

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra organické chemie



Syntetické studie vedoucí k totální syntéze pimeforazinu A a B

Bakalářská práce

Autor:	Štěpán Janoušek
Studijní program:	Chemie
Studijní obor:	Chemie pro vzdělávání a Biologie a environmentální výchova pro vzdělávání
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Jiří Pospíšil, Ph.D.

Olomouc 2024

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení autora:	Štěpán Janoušek
Název práce:	Studie vedoucí k syntéze pimeforazinu 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:	Důležitou součástí dnešní organické chemie je mimo jiné i vývoj léčiv a jiných biologicky aktivních látek. V mé bakalářské práci se zaměřuji právě na přípravu dvou potenciálně biologicky aktivních látek, které by mohly vykazovat neuroprotektivní vlastnosti. V rámci této práce tak budou představeny syntetické studie zaměřené na přípravu pimeforazinu A a B. V teoretické části pak diskutuji původ a výskyt sekundárních metabolitů zejména s ohledem na jejich 3D strukturu.
Klíčová slova:	fenoxazinový skelet; sekundární metabolity; organická syntéza; chiralita; fotochemie
Počet stran:	39
Počet stran příloh:	3
Počet příloh:	6
Jazyk:	Čeština

Bibliographical identification

Author's first name and surname:	Štěpán Janoušek
Title:	Synthetic studies towards pimeforazine A and B synthesis
Type of thesis:	Bachelor
Department:	Department of Organic chemistry, Faculty of Science, Palacký Univerzity
Advisor:	doc. RNDr. Jiří Pospíšil, Ph.D.
The year of presentation:	2024
Abstract:	An important part of today's organic chemistry is also the development of drugs and other biologically active substances. In my bachelor thesis, I focus on the preparation of two potentially biologically active compounds that could exhibit neuroprotective properties. Thus, synthetic studies aimed at the preparation of pimephorazine A and B will be presented in this thesis. The theoretical part will then discuss the origin and occurrence of the secondary metabolites with particular reference to their 3D structure.
Key words:	Phenoxazine skeleton; secondary metabolites; organic synthesis; chirality; photochemistry
Number of pages:	39
Number of appendix pages:	3
Number of appendices:	6
Language:	Czech

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně a že jsem uvedl všechny literární prameny a další zdroje informací, které jsem při jejím psaní použil. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Olomouci dne

.....

Podpis

Poděkování:

Rád bych poděkoval především a nejvíce vedoucímu mé bakalářské práce doc. RNDr. Jiřímu Pospíšilovi, který si na mne vždy našel čas, aby mi pomohl s daným problémem. Chtěl bych mu poděkovat hlavně za jeho pracovitost a trpělivost. Dále mé díky patří také panu Mgr. Jozefu Kristkovi, který mi pomáhal v laboratoři se všemi nejasnostmi a vždy byl ochoten obětovat svůj vlastní čas pro ten můj. Také mu chci poděkovat za to, že mi vysvětlil, jak fungují NMR spektra a všechny ostatní analytické metody. Dále bych chtěl také poděkovat svým kolegům v laboratoři, kteří byli vždy ochotni odpovídat na mé dotazy.

Chtěl bych také poděkovat Interní Grantové Agentuře Univerzity Palackého (IGA_PrF_2024_028) za pomoc při financování výzkumu spojeného s touto závěrečnou prací.

