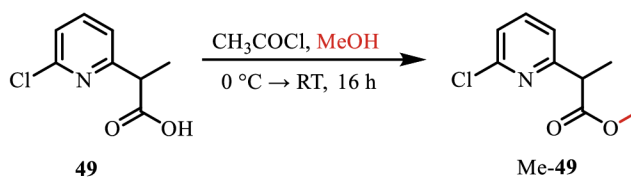
¹³C NMR (126 MHz, Chloroform-d) δ (ppm): 165.7, 150.7, 139.4, 121.6, 66.9, 42.7, 17.1.

MS (ESI), *m/z* (%): [M+H]⁺: 172.1

HRMS vypočteno pro C₈H₁₁ClNO⁺ [M+H]⁺: 172.0524; nalezeno 172.0525

K dosažení nejlepších výsledků pro rozdělení dvou enantiomerů látky *rac*-**48** byla kolona CHIRALCEL® OZ-H S-5 μm 4.6 mm I.D. X 250 mmL s použitou mobilní fází hexan:isopropanol = 99:1 v isokratickém módu, přičemž retenční časy byly 71,73 min a 75,58 min.

5.3.4 Syntéza methylesteru (Me-49)



K roztoku kyseliny **49** (200 mg; 1,08 mmol; 1,0 ekviv.) v methanolu (10,8 ml; 1,08 mmol; 0,1M) ochlazeném na 0° C byl přikapán acetylchlorid (0,192 ml; 2,69 mmol; 2,5 ekviv.). Reakční směs byla 18 hodin míchána při pokojové teplotě. Zbytkové organické rozpouštědlo bylo odpařeno na RVO. Výsledný surový produkt byl následně přečištěn pomocí sloupcové chromatografie (SiO₂, hexan:EtOAc = 20:1→15:1→10:1→6:1) a poskytl methylester Me-**49** ve formě žlutého oleje (103 mg; 48 %).

R_f = 0,53 (hexan:EtOAc = 3:1)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.68 – 7.58 (m, 1H), 7.24 – 7.18 (m, 2H), 4.09 – 3.79 (m, 1H), 3.69 (s, 3H), 1.55 (d, *J* = 7.3 Hz, 3H).

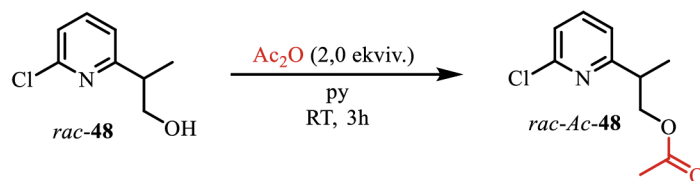
¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 173.8, 160.9, 151.0, 139.5, 123.0, 120.6, 52.4, 47.8, 17.5.

MS (ESI), m/z (%): [M+H]⁺: 200.0

HRMS vypočteno pro C₉H₁₁ClNO₂⁺ [M+H]⁺: 200.0473; nalezeno 200.04375

5.4 Enzymatická rezoluce

5.4.1 Příprava acylovaného alkoholu (*rac*-Ac-48)



Alkohol *rac*-48 (62 mg; 0,36 mmol; 1,0 ekv.) byl rozpuštěn v pyridinu (3,6 ml; 0,36 mmol; 1,0 ekv.). Ke směsi byl přikapán acetanhydrid (0,07 ml; 0,7 mmol; 2,0 ekv.). Reakční směs byla při laboratorní teplotě míchána 3 hodiny. Následovalo ukončení reakce (*quench*) 6 ml NaHCO_3 , extrakce pomocí EtOAc (3x 10 ml). Spojené organické vrstvy byly promyty solankou, vysušeny pomocí bezvodého Na_2SO_4 a přefiltrovány přes vatu. Organické rozpouštědlo bylo poté odpařeno na RVO. Vzniklý produkt *rac*-Ac-48 byl ve formě žlutého oleje použit bez další purifikace (74,4 mg; 97 %).

$R_f = 0,72$ (hexan:EtOAc = 1:1)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7.59 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.19 (dd, $J = 8.1, 0.9$ Hz, 1H), 7.10 (dd, $J = 7.5, 0.8$ Hz, 1H), 4.34 (dd, $J = 10.8, 7.5$ Hz, 1H), 4.27 (dd, $J = 10.8, 6.4$ Hz, 1H), 3.24 (h, $J = 7.0$ Hz, 1H), 2.00 (s, 3H), 1.33 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H).

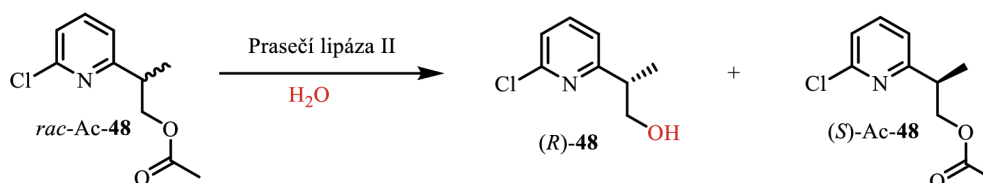
$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 165.8, 150.8, 139.5, 122.3, 121.0, 67.0, 42.7, 17.1.

MS (ESI), m/z (%): $[\text{M}+\text{H}]^+$: 214.1

HRMS vypočteno pro $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{ClNO}_2^+$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 214.0629; nalezeno 214.0630

Pro rozdělení dvou enantiomerů látky *rac*-Ac-48 byla nejefektivnější kolona CHIRAL ART Amylose-SA S-5 μm 250 X 4.6 mm I.D. s mobilní fází hexan:isopropanol = 99:1 v isokratickém módu, přičemž retenční časy byly 13,85 min a 14,72 min.

5.4.2 Rezoluce hydrolyzou



Acetát *rac*-Ac-48 (100 mg; 0,468 mmol; 1,0 ekviv.) byl rozpuštěn v diethyletheru (0,468 ml) a k roztoku byl přidán silikagel (400 mg). Přebytečný ether byl odpařen a vzniklá směs byla poté rozpuštěna ve fosfátovém pufru o pH 7 (4,68 ml; 0,1M; 1,0 ekviv.) o složení Na₂HPO₄, NaOH a destilovaná voda. Následně byla přidána prasečí lipáza typu II (20 mg; 0,084 mmol; 0,18 ekviv.) a směs byla míchána při 37 °C po dobu dvou hodin. Průběh reakce byl monitorován pomocí HPLC s využitím chirální kolony a pomocí TLC. Po ukončení reakce byl silikagel přefiltrován a roztok byl extrahován pomocí EtOAc (3x 50 ml). Spojené organické vrstvy byly promyty solankou, vysušeny pomocí bezvodého MgSO₄ a přefiltrovány. Organické rozpouštědlo bylo poté odpařeno na RVO. Reakční směs byla přečištěna na chromatografické koloně (SiO₂, hexan:EtOAc = 10:1→8:1→5:1→3:1), přičemž byly izolovány dva produkty (*R*)-48 (31,3 mg; 39 %) a (*S*)-Ac-48 (34,7 mg; 34,7 %). Oba ve formě žlutého oleje.

Produkt (*R*)-48:

R_f = 0,13 (hexan:EtOAc = 3:1)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.60 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.22 – 7.17 (m, 1H), 7.13 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 3.93 – 3.79 (m, 2H), 3.08 (pent, *J* = 6.8 Hz, 1H), 2.90 (broad s, 1H), 1.31 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H).

¹³C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm): 165.7, 150.7, 139.4, 121.6, 66.9, 42.7, 17.1.

MS (ESI), *m/z* (%): [M+H]⁺: 172.1

HRMS vypočteno pro C₈H₁₁ClNO⁺ [M+H]⁺: 172.0524; nalezeno 172.0525

Produkt (*S*)-Ac-48:

R_f = 0,53 (hexan:EtOAc = 3:1)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7.59 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.19 (dd, *J* = 8.1, 0.9 Hz, 1H), 7.10 (dd, *J* = 7.5, 0.8 Hz, 1H), 4.34 (dd, *J* = 10.8, 7.5 Hz, 1H), 4.27 (dd, *J* = 10.8, 6.4 Hz, 1H), 3.24 (h, *J* = 7.0 Hz, 1H), 2.00 (s, 3H), 1.33 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H).

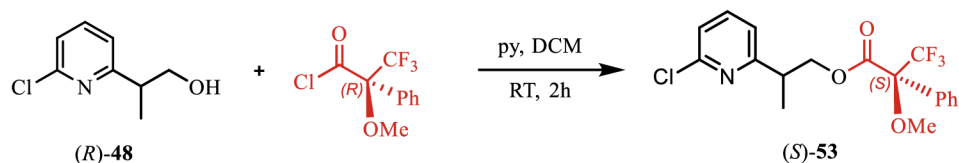
¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 165.8, 150.8, 139.5, 122.3, 121.0, 67.0, 42.7, 17.2.

