

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

**Syntéza strukturních derivátů lignano-9,9'-laktonů
s potenciální antileishmaniální aktivitou**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Tereza Golková
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	RNDr. Jiří Pospíšil, PhD.
Termín odevzdání práce:	2019

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Tereza Golková
Název práce	Syntéza strukturních derivátů lignano-9,9'-laktonů s potenciální antileishmaniální aktivitou
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	RNDr. Jiří Pospíšil, PhD.
Rok obhajoby práce	2019
Abstrakt	<p>Bakalářská práce je zaměřená na syntézu strukturních derivátů lignano-9,9'-laktonů s potenciální antileishmaniální aktivitou. V teoretické části práce je sepsána literární rešerše, která se zabývá sekundárními metabolity, nejvíce však fenylypropanoidy, do jejichž skupiny lignany patří. Dále je v teoretické části popsána biologická aktivita vybraných lignano-9,9'-laktonů. V naší skupině nedávno vyvinutý building-block, 1-(fenylsulfonyl)-3-oxabicyclo[3.1.0]hexan-2-on, byl následně využit k přípravě dvou nepřírodních látek lignanového charakteru. Výsledné látky pak byly poskytnuty k biologickým testům, jejichž výsledky nejsou součástí této práce.</p>
Klíčová slova	Lignany, lignano-9,9'-laktony, sekundární metabolity, biologická aktivita, šikimátová dráha
Počet stran	50
Počet příloh	4
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Tereza Golková
Title of thesis	Synthesis of structural derivatives lignano-9,9'-lactones with potential antileishmanial activity
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	RNDr. Jiří Pospíšil, PhD.
The year of presentation	2019
Abstract	<p>The bachelor thesis focuses on the synthesis of structural derivatives of lignano-9,9'-lactones with potential antileishmanial activity. The theoretical part includes a literature review about secondary metabolites (mostly phenylpropanoids which are precursors to lignans), and further it describes the biological activity of selected lignano-9,9'-lactones. Within the experimental part, I have used recently developed 1-(phenylsulfonyl)-3-oxabicyclo[3.1.0]hexan-2-one building block to prepare two novel unnatural lignan-type products. These molecules were submitted to the biological testing, however, the results of such evaluation is not included in this theses.</p>
Keywords	Lignans, linano-9,9'-lactones, secondary metabolites, biological activity, shikimate pathway
Number of pages	50
Number of appendices	4
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne

Tereza Golková

Můj velký dík patří v první řadě mému vedoucímu bakalářské práce RNDr. Jiřímu Pospíšilovi, PhD. za jeho nekonečnou trpělivost, vstřícnost, odborné vedení a cenné rady při sepisování této práce. Další velké díky patří Mgr. Daniele Konrádové za pomoc při syntéze a porozumění v případě nezdarů. V neposlední řadě bych ráda poděkovala rodině a přátelům za nekončící podporu, která někdy byla opravdu třeba.

Na závěr bych chtěla poděkovat Interní grantové agentuře Univerzity Palackého v Olomouci za finanční podporu při výzkumu prováděného v této bakalářské práci (IGA_PrF_2019_018 a IGA_PrF_2019_020).

Obsah

Seznam použitých zkratk.....	8
1 Úvod a cíle práce.....	9
2 Teoretická část	11
2.1 Sekundární metabolity rostlin.....	11
2.1.1 Terpenoidy	12
2.1.2 Alkaloidy.....	14
2.1.3 Fenoly a fenyylpropanoidy.....	16
2.2 Fenyylpropanoidy	17
2.2.1 Biosyntéza fenyylpropanoidů	18
2.2.2 Šikimátová dráha.....	19
2.2.3 Fenyylpropanoidová dráha	21
2.3 Lignany	23
2.3.1 Rozdělení a číslování lignanů	23
2.3.2 Biosyntéza lignanů	26
2.4 Lignano-9,9'-laktony.....	26
2.4.1 Cubebin	27
2.4.2 Hinokinin	28
2.5 Cílový syntetický derivát – chiméra mezi podofylotoxinem a lignano laktone	29
3 Výsledky	30
4 Diskuze	32
4.1 Syntéza 1-(fenylsulfonyl)-3-oxabicyclo[3.1.0]hexan-2-onu 6	32
4.2 Syntéza nového lignanového laktonu	34
5 Experimentální část.....	36
5.1 Obecné informace k experimentální části	36
5.1.1 Chemikálie.....	36
5.1.2 Metody a materiál.....	36
5.2 Organická syntéza	38
5.2.1 Syntéza 2-(fenylsulfonyl)acetonitrilu	38
5.2.2 Syntéza 1-(fenylsulfonyl)-3-oxabicyclo[3.1.0]hexan-2-onu z výchozí látky 2-(fenylsulfonyl)acetonitrilu.....	39
5.2.3 Otevření cyklopropanu: syntéza laktonu (+)-11.....	40
5.2.4 Syntéza (3a <i>R</i>)-3a-(fenylsulfonyl)-3,3a,4,4a,7a,8-hexahydro-5 <i>H</i> ,7 <i>H</i> -furo[3,4- <i>d</i>][1,2,3]triazolo[1,5- <i>a</i>]pyridin-5-onu (+)-14	42
5.2.5 Charakteristické signály látky (+)-13.	45

6	Závěr.....	46
7	Seznam použité literatury	47
	Příloha	51

Seznam použitých zkratek

ATP – adenosintrifosfát

CDCl_3 – deuterovaný chloroform

DAHP – 3-deoxy-D-arabino-2-heptulózónová kyselina 7-fosfát

DCM – dichlormethan

DHQ – 3-dehydrochinát

DIAD – diisopropyl azodykarboxylát

DMF – N,N-dimethylformamid

ESPS – 5-enolpyruvylšikimát-3-fosfát

EtAc – ethylacetát

HIV – virus lidské imunitní nedostatečnosti

MeOH – methanol

NaOMe – methanolát sodný

NMR – nukleární magnetická rezonance

PAL – fenylalanin amoniak lyasa

PE – petrolether

PEP – fosfoenolpyruvát

PhSO_2Na – benzensulfinát sodný

PPh_3 – trifenylofosfin

RVO – rotační vakuová odparka

SARS – syndrom náhlého selhání dýchání

TLC – chromatografie na tenké vrstvě

1 Úvod a cíle práce

Výzkum, vývoj a použití přírodních látek jakožto prekurzorů při vývoji léčivých látek, biologických sond a terapeutik oproti očekávání v posledních letech nejenom nestagnuje, ale nadále se i zvyšuje. Cílové látky tohoto typu jsou velice často odvozovány z vyšších rostlin. Typickými příklady takovýchto přírodních látek, rostlinných metabolitů, které „uběhly dlouhou trať“ od izolace až po využití ve farmaceutickém průmyslu, tak může být např. taxol nebo morfin. Další velická skupina látek (např. podofylotoxin) byla „zařazena“ do klinického používání ne ve formě v jaké se nachází přímo v přírodě, ale pouze v modifikované formě. Původní látky tedy byly synteticky upraveny tak, aby se zvýšila/snížila jejich biologická aktivita nebo toxicita. Další modifikace následně umožnily například změnu fyzikálně-chemických vlastností těchto látek (rozpustnost, dostupnost atd.).

Tak či onak, prvním krokem při hledání nových léčiv přírodního původu je jejich izolace (Cunha et al., 2012). V naší skupině se zaměřujeme v oblasti izolovaných rostlinných sekundárních metabolitů zejména na oblast fenolů fenylypropanoidového typu, zejména pak jejich dimerů lignanového a neolignanového skeletu.

Lignany patří do skupiny sekundárních metabolitů se širokou škálou chemických struktur, které vznikají spojením dvou fenylypropanoidových jednotek na vazbě C8-C8' (viz dále). Mezi hlavní biologické aktivity lignanů patří protizánětlivá, protinádorová, trypanocidní, antimikrobiální a antileishmaniální aktivita (Pereira, Perazzo, Souza, Fonseca & Rosa, 2016). Strukturně a biologicky nejzajímavější z této skupiny dimerů lignanového typu jsou asi látky s lignano-9,9'-laktonovým skeletem (dibenzylbutyrolaktonové lignany) (Zhang, Chen, Liang & Zhao, 2014).

Pro tuto práci je nejdůležitější antileishmaniální aktivita daných látek, protože se v naší skupině snažíme vyvinout nové látky, které by nám umožnily bojovat s jednou z nejvíce zanedbaných chorob světa – leishmaniózou. Tato choroba je nejvíce rozšířena v nejhudších regionech rozvojových zemích světa. K dnešnímu dni je ohroženo kolem 350 milionů lidí nákazou leishmaniózy a každoročně se vyskytne okolo 2 milionů nových případů nákazy. Bohužel v posledních letech došlo i přes významný posun v diagnostice i prevenci leishmaniózy k významnému rozšíření této nemoci. Jedním z důvodů je vznik rezistence parazitů na existující léčbu. A to je důvod, proč je nezbytné vyvinout nová

léčiva založená na jiných typech *modus operandi*, než mají stávající léčiva (Bern, 2010). Dalším důvodem, neméně závažným, jsou značné vedlejší účinky těchto léčiv na léčené organismy. Typickým příkladem jsou například vedlejší účinky spojené se standardní léčbou založenou na léčivu vycházejícího z pětimocného antimonu. Tento typ látky má v organismu vysokou renální a kardiální toxicitu. Proto existuje potřeba vývoje dalších léků, které jsou bezpečné a účinné (Pereira et al., 2016).

Cíle práce:

1. Vypracovat rešerši na téma "Lignano-9,9'-laktony a jejich biologické účinky v kontextu parazitických onemocnění."
2. Syntéza nové látky nepřírodního charakteru obsahující lignanový laktonový motiv vycházející z 1-(fenylsulfonyl)-3-oxabicyclo[3.1.0]hexan-2-onového building bloku.
3. Charakterizace připravených látek pomocí dostupných fyzikálně-chemických metod.

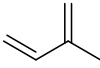
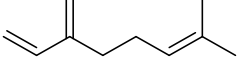

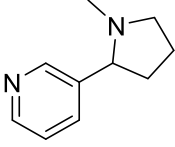
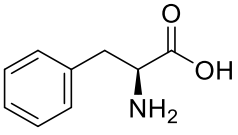
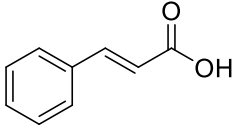
2 Teoretická část

2.1 Sekundární metabolity rostlin

Sekundární metabolity jsou látky s omezeným výskytem v taxonomických skupinách, které nejsou nezbytné pro život buňky/organismu, ale hrají roli ve vzájemném působení buňky/organismu s prostředím, ve kterém se buňka/organismus vyskytuje. Sekundární metabolity tedy usnadňují přežití organismu v ekosystému, ale nejsou životně nezbytné k jeho přežití. V tomto ohledu jsou sekundární metabolity nezbytné ke zvýšení komfortu přežití (Verpoorte, 2000).

Sekundární rostlinné metabolity můžeme tedy definovat jako sloučeniny, jež rostlina syntetizuje, aniž by byly pro rostlinu životně důležité. Sekundární metabolity pak ovšem hrají klíčovou roli při konkurenčním boji, adaptabilitě rostlin a jejich schopnosti zvýšit šance na svoje rozmnožování (Davey, 2017). V rámci buněk pak mnohé z nich můžeme nalézt jako identifikátory/odpověď organismu na abiotický a biotický stres (Kim, Dolan, Anderson & Chapple, 2015).

Tabulka 1: Reprezentativní příklady každé z hlavních tříd sekundárních metabolitů. Převzato a upraveno z Web 1.

Typ sloučeniny	Hlavní stavební kámen	Příklad
Terpenoidy	 isopren	 myrcen
Alkaloidy	 dusík	 nikotin
Fenoly a fenylpropanoidy	 fenylalanin	 kyselina skořicová

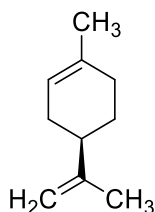
Sekundární metabolity velice často v rostlině slouží jako obrana proti patogenům. Tato obrana spočívá hlavně v odrazování býložravců a herbivorního hmyzu před pozřením rostliny nebo její části. Dále mohou tyto látky sloužit k inhibici růstu konkurenčních druhů rostlin nebo alespoň k jeho potlačení. Sekundární metabolity rostlina ovšem využívá i jako lákadlo pro své opylovače, čímž si zajišťuje větší pravděpodobnost k opylování a zároveň tak zvyšuje šanci ke svému rozmnožení.

Sekundární metabolity jsou syntetizovány v různých částech rostliny a jsou to látky velmi různorodé. Jejich zastoupení v sušině rostliny je ovšem menší než 1 % hmotnosti, což je pro komerční využití těchto látek obecně nedostačující. Navíc zastoupení různých metabolitů v rámci jednoho druhu rostlin je značně různorodé a značně závisí na přírodních podmínkách, ve kterých daná rostlina vyrůstá (Davey, 2017). Dále pak je nutné si uvědomit, že sekundární metabolity jsou značně regionálně modifikovatelné a že u stejné rostliny se jejich výskyt v závislosti na oblasti může značně lišit. Zde je velký rozdíl s metabolity primárními, které jsou shodné u všech rostlin v celé rostlinné říši (Taiz & Zeiger, 2010).

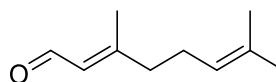
Rostlinné metabolity mohou být rozděleny na základě jejich biosyntetického původu do tří základních skupin, jmenovitě terpenoidy, alkaloidy a fenoly spolu s fenylpropanoidy (Davey, 2017).

2.1.1 Terpenoidy

Terpenoidy jsou strukturně velmi rozmanité malé organické molekuly, které jsou strukturně příbuzné – základní struktura vychází z pětiuhlíkaté isoprenové jednotky. Některé z těchto sloučenin patří mezi alifatické, jiné jsou cyklické. Některé jsou složeny pouze z uhlíku a vodíku, jiné mohou obsahovat kyslík. Terpenoidy složeny pouze z uhlíku a vodíku, které vždy obsahují dvojné vazby nazýváme terpeny.



limonen



citral

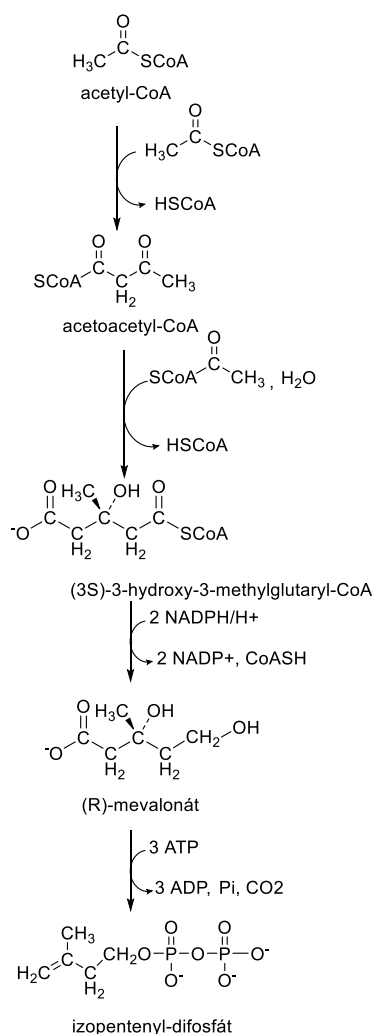
Obr. 1: Ukázka cyklického terpenu limonenu a alifatického terpenoidu citralu.

Terpeny dále dělíme podle počtu isoprenových jednotek na monoterpeny, které obsahují dvě isoprenové jednotky, seskviterpeny obsahující tři isoprenové jednotky, diterpeny, které se skládají ze čtyř isoprenových jednotek a tak dále (McMurry, 2012).

Terpenoidy tvoří velkou skupinu sekundárních metabolitů. Jsou syntetizovány z acetyl-CoA nebo z glykolytických meziproduktů a jejich biosyntéza je uskutečňována v rostlinách pomocí dvou různých metabolických drah.

Nejčastěji využívanou metabolickou dráhou je dráha kyseliny mevalonové (Obr. 2), ve které jsou tři molekuly acetyl-CoA postupně spojeny dohromady, čímž vytvoří kyselinu mevalonovou. Tento šestiuhlíkatý meziprodukt je dále pyrofosforylován, dekarboxylován a dehydratován k získání isopentenyl difosfátu. Isopentenyl difosfát je tvořen také methyletrytol-fosfátovou dráhou, která působí v chloroplastech a ostatních plastidech. Isopentenyl difosfát a jeho isomer dimethylallyl difosfát jsou dále použity k biosyntéze větších molekul terpenů.