Obsah

Seznam zkratk	8
1 Úvod	9
1.1 Cíle	10
2 Teoretická část	11
2.1 Sekundární metabolity	11
2.1.1 Terpeny a steroidy	12
2.1.2 Neribosomální peptidy	13
2.1.3 Mastné kyseliny a polypeptidy	13
2.1.4 Alkaloidy	14
2.2 Pimeforazin A a B (1 a 2)	15
2.3 Biosyntéza fenazinového skeletu	16
2.4 Biomimetický přístup k syntéze fenazinu a fenoxazinonu	18
2.5 Pimeforazin A a B (látky 1 a 2) – náš cíl	18
2.6 Chiralita	19
3 Výsledky a diskuse	21
3.1 Retrosyntéza	21
3.2 Příprava 3-hydroxy-4-nitro-fenylctové kyseliny 29	22
3.3 Příprava 3-amino-4-hydroxyfenethyl alkoholu 26	24
3.3.1 Příprava Iodosobenzenu 34	24
3.3.2 Nitrace 4-hydroxyfenethyl alkoholu 33	25
3.3.3 Redukce 3-nitro-4-hydroxyfenethyl alkoholu 35	26
3.4 Příprava 3,4-dihydroxyfenethyl alkoholu 27	27
3.5 Esterifikace připravených alkoholů 26, 27	28
4 Závěr	30
5 Experimentální část	31
5.1 Obecné informace	31
5.1.1 Vizualizační roztoky pro TLC	32
5.2 Syntéza 3,4-dihydroxyfenethyl alkoholu 27	32
5.3 Syntéza 3-nitro-4-hydroxyfenethyl alkoholu 35	33
5.4 Syntéza 3-amino-4-hydroxyfenethyl alkoholu 26	33
6 Seznam literatury	35
7 Přílohy	37
7.1 Kopie ¹ H a ¹³ C NMR spekter látky 27	37

7.2 Kopie ^1H a ^{13}C NMR spekter látky 35	38
7.3 Kopie ^1H a ^{13}C NMR spekter látky 26	39

Seznam zkratek

Coa – koenzym A

DCC – *N,N'* – Dicyklohexylkarbodiimid

DCM – dichlormethan

DMAP – 4 - (*N,N*-dimetylamino)pyridin

DMSO – dimethylsulfoxid

Ekviv. – ekvivalent

HRMS – vysoko účinná hmotností spektrometrie

LiAlH₄ – tetrahydridohlinitanu lithný

MeOH – methanol

NMR – nukleární magnetická resonance

PhIO – iodosobenzen

PhZ – phenazine biosynthetic

PM – primární metabolity

RNA – ribonukleová kyselina

RVO – rotační vakuová odparka

SM – sekundární metabolity

THF – tetrahydrofuran

TLC – chromatografie na tenké vrstvě

VL – výchozí látka

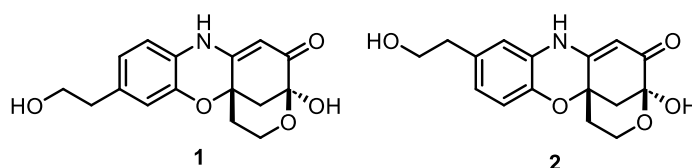
1 Úvod

Honba za poznáním provází lidstvo už od jejího počátku. Ale jednou z hlavních předností dnešní doby je přes všechny její neduhy možnost navázat na výzkum někoho jiného. Této výhody můžeme lehce využít i v oblasti výzkumu nových, biologicky aktivních látek. Tedy látek, jež interagují s živými organismy, nebo s živou tkání.

Představme si situaci, kdy specializovaný biolog na druhé straně světa objeví a popíše nový živý organismus. Tento organismus může vykazovat dosud neznámé a doposud nepozorovatelné vlastnosti. Jednou z těchto vlastností může být biosyntéza doposud neznámé látky. Tato látka pak může být biologem izolována ve velmi malém množství a poskytnuta k další analýze specializovaným chemikům, kteří mohou být tisíce kilometrů vzdáleni. Pro biologa, který organismus objevil, bude možná tato látka nepodstatná, ale pro jiné odvětví vědy, se však informace získané z této látky mohou ukázat jako naprosto klíčové.