MS (ESI), *m/z* (%): [M+H]⁺: 214.1

HRMS vypočteno pro C₁₀H₁₃ClNO₂⁺ [M+H]⁺: 214.0629; nalezeno 214.0630

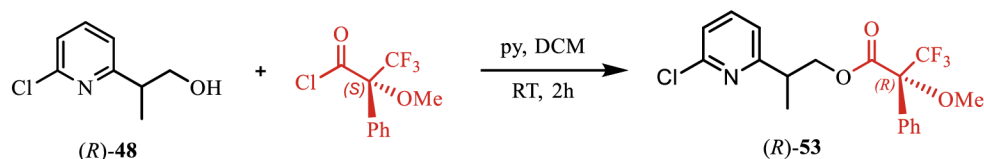
5.5 Určení absolutní konfigurace

5.5.1 Příprava S-MTPA esteru (S)-53 [42]



K roztoku alkoholu (*R*)-**48** (1,7 mg; 9,91 μmol ; 1,0 ekviv.) a suchého pyridinu (2,5 μl ; 30,7 μmol ; 3,1 ekviv.) v suchém DCM (0,16 ml; 2,5 mmol; [*R*]-**48**] = 0,064 M) byl přidán R-MTPA-Cl (3,56 μl ; 18,8 μmol ; 1,9 ekviv.). Po dvou hodinách míchání za RT byla reakce ukončena (quench) přidavkem vody (1 ml) a diethyletheru (3 ml). Poté byla vodná fáze pomocí diethyletheru extrahována (3x 5 ml). Spojené organické vrstvy byly vysušeny pomocí bezvodého Na_2SO_4 a přefiltrovány. Organické rozpouštědlo bylo poté odpařeno na RVO a surový produkt (*S*)-**53** byl kvantitativně přenesen do NMR kyvety pro změření ^1H NMR spekter.

5.5.2 Příprava R-MTPA esteru (R)-53 [42]



K roztoku alkoholu (*R*)-**48** (1,5 mg; 8,74 μmol ; 1,0 ekviv.) a suchého pyridinu (2,2 μl ; 27,1 μmol ; 3,1 ekviv.) v suchém DCM (0,14 ml; 2,5 mmol; [*R*]-**48**] = 0,064 M) byl přidán S-MTPA-Cl (3,14 μl ; 16,6 μmol ; 1,9 ekviv.). Po dvou hodinách míchání za RT byla reakce ukončena (quench) přidavkem vody (1 ml) a diethyletheru (3 ml). Poté byla vodná fáze pomocí diethyletheru extrahována (3x 5 ml). Spojené organické vrstvy byly vysušeny pomocí bezvodého Na_2SO_4 a přefiltrovány. Organické rozpouštědlo bylo poté odpařeno na RVO a surový produkt (*R*)-**50** byl kvantitativně přenesen do NMR kyvety pro změření ^1H NMR spekter.

6. Použitá literatura

- [1] Poulsen-Silva, E.; Gordillo-Fuenzalida, F.; Atala, C.; Moreno, A. A.; Otero, M. C. Bioactive Lichen Secondary Metabolites and Their Presence in Species from Chile. *Metabolites* **2023**, *13* (7), 805. <https://doi.org/10.3390/metabo13070805>.
- [2] Bernan, V. S.; Greenstein, M.; Maiese, W. M. Marine Microorganisms as a Source of New Natural Products. *Adv Appl Microbiol* **1997**, *43*, 57–90. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)70223-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)70223-5).
- [3] Lee, H.; Moon, S. J.; Yoo, Y. Du; Jeong, E. J.; Rho, J. R. Voratins A-C: Pyridinium Alkaloids from the Marine Dinoflagellate *Effrenium Voratum* with Inhibitory Effects on Biomarkers for Benign Prostatic Hyperplasia. *J Nat Prod* **2022**, *85* (6), 1495–1502. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.1c01190>.
- [4] Gao, B.; Lu, S.; Bhojani, N.; Zorn, K. C.; Chughtai, B.; Elterman, D. Office-Based Procedures for BPH. *Curr Urol Rep* **2021**, *22* (12), 63. <https://doi.org/10.1007/s11934-021-01081-7>.
- [5] Li, J.; Fang, L.; Lou, J. G. RetroRanker: Leveraging Reaction Changes to Improve Retrosynthesis Prediction through Re-Ranking. *J Cheminform* **2023**, *15* (1), 58. <https://doi.org/10.1186/s13321-023-00727-7>.
- [6] Yang, F.; Liu, J.; Zhang, Q.; Yang, Z.; Zhang, X. CNN-Based Two-Branch Multi-Scale Feature Extraction Network for Retrosynthesis Prediction. *BMC Bioinformatics* **2022**, *23* (1), 362. <https://doi.org/10.1186/s12859-022-04904-7>.
- [7] Armarkar, A. V.; Mahure, D. S.; Pounikar, A. R.; Bhagat, R. T.; Nagare, D. N. An Overview on the Biosynthetic Pathways and Medicinal Values of Secondary Metabolites. *J Pharm Res Int* **2021**, 100–114. <https://doi.org/10.9734/jpri/2021/v33i33a31777>.
- [8] Song, C.; Yang, J.; Zhang, M.; Ding, G.; Jia, C.; Qin, J.; Guo, L. Marine Natural Products: The Important Resource of Biological Insecticide. *Chem Biodivers* **2021**, *18* (5), e2001020. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202001020>.
- [9] Madariaga-Mazón, A.; Hernández-Alvarado, R. B.; Noriega-Colima, K. O.; Osnaya-Hernández, A.; Martínez-Mayorga, K. Toxicity of Secondary Metabolites. *Physical Sciences Reviews* **2019**, *4* (12), 20180116. <https://doi.org/10.1515/psr-2018-0116>.

- [10] Cushnie, T. P. T.; Cushnie, B.; Lamb, A. J. Alkaloids: An Overview of Their Antibacterial, Antibiotic-Enhancing and Antivirulence Activities. *Int J Antimicrob Agents* **2014**, *44* (5), 377–386. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.06.001>.
- [11] Ninkuu, V.; Zhang, L.; Yan, J.; Fu, Z.; Yang, T.; Zeng, H. Biochemistry of Terpenes and Recent Advances in Plant Protection. *Int J Mol Sci* **2021**, *22* (11), 5710. <https://doi.org/10.3390/ijms22115710>.
- [12] González-Hernández, R. A.; Valdez-Cruz, N. A.; Macías-Rubalcava, M. L.; Trujillo-Roldán, M. A. Overview of Fungal Terpene Synthases and Their Regulation. *World J Microbiol Biotechnol* **2023**, *39* (7), 194. <https://doi.org/10.1007/s11274-023-03635-y>.
- [13] Silva, J. J. M. da; Campanharo, S. C.; Paschoal, J. A. R. Ethnoveterinary for Food-Producing Animals and Related Food Safety Issues: A Comprehensive Overview about Terpenes. *Compr Rev Food Sci Food Saf* **2021**, *20* (1), 48–90. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12673>.
- [14] Jurasova, L.; Jurikova, T.; Baron, M.; Sochor, J. Content of Selected Polyphenolic Substances in Parts of Grapevine. *Italian Journal of Food Science* **2023**, *35* (3), 17–43. <https://doi.org/10.15586/ijfs.v35i3.2298>.
- [15] Shi, R.; Gao, D.; Stoika, R.; Liu, K.; Sik, A.; Jin, M. Potential Implications of Polyphenolic Compounds in Neurodegenerative Diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr* **2022**, 1-24. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2155106>.
- [16] Panche, A. N.; Diwan, A. D.; Chandra, S. R. Flavonoids: An Overview. *J Nutr Sci* **2016**, *5*, e47. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>.
- [17] Cahyana, Y.; Adiyanti, T. Review: Flavonoids as Antidiabetic Agents. *Indonesian Journal of Chemistry* **2021**, *21* (2), 512–526. <https://doi.org/10.22146/ijc.58439>.
- [18] Georgiou, N.; Kakava, M. G.; Routsis, E. A.; Petsas, E.; Stavridis, N.; Freris, C.; Zoupanou, N.; Moschovou, K.; Kiriakidi, S.; Mavromoustakos, T. Quercetin: A Potential Polydynamic Drug. *Molecules* **2023**, *28* (24), 8141. <https://doi.org/10.3390/molecules28248141>.
- [19] Di Pede, G.; Mena, P.; Bresciani, L.; Almutairi, T. M.; Del Rio, D.; Clifford, M. N.; Crozier, A. Human Colonic Catabolism of Dietary Flavan-3-Ol Bioactives. *Mol Aspects Med* **2023**, *89*, 101107. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2022.101107>.

- [20] Veiko, A. G.; Olchowik-Grabarek, E.; Sekowski, S.; Roszkowska, A.; Lapshina, E. A.; Dobrzynska, I.; Zamaraeva, M.; Zavodnik, I. B. Antimicrobial Activity of Quercetin, Naringenin and Catechin: Flavonoids Inhibit Staphylococcus Aureus-Induced Hemolysis and Modify Membranes of Bacteria and Erythrocytes. *Molecules* **2023**, *28* (3), 1252. <https://doi.org/10.3390/molecules28031252>.
- [21] Stephan, L. S.; Almeida, E. D.; Markoski, M. M.; Garavaglia, J.; Marcadenti, A. Red Wine, Resveratrol and Atrial Fibrillation. *Nutrients* **2017**, *9* (11), 1190. <https://doi.org/10.3390/nu9111190>.
- [22] Kluska, M.; Jabłońska, J.; Pukała, W. Analytics, Properties and Applications of Biologically Active Stilbene Derivatives. *Molecules* **2023**, *28* (11), 4482. <https://doi.org/10.3390/molecules28114482>.
- [23] Teka, T.; Zhang, L.; Ge, X.; Li, Y.; Han, L.; Yan, X. Stilbenes: Source Plants, Chemistry, Biosynthesis, Pharmacology, Application and Problems Related to Their Clinical Application-A Comprehensive Review. *Phytochemistry* **2022**, *197*, 113128. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2022.113128>.
- [24] Kursvietiene, L.; Kopustinskiene, D. M.; Staneviciene, I.; Mongirdiene, A.; Kubová, K.; Masteikova, R.; Bernatoniene, J. Anti-Cancer Properties of Resveratrol: A Focus on Its Impact on Mitochondrial Functions. *Antioxidants* **2023**, *12* (12), 2056. <https://doi.org/10.3390/antiox12122056>.
- [25] Meng, Q.; Li, J.; Wang, C.; Shan, A. Biological Function of Resveratrol and Its Application in Animal Production: A Review. *J Anim Sci Biotechnol* **2023**, *14* (1), 25. <https://doi.org/10.1186/s40104-022-00822-z>.
- [26] Zálešák, F.; Bon, D. J. Y. D.; Pospíšil, J. Lignans and Neolignans: Plant Secondary Metabolites as a Reservoir of Biologically Active Substances. *Pharmacol Res* **2019**, *146*, 104284. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104284>.
- [27] Consonni, R.; Ottolina, G. NMR Characterization of Lignans. *Molecules* **2022**, *27* (7), 2340. <https://doi.org/10.3390/molecules27072340>.
- [28] Bruno, F.; Castelli, G.; Vitale, F.; Catanzaro, S.; Badaco, V. V.; Roberti, M.; Colomba, C.; Cascio, A.; Tolomeo, M. Antiparasitic Effect of Stilbene and Terphenyl Compounds against Trypanosoma Cruzi Parasites. *Pharmaceuticals* **2021**, *14* (11), 1199. <https://doi.org/10.3390/ph14111199>.