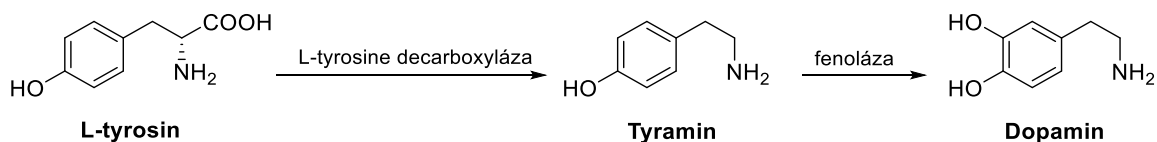
Z biologického hlediska jsou terpeny toxiny a odpuzovače chuti. Odpuzovače chuti slouží k odrazení herbivorního hmyzu a býložravců, neboť zhoršují chuť dané rostliny. A právě ono zhoršení chuti hraje důležitou roli v obraně rostlin. Velké množství rostlin obsahuje směs těkavých monoterpenů a seskviterpenů, které nazýváme esenciální oleje. Tyto směsi látek propůjčují listům rostliny charakteristickou vůni jako je třeba mentolová, citrónová nebo bazalková. Esenciální oleje mají rovněž repelentní vlastnosti (Taiz & Zeiger, 2010).



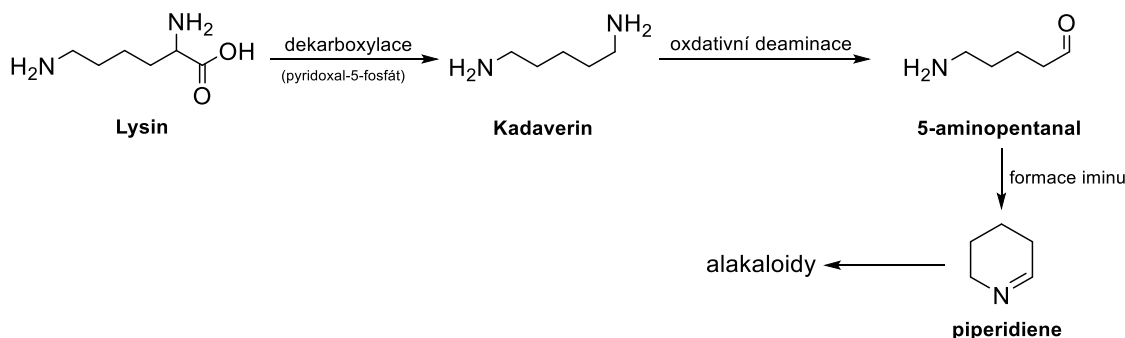
Obr. 2: Schéma biosyntézy terpenoidového prekursoru izopentenyl-difosfátu přes mevalonátovou cestu. Převzato a upraveno z (McMurry, 2012).

2.1.2 Alkaloidy

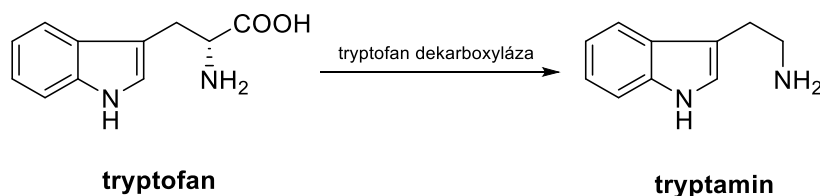
Alkaloidy obsahující rostlinné extrakty byly v průběhu lidských dějin (neúmyslně) lidmi užívány (a zneužívány) jako hlavní součást k přípravě lektvarů a jedů (Buchanan, B.B., Gruissem, W. & Jones, 2015). Typickým znakem alkaloidů je, že jejich skelet obsahuje alespoň jeden atom dusíku. Tato skupina čítá více než 15 000 metabolitů tohoto typu. Dusík, který se nachází v těchto metabolitech je obvykle součástí heterocyklického kruhu. Díky tomuto atomu také nese celá skupina látek svůj název – jméno alkaloidy je odvozeno ze slova alkaloidní = bazický. A tato bazicita těchto látek je úzce spojena s atomem dusíku. Z pohledu biosyntézy jsou alkaloidy obvykle připravovány z jedné z několika běžných aminokyselin, konkrétně z tyrosinu, lysinu nebo tryptofanu (Obr. 3). Velice často je také atom dusíku přiveden do cílové molekuly díky aminoreduktázám (Obr. 4).



Obr. 3: Schéma biosyntézy dopaminu z L-tyrosinu. Převzato a upraveno z (Sato, 2002).



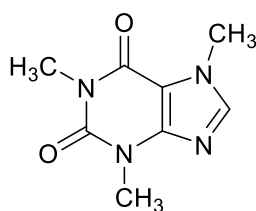
Obr. 4: Schéma biosyntézy alkaloidů z lysinu. Převzato a upraveno z (Chopra, Dhingra, Kapoor & Prasad, 2017; Herbert, 2003).



Obr. 5: Schéma biosyntézy alkaloidu tryptaminu z tryptofanu. Převzato a upraveno z (Daniel, 2011).

Funkce alkaloidů v rostlinách nebyla vždy jasná. Z počátku se odhadovalo, že alkaloidy jsou pouze dusíkatý odpad. Poté, že to jsou regulátory růstu. Dnes je obecně přijímaná teorie, že alkaloidy jsou látky pomáhající rostlině v obraně před herbivorními živočichy, především pak býložravci. Alkaloidy jsou pro savce většinou toxické (Taiz & Zeiger, 2010).

Mezi známé a využívané alkaloidy patří například kofein, který se nachází v listech a semenech kakaovníku (*Theobroma cacao*), kávovníku (*Coffea arabica*), čajovníku (*Camellia sinensis*) nebo například v listech cesmíny paraguajské (*Ilex paraguariensis* – příprava nápoje maté). Role kofeinu v těchto rostlinách byla určena jako přírodní insekticid. Kofein obsažený v listech čajovníku, popřípadě v semenech kávovníku, dokáže zabít téměř všechny housenky lišaje *Manduca sexta* během dvaceti čtyř hodin. (Buchanan, B.B., Grisse, W. & Jones, 2015)



Obr. 6: Vzorec alkaloidu kofeinu.



Obr. 7: Foto kávovníku s čerstvými zralými i nezralými kávovými boby. Převezato z web 2.

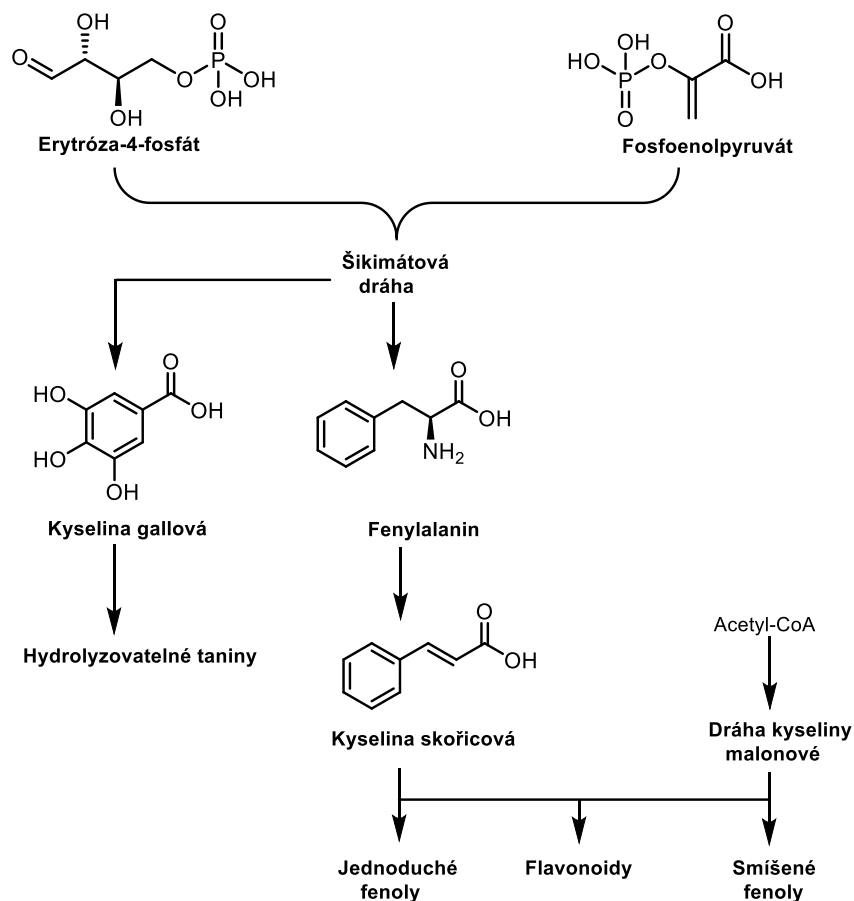
2.1.3 Fenoly a fenypropanoidy

Rostliny produkují velké spektrum sekundárních metabolitů, které obsahují fenolickou skupinu, složenou z hydroxylové funkční skupiny na aromatickém jádře. Tyto látky se klasifikují jako fenoly.

Rostlinné fenoly jsou chemicky velmi rozmanité látky, které zastávají v rostlinách velmi různorodé funkce (Taiz & Zeiger, 2010). Velké množství z nich slouží k obraně rostlin před býložravci, herbivorním hmyzem a jinými patogeny. Příkladem fenolu sloužícímu k obraně proti býložravcům může být digitoxin (Taiz, Zeiger, Møller & Murphy, 2018). Dalším příkladem rostlinného fenolu může být kumarin, který zabraňuje růstu plísní a také odpuzuje herbivorní hmyz (Rehman, Khan & Badruddin, 2012). Jiné pomáhají rostlině s mechanickou oporou (např. lignin)

nebo s přilákáním opylovačů. Některé fenoly dokonce slouží rostlině jako pohlcovače ultrafialového záření, které by mohlo jinak rostlinu poškodit.

Rostlinné fenoly jsou biosyntetizovány několika rozdílnými dráhami, a tak vytváří z metabolického hlediska heterogenní skupinu. Do biosyntézy fenolů jsou zapojeny dvě dráhy a to šikimátová dráha a dráha kyseliny malonové. Dráha kyseliny malonové se podílí na syntéze fenolických sloučenin převážně v houbách a bakteriích, méně u vyšších rostlin (Taiz & Zeiger, 2010).



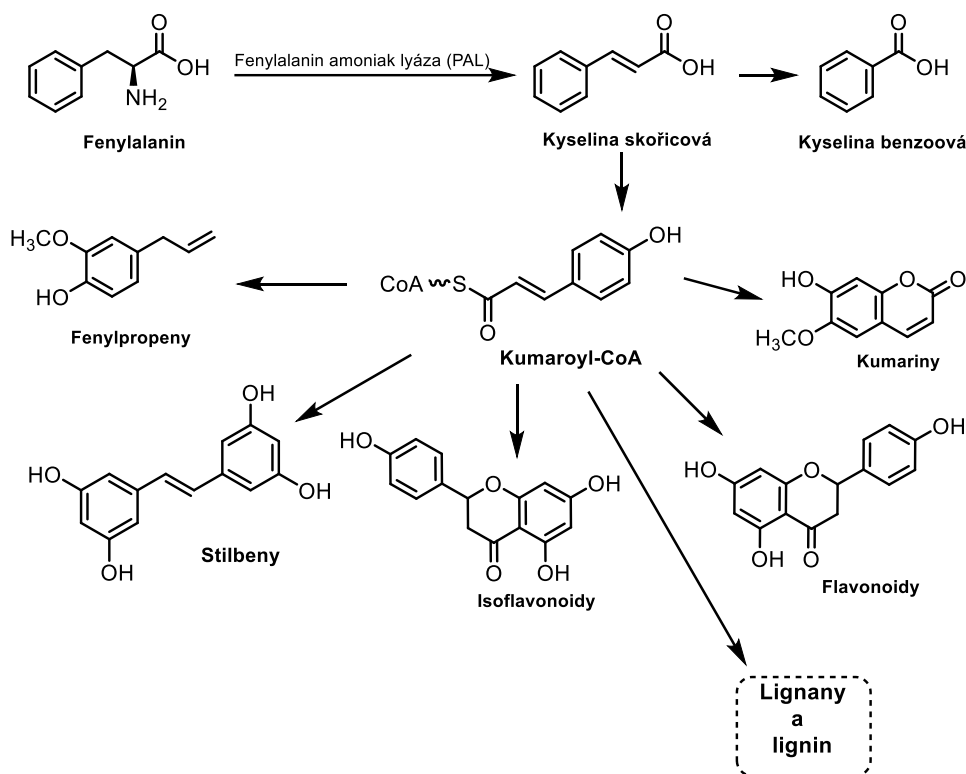
Obr. 8: Schéma biosyntézy fenolů. Převzato a upraveno z (Taiz & Zeiger, 2010)

2.2 Fenylpropanoidy

Základní jednotkou fenolických sekundárních metabolitů lignanového a neolignanového typu je fenylpropanoidová jednotka. Z biosyntetického pohledu jsou fenylpropanoidy v rostlinách připravovány z aminokyseliny fenylalaninu (Obr. 9) (Kim et al., 2015). Fenylpropanoidová jednotka je pak základním stavebním kamenem při přípravě lignanů a neolignanů (dimery) a ligninu (polymerní struktura). Z pohledu zastoupení jsou tyto látky, látky odvozené od fenylpropanoidů anebo sloučeniny obsahující ve své struktuře alespoň jeden fenylpropanoidní motiv, nejrozsáhleji

zastoupené fenolické sekundární metabolity nalézající se v rostlinách (Taiz & Zeiger, 2010).

Jedním z důvodů je již dříve zmíněný lignin. Tento heteropolymer je důležitý pro mechanickou oporu a hydrofobicitu rostlinné buněčné stěny. Kromě ligninu vzniká fenylypropanoidovou cestou velká škála rozpustných metabolitů jako jsou flavonoidy anebo další hydroxyskořicové deriváty (např. kumariny) (Landry, Chapple & Last, 1995).



Obr. 9: Schéma možných produktů fenylypropanoidové dráhy. Převzato a upraveno z (Vogt, 2010).

2.2.1 Biosyntéza fenylypropanoidů

Biosyntéza fenylypropanoidů začíná aminokyselinou L-fenylylalaninem. Z této látky jsou následně odvozeny všechny ostatní fenylypropanoidy rostlinného typu. U živočišných buněk naopak biosyntéza struktur obsahujících hydroxylovaný fenylypropanoidový skelet začíná u L-tryptofanu a L-tyrosinu. Tyto jsou následně využity při biosyntéze proteinů. U rostlin naopak fenylypropanoidové monomery slouží při biosyntéze nespočtu přírodních sekundárních metabolitů, které plní funkci pigmentu, hormonů či komponentů buněčné stěny.

Všechny tyto tři aminokyseliny ale mají svůj původ v šikimátové dráze (Obr. 10). Tato dráha, která spotřebuje kolem 30 % všeho uhlíku absorbovaného cévnatými rostlinami během fotosyntézy, je opravdu nezbytná pro život živočichů,

neboť biosyntetické dráhy těchto aminokyselin se u živočichů nenachází. Tudíž jsou tyto aminokyseliny pro živočichy esenciální (Maeda & Dudareva, 2012). Zejména se to týká aminokyselin fenylalaninu a tryptofanu. Tyto látky jsou totiž pro život živočichů naprosto nezbytné. Jejich příjem je pak limitován pouze na příjem v podobě potravy. Aminokyselina tyrosin je pak získána biosynteticky z fenylalaninu (Herrmann, 1995).

2.2.2 Šikimátová dráha

Šikimátová dráha je hlavní biosyntetickou cestou zaměřenou na biosyntézu aromatických aminokyselin. Tuto biosyntetickou dráhu nalezneme u bakterií, rostlin, hub i kvasinek. Tato dráha ovšem zcela chybí u savců. Tato dráha je jedna z hlavních proteosyntetických drah a využívá se při syntéze vitamínů a elektron přenášejících sloučenin jako jsou kofaktory nebo chinony (Díaz-Quiroz et al., 2018).

První krok:

Šikimátová dráha začíná kondenzací fosfoenolpyruvátu (PEP) a erythróza-4-fosfátu. Tato reakce je enzymaticky katalyzována a to enzymem 3-deoxy-D-arabino-heptulosonát-7-fosfát syntázou, zkráceně DAHP syntázou. Touto reakcí vzniká 3-deoxy-D-arabino-2-heptulózonová kyselina 7-fosfát (DAHP) (Dewick, 1994).

Druhý krok:

Poté, co kondenzací PEP s D-erythróza-4-fosfátem vznikne DAHP dochází pomocí enzymu 3-dehydrochinát syntázy k přeměně DAHP na 3-dehydrochinát (DHQ).

Třetí krok:

Následně je 3-dehydrochinát dehydratován. Tato dehydratace je enzymaticky katalyzována 3-dehydrochinázou, kdy se 3-dehydrochinát postupně dehydratuje až na 3-dehydrošikimát.

Čtvrtý krok:

Šikimát dehydrogenáza katalyzuje NADPH dependentní redukci 3-dehydrošikimátu na šikimát (Knaggs, 2003).