Takto produkované látky, které některé organismy vylučují se nazývají sekundární metabolity (SM). Sekundární metabolity (SM) jsou tedy bioaktivní látky, které daný organismus nepotřebuje pro bezprostřední přežití, ale zlepšují jejich životní úroveň.¹

Téma mé bakalářské práce je zaměřené na sekundární metabolity produkované nosatcem olivovým (*Pimelocerus perforatus*), který parazituje v Japonsku na olivovnících evropských (*Olea europaea*).²



Obrázek 1: (+/-)-Pimeforazin A (1) a (+/-)-Pimeforazin B (2).

1.1 Cíle

Cílem mé bakalářské práce je připravit, a tím i potvrdit navrženou strukturu látky 1 a 2 z nosatce olivového (*Pimelocerus perforatus*), která podle předběžných výsledků vykazuje zajímavou neuroprotektivní aktivitu. V bodech tedy moje cíle jsou:

1. Literární rešerše na téma: fenoxazinony – (bio)syntéza a biologická aktivita.
2. Vývoj syntetických metod umožňujících přípravu přírodních látek s fenoxazinovým skeletem.
3. Charakterizace připravených látek pomocí dostupných fyzikálně-chemických metod.

2 Teoretická část

2.1 Sekundární metabolity

Metabolismus můžeme definovat jako všechny biochemické reakce, které se dějí v organismu.³ Tyto biochemické reakce zajišťují základní životní funkce všech organismů. Probíhají neustále a během nich jsou látky přeměňovány na jiné za spotřebování energie. Tyto přeměny, které by u samotných volných látek mohly probíhat desítky až stovky let, jsou často v živých organismech urychlovány pomocí biokatalyzátorů a enzymů. Díky nim mohou reakce probíhat i v rádech setin vteřin. Látky, které vznikají při těchto přeměnách i finální produkty se poté nazývají metabolity.³

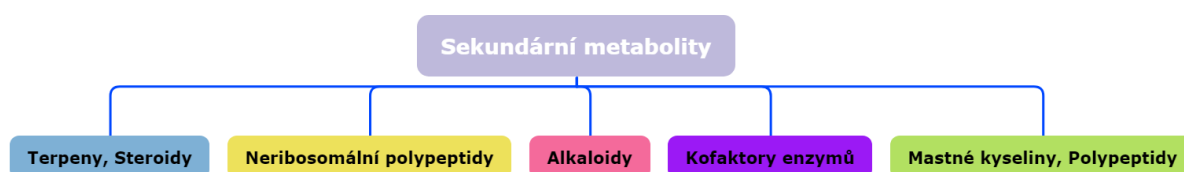
Metabolické děje, které v organismech probíhají dále dělíme na primární a sekundární. Primární metabolické děje jsou takové děje, při nichž vznikají primární metabolity (PM). Tyto produkty primárního metabolismu často úzce souvisí s růstem a vývojem a jsou pro organismus klíčová. Bez nich by život, jak jej známe nebyl možný.³

Naopak sekundární metabolity jsou produkty tzv. sekundárních metabolických dějů. Tyto metabolity pak slouží organismům, co je produkují např. k interakcím s ostatními organismy přispívají k interakcím mezi ostatními organismy.⁴ Ačkoliv se může zdát, že tedy rozdíl mezi primárními a sekundárními metabolity jsou jednoznačné, tak se ukazuje, že v mnohých případech jsou účinky PM a SM velmi provázané. Velmi dobře je to vidět například u biosyntézy, kdy z mnoha meziproductů primárních metabolitů vznikají sekundární metabolity.³

Funkce sekundárních metabolitů jsou, jak zmíněno výše, velmi různorodé. Mohou sloužit jako obranné či útočné prostředky proti ostatním organismům. Mají funkci jako transportéry kovů a hrají nezanedbatelnou roli při rozmnožování, či výběru partnerů. U mnoha z nich se ale stále ještě neví, co a proč dělají. Z pohledu biologické aktivity, pak tyto látky vykazují v závislosti na struktuře biochemického původu antimikrobiální, antivirové, protinádorové, farmakologické a jiné aktivity.⁵

V přírodě se sekundární metabolity, vyskytují zejména v rostlinné říši. Až 80 % všech sekundárních metabolitů pochází právě z rostlin.³ Mimo rostliny se pak sekundární metabolity vyskytují také v sinicích, houbách, korálech, pláštěncích a dalších přisedlých organismech.