- [29] Liu, J.; Poojary, M. M.; Zhu, L.; Williams, A. R.; Lund, M. N. Phenolic Acid-Amino Acid Adducts Exert Distinct Immunomodulatory Effects in Macrophages Compared to Parent Phenolic Acids. *J Agric Food Chem* **2023**, *71* (5), 2344–2355. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c06658>.
- [30] Pavlíková, N. Caffeic Acid and Diseases—Mechanisms of Action. *Int J Mol Sci* **2023**, *24* (1), 588. <https://doi.org/10.3390/ijms24010588>.
- [31] Kahkeshani, N.; Farzaei, F.; Fotouhi, M.; Alavi, S. S.; Bahramsoltani, R.; Naseri, R.; Momtaz, S.; Abbasabadi, Z.; Rahimi, R.; Farzaei, M. H.; Bishayee, A. Pharmacological Effects of Gallic Acid in Health and Disease: A Mechanistic Review. *Iran J Basic Med Sci* **2019**, *22* (3), 225–237. <https://doi.org/10.22038/ijbms.2019.32806.7897>.
- [32] Lefevere, H.; Bauters, L.; Gheysen, G. Salicylic Acid Biosynthesis in Plants. *Front Plant Sci* **2020**, *11*, 338. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00338>.
- [33] Li, D.; Rui, Y. xin; Guo, S. duo; Luan, F.; Liu, R.; Zeng, N. Ferulic Acid: A Review of Its Pharmacology, Pharmacokinetics and Derivatives. *Life Sci* **2021**, *284*, 199921. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119921>.
- [34] Ameen, F.; AlNadhari, S.; Al-Homaidan, A. A. Marine Microorganisms as an Untapped Source of Bioactive Compounds. *Saudi J Biol Sci* **2021**, *28* (1), 224–231. <https://doi.org/10.1016/J.SJBS.2020.09.052>.
- [35] Tian, J.; Chen, S.; Liu, F.; Zhu, Q.; Shen, J.; Lin, W.; Zhu, K. Equisetin Targets Intracellular Staphylococcus Aureus through a Host Acting Strategy. *Mar Drugs* **2022**, *20* (11), 656. <https://doi.org/10.3390/md20110656>.
- [36] Zhang, L.; Jin, M.; Shi, X.; Jin, L.; Hou, X.; Yu, Y.; Liu, B.; Cao, J.; Quan, C. Macrolactin Metabolite Production by Bacillus Sp. ZJ318 Isolated from Marine Sediment. *Appl Biochem Biotechnol* **2022**, *194* (6), 2581–2593. <https://doi.org/10.1007/s12010-022-03841-8>.
- [37] Li, Y.; Lin, P.; Lu, X.; Yan, H.; Wei, H.; Liu, C.; Liu, X.; Yang, Y.; Molnár, I.; Bai, Z. Plasmid Copy Number Engineering Accelerates Fungal Polyketide Discovery upon Unnatural Polyketide Biosynthesis. *ACS Synth Biol* **2023**, *12* (8), 2226–2235. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.3c00178>.
- [38] Zhang, Y.; Liu, W.; Li, G.; Wu, C.; Yan, J.; Feng, D.; Yuan, S.; Zhang, R.; Lou, H.; Peng, X. Novel Polyketide from Fusarium Verticillioide G102 as NPC1L1 Inhibitors. *Nat Prod Res* **2023**, 1–7. <https://doi.org/10.1080/14786419.2023.2201885>.

- [39] Moriya, T.; Ishida, Y.; Nakamura, H.; Asari, T.; Murai, A.; Ohizumi, Y. Vasoconstriction Induced by Zooxanthellatoxin-B, a Polyoxygenated Long-Chain Product from a Marine Alga. *Eur J Pharmacol* **1998**, *350*, 59–65. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(98\)00225-8](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(98)00225-8).
- [40] Kang, N. S.; Kim, E. S.; Lee, J. A.; Kim, K. M.; Kwak, M. S.; Yoon, M.; Hong, J. W. First Report of the Dinoflagellate Genus *Effrenium* in the East Sea of Korea: Morphological, Genetic, and Fatty Acid Characteristics. *Sustainability* **2020**, *12* (9), 3928. <https://doi.org/10.3390/su12093928>.
- [41] Jeong, H. J.; Lee, S. Y.; Kang, N. S.; Yoo, Y. Du; Lim, A. S.; Lee, M. J.; Kim, H. S.; Yih, W.; Yamashita, H.; Lajeunesse, T. C. Genetics and Morphology Characterize the Dinoflagellate *Symbiodinium Voratum*, n. Sp., (Dinophyceae) as the Sole Representative of *Symbiodinium* Clade e. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **2014**, *61* (1), 75–94. <https://doi.org/10.1111/jeu.12088>.
- [42] Hoye, T. R.; Jeffrey, C. S.; Shao, F. Mosher Ester Analysis for the Determination of Absolute Configuration of Stereogenic (Chiral) Carbinol Carbons. *Nat Protoc* **2007**, *2* (10), 2451–2458. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.354>.
- [43] Cruz, Á. B.; Ciribelli, N. N.; Cunha, C. L.; Nascimento, I. R.; Holzbach, J. C.; Pereira, D. H. Theoretical and Experimental Study of the Diastereoisomers (2S) and (2R)-Naringenin-6-C-β-D-Glucopyranoside Obtained from *Clitoria Guianensis*. *J Mol Model* **2023**, *29* (3), 77. <https://doi.org/10.1007/s00894-023-05482-y>.
- [44] Silva, J.; Silva, C. M.; Cruz, F. Current Medical Treatment of Lower Urinary Tract Symptoms/BPH: Do We Have a Standard? *Curr Opin Urol* **2014**, *24* (1), 21–28. <https://doi.org/10.1097/MOU.0000000000000007>.
- [45] Hutchison, A.; Farmer, R.; Verhamme, K.; Berges, R.; Navarrete, R. V. The Efficacy of Drugs for the Treatment of LUTS/BPH, A Study in 6 European Countries. *Eur Urol* **2007**, *51* (1), 207–216. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2006.06.012>.
- [46] Roehrborn, C. G.; Nuckolls, J. G.; Wei, J. T.; Steers, W. The Benign Prostatic Hyperplasia Registry and Patient Survey: Study Design, Methods and Patient Baseline Characteristics. *BJU Int* **2007**, *100* (4), 813–819. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2007.07061.x>.

- [47] Bellos, T. C.; Tzelves, L. I.; Manolitsis, I. S.; Katsimperis, S. N.; Berdempes, M. V.; Skolarikos, A.; Karakousis, N. D. Frailty and Benign Prostatic Hyperplasia: The Thrilling Underlying Impact. *Archivio Italiano di Urologia e Andrologia* **2022**, *94* (3), 345–349. <https://doi.org/10.4081/aiua.2022.3.345>.
- [48] Shah, M.; Naik, N.; Hameed, B. Z.; Paul, R.; Shetty, D. K.; Ibrahim, S.; Rai, B. P.; Chlosta, P.; Rice, P.; Somani, B. K. Current Applications of Artificial Intelligence in Benign Prostatic Hyperplasia. *Turk J Urol* **2022**, *48* (4), 262–267. <https://doi.org/10.5152/tud.2022.22028>.
- [49] *Prostate Enlargement Urologist | Urohealth Medical Clinic*. <https://www.urologysingapore.com/prostate-enlargement-bph/> (převzato 9. 11. 2023).
- [50] Kesharwani, S.; Sahu, N. K.; Kohli, D. V. Synthesis and biological evaluation of some new spiro derivatives of barbituric acid. *Pharm Chem J* **2009**, *43*, 315–319. <https://doi.org/10.1007/s11094-009-0298-8>.
- [51] Ingle, V. N.; Gaidhane, P. K.; Dutta, S. S.; Naha, P. P.; Sengupta, M. S. Synthesis of Novel Galactopyranosyl-Derived Spiro Barbiturates. *J Carbohydr Chem* **2006**, *25* (8–9), 661–671. <https://doi.org/10.1080/07328300601039328>.
- [52] Magoo, D.; Srivastava, A.; Gupta, S.; Jain, R.; Mondal Ghorai, S.; Dawer, Y.; Sengupta, S.; Rani, S. Developments in Synthesis Strategies of Spiro-Barbiturate Compounds: A Classified Study. *Mini Rev Org Chem* **2024**, *21* (2), 246–270. <https://doi.org/10.2174/1570193X20666230428112212>.
- [53] Li, J. J.; Liang, X. M.; Jin, S. H.; Zhang, J. J.; Yuan, H. Z.; Qi, S. H.; Chen, F. U. H.; Wang, D. Q. Synthesis, Fungicidal Activity, and Structure-Activity Relationship of Spiro-Compounds Containing Macrolactam (Macrolactone) and Thiadiazoline Rings. *J Agric Food Chem* **2010**, *58* (5), 2659–2663. <https://doi.org/10.1021/jf903665f>.
- [54] Babar, K.; Zahoor, A. F.; Ahmad, S.; Akhtar, R. Recent Synthetic Strategies toward the Synthesis of Spirocyclic Compounds Comprising Six-Membered Carbocyclic/Heterocyclic Ring Systems. *Mol Divers* **2021**, *25* (4), 2487–2532. <https://doi.org/10.1007/s11030-020-10126-x>.
- [55] Kotha, S.; Panguluri, N. R.; Ali, R. Design and Synthesis of Spirocycles. *European J Org Chem* **2017**, *2017* (36), 5316–5342. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201700439>.