Pátý krok:

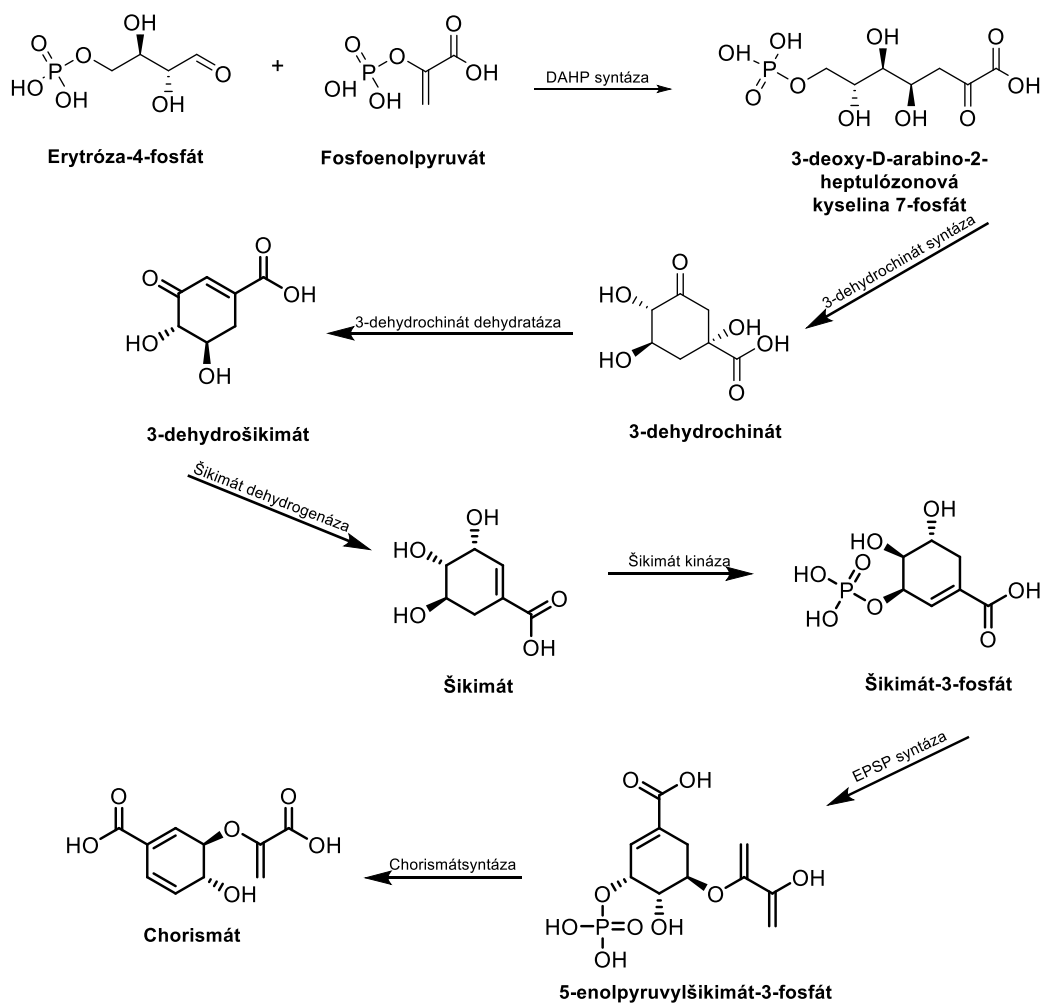
Šikimát kináza katalyzuje konverzi šikimátu na šikimát-3-fosfát. Konverze šikimátu na šikimát-3-fosfát využívá ATP jako kosubstrát (Koshiya, 1979).

Šestý krok:

Katalýza předposledního kroku šikimátové dráhy je uskutečněna pomocí 5-enolpyruvylšikimát-3-fosfát syntázy (ESPS syntáza), která je označována také jako 3-fosfošikimát 1-karboxyvinyltransferáza (Maeda & Dudareva, 2012). To zahrnuje přenos pyruvátu na 5-hydroxy skupinu šikimátu-3-fosfátu za vzniku 5-enolpyruvylšikimát-3-fosfátu.

Sedmý krok:

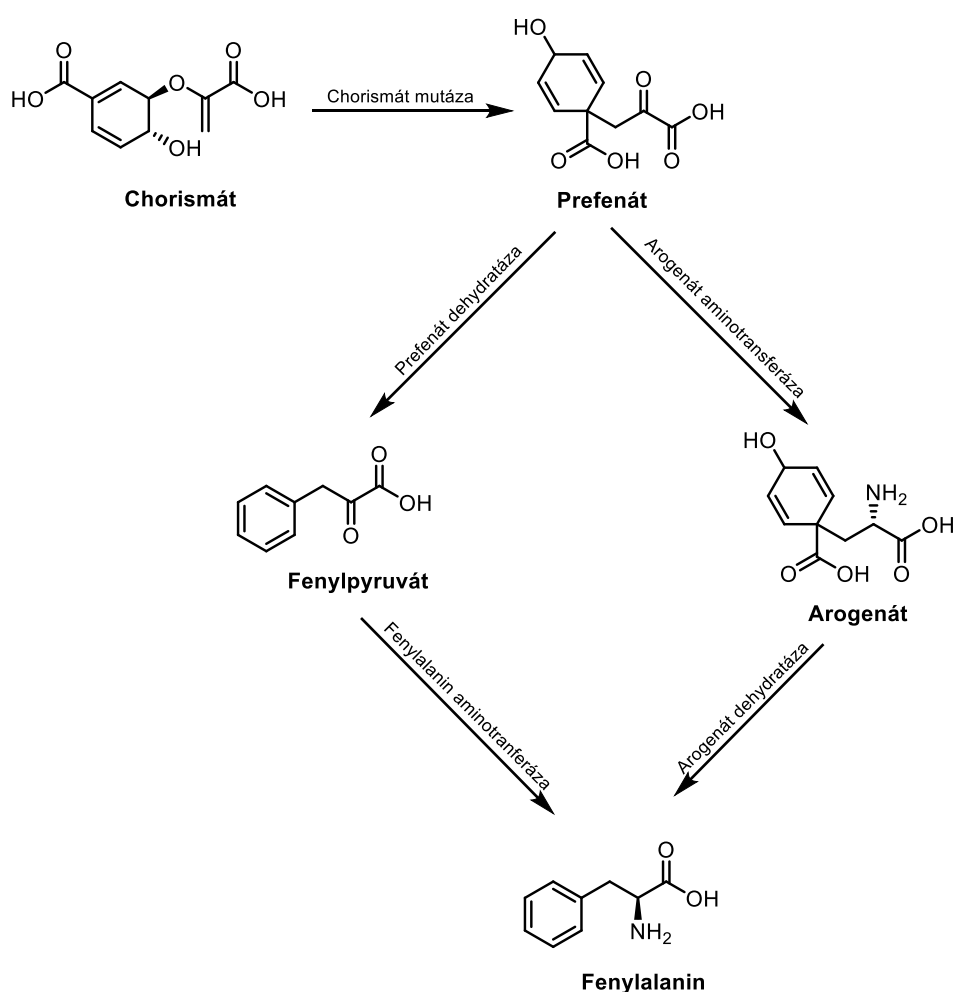
Chorismátsyntáza je sedmým a posledním enzymem, který se účastní aromatické biosyntetické dráhy. Tento enzym katalyzuje přeměnu EPSP na chorismát. Chorismát slouží jako prekurzor pro pět odlišných biosyntetických cest a zároveň slouží jako běžný prekurzor pro syntézu aromatických metabolitů jako jsou aromatické aminokyseliny, vitamín K, vitamín E, koenzym Q a další (Mir, Jallu & Singh, 2015).



Obr. 10: Schéma biosyntézy chorismátu šikimátovou dráhou. Převzato a upraveno z (Mir et al., 2015).

Chorismát vzniklý šikimátovou dráhou je následně přeměněn pomocí fenylalaninové dráhy na fenylalanin. Tato přeměna probíhá za pomoci enzymu chorismát mutázy, kde z chorismátu vzniká nejprve prefenát (Obr. 11). Prefenát je následně přeměněn na fenylalanin pomocí jedné ze dvou možných cest.

První cesta zahrnuje transaminaci prefenátu. Transaminací získáme arogenát, který je následně dehydratován za vzniku fenylalaninu. Druhá cesta se odehrává v opačném pořadí, kdy je prefenát nejprve podroben dehydrataci pomocí enzymu prefenát dehydratázy. Produkt fenylpyruvát je následně transaminován na fenylalanin (Zamir, Fiske, Tiberio, Berry & Jensen, 1985).

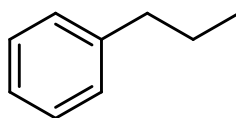


Obr. 11: Schéma biosyntéza fenylalaninu z chorismátu přes 2 různé meziprodukty. Převzato a upraveno z (Jensen, 1986; Keller, Keller, Salcher & Lingens, 1982)

2.2.3 Fenylpropanoidová dráha

Fenylpropanoidová dráha úzce souvisí s dráhou šikimátovou (Lenka Jašková, 2015). Výsledný produkt šikimátové dráhy, fenylalanin, zde slouží jako prekurzor pro tvorbu rozmanité skupiny fenylpropanoidních látek (Vogt, 2010).

Fenylalanin amoniak lyáza (PAL) katalyzuje stereospecifickou eliminaci amoniaku z L-fenylalaninu a to selektivním odstraněním vodíku z postranního řetězce β -uhlíku. To dá za vznik kyseliny (*E*)-skořicové. Tato reakce představuje první enzymaticky vázaný biosyntetický krok při tvorbě fenylpropanoidového skeletu. Tedy tento krok slouží jako regulační krok, který spouští/utlumuje, tedy reguluje, metabolismus spojený s aromatickými látkami v rostlinách (Bohnert, 2007).

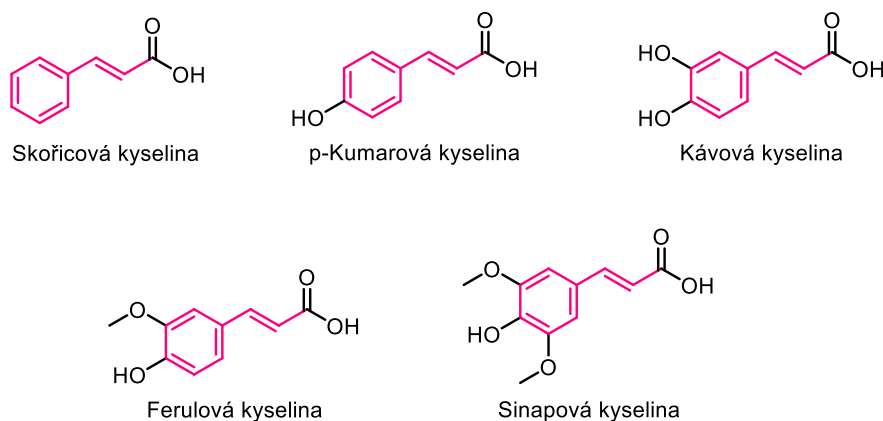


Obr. 12: Fenylpropanoidový skelet.

Z takto vzniklé kyseliny skořicové je sérií hydroxylačních anebo *ortho*-methylačních kroků vytvořena škála aromatických kyselin jako jsou kyseliny *p*-kumarová, kávová, ferulová či sinapová (Obr.13) (Ibrahim & Barron, 1989).

Jejich biosyntéza zahrnuje hydroxylaci skořicové kyseliny v pozici 4 pomocí membránou asociované cytochrom-P450 dependentní monooxygenázy a cinamát 4-hydroxylázy. Tento krok způsobí přeměnu kyseliny skořicové na kyselinu *p*-kumarovou, která může být následně díky kumarát 3-hydroxyláze hydroxylována na kyselinu kávovou. Kyselina kávová může poté být methylována pomocí bi-specifické caffeic/5-hydroxyferulic o-methyl transferázy. Tato methylace dává vzniknout kyselině ferulové.

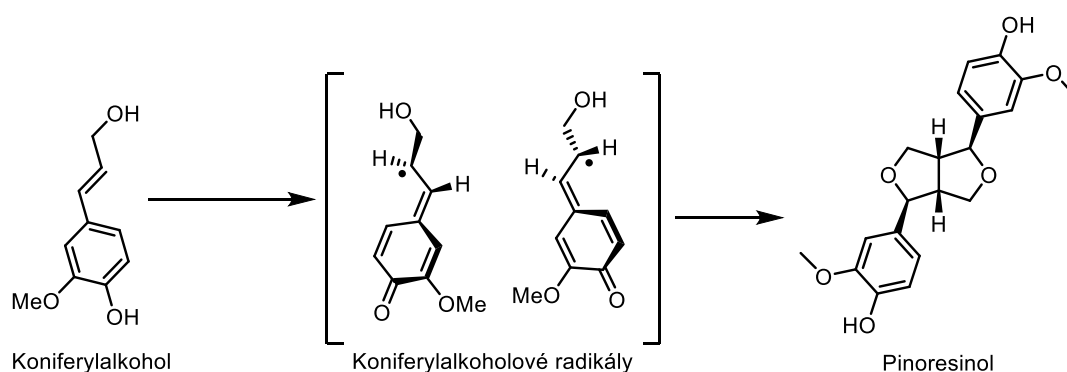
Kyselina ferulová pak může být pomocí mikrozomální ferulát 5-hydroxylázy hydroxylována v poloze 5 a následně methylována na kyselinu sinapovou (Bohnert, 2007).



Obr. 13: Kyseliny se zvýrazněným fenylpropanoidovým skeletem.

2.3 Lignany

Lignany jsou přirozeně se vyskytující rostlinné fenoly, které jsou z biosyntetického pohledu dimery fenylpropanoidů (Zhang et al., 2014). Jejich četnost v rostlinách je tak velká, že mají v rámci sekundárních rostlinných metabolitů svoji vlastní podtřídu. Z pohledu organické chemie tyto látky vznikají oxidativní dimerizací dvou fenylpropanoidových jednotek. Obecně tímto procesem vznikne škála opticky aktivních dimerů fenylpropanoidního typu (ne vždy jsou látky přítomny v enantiomerním nadbytku – dimerizace není stereoselektivní proces). Tyto látky dimerují v pozicích C-8 a C-8' a v drtivé většině případů dochází k homodimerizačnímu procesu. Jeden z příkladů takovéto reakce je ukázán na Obr. 14 (Harmatha, 2005).



Obr. 14: Schéma dimerizace fenylpropanoidových jednotek, konkrétně koniferylalkoholových derivátů za vzniku lignanu – pinosresinolu. Převzato a upraveno z (Cunha et al., 2012).

2.3.1 Rozdělení a číslování lignanů

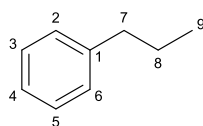
Ze své podstaty jsou lignany, a zejména jejich polymerní ligninová forma, produkovány rostlinami napříč celou rostlinnou říší. Vždyť všechny rostliny chtějí mít rigidní formu a ne jen tak si polehávat po zemi. Ale zpět k lignanům. V rostlinách jsou lignany kvazivšudypřítomné a tak je můžeme najít nejen v rhizoidech a kořenech rostlin, ale také v listech, semenech, plodech či stonku. Z tohoto důvodu je asi překvapivé, že naprostá většina rostlin je komerčně bezvýznamným zdrojem těchto látek. Hlavním důvodem je totiž naše „neschopnost“ izolovat tyto látky z komplexních směsí, ve kterých se tyto látky v rostlinách nachází. Jedinou výjimkou z tohoto pravidla jsou stromy, které obsahují pryskyřici. Zde se lignany nacházejí ve směsi s jinými obecně nepolárními přírodními látkami, které je velmi snadné od lignanů separovat. Dalším bohatým zdrojem rostlinných lignanů je len. V lnu můžeme najít lignany jako jsou matairezinol, pinosresinol a isolariciresinol. Je zajímavé, že i když se tyto látky nachází

v celé rostlině, stále není zcela jasná jejich biologická funkce (Saleem, Kim, Ali & Lee, 2006). Vzhledem k detekovaným antimikrobiálním, antifungálním, antioxidačním a insekticidním vlastnostem ve lnu detekovaných lignanů se tak předpokládá, že asi slouží jako obrana rostliny proti různým biologickým patogenům a škůdcům (Cunha et al., 2012).

Z těchto důvodů se tak ale lignany stávají nejenom důležitými pro rostlinu, ale rostou tak i jejich význam ve farmakologii. Biologické testování lignanů totiž ukázalo, že některé z nich mají velmi zajímavé protinádorové, imunosupresivní, antioxidační, kardiovaskulární a antivirové účinky (Saleem et al., 2006). Byla prokázána také jejich analgetická, protizánětlivá (Bastos, Carvalho, De Souza, Pedrazzi & Sarti, 2001) trypanocidní (Bastos, Albuquerque & Silva, 1999) a antileishmaniální aktivita (Silva Carrara et al., 2013).

Z chemického hlediska představují lignany obrovskou skupinu strukturně různorodých látek a to i navzdory tomu, že se jejich základní skelet sestává pouze ze dvou fenylypropanoidových jednotek (strukturní motivy kombinující C6-C3 (aromatický kruh + C3 lineární řetězec, viz Obr. 15)).