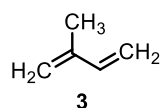
Co se týče dělení SM, tak není tak jednoznačné, jak se zdá, jelikož škála struktur SM se v poslední době rozšiřuje a pokud se tedy bavíme o sekundární metabolitech obecně, tak se dělí na 5 podskupin, jak je uvedeno v knize *Organic chemistry with Biological Applications*.⁶ (**Obr. 2**) Toto dělení je obecnějšího rázu a lépe popisuje dnešní realitu. V další části se tak budu podrobněji věnovat těmto jednotlivým podtřídám.



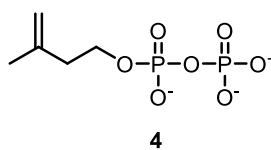
Obrázek 2: Dělení sekundárních metabolitů podle Johna McMurry v knize *Organic chemistry with Biological Applications*.⁶

2.1.1 Terpeny a steroidy

První velkou skupinou jsou terpeny a steroidy. Spolu tvoří jednu z největších skupin SM.⁷ Mají společnou vlastnost tvorby skeletu z izoprenových jednotek. (**Obr. 3**) Ty vznikají z isopentenyl difosfátu⁷ (**Obr. 4**). Skupina terpenů a steroidů obsahuje mnoho biologicky aktivních látek, vyskytujících se jak v říši rostlin, tak i u savců, jako hormony, antibiotika, látky s protinádorovými vlastnostmi a další.⁷ V přírodě pak známe několik podtříd Terpenů, jež se liší počtem isoprenodiních jednotek. Monoterpeny, které se skládají ze dvou molekul izoprenu, seskviterpeny, které tvoří 3 molekuly izoprenu, diterpeny obsahují 4 molekuly izoprenu, triterpeny, které v sobě mají 6 molekul izoprenu, tetraterpeny, které mají 8 molekul izoprenu. V přírodě se také vyskytují polyterpeny, které mohou obsahovat 1000–5000 jednotek izoprenu.⁸



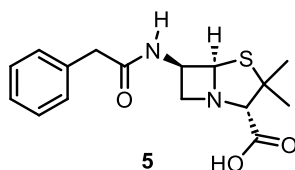
Obrázek 3: Struktura izoprenu, základní jednotky terpenů.



Obrázek 4: Struktura isopentenyl difosfátu.

2.1.2 Neribosomální peptidy

Neribosomální peptidy mají strukturu podobnou peptidům ribosomálním a jsou syntetizovány bez přímé RNA transkripce z aminokyselin.⁶ Neribosomální peptidy tvoří více jak 20 prodáváných léků. Jsou to například antibakteriální penicilin (**Obr. 5**), protinádorový bleomycin, nebo třeba cyklosporin.⁹ Peptidy jsou aminokyseliny, které jsou spojeny peptidickou vazbou, tedy vazbou charakteristickou pro skupinu peptidů polypeptidů a proteinů. Aminokyseliny spolu reagují za vzniku peptidické vazby tak, že vždy α -aminokyselina reaguje s karboxylovou skupinou druhé molekuly pomocí adičně-eliminacího mechanismu. Takto se vytvoří molekula vody a dvě aminokyseliny se spojí za vzniku peptidické vazby.¹⁰

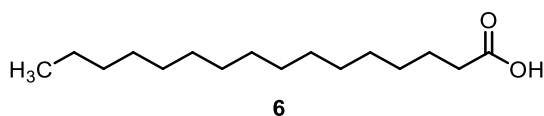


Obrázek 5: Penicilin G (5).