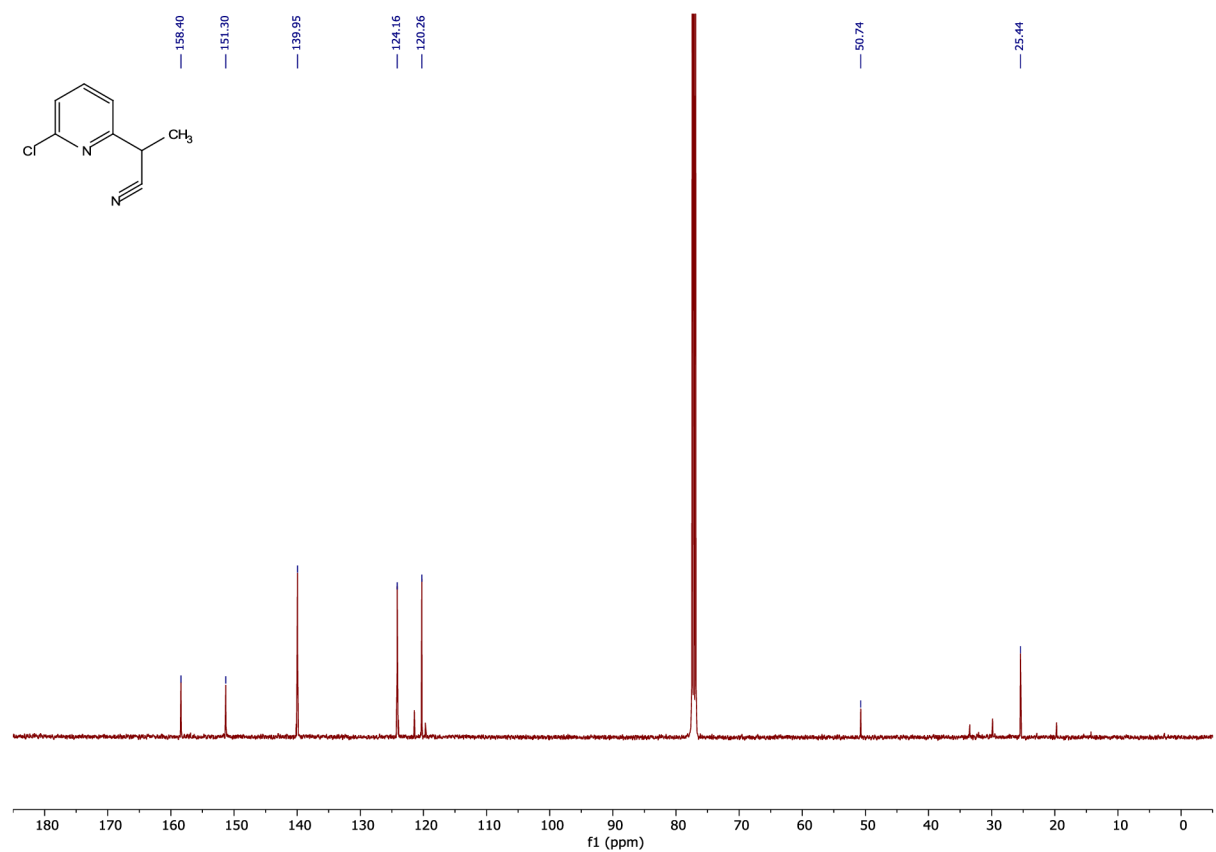
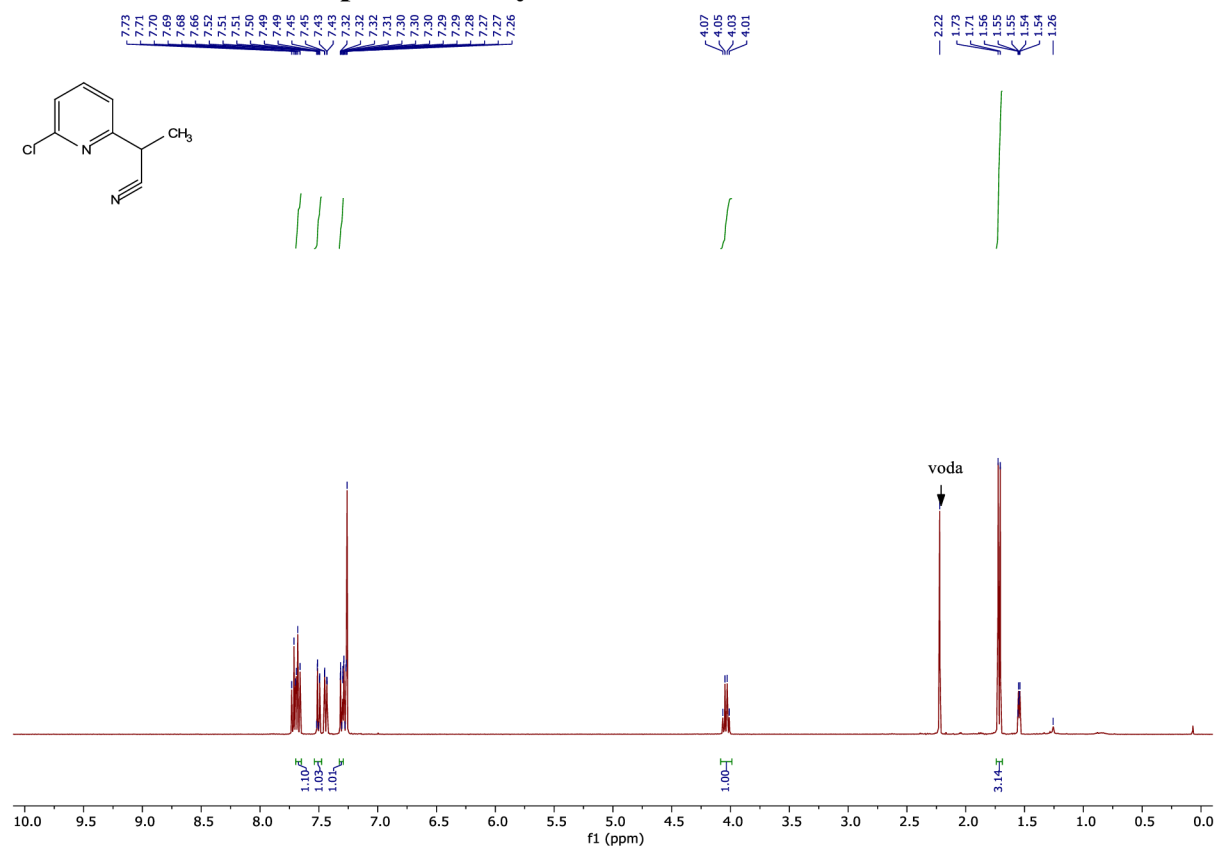
- [56] Carreira, E. M.; Fessard, T. C. Four-Membered Ring-Containing Spirocycles: Synthetic Strategies and Opportunities. *Chem Rev* **2014**, *114* (16), 8257–8322. <https://doi.org/10.1021/cr500127b>.
- [57] Hiesinger, K.; Dar'In, D.; Proschak, E.; Krasavin, M. Spirocyclic Scaffolds in Medicinal Chemistry. *J Med Chem* **2021**, *64* (1), 150–183. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c01473>.
- [58] King, T. A.; Stewart, H. L.; Mortensen, K. T.; North, A. J. P.; Sore, H. F.; Spring, D. R. Cycloaddition Strategies for the Synthesis of Diverse Heterocyclic Spirocycles for Fragment-Based Drug Discovery. *European J Org Chem* **2019**, *2019* (31–32), 5219–5229. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201900847>.
- [59] Ding, A.; Meazza, M.; Guo, H.; Yang, J. W.; Rios, R. New Development in the Enantioselective Synthesis of Spiro Compounds. *Chem Soc Rev* **2018**, *47* (15), 5946–5996. <https://doi.org/10.1039/c6cs00825a>.
- [60] Hamill, R.; Jones, B.; Pask, C. M.; Sridharan, V. Synthesis of Oxetane/Azetidine Containing Spirocycles. *Tetrahedron Lett* **2019**, *60* (16), 1126–1129. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2019.03.042>.
- [61] Li, L.; Wang, S.; Luo, P.; Wang, R.; Wang, Z.; Li, X.; Deng, Y.; Peng, F.; Shao, Z. Direct Access to Spirocycles by Pd/WingPhos-Catalyzed Enantioselective Cycloaddition of 1,3-Enynes. *Nat Commun* **2021**, *12* (1), 5667. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25981-x>.
- [62] Kotha, S.; Meshram, M.; Dommaraju, Y. Design and Synthesis of Polycycles, Heterocycles, and Macrocycles via Strategic Utilization of Ring-Closing Metathesis. *Chemical Record* **2018**, *18* (11), 1613–1632. <https://doi.org/10.1002/tcr.201800025>.
- [63] Wybrow, R. A. J.; Johnson, L. A.; Auffray, B.; Moran, W. J.; Adams, H.; Harrity, J. P. A. Unusual Macrocyclic Spirocycles from Tandem Metathesis Reactions. *Tetrahedron Lett* **2002**, *43*, 7851–7854. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(02\)01909-3](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(02)01909-3).
- [64] Wallace, D. J. On the Mechanism of a Double Ring-Closing Metathesis Reaction. *Tetrahedron Lett* **2005**, *46* (4), 591–594. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2004.11.149>.
- [65] Dias, L. C.; Correia, V. G.; Finelli, F. G. Stereoselective Synthesis of the 6,6-Spiroketal Core of CP-61,405 (Routienocin). *Tetrahedron Lett* **2007**, *48* (43), 7683–7686. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2007.08.087>.