Jak již ale bylo předesláno, tento strukturní motiv s radostí dimerizuje/oligomerizuje/nebo polymerizuje. Vzniklé deriváty jsou pak strukturně, chemicky a i z pohledu biologických vlastností značně rozdílné a dají se tak rozdělit do čtyř základních skupin – na lignany, neolignany, oxyneolignany a trimery a vyšší analogy (Gordaliza, García, Miguel Del Corral, Castro & Gómez-Zurita, 2004). Z pohledu názvosloví je pak základní monomerní jednotka C6-C3 brána jako propylbenzen a její aromatický kruh je číslován číslicemi 1 až 6 a následná propylová jednotka pak 7 až 9, kdy číslem 7 je očíslován první uhlík propylové skupiny, který se nachází nejbližší benzenovému jádru.

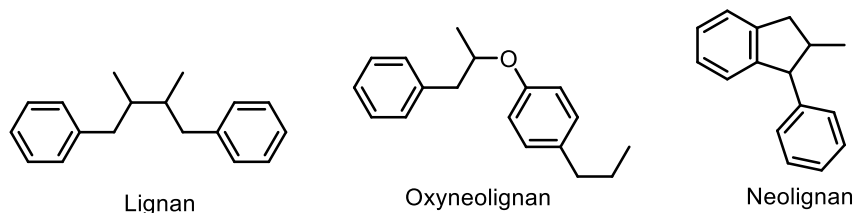


C6-C3 jednotka

Obr. 15: Ukázka číslování fenylypropanoidové jednotky - propylbenzenu.

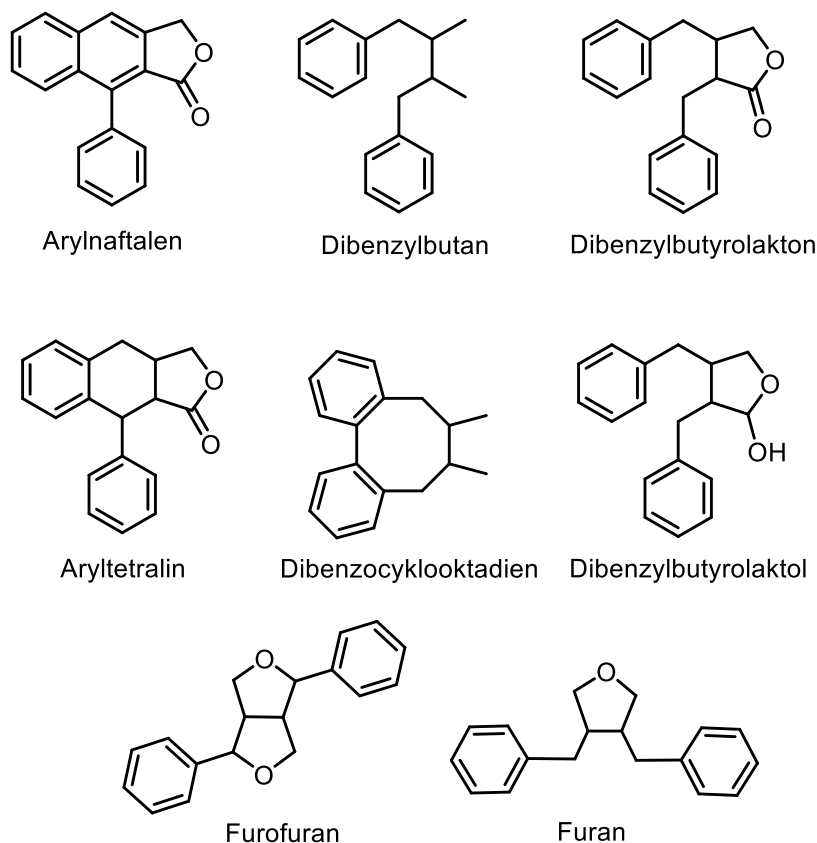
Lignany jsou pak nazývány dimerické sloučeniny spojující dvě fenylypropanové jednotky C6-C3 v pozicích 8 a 8' (kde C-8 a C-8' referují dvěma různým fenylypropanovým derivátům). Pakliže se tyto monomerní jednotky spojí přes pozice C-5 a C-8',

pak budeme tyto dimery nazývat neolignany (následná adice fenolu vede ke vzniku charakteristického benzofuranového kruhu (Teponno, Kusari & Spiteller, 2016)), a jestliže k dimerizaci dojde přes fenolický kyslíkový atom prvního fenylpropanoidu a uhlíkatý atom druhého fenylpropanoidu, pak se bude jednat o oxyneolignany (Barbara Raffaelli, 2012). Typické příklady pak můžete nalézt na Obr. 16.



Obr. 16: Ukázka tří skupin fenylpropanoidních dimerů – lignany, oxyneolignany a neolignany. Převzato a upraveno z (Moss, Mary & Road, 2000)

Jak je asi celkem zřejmé, každá z těchto jednotlivých skupin má několik podskupin. Nás samozřejmě nejvíce zajímají lignany, C-8/C-8' dimery. Tato skupina se dá dále na základě typických strukturních vzorců izolovaných produktů rozdělit do osmi podskupin (Obr. 17). Tyto podskupiny se pak nazývají: arylnaftaleny, aryltetraliny, dibenzocyklooktadieny, dibenzylbutany, dibenzylbutyrolaktoly, dibenzylbutyrolaktony, furany a furofurany (Satake, Ono & Murata, 2013).



Obr. 17: Hlavní podskupiny lignanů. Převzato a upraveno z (Moss et al., 2000).

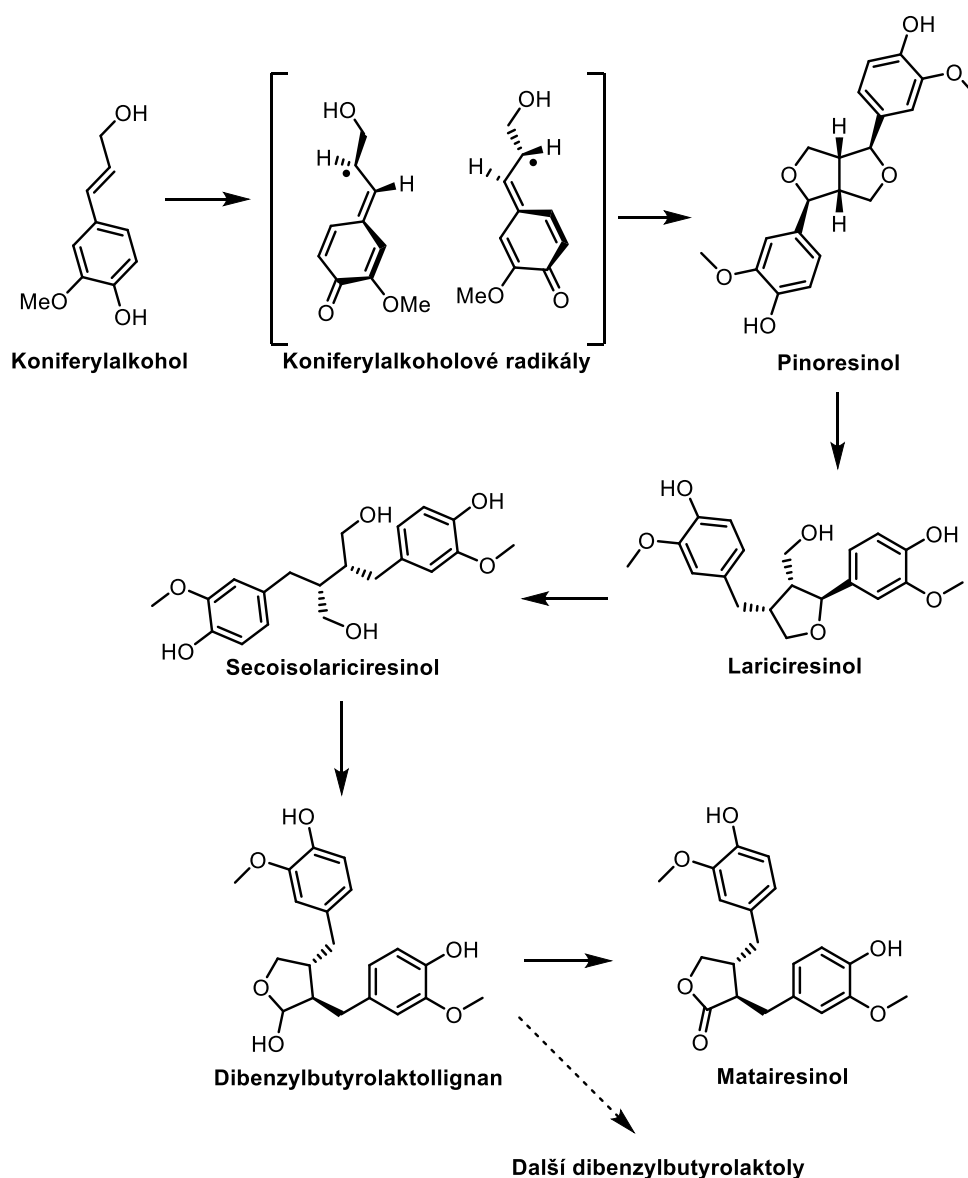
2.3.2 Biosyntéza lignanů

Biosyntéza lignanů probíhá jako radikálová oxidativní adice a vyžaduje přítomnost fenolické funkční skupiny na fenylypropanoidovém monomeru. Prvotní oxidativní dimerizace mediovaná pomocí oxidáz či lakáz je téměř vždy homodimerizací, kde následně dochází k postupné oxidaci respektive intramolekulárním cyklizacím na takto vzniklém dimeru. Reakce jako taková je pak samozřejmě nestereospecifická a pozorovaná stereospecifičnost (optická aktivita izolovaných lignanů) je způsobena přítomností tzv. řídicích proteinů. To je proteinů, které se podílí na post dimerizačních procesech a ovlivňují tak následné transformace dimerů (Ríos, Giner & Prieto, 2002).

2.4 Lignano-9,9'-laktony

Jako typický příklad takovéto biosyntézy lignanů může sloužit biosyntéza lignanů u rostlin z druhu *Forsythia*, kterou od roku 1990 studoval Lewis se svými spolupracovníky (Davin et al., 1997). Jejich studie umožnila objasnit tvorbu mnohých lignanů, především pak těch obsahujících dibenzylbutyrolaktonový motiv (lignano-9,9'-laktony), zejména pak matairesinolu (B Raffaelli, Hoikkala, Leppälä & Wähälä, 2002). Jejich práce ukázala, že nescifická oxidace výchozího monolignolu mediovaná oxidázami ve spojení s řídicím proteinem o hmotnosti 78 kDa umožňuje připravit tento typ laktonů stereospecificky ze dvou molekul koniferylalkoholu.

Obecně dibenzylbutyrolaktony představují velmi důležitou podskupinu rodiny lignanů. Hlavním rysem tohoto typu látek je jejich vysoká biologická aktivita, která zahrnuje například imunoregulaci, neuroprotektci či protinádorovou a anti-HIV aktivitu (Hajra, Mandal & Hazra, 2013). Některé látky patřící do této skupiny jako je například cubebin nebo hinokinin vykazují i trypanocidní aktivitu (Cunha et al., 2012). A tento typ derivátů nás zajímá v kontextu antileishmaniální aktivity. (Silva et al., 2010).

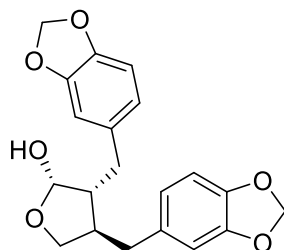


Obr. 18: Schéma biosyntézy matairesinolu. Převzato a upraveno z(Cunha et al., 2012; Godoy de Lima, Barros & da Silva Laurentiz, 2018).

2.4.1 Cubebin

Cubebin je lignan, jak již bylo zmíněno dříve, patří do skupiny dibenzylbutylolaktónů. Můžeme jej najít v celé řadě rostlinných čeledí například u podražcovitých, muškátovitých nebo pepřovníkovitých. Poměrně často jsou tyto typy lignanů, a zejména pak výše zmíněný Cubebin, izolovány z rostliny *Piper cubeba*. Cubebin pak konkrétně z jejích semen (Pereira et al., 2016). Překvapivě je cubebin znám již více než 100 let, ale pozornost na svoji biologickou aktivitu začal strhávat až v posledních desetiletích. Mohou za to zejména zajímavé biologické vlastnosti, které byly vždy připisovány extraktům z plodů *P. cubeba*. Bioaktivně řízená extrakce pak vedla k izolaci biologicky aktivních frakcí těchto rostlin, které právě obsahovali tuto látku. Bylo prokázáno,

že v plodech tohoto pepřovníku se ho nachází až 3 % (Godoy de Lima et al., 2018). Následné testování této látky prokázalo jeho protizánětlivé, analgetické a antimikrobiální účinky (Bastos et al., 2001) a později také antioxidační vlastnosti (Graidist, Martla & Sukpondma, 2015). Z našeho pohledu jsou zajímavé jeho účinky proti parazitu *Trypanosoma cruzi*. *T. cruzi* je totiž parazit zodpovědný za Chagasovu chorobu, známou též jako Americká trypanosomóza. Touto nemocí trpí v Latinské Americe okolo 10 milionů lidí (Godoy de Lima et al., 2018).



Obr. 19: Vzorec cubebinu.

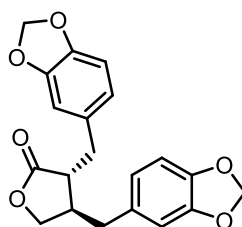
2.4.2 Hinokinin

Hinokinin (Obr. 20), obdobný lignano-9,9'-lakton, byl poprvé izolován japonskými vědci Yoshikim a Ishigurou v roce 1933 z etherového extraktu dřeva hinoki. Tato látka byla izolována jako bezbarvá krystalická sloučenina a její struktura byla později potvrzena Mamelim, Briggsem a Keimatsem pomocí její transformace na již známou látku cubebinolid (Marcotullio, Pelosi & Curini, 2014).

Hinokinin má také velice zajímavý profil, bereme-li v potaz veškeré biologické aktivity, které vykazuje. Mimo antiparazitární aktivitu, která by se dala ze strukturní podobnosti s cubebinem odhadovat, hinokinin je znám také pro svou protizánětlivou, cytotoxickou a protinádorovou aktivitu. V roce 2010 Silva se svými spolupracovníky vyhodnotil antimykobakteriální aktivitu na *Mycobacterium tuberculosis*. *M. tuberculosis* je bakterie zodpovědná za vznik závažného onemocnění tuberkulózy. Hinokinin prokázal mírnou aktivitu proti této bakterii s minimální inhibiční koncentrací 62,5 mg/ml. Takovýto výsledek, zejména z pohledu strukturní rozmanitosti (aktivita takového strukturní typu látek vůči tuberkulóze nebyla nikdy předtím pozorována), je velmi slibná a může v budoucnosti pomoci při hledání dalších biologicky aktivních přírodních látek nebo jejich derivátů vůči této zhoubné nemoci (Godoy de Lima et al., 2018). A samozřejmě že hinokinin, stejně tak jako cubebin, vykazuje velmi zajímavou antiparazitární aktivitu proti *T. cruzi*, která, jak již bylo zmíněno, způsobuje

Chagasovu chorobu. Narozdíl od cubebinu byla ale interakce hinokininu s *T. cruzi* studována detailněji. V roce 2005 de Souza a kolektiv testovali hinokinin *in vitro* proti volným amastigotovým formám *T. cruzi*. Vzhledem k jeho antitrypanosomální aktivitě byl hinokinin později vybrán pro testování jeho účinků proti epimastigotovým a intracelulárním amastigotovým formám *T. cruzi*, a to jak *in vitro*, tak i *in vivo*. Výsledky *in vivo* testů ukázaly, že aplikace hinokininu vedla k poklesu nakažení parazitem o 71 %.

Následně byli u hinokininu testovány také jeho antivirové vlastnosti. Konkrétně se jednalo o testování jeho účinků proti viru lidské hepatitidy B, HIV a proti viru SARS. Ve všech případech vykazoval hinokinin významnou antivirovou aktivitu (Marcotullio et al., 2014).



Obr. 20: Vzorec Hinokininu.

2.4.3 Cílový syntetický derivát – chiméra mezi podofylotoxinem a lignano-laktonem

Na základě předcházejících výsledků publikovaných v literatuře jsme se rozhodli připravit (a po následné syntéze také otestovat – není součástí této bakalářské práce) chimérní produkt **14**, který by kombinoval svoje vlastnosti lignano-laktonů s již ustanovenými léčivy na bázi podofylotoxinu. Tato látka by tak mohla skloubit očekávanou antiparazitickou funkci se zvýšenou cytotoxicitou. Navíc lze očekávat, že tento produkt bude následně možné selektivně modifikovat tak, abychom v budoucnosti mohli látku podobnou využít jako molekulární sondu pro studium *mode of action* této látky v organizmech infikovaných parazity.