2.1.3 Mastné kyseliny a polypeptidy

Mastné kyseliny a polypeptidy jsou biosyntetizovány, de novo z acetyl CoA, propionyl CoA anebo methylmalonyl CoA.⁶ Mastné kyseliny jsou karboxylové kyseliny, které se vyskytují ve všech tucích. Ve volné přírodě se většinou nevyskytují jako jednotlivé kyseliny, ale v uskupení s glycerolem. Mastných kyselin je mnoho, ale nejčastěji se vyskytujícími jsou kyselina palmitová, která má 16 atomů uhlíku a kyselina stearová, která má 18 atomů uhlíku.¹¹ (**Obr. 6**)

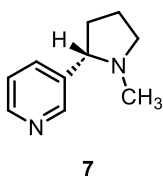
Polypeptidy jsou polymery, u kterých je základní jednotka peptid. Vznikají kondenzací 10-100 aminokyselin a mohou mít významné biologické vlastnosti a jsou snadno stravitelné.¹²



Obrázek 6: Kyselina palmitová (6).

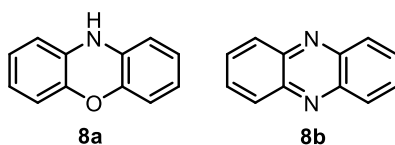
2.1.4 Alkaloidy

Alkaloidy jsou skupinou, které bych se chtěl věnovat nejvíce, jelikož mezi alkaloidy patří i výše zmíněné fenoxaziny, kterým se budu více věnovat později. Alkaloidů je známo přes 12 000. Jejich základní skelet obsahuje heterocyklické jádro a nejméně jeden atom dusíku.⁶ Alkaloidy jsou lidmi i zvířaty využívány po tisíciletí pro jejich pozitivní i negativní účinky. Mnohé z nich mají významné vlastnosti využitelné v oblasti lékařství. Morfin například pomáhá od bolesti a je tak používán jako velmi silné narkotikum. Jeho negativní stránkou je však jeho adiktivita. Mnoho jiných alkaloidů má také vlastnosti, které různým způsobem ovlivňují tělo, a proto jsou alkaloidy často využívány jako drogy. Například kokain, který pochází z rostliny *Erythroxylum coca*. Existují ale i alkaloidy, které mají významné protinádorové vlastnosti a jsou tak využívány v chemoterapeutických léčbách.¹³ Příkladem dalšího významného alkaloidu je nikotin, vyskytující se v tabáku (*Nicotiana spp.*)¹⁴ (**Obr. 7**)



Obrázek 7: L-nikotin (7).

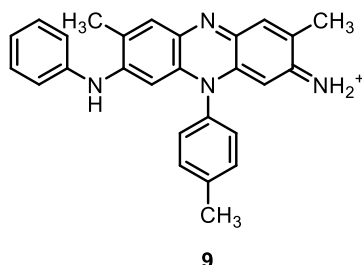
Alkaloidy je ovšem označení pro neskutečně velké množství látek, mezi něž patří i fenaziny a fenoxazinony (**Obr. 8**), jelikož splňují kritéria heterocyklického kruhu a alespoň jednoho atomu dusíku v něm.



Obrázek 8: Strukturální vzorec základního skeletu fenoxazinonů (8a) a fenazinů (8b).

Fenaziny **8b**, se nejčastěji vyskytují v houbách *Pseudomonas*, *Streptomyces* a dále pak i v dalších organismech žijících jak v moři, tak v půdě.¹⁵ Tyto látky, jak již bylo dříve zmíněno mají významné biologické vlastnosti, mezi něž patří i antibiotická, protinádorová, antimalarická

a antiparazitická aktivita.¹⁵ Fenaziny **8b** mají své využití i v oblasti barviv. Jejich barviva jsou využívána pro barvení textilních vláken. První synteticky vytvořené barvivo obsahující strukturu fenazinu bylo barvivo mauve **9** (**Obr. 9**) s barvou světle fialovou neboli slézovou.¹⁶ Struktura fenazinu (**Obr. 8**) se skládá ze tří aromatických konjugovaných kruhů typických pro antracen. V pozicích 9 a 10 však fenaziny obsahují atomy dusíku.