- [66] Selvaratnam, S.; Ho, J. H. H.; Huleatt, P. B.; Messerle, B. A.; Chai, C. L. L. Highly Efficient Catalytic Routes to Spiroketal Motifs. *Tetrahedron Lett* **2009**, *50* (10), 1125–1127. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2008.12.075>.
- [67] Herbort, J. H.; Bednar, T. N.; Chen, A. D.; Rajanbabu, T. V.; Nagib, D. A. GC-H Functionalization of Amines via Triple H-Atom Transfer of a Vinyl Sulfonyl Radical Chaperone. *J Am Chem Soc* **2022**, *144* (29), 13366–13373. <https://doi.org/10.1021/jacs.2c05266>.
- [68] Demchuk, O. P.; Hryshchuk, O. V.; Vashchenko, B. V.; Radchenko, D. S.; Kovtunencko, V. O.; Komarov, I. V.; Grygorenko, O. O. Robust and Scalable Approach to 1,3-Disubstituted Pyridylcyclobutanes. *European J Org Chem* **2019**, *2019* (34), 5937–5949. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201901001>.
- [69] Edwards, J. D.; Hase, T.; Ichikawa, N. The Synthesis of Seneciphylllic Acid. *J Heterocycl Chem* **1967**, *4* (4), 487–490. <https://doi.org/10.1002/jhet.5570040405>.
- [70] Sierov, D. I.; Dzhulai, I. V.; Siryk, K. I.; Shvydenko, K. V.; Shvydenko, T. I.; Nazarenko, K.; Kostyuk, A.; Liashuk, O. S.; Grygorenko, O. O. Multigram Synthesis of α - and γ -((Hetero)Cyclo)Alkylpyridines through α -Arylation of (Hetero)Aliphatic Nitriles. *European J Org Chem* **2023**, *26* (34), e202300538. <https://doi.org/10.1002/ejoc.202300538>.
- [71] Thompson, H. W.; Rashid, S. Y. Stereochemical Control of Reductions. 9. Haptophilicity Studies with 1,1-Disubstituted 2-Methyleneacenaphthenes. *Journal of Organic Chemistry* **2002**, *67* (9), 2813–2825. <https://doi.org/10.1021/jo010633b>.
- [72] Chen, W.; Fang, H.; Xie, K.; Oestreich, M. The Cyclohexa-2,5-Dienyl Group as a Placeholder for Hydrogen: Organocatalytic Michael Addition of an Acetaldehyde Surrogate. *Chemistry - A European Journal* **2020**, *26* (66), 15126–15129. <https://doi.org/10.1002/chem.202003764>.
- [73] Ramachandran, P. V.; Alawaed, A. A.; Hamann, H. J. Catalyst- and Stoichiometry-Dependent Deoxygenative Reduction of Esters to Ethers or Alcohols with Borane-Ammonia. *Org Lett* **2023**, *25* (37), 6902–6906. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.3c02643>.
- [74] *RCSB PDB - 1GPL: RP2 LIPASE*. <https://www.rcsb.org/structure/1gpl> (převzato 17. 3. 2024).

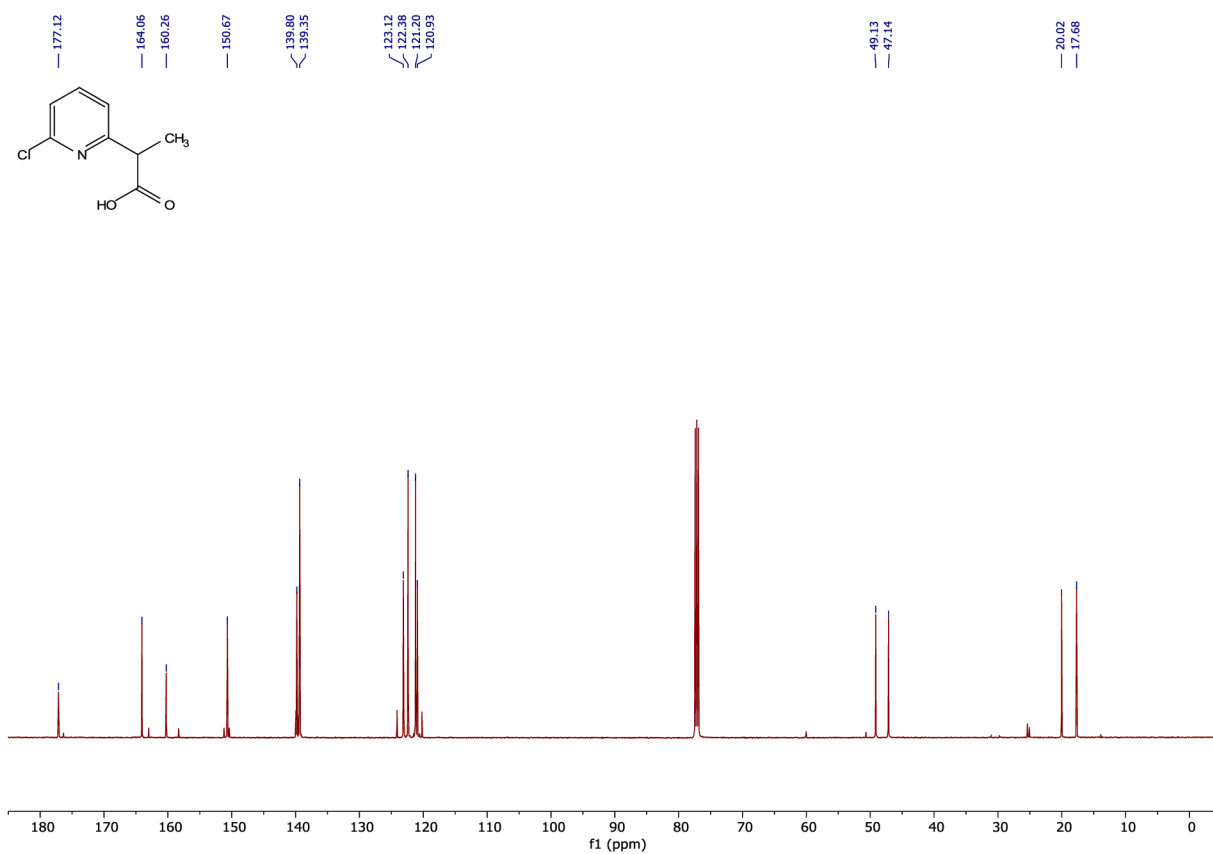
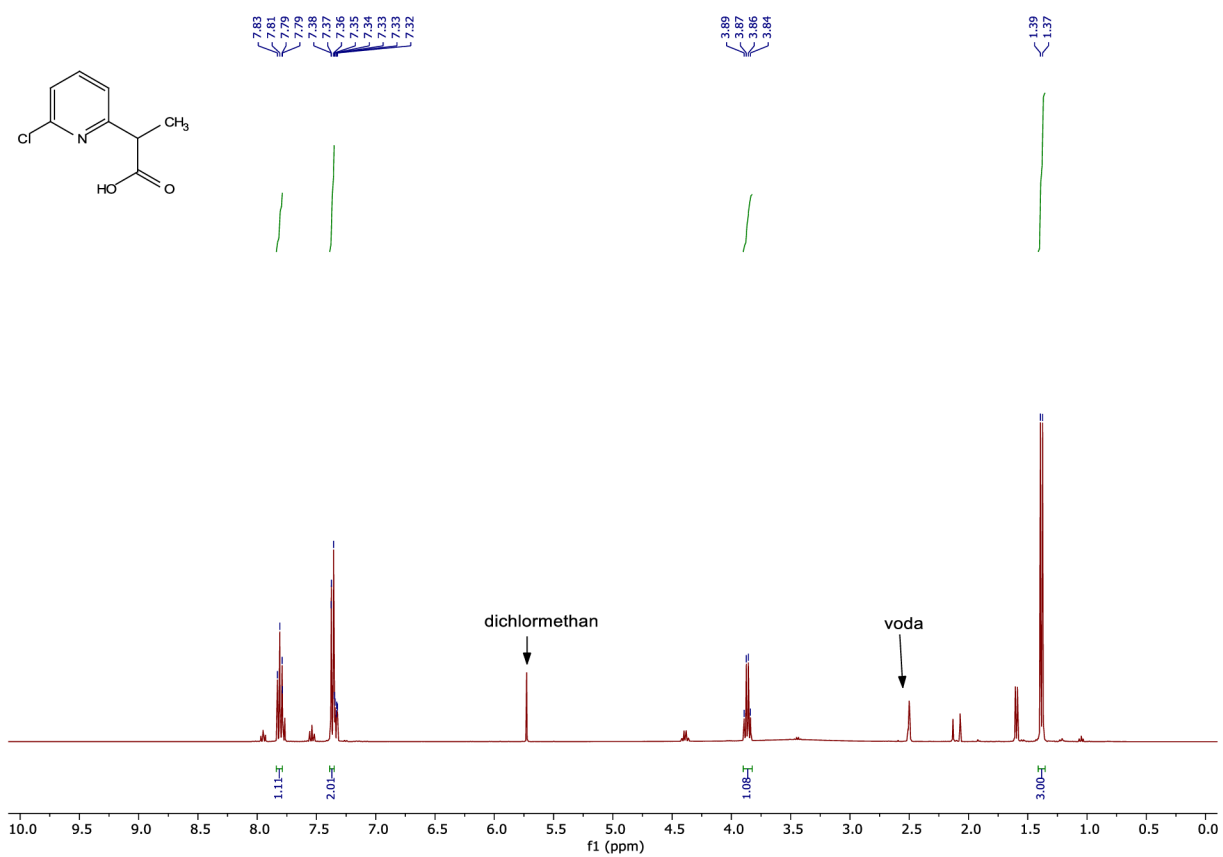
- [75] Ohtanv, I.; Kusumi, T.; Kashman, Y.; Kakisawa, H. High-Field FT NMR Application of Mosher's Method. The Absolute Configurations of Marine Terpenoids. *J. Am. Chem. Soc* **1991**, *113*, 4092–4096. <https://doi.org/10.1021/ja00011a006>.
- [76] Dale, J. A.; Mosher, H. S.; Pirkle, W. H.; Beare, S. D.; Amer, J.; Muntz, R. L.; Para, M.; Ejchart, E.; Jurczak, J. Nuclear Magnetic Resonance Enantiomer Reagents. Configurational Correlations via Nuclear Magnetic Resonance Chemical Shifts of Diastereomeric Mandelate, 0-Methylmandelate, and-Methoxy- α -Trifluoromethylphenylacetate (MTPA) Esters^{1,210} (a) *M. Bull. Soc. Chim. Fr* **1970**, *22* (5), 512–519. <https://doi.org/10.1021/ja00783a034>.
- [77] Fulmer, G. R.; Miller, A. J. M.; Sherden, N. H.; Gottlieb, H. E.; Nudelman, A.; Stoltz, B. M.; Bercaw, J. E.; Goldberg, K. I. NMR Chemical Shifts of Trace Impurities: Common Laboratory Solvents, Organics, and Gases in Deuterated Solvents Relevant to the Organometallic Chemist. *Organometallics* **2010**, *29* (9), 2176–2179. <https://doi.org/10.1021/om100106e>.