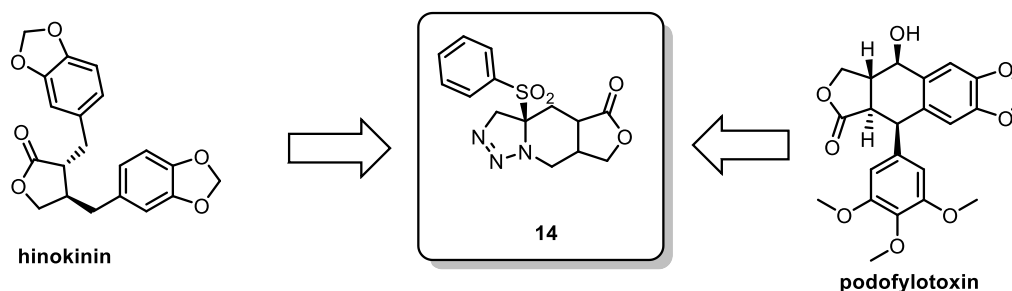
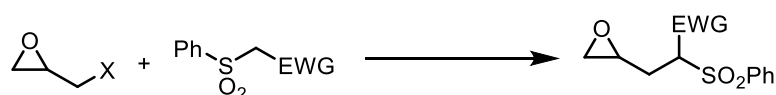


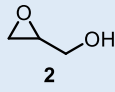
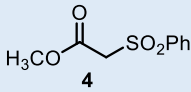
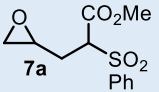
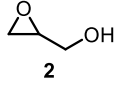
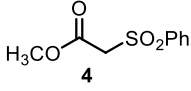
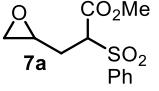
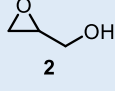
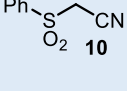
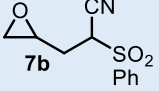
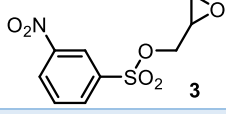
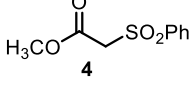
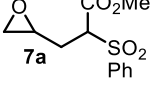
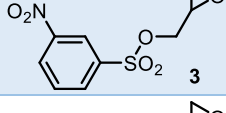
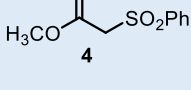
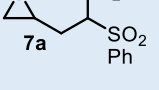
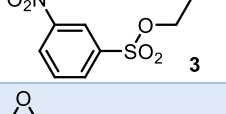
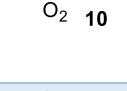
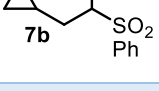
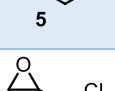
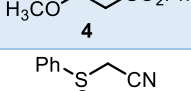
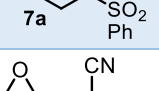
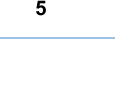

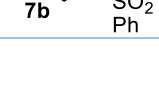
Schéma 1: Vývoj chiméry hinokininu a podofylotoxinu.

3 Výsledky

Cílová látka **14** byla připravena podle Schématu 2. Naše syntéza vycházela ze sulfinátové soli **8**, která byla reagována s bromacetonitrilem **9** v acetonitrilu a toluenu za 45% respektive 57% výtěžku (v případě toluenu jde o průměr z 6 reakcí). Výsledný produkt **10** byl pak reagován s glycidolem za Mitsunobu reakčních podmínek. V tomto případě bohužel výsledný produkt **7** nebyl pozorován. Obdobné reakce pak byly ještě testovány u dalších substrátů, ale výsledný produkt **7** nebyl nikdy izolován (Tab. 2). Z tohoto důvodu byl sulfonitril **10** ponechán reagovat s (+)-epichlorhydrinem **5**, dle protokolu vyvinutého ve skupině, za vzniku cyklizovaného produktu **6**. Syntéza látky **6** byla provedena na 0,1mmol, 1,0mmol a 10,0mmol měřítku a poskytla reprodukovatelně produkt **6** v 7% výtěžku (Schéma 2). Látka **6** byla izolována jako opticky čistá – při reakci nedocházelo k žádné epimerizaci.

Tabulka 2: Testované podmínky vedoucí ke vzniku epoxidu **7**.



Vstup	Epoxid	Sulfon	Podmínky	Produkt	Poznámka
1	 2	 4	DIAD (1,2 ekvív), PPh ₃ (1,2 ekvív), THF	 7a	Komplexní směs
2	 2	 4	DIAD (1,2 ekvív), PPh ₃ (1,2 ekvív), toluen	 7a	Komplexní směs
3	 2	 10	DIAD (1,2 ekvív), PPh ₃ (1,2 ekvív), toluen	 7b	Komplexní směs
4	 3	 4	NaH (1,2 ekvív), DMF	 7a	Komplexní směs
5	 3	 4	NaH (2,2 ekvív), DMF	 7a	Komplexní směs
6	 3	 10	NaH (1,2 ekvív), DMF	 7b	Komplexní směs
7	 5	 4	NaH (1,2 ekvív), DMF	 7a	Komplexní směs
8	 5	 10	NaH (1,2 ekvív), DMF	 7b	Komplexní směs

4 Diskuze

Syntéza nového lignanového laktonu vycházejícího z obecného vzorce se sestávala ze dvou kroků. Prvním krokem byla syntéza cyklopropyl fenylsulfonyl laktonu (**6**), konkrétně 1-(fenylsulfonyl)-3-oxabicyclo[3.1.0]hexan-2-on, který sloužil jako stavební kámen pro následující krok, kterým byla syntéza nového lignanového laktonu. Hlavní problémy jsem měla s prvním krokem, přípravou 1-(fenylsulfonyl)-3-oxabicyclo[3.1.0]hexan-2-onu **6**, zatímco druhý krok, propargylace následovaná termicky aktivovanou [3+2] 1,3-dipolární cykloadicí probíhala bez problémů a s vysokou stereoselektivitou. Nyní projdeme oba tyto kroky separátně.

4.1 Syntéza 1-(fenylsulfonyl)-3-oxabicyclo[3.1.0]hexan-2-onu **6**

Klíčový intermediát **6** měl být připraven pomocí intramolekulární cyklizace z epoxidu substituovaného pomocí dobře odstupující skupiny jako je derivatizovaný glycidol **3**, epichlorhydrin **5** anebo glycidol **2** (hydroxy skupina může být nahrazena pomocí Mitsunobu reakce). Jako C-nukleofil při této reakci jsme se pak rozhodli využít fenylsulfonyl ester **4** anebo odpovídající nitrilový ekvivalent **10** (Schéma 3).

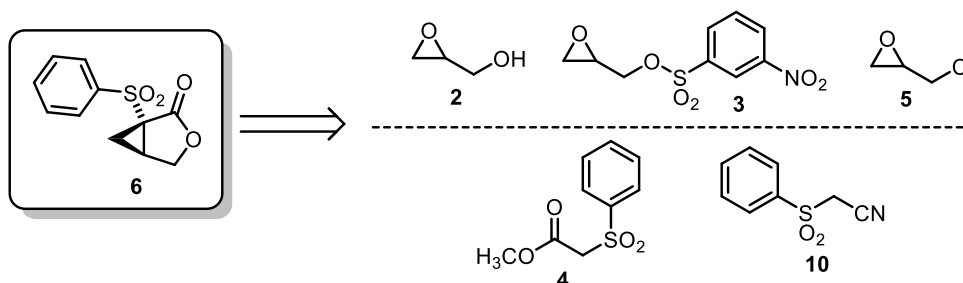


Schéma 3: Prvotní retrosyntéza cílového intermediátu **6**.

Předpokládali jsme, že reakce příprava látky **6** nebude příliš obtížná, protože syntéza tohoto typu intermediátu již byla v literatuře několikrát publikována (Benedetti, Berti & Risaliti, 1993; Gaoni, 1982; Hell, 1999; Kazuta, Matsuda & Shuto, 2002; Ok et al., 2007). Bohužel se ukázalo, že jejich reprodukovatelnost v našich rukou je více než diskutabilní. Nejprve jsme se zaměřili na přípravu aktivovaného glycidolu **3** (Klunder, Onami & Sharpless, 1989) (Schéma 3). Transformace glycidolu **2** na odpovídající sulfon **3** probíhala snadno a cílový produkt byl izolován ve 48% výtěžku. V dalším kroku jsme se pak pokoušeli transformovat glycidol **2**, epoxy sulfone **3** a epichlorhydrin **5** pomocí nukleofilní substituce nebo Mitsunobu reakce na epoxid **7a**

respektive **7b** (Tab. 2). Bohužel se nám však ani v jednom případě nepodařilo izolovat cílový produkt substituce. Všechny reakce skončily jako divoké směsi produktů. Pouze v případě reakce epichlorhydrinu **5** s nitril-sulfonem **10** se nám zdálo, že v reakční směsi nějaký produkt být může (zpětná analýza). V tomto okamžiku ale přišla Mgr. Konrádová s one-pot protokolem, který v jedné reakční nádobě nejenomže generoval produkt substituce, ale zároveň jej podrobil následné intramolekulární cyklizaci, která vedla ke tvorbě cyklopropanového kruhu. Následná kyselá hydrolyza reakční směsi pak umožnila uzavřít i laktonový kruh a generovala tak cílový intermediát **6** v one-pot protokolu. Tento protokol, i když v mých rukou dával cílovou látku pouze v 7% výtěžku, byl i nadále využíván při další syntéze. Hlavním pozitivním bodem této reakce bylo, že produkt si udržel svoji stereochemickou integritu a nedošlo při reakci k destrukci (epimeraci) chirálního centra.

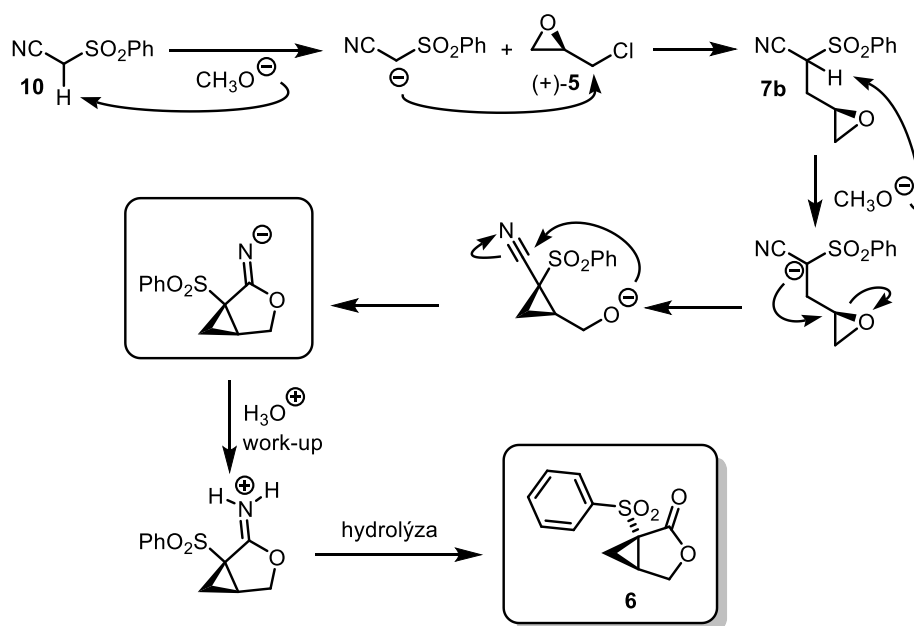


Schéma 4: Zjednodušený pohled na reakční mechanismus cyklizační reakce poskytující produkt **6**. Rovnovážné reakce jsou pro zjednodušení vynechány.

Výchozí látky, sulfony **4** a **10** byly připraveny pomocí substituční reakce methyl bromacetátu respektive bromoacetonitrilu s fenylsulfínovou solí v toluenu (Schéma 5).

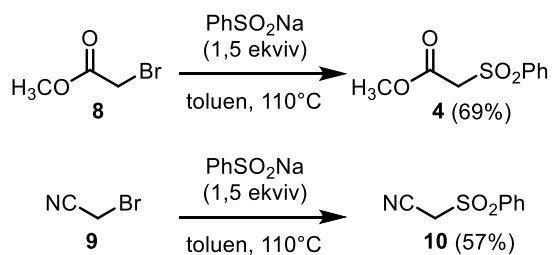
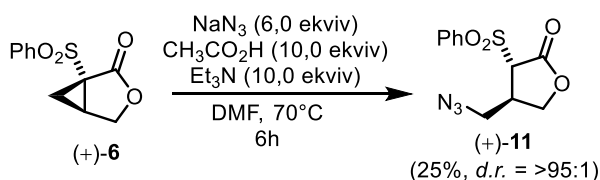


Schéma 5: Syntéza výchozích sulfonů.

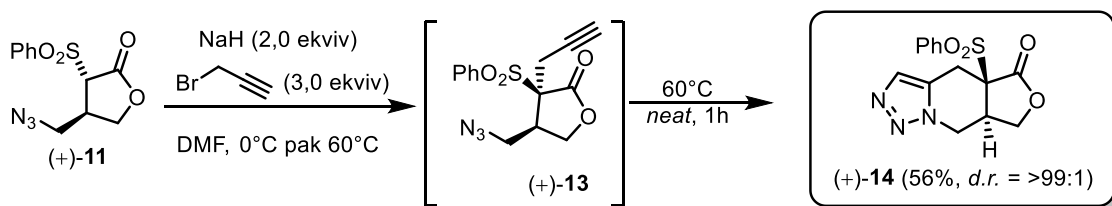
4.2 Syntéza nového lignanového laktonu

Výchozí látkou pro syntézu nového lignanového laktonu byl 1-(fenylsulfonyl)-3-oxabicyclo[3.1.0]hexan-2-on **6**, který byl připraven v dostatečném množství, pro účely jeho modifikace. Tato látka byla připravena pomocí nukleofilního otevření cyklopropanového kruhu bicyklu **6** dle protokolu vyvinutého Mgr. Konrádovou v 25% výtěžku (Obr. 21).



Obr. 21: Schéma otevření cyklopropylu základního skeletu jehož výsledným produktem byl 4-(azidomethyl)-3-(fenylsulfonyl)dihydrofuran-2(3H)-on **11**.

Následným krokem byla propargylace otevřeného bicyklu **11** pomocí propargyl bromidu **12** v bazickém prostředí (Obr. 22).



Obr. 22: Reakce laktonu (+)-**11** s propargyl bromidem a následná termická cykloadiční reakce poskytující tricyklus (+)-**14**.

Tato reakce byla značně náročná, neboť jsme chtěli, aby došlo k selektivní tvorbě kvarterního stereogenního centra na pozici C-2. Pakliže ale porovnáme oba možné přístupy nukleofilu (enolátu) k elektrofilu, vidíme, že pouze jeden z přístupů je kineticky preferovaný. Tento produkt, látka **13**, také při reakci vzniká jako hlavní produkt (založeno na určení relativní konfigurace u produktu cykloadice **14**).

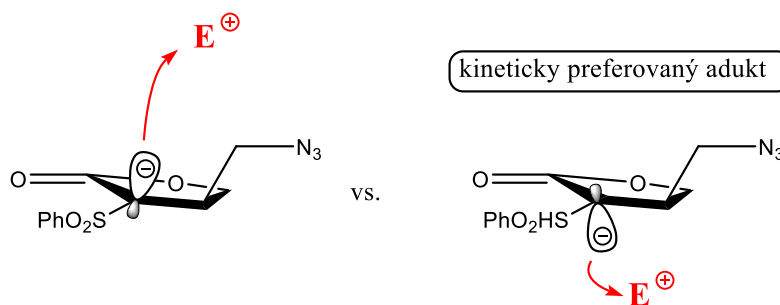


Schéma 6: Dva možné přístupy enolátu (nakreslen pro lepší znázornění v rezonanční struktuře s C-aniontem) k elektrofilu.

Po reakčním work-upu jsem pak nechala surový produkt odpařovat na rotační vakuové odparce při teplotě lázně 60 °C. Analýza surové reakční směsi ukázala, že se již ve stopách začíná tvořit produkt. Toto zjištění odpovídalo výsledkům a zjištění experimentů Mgr. Konrádové a Dr. Bona. Ti také zjistili, že prodloužené zahřívání čistého produktu propargylace má za vznik cílového cykloaduktu **14**. Proto jsme celou sekvenci zopakovali ještě jednou (alkylace a následně surový produkt umístěn v lázni vyhřáté na 60 °C) a získali cílový produkt (+)-**14** v 56% výtěžku přes dva kroky.

5 Experimentální část

5.1 Obecné informace k experimentální části

5.1.1 Chemikálie

V rámci experimentální části práce byly pro syntézy použity tyto chemikálie: sulfonyl chlorid, glycidol, triethyl amin (Et_3N), dichlormethan (DCM), epichlorhydrin, methanolát sodný (NaOMe), methanol (MeOH), benzensulfínát sodný (PhSO_2Na), bromoacetonitril, toluen, diisopropyl azodikarboxylát (DIAD), trifenylfosfin (PPh_3), azid sodný (NaN_3), 98% kyselina octová (CH_3COOH), hydrid sodný (NaH), propargyl bromid, síran sodný bezvodý (Na_2SO_4), silikagel, petrolether (PE), ethyl acetát (EtAc), hexan, *n*-heptan, diethylether. Všechny využívané látky byly použity v takové čistotě, v jaké byly dodány výrobcem. Výrobci těchto chemikálií jsou Sigma-Aldrich, Lachner, Merck, Alfa Aesar a Fluka.