Obrázek 9: Barvivo mauve (9).

Fenoxazinony **8a** se strukturou i vlastnostmi velmi podobají fenazinonu. Jsou to také alkaloidy, s významnými biologickými vlastnostmi. Ze strukturního pohledu si ale můžeme všimnout, že původní antracen je nyní přerušen dvěma heteroatomy. Atomem dusíku (pozice 9) v sp^3 hybridizaci a atomem kyslíku (pozice 10). Prostřední kruh pak není aromatický. Předmětem mé praktické části bakalářské práce je právě syntéza fenoxazinonu pimeforazinu **1,2**. Deriváty fenoxazinonu **8a** obecně vykazují protinádorové vlastnosti a jsou také přítomny v mnoha barvivech.¹⁷

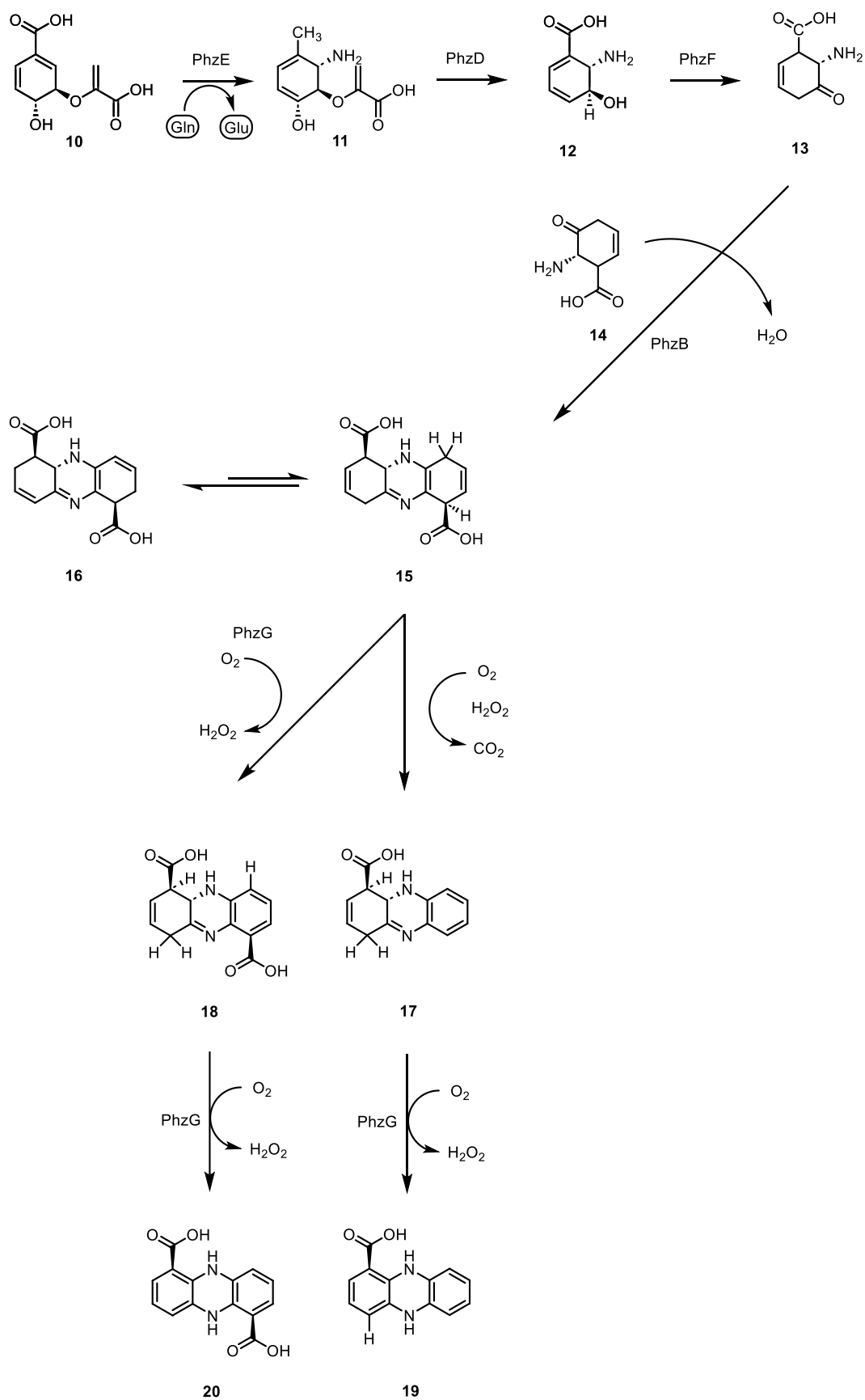
2.2 Pimeforazin A a B (1 a 2)