7. Přílohy

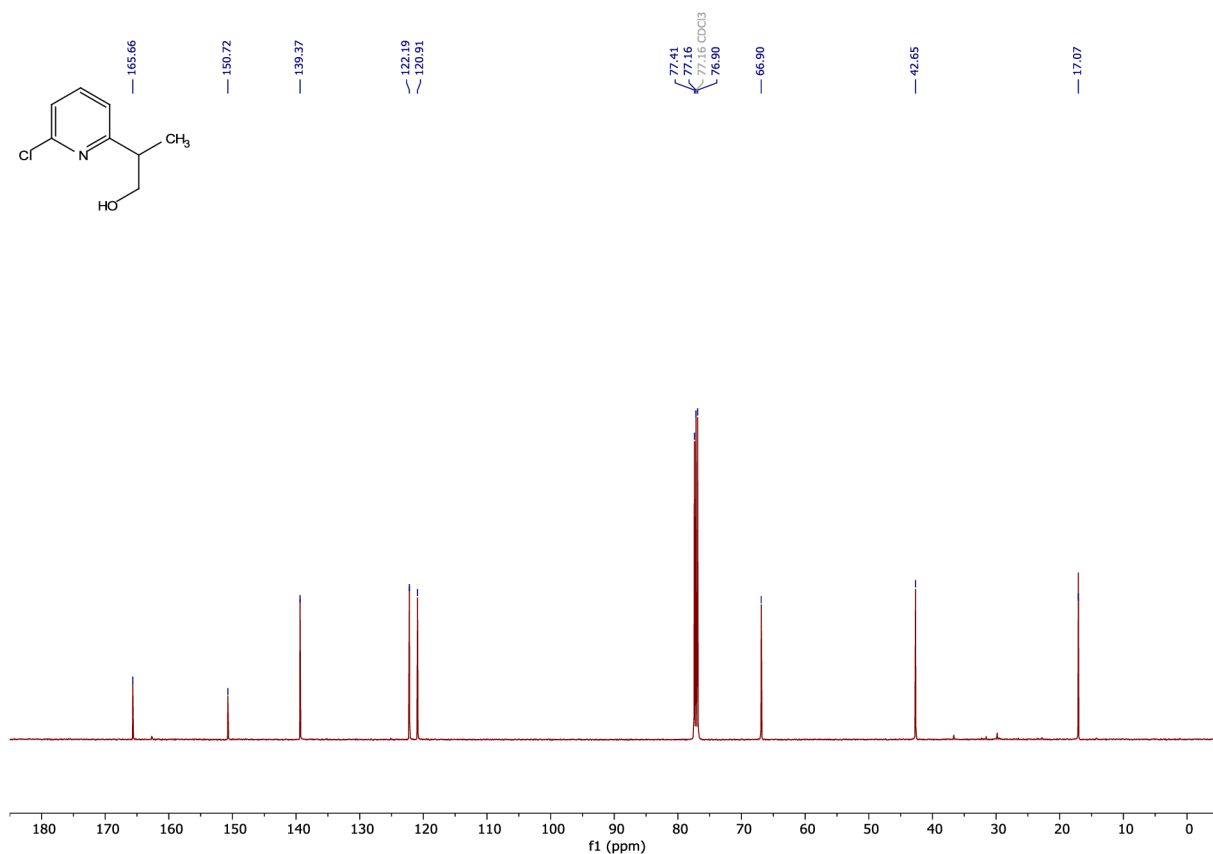
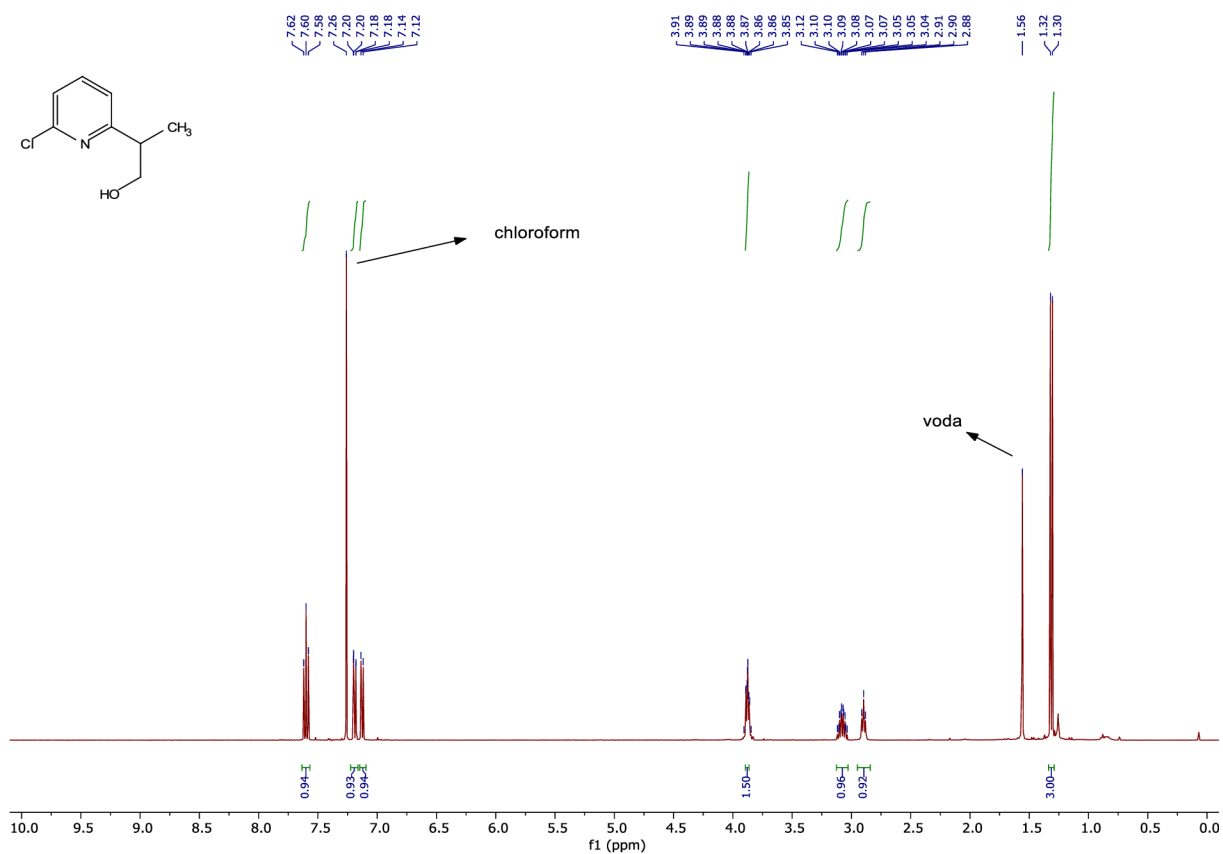
7.1. ^1H a ^{13}C NMR spektra látky 50