Mezi látky, které byly připravovány patří: 5% vodný roztok H_2SO_4 , nasycený vodný roztok hydrogenuhličitanu sodného (NaHCO_3), nasycený vodný roztok NaCl (solanka) a předsušený *N,N*-dimethylformamid (DMF, komerčně dostupný DMF byl sušen po dobu 2 dní nad aktivovaným molekulovým sítem 4A). Tyto látky byly připraveny v Laboratoři Růstových regulátorů technickým personálem.

5.1.2 Metody a materiál

Pro kontrolu průběhu reakcí byla použita tenkovrstvá chromatografie (TLC) na hliníkových deskách pokrytých silikagelem 60 SIL-G/UV254 s fluorescentním indikátorem (Machery-Nagel). Jednotlivé sloučeniny přítomny v reakční směsi byly vizualizované pomocí zásaditého KMnO_4 . Finální produkty byly purifikovány pomocí kolonové chromatografie na silikagelu od firmy Sigma Aldrich (velikost částic 230-400 mesh; velikost pórů 60 Å). Eluované frakce byly jímány po 2-30 ml a jejich obsah byl monitorován pomocí TLC. Frakce mající stejný obsah byly spojeny, zahuštěny na RVO a následně analyzovány pomocí spektrálních metod. Analýza pomocí nukleární magnetické rezonance (NMR) byla provedena na spektrometru JEOL 500 JNM-ECA 500 MHz pracující při frekvenci 500 MHz (^1H) a 125 MHz (^{13}C). Měření probíhala za laboratorní teploty a pro měření byl použit deuterovaný chloroform (CDCl_3). Chemické posuny (δ , ppm) a štěpící konstanty (Hz) ^1H NMR spekter jsou uvedeny

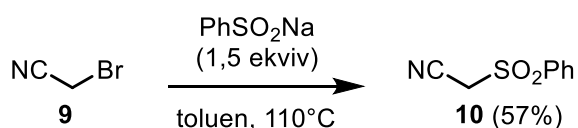
standardním způsobem vzhledem ke zbývajícimu CHCl_3 přítomnému v CDCl_3 ($\delta\text{H} = 7,27$ ppm). ^{13}C NMR chemické posuny (δ , ppm) jsou uváděny vzhledem k CDCl_3 ($\delta\text{C} = 77,23$ ppm, prostřední signál). Protonové interakce jsou reprezentovány jako singlet (s), dublet (d), dublet dubletu (dd), triplet (t), triplet tripletu (tt), pentet (p) a multiplot (m). Hodnoty HRMS byly získány za použití kvadrupolové /iontové pasti hmotnostního analyzátoru. Analýza a přiřazení byly provedeny porovnáním s literárními spektroskopickými daty nebo pomocí experimentů 2D-COSY, HSQC, HMBC, 2D-NOESY a 1D-NOEdiff. Čistota konečných sloučenin byla stanovena dle následujícího postupu: 1 mg sloučeniny byl rozpuštěn v 1 ml 1% methanolu a vstříknut (10 μl) na kolonu s reverzní fází (Symmetry C18, 5 μm , 150 mm x 2,1 mm; Milford, MA, USA), inkubováno při 25 °C. Rozpouštědlo (A) bylo tvořeno 15 mM mravenčanem amonným upraveným na pH 4,0. Rozpouštědlo (B) bylo tvořeno methanolem. Při průtoku 200 μl / min byl použit binární gradient: 0 min, 10% B; 0-24 min. lineární gradient na 90% B; 25-34 min. izokratické eluce 90% B; 35-45 min. lineární gradient na 10% B. Eluovaná fáze byla poté zavedena do PDA detektoru (rozsah snímání 210-700 nm s rozlišením 1,2 nm) a elektrosprejový zdroj (zdrojová teplota 120 °C, desolvační teplota 300 °C, kapilární napětí 3 kV, kuželové napětí 20 V). Dusík byl použit jako kuželový (50 l / h) i desolvační plyn (500 l / h). Sběr dat byl prováděn v režimu úplného skenování (50-1000 Da), doba skenování 0,5 s a srážkovou energií 6 V. Analýzy byly provedeny v pozitivním módu (ES^+) nebo v záporném módu (ES^-), a proto byly shromážděny jako kvazimolekulární ionty $[\text{M} + \text{H}]^+$ a $[\text{M} - \text{H}]^-$.

Teploty tání (b.t.) byly měřeny na přístroji B-540 Büchi® a nejsou korigovány. Látky byly navažovány na analytických vahách značky AS 220.R2. Veškeré reakce probíhaly za pomoci laboratorní magnetické míchačky s ohřevem Heidolph MR 3001 K (Heidolph, Německo). Látky byly odpařovány a zahušťovány za použití vakuové rotační odparky Interface I-300 (Büchi, Švýcarsko).

Vizualizačním roztokem pro detekci produktu na TLC byl zásaditý roztok KMnO_4 (9 g KMnO_4 , 20 g K_2CO_3 , 150 ml 10% NaOH), který byl následně zahříván na 250 °C.

5.2 Organická syntéza

5.2.1 Syntéza 2-(fenylsulfonyl)acetonitrilu

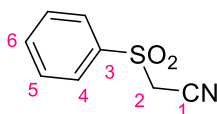


PhSO₂Na (3,0g, 1,5 ekviv) byl rozsuspendován v toluenu (26,4 ml, 0,2 M) a bromacetonitril (**9**) (0,9 ml, 1,0 ekviv) byl přidán. Reakční směs byla zahřívána na 110 °C po dobu 12 hodin za vzniku bílé sraženiny. H₂O (5 ml) byla přidána a výsledná směs byla extrahována pomocí EtOAc (3x20 ml). Výsledná organická fáze byla promyta solankou (10 ml) a poté byla sušena nad Na₂SO₄, zfiltrována a filtrát byl odpařen na RVO do sucha. Surový produkt byl čištěn pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu (P.E.:EtOAc = 10:1) za vzniku 1,24 g (57%) sulfonylu **10**.

MS (ESI⁺), *m/z* (%): 182 [M+H]⁺ (100)

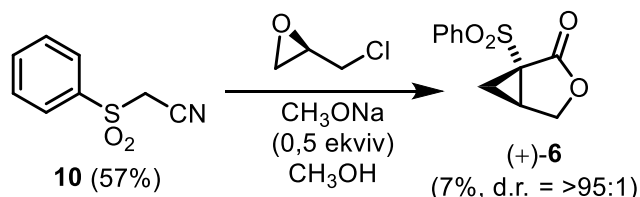
HRMS (ESI⁺) *calcd.* pro C₈H₈NO₂S [M+H]⁺: 182.0270, nalezeno 182.0270.

Tabulka 3: Přiřazení signálů ¹H-NMR a ¹³C-NMR spektra 2-(fenylsulfonyl)acetonitrilu **10**.



Atom	¹ H NMR (500 MHz, CDCl ₃) [ppm]	Intenzita	¹³ C NMR 125 MHz, CDCl ₃ [ppm]
1	-	-	C-1 110,5
2	H-2 4,06 (s)	2H	C-2 45,9
3	-	-	C-3 136,8
4	H-4 8,03 (dd, <i>J</i> = 8; 1,5 Hz)	2H	C-4 129,1
5	H-5 7,54-7,60 (m)	2H	C-5 130,0
6	H-6 7,79 (tt, <i>J</i> = 7,5; 1,5 Hz)	1H	C-6 135,6

5.2.2 Syntéza 1-(fenylsulfonyl)-3-oxabicyclo[3.1.0]hexan-2-onu z výchozí látky 2-(fenylsulfonyl)acetonitrilu



Sulfonitril (**10**) (2,7g, 1 ekviv) byl rozpuštěn v MeOH (64 ml) a NaOMe (20,25 g) byl přidán. Reakční směs se míchala 30 minut. Po 30 minutách byl přidán epichlorhydrin (1,3 ml, 1,1 ekviv). Reakční směs se poté míchala 12 hodin. Po 12 hodinách byla vzniklá oranžová kapalina odpařena na RVO. Ke zbytku byla přidána H₂O (25 ml) a pH výsledného roztoku bylo upraveno pomocí ledové kyseliny octové na pH 3. Následně byla reakční směs míchána další dva dny pod inertní atmosférou za RT. Po dvou dnech byla provedena extrakce pomocí DCM (3x50 ml). Spojené organické vrstvy byly promyty solankou (50 ml), sušeny nad Na₂SO₄ a odpařeny na RVO. Výsledný odparek byl čištěn na sloupcové chromatografii na silikagelu (P.E.:EtAc = 5:1 ->2:1 -> 0:100) a poskytl látku (+)-**6** v 7% výtěžku (0,249 g).

b.t. = 113-114 °C

$\alpha_D^{25} = -108$ (c 1.02, CHCl₃)

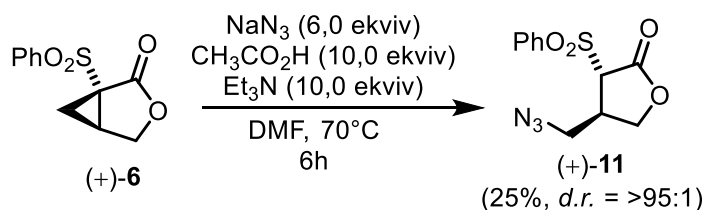
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 1.46 (1 H, dd, *J* = 5.4, 5.4 Hz), 2.19 (1 H, dd, *J* = 5.4, 8.7 Hz), 3.18 (1 H, ddd, *J* = 4.8, 5.4, 8.7 Hz), 4.19 (1 H, d, *J* = 9.7 Hz), 4.40 (1 H, dd, *J* = 4.8, 9.7 Hz), 7.60 (2 H, dd, *J* = 7.3, 7.8 Hz), 7.71 (1 H, dd, *J* = 7.8, 7.8 Hz), 8.07 (2 H, d, *J* = 7.3 Hz)

¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 19.32, 26.62, 45.93, 66.90, 128.84, 129.06, 134.27, 138.06, 167.65

MS (ESI⁺), *m/z* (%): 238 (M⁺)

HRMS (ESI⁺) *calcd.* pro C₁₁H₁₀O₄S 238.0300, nalezeno 238.0299

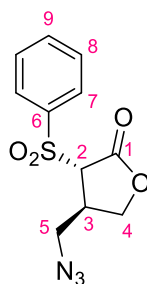
5.2.3 Otevření cyklopropanu: syntéza laktonu (+)-11



NaN_3 (0,732 g, 12,6 mmol, 6,0 ekvív), AcOH (1,2 ml, 19 mmol, 10,0 ekvív; 100% čistota) a Et_3N (2,7 ml, 21 mmol, 10 ekvív) byly postupně přidány do reakční směsi obsahující roztok (+)-6 (0,5 g, 2,1 mmol, 1,0 ekvív) v DMF (7,0 ml, 0,3M) za RT. Výsledná směs byla umístěna v přehřáté olejové lázni (70°C , vnější teplota) a výsledná směs byla zahřívána po dobu 6 h. Poté byla reakční směs ochlazena na l.t. a odpařena do sucha na RVO. Odparek byl čištěn pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu (PE:EtOAc = 2:1). Odpaření odpovídajících frakcí poskytlo (+)-11 (0,121 g, 25%; *d.r.* = >95:1 na základě ^1H NMR spektra surové reakční směsi) ve formě bílých krystalů.

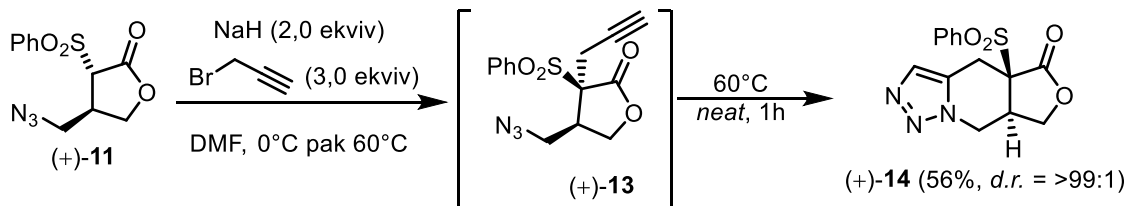
b.t. = 240°C (rozklad.); $\alpha_D^{25} = +254$ (c 1.08, CHCl_3); ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 3.49 (dddd, $J = 10.6, 8.0, 5.6, 5.0$ Hz, 1H), 3.66 (dd, $J = 12.5, 4.8$ Hz, 1H), 3.77 (dd, $J = 12.5, 5.7$ Hz, 1H), 4.00 (d, $J = 5.7$ Hz, 1H), 4.15 (dd, $J = 9.3, 5.1$ Hz, 1H), 4.55 (dd, $J = 9.3, 8.0$ Hz, 1H), 7.58 – 7.69 (m, 2H), 7.70 – 7.81 (m, 1H), 7.94 – 8.03 (m, 2H); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 36.8, 52.0, 65.9, 69.2, 129.6, 129.7, 135.2, 136.6, 167.3; MS (ESI⁺), *m/z* (%): 282 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (22), 299 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ (100); HRMS (ESI⁺) *calcd.* pro $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 282.0543, nalezeno 282.0544.

Tabulka 4: Přiřazení charakteristických signálů $^1\text{H-NMR}$ a $^{13}\text{C-NMR}$ 4-(azidomethyl)-3-(fenylsulfonyl)dihydrofuran-2(3H)-onu (+)-11.



Atom	^1H NMR	(500 MHz, CDCl_3) [ppm]	Intenzita	^{13}C NMR	125 MHz, CDCl_3 [ppm]
1	-	-	-	1-C	167,3
2	H-2	3,99 (d, $J = 5,5$)	1H	2-C	65,8
3	H-3	3,45-3,52 (m)	1H	3-C	36,75
4	H-4a	4,14 (dd, $J = 9,5; 5,5$ Hz)	1H	4-C	69,1
	H-4b	4,53 (dd, $J = 9,5; 8$ Hz)	1H		
5	H-5a	3,65 (dd, $J = 12,5; 5$ Hz)	1H	5-C	51,9
	H-5b	3,76 (dd, $J = 12,5; 6$ Hz)	1H		
6	-	-	-	6-C	136,5
7	H-7	7,95-8,00 (m)	2H	7-C	129,5
8	H-8	7,62 (tt, $J = 8,5; 1,5$ Hz)	1H	8-C	129,7
9	H-9	7,75 (tt, $J = 7; 1,5$ Hz)	1H	9-C	135,2

5.2.4 Syntéza (3a*R*)-3a-(fenylsulfonyl)-3,3a,4,4a,7a,8-hexahydro-5H,7H-furo[3,4-*d*][1,2,3]triazolo[1,5-*a*]pyridin-5-onu (+)-14

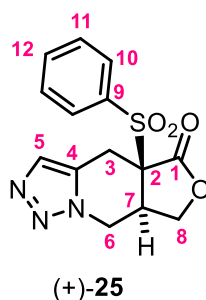


Látka (**11**) (29 mg, 1 ekviv) byla smíchána se suchým DMF (2 ml). Roztok byl po 2 minutách míchání ochlazen na 0 °C. Do směsi se po 5 minutách míchání od ochlazení na 0 °C přidal NaH 60% (5,018 mg, 1,22 ekviv), který byl nejprve rozpuštěn v suchém DMF. Po 20 minutách míchání se přidal do reakční směsi propargylbromid a reakční směs byla míchána 3 dny. Reakce byla zpracována přidáním 7,5 µl kyseliny octové a 1,5 ml H₂O. Následně došlo k vytřepání reakční směsi v dělicí nálevce v 50 ml diethyletheru. Dále byl do směsi přidán nasycený roztok NaHCO₃, solanka a nakonec byla reakční směs sušena pomocí Mg₂SO₄. Po přefiltrování byl filtrát odpařen na RVO. Surová látka byla umístěna v olejové lázni předehřáté na 60 °C po dobu 1 h. Po této době byla reakční směs ochlazená a produkt čištěn pomocí preparativní chromatografie, kde mobilní fází byl PE:EtOAc v poměru 4:1. Získali jsme 18 mg (57%) ve formě bezbarvého viskózního oleje.

d.r. = >95:1 založeno na ¹H NMR spektrech surového produktu

$\alpha_D^{26} = +44.8$ (*c* 1.04, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 3.32 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H), 3.37 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H), 3.73 (dd, *J* = 9.5, 5.5 Hz, 1H), 4.12 – 4.22 (m, 1H), 4.49 (dd, *J* = 14.1, 4.7 Hz, 1H), 4.65 (dd, *J* = 9.4, 9.4 Hz, 1H), 4.78 (dd, *J* = 14.2, 2.2 Hz, 1H), 7.52 (s, 1H), 7.67 (t, *J* = 7.8 Hz, 3H), 7.82 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.97 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H); ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 25.0, 37.4, 46.8, 69.0, 70.3, 128.9, 129.5, 131.3, 131.7, 133.1, 135.9, 170.2; MS (ESI⁺), *m/z* (%): 320 [M+H]⁺ (100); HRMS (ESI⁺) *calcd.* for C₁₄H₁₄N₃O₄S [M+H]⁺: 320.0670, found 320.0699.