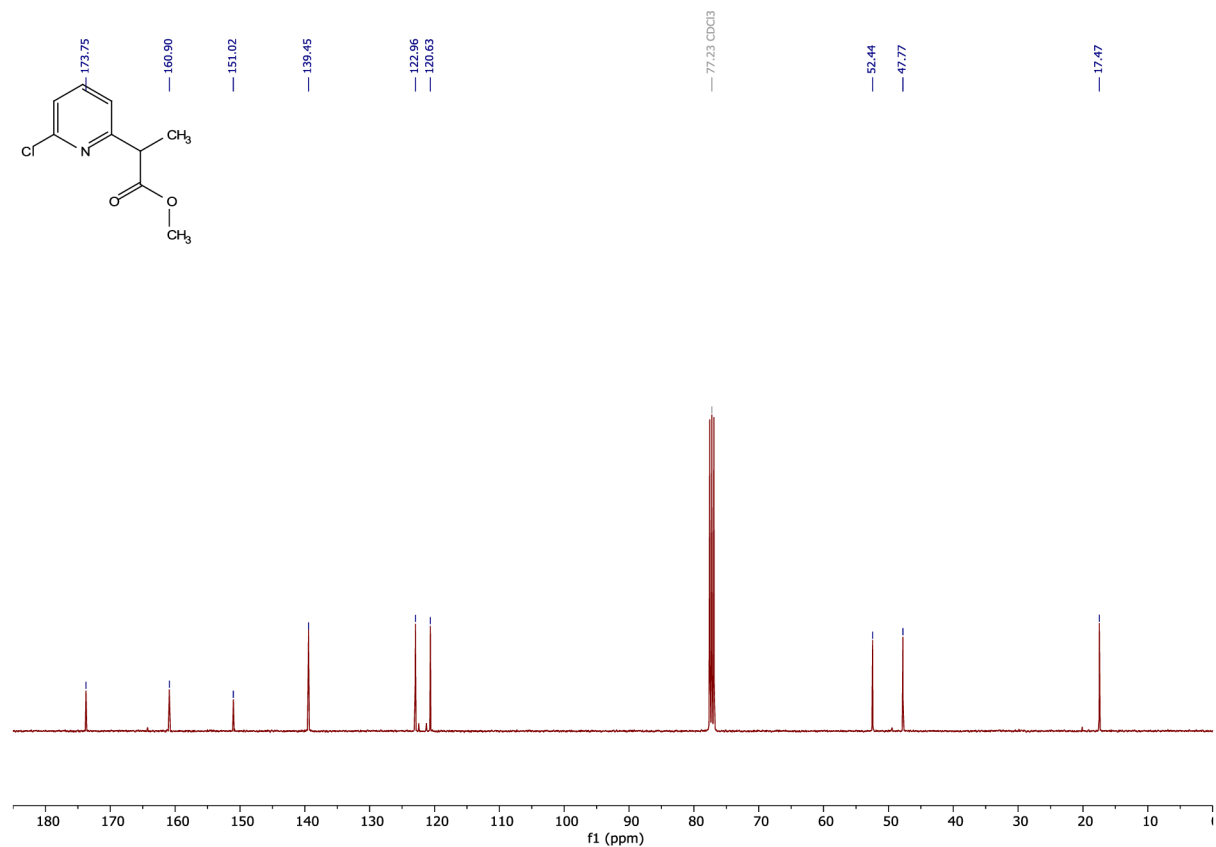
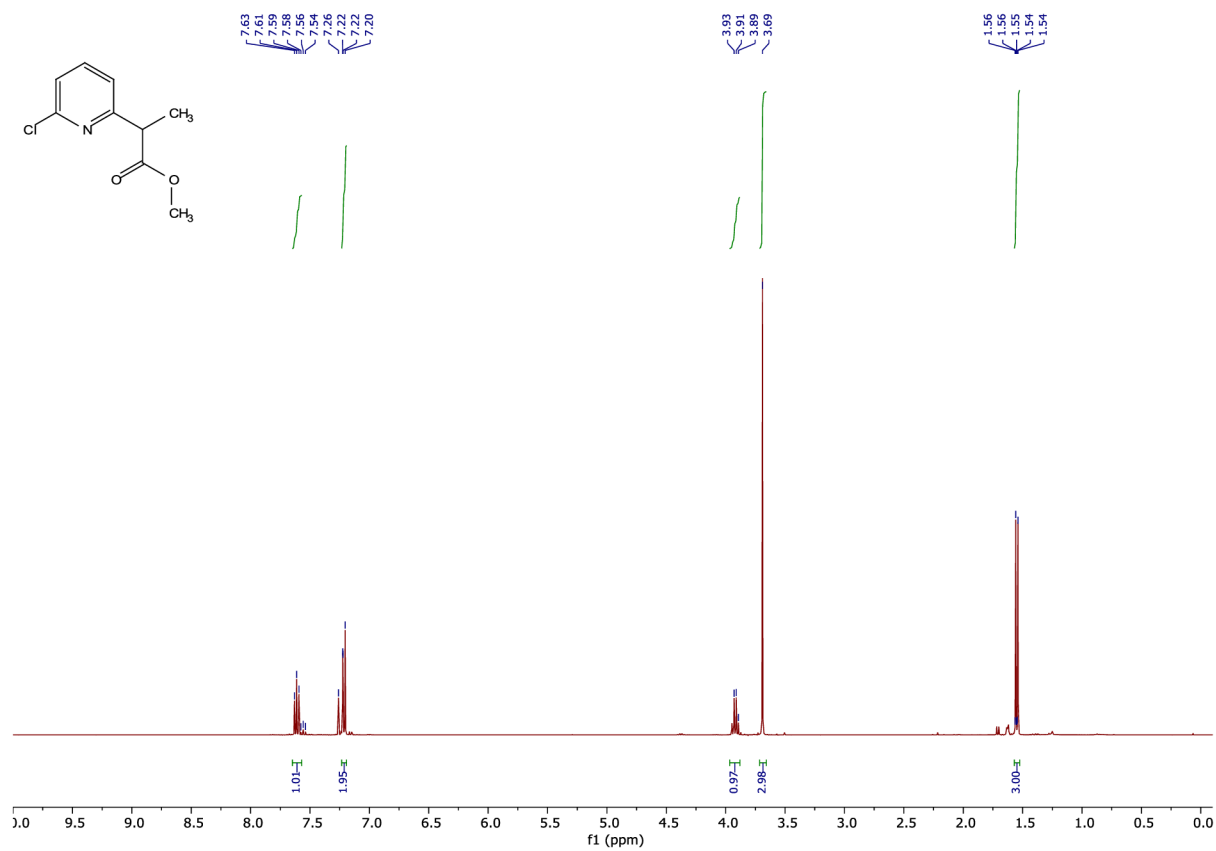
7.2. ^1H a ^{13}C NMR spektra látky 49



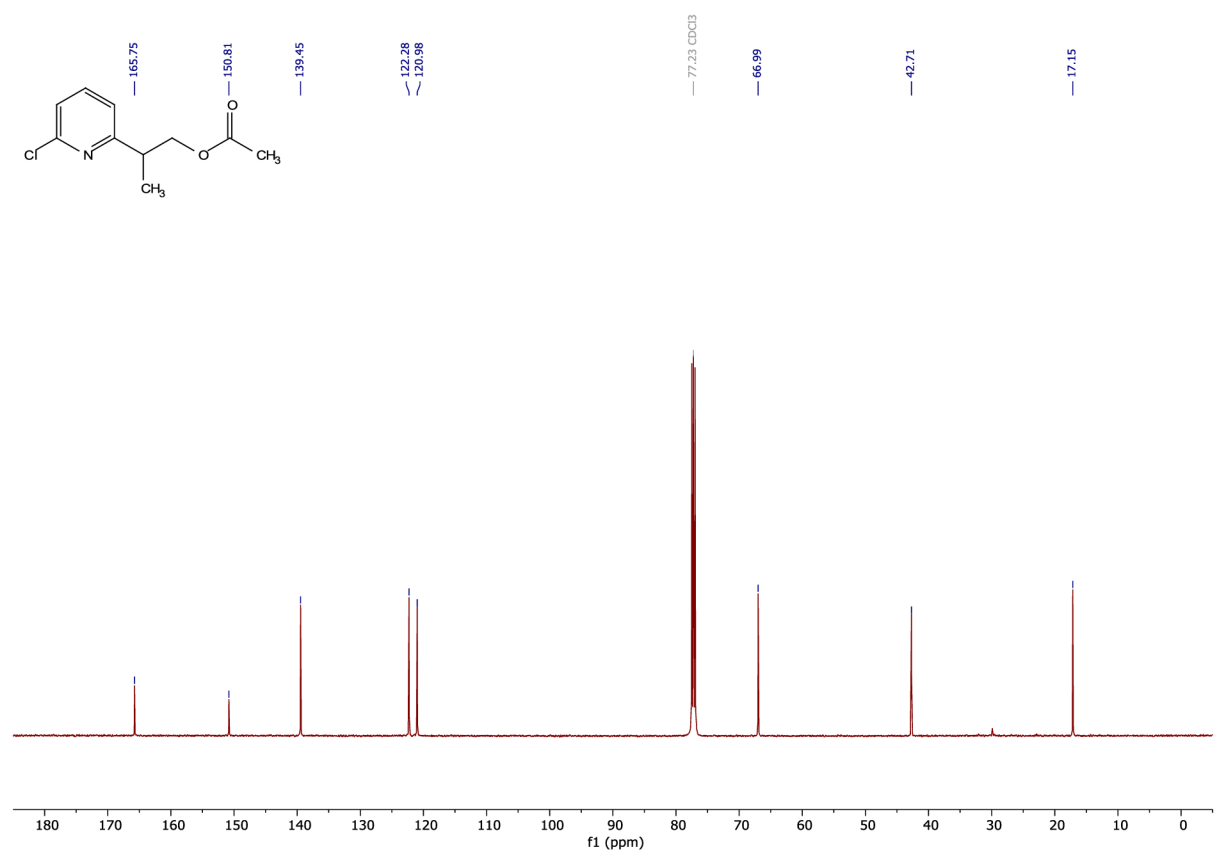
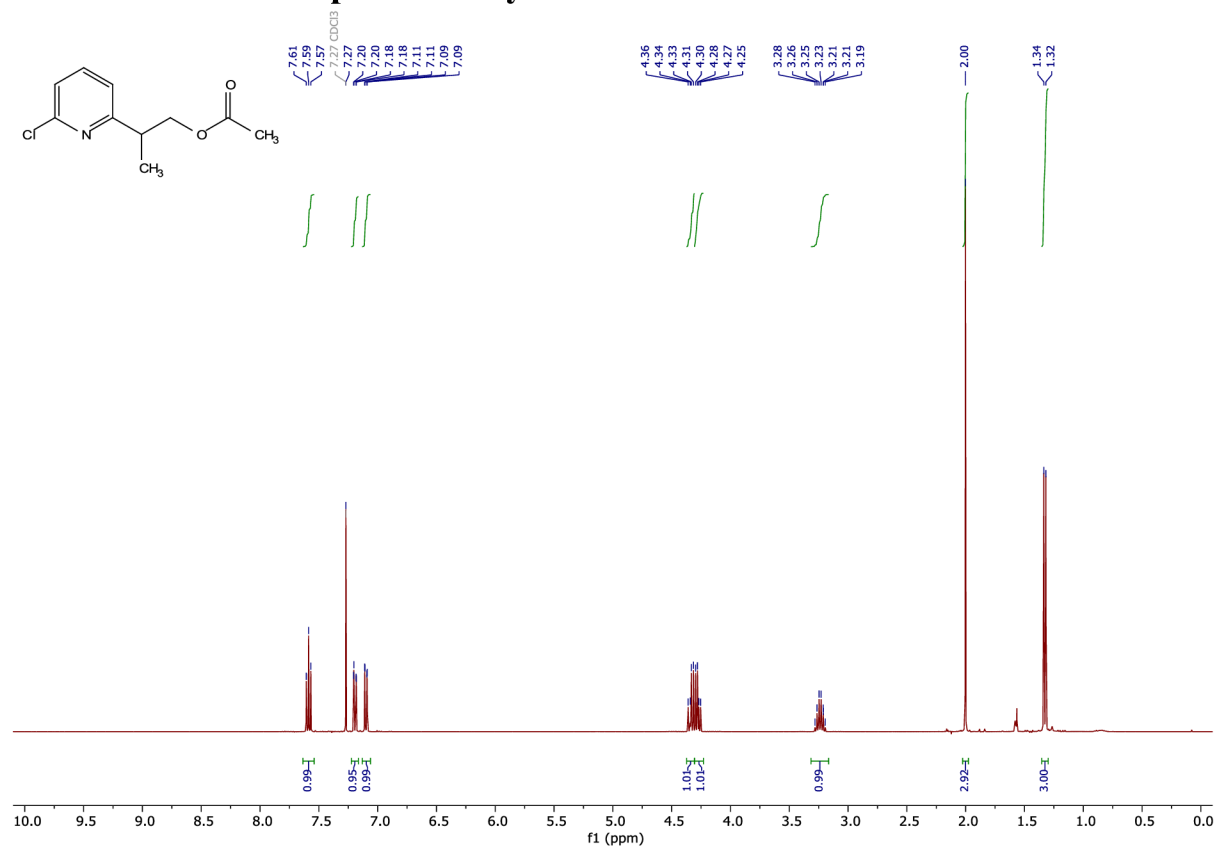
7.3. ^1H a ^{13}C NMR spektra látky *rac*-48



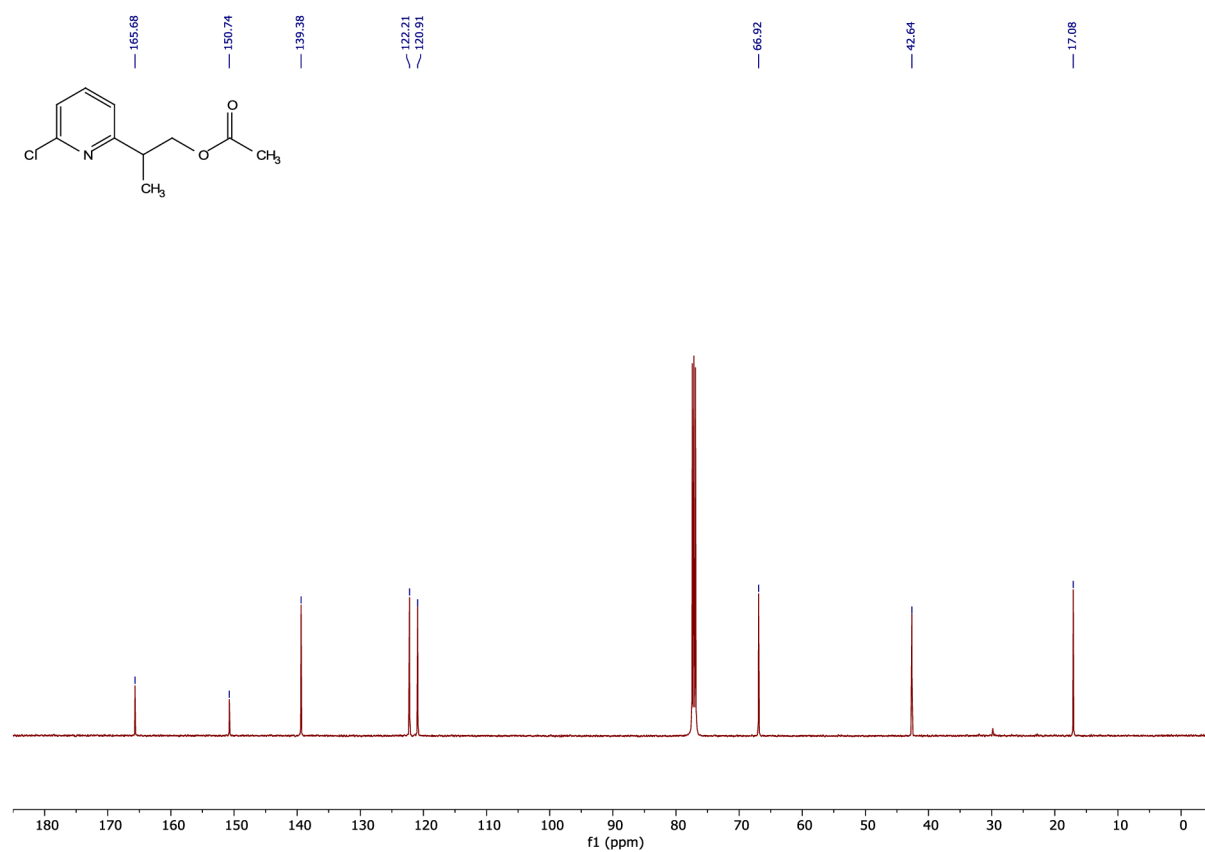
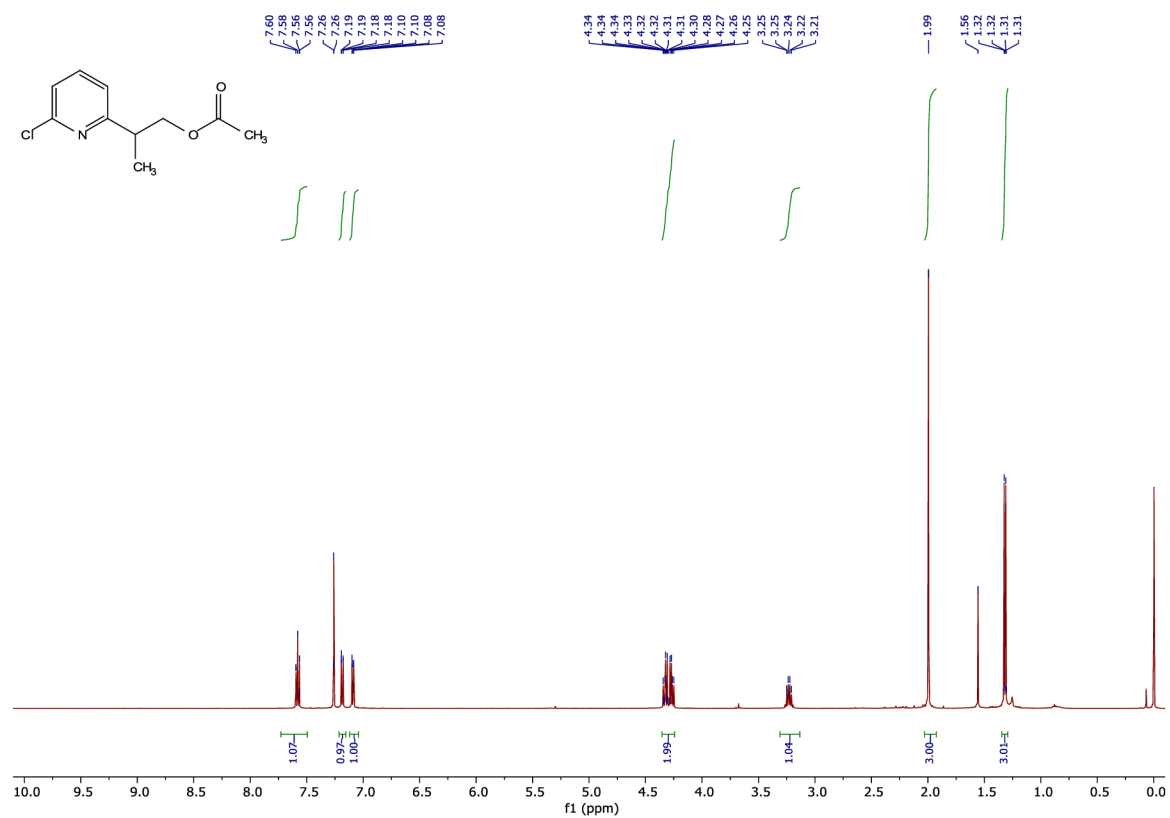
7.4. ^1H a ^{13}C NMR spektra látky Me-49



7.5. ^1H a ^{13}C NMR spektra látky *rac*-Ac-48



7.6. ^1H a ^{13}C NMR spektra látky (S)-Ac-48



7.7. ^1H a ^{13}C NMR spektra látky (*R*)-48