Tabulka 5: Přiřazení signálů ^1H a ^{13}C u látky (+)-14.

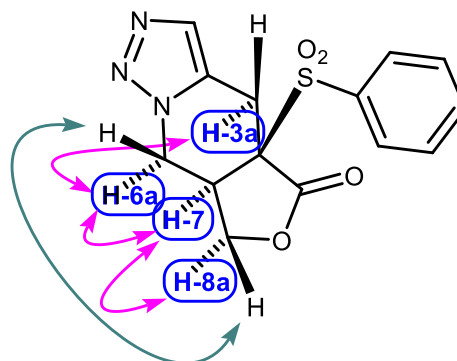


Atom	^1H NMR	Intenzita	(400 MHz, CDCl_3) [ppm]	^{13}C NMR	APT experiment ^[1]	(101 MHz, CDCl_3) [ppm]
1	-	-	-	C-1	X	170.2
2	-	-	-	C-2	X	70.3
3	H-3a	1H	3.32 (d, $J = 15.5$ Hz)	C-3	**	25.0
	H-3b	1H	3.37 (d, $J = 15.5$ Hz)			
4	-	-	-	C-4	X	128.9
5	H-5	1H	7.52 (s)	C-5	*	135.9
6	H-6a	1H	3.73 (dd, $J = 9.5, 5.5$ Hz)	C-6	**	46.8
	H-6b	1H	4.65 (dd, $J = 9.4, 9.4$ Hz)			
7	H-7	1H	4.12 – 4.22 (m)	C-7	*	37.4
8	H-8a	1H	4.49 (dd, $J = 14.1, 4.7$ Hz)	C-8	**	69.0
	H-8b	1H	4.78 (dd, $J = 14.2, 2.2$ Hz)			
9	-	-	-	C-9	X	133.1
10	H-10	2H	7.97 (d, $J = 7.5$ Hz)	C-10	*	131.3
11	H-11	2H	7.67 (t, $J = 7.8$ Hz)	C-11	*	129.5
12	H-12	1H	7.82 (t, $J = 7.5$ Hz)	C-12	*	131.7

^[1] X = uhlík nemající žádný vodíkový atom; * = uhlík s jedním vodíkovým atomem (CH); ** = CH_2 ; *** = CH_3

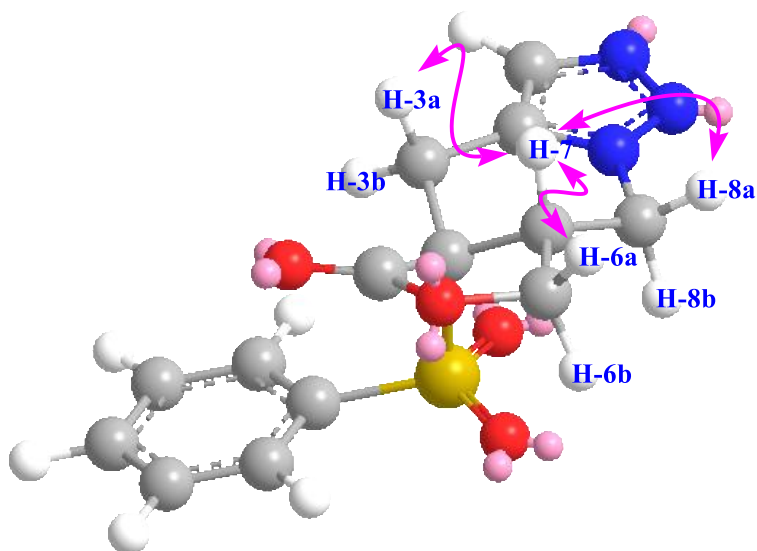
Pozorované n.O.e. interakce

1D n.O.e.: silná →
slabá - - →
klíčová interakce - - →



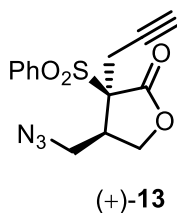
Pozorované klíčové nOe interakce látky (+)-14

n.O.e. interaction



Obr. 23: Určení relativní konfigurace látky (+)-14.

5.2.5 Charakteristické signály látky (+)-13.



$$\alpha_D^{26} = +22.2 \text{ (c 1.53, CHCl}_3\text{)}$$

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 2.18 (t, $J = 2.7$ Hz, 1H), 2.75 (dd, $J = 16.7, 2.6$ Hz, 1H), 3.01 (dd, $J = 16.7, 2.7$ Hz, 1H), 3.49 – 3.63 (m, 1H), 4.10 (dd, $J = 12.6, 9.7$ Hz, 1H), 4.29 (dd, $J = 12.6, 5.8$ Hz, 1H), 4.57 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H), 4.59 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H), 7.57 – 7.67 (m, 2H), 7.71 – 7.81 (m, 1H), 7.78 – 7.87 (m, 2H)

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 23.2, 42.9, 51.7, 70.5, 71.3, 74.6, 75.9, 129.3, 131.0, 135.7, 139.5, 169.9

MS (ESI⁺), m/z (%): 320 [M+H]⁺ (24), 342 [M+Na]⁺ (100)

HRMS (ESI⁺) *calcd.* for C₁₄H₁₃N₃O₄SNa [M+Na]⁺: 342.0519, found 342.0520.

6 Závěr

Ve své práci jsem se zabývala syntézou chimérní molekuly, jež by v sobě zahrnovala strukturní rysy jak lignano-laktonů tak podofylotoxinu. Tato látka se mi povedla připravit v pěti krocích, ale neakceptovatelně nízkém výtěžku. Ale i tak je látky dost, abychom mohli učinit první ohodnocení této látky v rámci biologických testů.

V teoretické části této práce jsem se zaměřila na pokrytí literatury, jež se zabývá lignano-9,9'-laktony jakožto sekundárními rostlinnými metabolity se zajímavými biologickými účinky. Hlavně jsem se zaměřila na jejich aktivitu vůči parazitům.

Dále byly v rámci práce připraveny a charakterizovány veškeré vytyčené intermediáty a finální produkty. Bohužel mnohdy v tristních výtěžcích. I tak si ale myslím, že tato práce je dobrým podkladem pro další výzkum v této oblasti.

7 Seznam použité literatury

- Bastos, J. K., Albuquerque, S., & Silva, M. L. A. (1999). Evaluation of the trypanocidal activity of lignans isolated from the leaves of *Zanthoxylum naranjillo*. *Planta Medica*, 65(6), 541–544. <https://doi.org/10.1055/s-1999-14012>
- Bastos, J. K., Carvalho, J. C. T., De Souza, G. H. B., Pedrazzi, A. H. P., & Sarti, S. J. (2001). Anti-inflammatory activity of cubebin, a lignan from the leaves of *Zanthoxylum naranjillo* Griseb. *Journal of Ethnopharmacology*, 75(2–3), 279–282. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(01\)00171-4](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00171-4)
- Benedetti, F., Berti, F., & Risaliti, A. (1993). Cyclization of γ,δ -epoxy- α -cyanosulphones. A simple, diastereoselective route to cyclopropane carboxylic acids. *Tetrahedron Letters*, 34(40), 6443–6446. [https://doi.org/10.1016/0040-4039\(93\)85066-6](https://doi.org/10.1016/0040-4039(93)85066-6)
- Bohnert, H. J. (2007). *Abiotic Stress*. *Encyclopedia of Life Sciences*. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0020087>
- Buchanan, B.B., Gruissem, W. & Jones, R. L. (2015). *Biochemistry & Molecular biology of Plants*. *Biochemistry & Molecular biology of Plants*. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Chopra, B., Dhingra, A. K., Kapoor, R. P., & Prasad, D. N. (2017). Piperine and Its Various Physicochemical and Biological Aspects: A Review. *Open Chemistry Journal*, 3(1), 75–96. <https://doi.org/10.2174/1874842201603010075>
- Cunha, W. R., Luis, M., Sola, R. C., Ambrósio, S. R., Bastos, J. K., Franca, D., & Paulo, D. S. (2012). Lignans: Chemical and Biological Properties. *Phytochemicals - A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health*, (1978), 213–234. <https://doi.org/10.5772/1387>
- Daniel, M. (2011). Secondary Metabolites. *Medicinal Plants*, 5–8. <https://doi.org/10.1201/b11003-3>
- Davey, M. (2017). Secondary Metabolism in Plant Cell Cultures. In *Encyclopedia of Applied Plant Sciences* (pp. 462–467). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394807-6.00146-5>
- Davin, L. B., Wang, H. B., Crowell, A. L., Bedgar, D. L., Martin, D. M., Sarkanen, S., & Lewis, N. G. (1997). Stereoselective bimolecular phenoxy radical coupling by an auxiliary (dirigent) protein without an active center. *Science (New York, N.Y.)*, 275(5298), 362–366. <https://doi.org/10.1126/science.275.5298.362>
- Dewick, P. M. (1994). The biosynthesis of shikimate metabolites. *Natural Product Reports*, 11(1), 173. <https://doi.org/10.1039/np9941100173>
- Díaz-Quiroz, D. C., Cardona-Félix, C. S., Viveros-Ceballos, J. L., Reyes-González, M. A., Bolívar, F., Ordoñez, M., & Escalante, A. (2018). Synthesis, biological activity and molecular modelling studies of shikimic acid derivatives as inhibitors of the shikimate dehydrogenase enzyme of *Escherichia coli*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 33(1), 397–404. <https://doi.org/10.1080/14756366.2017.1422125>
- Dr Caryn Bern. (2010). The control of leishmaniasis. *Bulletin of the World Health Organization*, 58(6), 807–818. Retrieved from https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44412/WHO_TRS_949_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Gaoni, Y. (1982). Preparation of ring-substituted (arylsulfonyl)cyclopropanes and (arylsulfonyl)bicyclobutanes from γ,δ -epoxy sulfones. *The Journal of Organic Chemistry*, 47(13), 2564–2571. <https://doi.org/10.1021/jo00134a012>
- Godoy de Lima, R., Barros, M. T., & da Silva Laurentiz, R. (2018). Medicinal Attributes of Lignans Extracted from Piper Cubeba : Current Developments. *ChemistryOpen*, 7(2), 180–191. <https://doi.org/10.1002/open.201700182>

- Gordaliza, M., García, P. A., Miguel Del Corral, J. M., Castro, M. A., & Gómez-Zurita, M. A. (2004). Podophyllotoxin: Distribution, sources, applications and new cytotoxic derivatives. *Toxicon*, *44*(4), 441–459. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.05.008>
- Graidist, P., Martla, M., & Sukpondma, Y. (2015). Cytotoxic Activity of Piper cubeba Extract in Breast Cancer Cell Lines. *Nutrients*, *7*(4), 2707–2718. <https://doi.org/10.3390/nu7042707>
- Hajra, S., Mandal, A., & Hazra, S. (2013). Asymmetric aldol approach to dibenzylbutyrolactone lignans: Synthesis of (-)-(7'S)-hydroxymatairesinol and (-)-(7'S)-hydroxyarctigenin. *Tetrahedron Letters*, *54*(17), 2171–2173. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2013.02.044>
- Harmatha, J. (2005). Structural abundance and biological significance of lignans and related plant phenylpropanoids. *Chemicke Listy*, *99*(9).
- Hell, Z. (1999). Diastereoselectivity in the formation of bicyclic cyclopropane carboxylic acid lactones. *Tetrahedron*, *55*(5), 1367–1376. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(98\)01109-0](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(98)01109-0)
- Herbert, R. B. (2003). The biosynthesis of plant alkaloids and nitrogenous microbial metabolites. *Natural Product Reports*, *20*(5), 494–508. <https://doi.org/10.1039/b006522f>
- Herrmann, K. M. (1995). The Shikimate Pathway as an Entry to Aromatic Secondary Metabolism. *Plant Physiology*, *107*(1), 7–12. <https://doi.org/10.1104/pp.107.1.7>
- Ibrahim, R., & Barron, D. (1989). *Phenylpropanoids* (Vol. 1). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-461011-8.50009-3>
- Jensen, R. A. (1986). The shikimate/arogenate pathway: Link between carbohydrate metabolism and secondary metabolism. *Physiologia Plantarum*, *66*(1), 164–168. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1986.tb01251.x>
- Kazuta, Y., Matsuda, A., & Shuto, S. (2002). Development of Versatile cis - and trans -Dicarbon-Substituted Chiral Cyclopropane Units: Synthesis of (1 S ,2 R)- and (1 R ,2 R)-2-Aminomethyl-1-(1 H -imidazol-4-yl)cyclopropanes and Their Enantiomers as Conformationally Restricted Analogues of Histami. *The Journal of Organic Chemistry*, *67*(5), 1669–1677. <https://doi.org/10.1021/jo010852x>
- Keller, B., Keller, E., Salcher, O., & Lingens, F. (1982). Arogenate (Pretyrosine) Pathway of Tyrosine and Phenylalanine Biosynthesis in *Pseudomonas aureofaciens* ATCC 15926. *Microbiology*, *128*(6), 1199–1202. <https://doi.org/10.1099/00221287-128-6-1199>
- Kim, J. I., Dolan, W. L., Anderson, N. A., & Chapple, C. (2015). Indole Glucosinolate Biosynthesis Limits Phenylpropanoid Accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, *27*(5), 1529–1546. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00127>
- Klunder, J. M., Onami, T., & Sharpless, K. B. (1989). Arenesulfonate Derivatives of Homochiral Glycidol: Versatile Chiral Building Blocks for Organic Synthesis. *Journal of Organic Chemistry*, *54*(6), 1295–1304. <https://doi.org/10.1021/jo00267a014>
- Knaggs, A. R. (2003). The biosynthesis of shikimate metabolites. *Natural Product Reports*, *20*(1), 119–136. <https://doi.org/10.1039/b100399m>
- Koshiba, T. (1979). Partial purification and some properties of shikimate dehydrogenase from *Phaseolus mungo* seedlings. *Plant and Cell Physiology*.
- Landry, L. G., Chapple, C., & Last, R. L. (1995). Arabidopsis Mutants Lacking Phenolic Sunscreens Exhibit Enhanced Ultraviolet-B Injury and Oxidative Damage. *Plant Physiology*, *109*(4), 1159–1166. <https://doi.org/10.1104/pp.109.4.1159>
- Lenka Jašková. (2015). *Characterisation of Populus × canadensis (cv. Robusta) in vitro culture*.
- Maeda, H., & Dudareva, N. (2012). The Shikimate Pathway and Aromatic Amino Acid Biosynthesis in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, *63*(1), 73–105. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105439>
- Marcotullio, M. C., Pelosi, A., & Curini, M. (2014). Hinokinin, an emerging bioactive lignan. *Molecules*, *19*(9), 14862–14878. <https://doi.org/10.3390/molecules190914862>
- McMurry, J. (2012). *Organic Chemistry, 8th Edition. Reactions of Alkyl Halides: Nucleophilic Substitutions and Eliminations*.

- Mir, R., Jallu, S., & Singh, T. P. (2015). The shikimate pathway: Review of amino acid sequence, function and three-dimensional structures of the enzymes. *Critical Reviews in Microbiology*, 41(2), 172–189. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2013.813901>
- Moss, G. P., Mary, Q., & Road, M. E. (2000). JOINT COMMISSION ON BIOCHEMICAL NOMENCLATURE * NOMENCLATURE OF LIGNANS AND NEOLIGNANS Nomenclature of lignans and neolignans. *Pure and Applied Chemistry*, 72(8), 1493–1523.
- Ok, T., Jeon, A., Lee, J., Lim, J. H., Hong, C. S., & Lee, H.-S. (2007). Enantiomerically Pure Synthesis of β -Substituted γ -Butyrolactones: A Key Intermediate to Concise Synthesis of Pregabalin. *The Journal of Organic Chemistry*, 72(19), 7390–7393. [https://doi.org/10.1016/0040-4039\(93\)85066-6Get](https://doi.org/10.1016/0040-4039(93)85066-6Get)
- Pereira, C. C. S. S., Perazzo, F. F., Souza, G. H. B., Fonseca, F. L. A., & Rosa, P. C. P. (2016). Cubebin and semisynthetic dibenzyl butyrolactone derivatives: Biological activities. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 10(25), 526–532. <https://doi.org/10.5897/AJPP2015.4490>
- Raffaelli, B. (2012). *Synthesis of lignano-9,9'-lactones and rearrangement studies*. University of Helsinki.
- Raffaelli, B., Hoikkala, A., Leppälä, E., & Wähälä, K. (2002). Enterolignans. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 777(1–2), 29–43. [https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(02\)00092-2](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(02)00092-2)
- Rehman, F., Khan, F. A., & Badruddin, S. M. A. (2012). Role of Phenolics in Plant Defense Against Insect Herbivory. In *Chemistry of Phytopotentials: Health, Energy and Environmental Perspectives* (Vol. 32, pp. 309–313). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-23394-4_65
- Ríos, J. L., Giner, R. M., & Prieto, J. M. (2002). New findings on the bioactivity of lignans. *Studies in Natural Products Chemistry*, 26(PART G), 183–292. [https://doi.org/10.1016/S1572-5995\(02\)80008-4](https://doi.org/10.1016/S1572-5995(02)80008-4)
- Saleem, M., Kim, H. J., Ali, M. S., & Lee, Y. S. (2006). An Update on Bioactive Plant Lignans. *ChemInform*, 37(14), 696. <https://doi.org/10.1002/chin.200614258>
- Satake, H., Ono, E., & Murata, J. (2013). Recent advances in the metabolic engineering of lignan biosynthesis pathways for the production of transgenic plant-based foods and supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(48), 11721–11729. <https://doi.org/10.1021/jf4007104>
- Sato, F. (2002). Inaugural Article: Metabolic engineering of plant alkaloid biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(1), 367–372. <https://doi.org/10.1073/pnas.011526398>
- Silva Carrara, V. da, Cunha-Júnior, E. F., Torres-Santos, E. C., Corrêa, A. G., Monteiro, J. L., Demarchi, I. G., ... Garcia Cortez, D. A. (2013). Antileishmanial activity of amides from Piper amalago and synthetic analogs. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 23(3), 447–454. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2013005000022>
- Silva, M. L. A., Martins, C. H. G., Lucarini, R., Sato, D. N., Pavan, F. R., Freitas, N. H. A., ... Filho, A. A. d. S. (2010). Antimycobacterial activity of natural and semi-synthetic Lignans. *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, 64(11–12), 779–784.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2010). *Plant Physiology*, Fifth Edition. Taiz, L., & Zeiger, E. (2010). *Plant Physiology*, Fifth Edition. Cell, 1, 782. Retrieved from <http://www.amazon.com/dp/0878938567Cell, 1, 782>. Retrieved from <http://www.amazon.com/dp/0878938567>
- Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I. M., & Murphy, A. (2018). *Plant Physiology and Development international 6th edition*.
- Teponno, R. B., Kusari, S., & Spiteller, M. (2016). Recent advances in research on lignans and neolignans. *Natural Product Reports* (Vol. 33). <https://doi.org/10.1039/c6np00021e>

- Verpoorte, R. (2000). Secondary Metabolism. In *Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolism* (pp. 1–29). Dordrecht: Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-015-9423-3_1
- Vogt, T. (2010). Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular Plant*, 3(1), 2–20. <https://doi.org/10.1093/mp/ssp106>
- Zamir, L. O., Fiske, M., Tiberio, R., Berry, A., & Jensen, R. A. (1985). Enzymatic and Nonenzymatic Dehydration Reactions of L-Aroenate. *Biochemistry*, 24(7), 1607–1612. <https://doi.org/10.1021/bi00328a006>
- Zhang, J., Chen, J., Liang, Z., & Zhao, C. (2014). New lignans and their biological activities. *Chemistry and Biodiversity*, 11(1), 1–54. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201100433>

Internetové zdroje:

- Web 1: *Western Oregon University* [online]. (26. 4. 2019)
Dostupné z: <http://www.wou.edu/chemistry/courses/online-chemistry-textbooks/ch105-consumer-chemistry/ch105-chapter-6-hydrocarbons/>
- Web 2: AUTOR NEUVEDEN. <https://lenoiracroix.ca> [online]. (Staženo 2.4.2019)
Dostupné z: <https://lenoiracroix.ca/wp-content/uploads/2016/11/fruits.jpg>

Příloha

NMR spektra 1-(fenylsulfonyl)-3-oxabicyclo[3.1.0]hexan-2-onu (+)-6

BND_02_043_02(2)
single_pulse

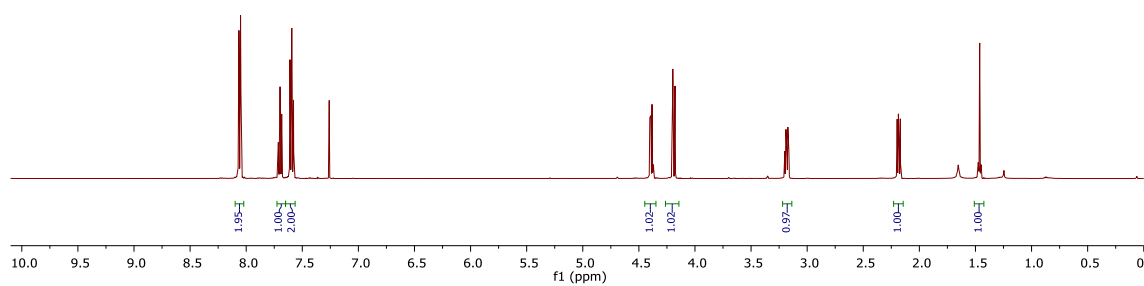
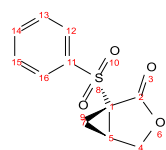
8.07
8.06
8.05
7.71
7.70
7.69
7.68
7.61
7.59
7.26

4.40
4.39
4.38
4.37
4.19
4.17

3.19
3.18
3.18
3.17
3.17
3.16

2.19
2.18
2.17
2.16

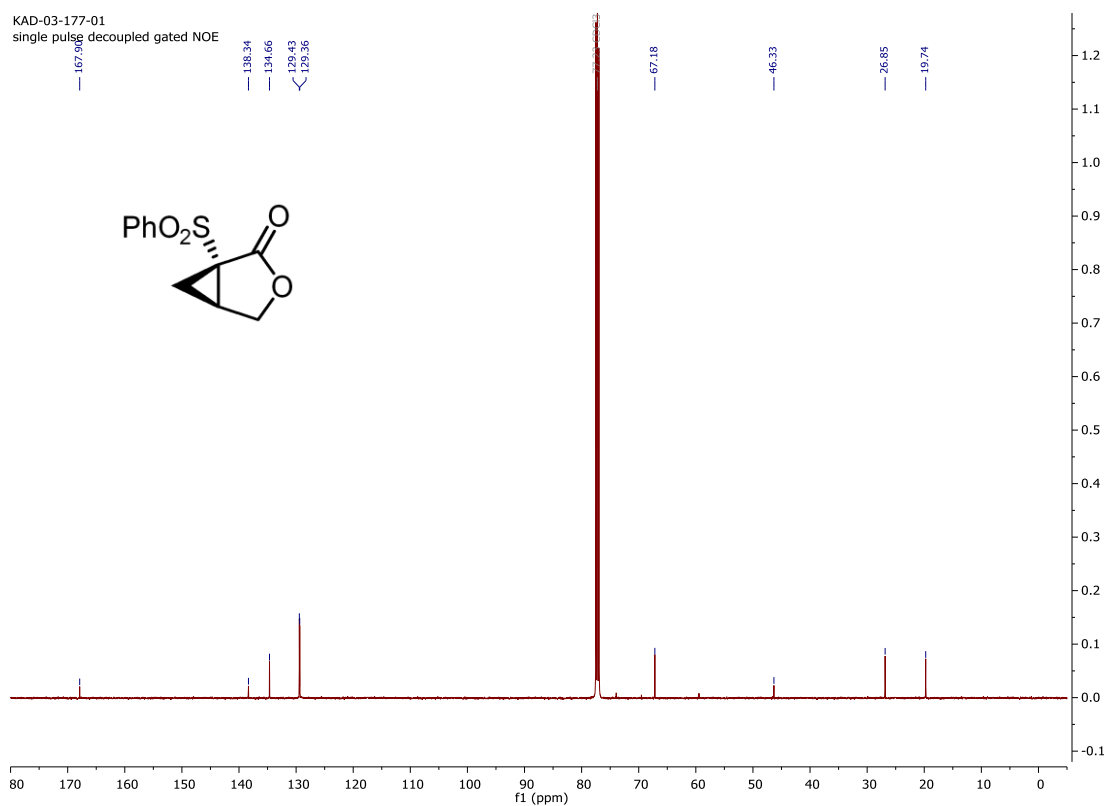
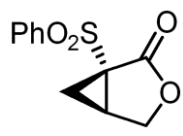
1.47
1.46
1.45



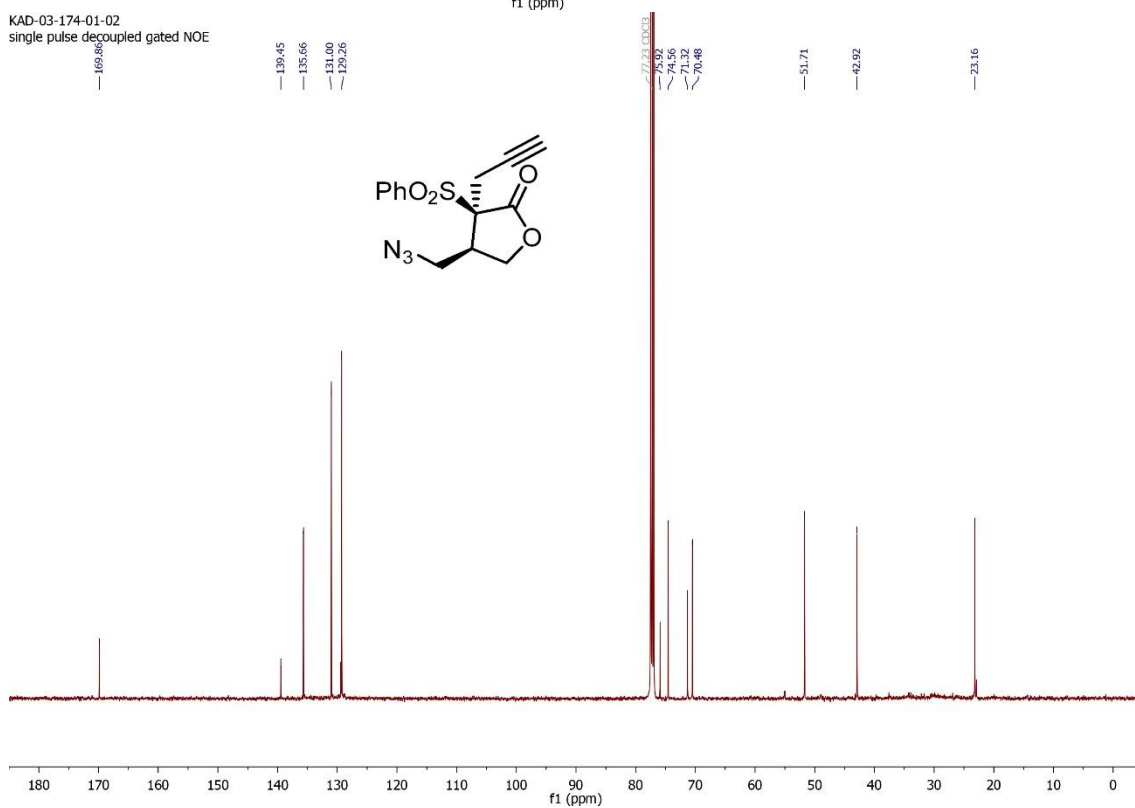
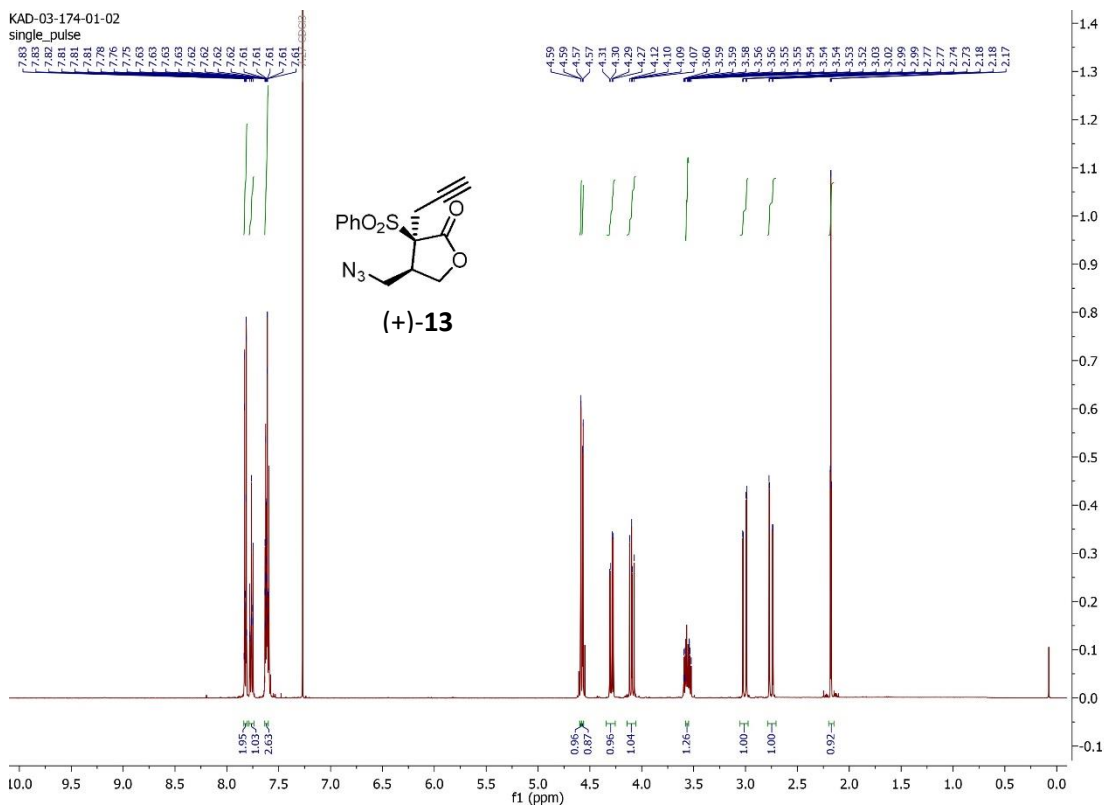
KAD-03-177-01

single_pulse decoupled gated NOE

167.56
138.34
134.66
129.43
129.36

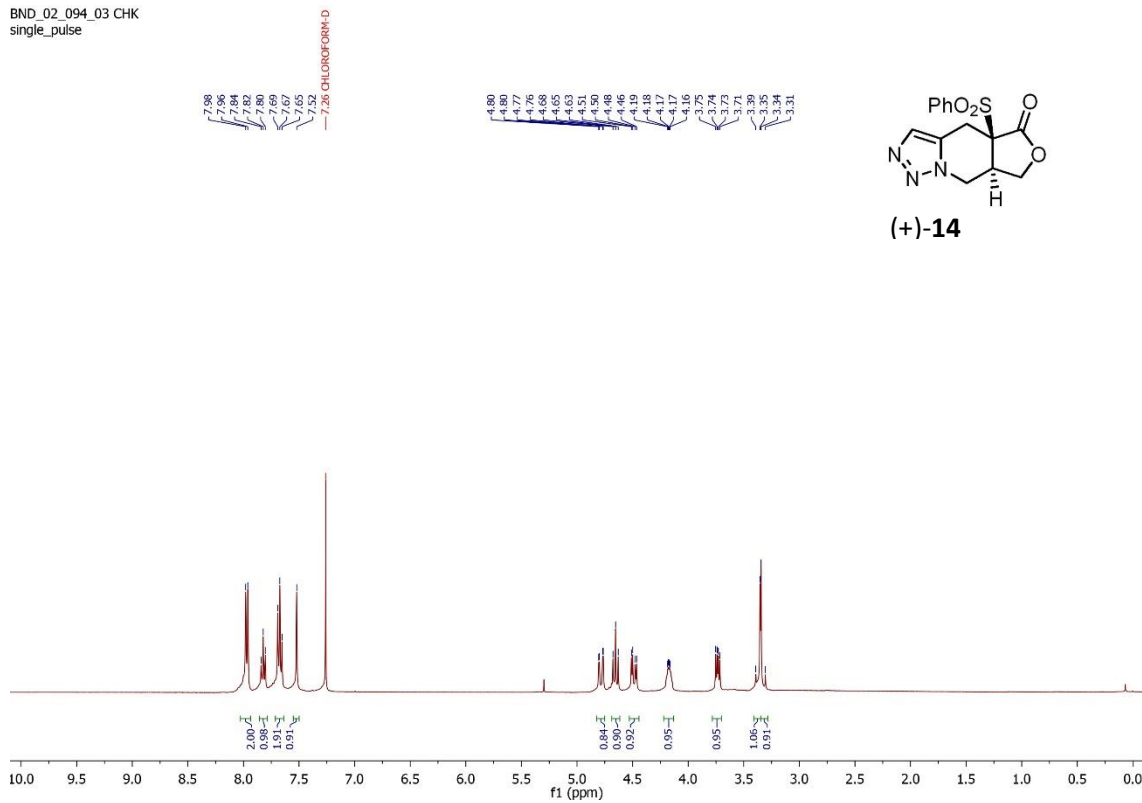


NMR spektra (+)-(3R,4R)-4-(azidomethyl)-3-(fenylsulfonyl)-3-(prop-2-yn-1-yl)dihydrofuran-2(3H)-onu (+)-13



NMR spektra (+)-(4aR,7aR)-4a-(fenylsulfonyl)-4,4a,7a,8-tetrahydro-5H,7H-furo[3,4-d][1,2,3]triazolo[1,5-a]pyridin-5-onu (+)-14

BND_02_094_03 CHK
single_pulse



BND_02_094_03 CHK
single_pulse decoupled gated NOE