Pimeforaziny A a B (**1** a **2**) patří do skupiny látek s fenoxazinovým skeletem. Tato chemická látka je v přírodě syntetizována nosatcem olivovým (*Pimelocerus perforatus*), který patří do skupiny brouků (*Coleoptera*).² Nosatec olivový (*Pimelocerus perforatus*) je endemitem na Japonských ostrovech Honšú, Šikoku a Kjúšú, kde se vyskytuje ve velkých počtech, a kde způsobuje velké škody na olivách zejména pak na olivovníku evropském (*Olea europaea*).² Než byli na Japonské ostrovy rozšířeny olivovníky evropské (*Olea europaea*), tito brouci cizopasili na původních rostlinách z čeledi Olivovníkovité (*Oleaceae*), jako je například Ptačí zob japonský (*Ligustrum japonicum*). Na původních rostlinách se nosatci ovšem nevyskytují tak hojně jako na zmíněných olivovnících evropských (*Olea europaea*). populace brouků na dospělém stromě může dosahovat až 100 jedinců. Protože se živí listy a kůrou stromu, tak napadený strom postupně hyne.²

Oba regioizomerní pimeforaziny A a B (**1** a **2**) byly z nosatců izolovány ve formě racemických směsí, tedy jak pimeforazinu A (\pm)-**1** a pimeforazinu B (\pm)-**2**. Tyto dva fluorescentní regioizomery vykazovali významné neuroprotektivní vlastnosti. Tyto vlastnosti byly hodnoceny na základě buněčného poškození SH-SY5Y lidských buněk neuroblastomu.²

2.3 Biosyntéza fenazinového skeletu

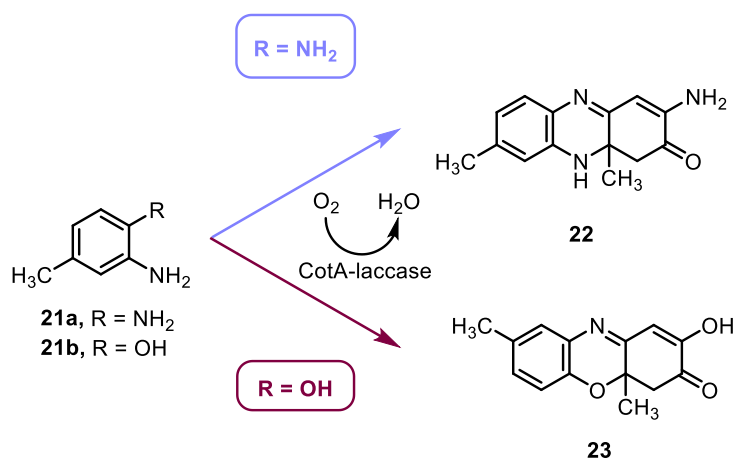
Sekundární metabolity fenazinového typu biochemicky vychází z šikimátové biosyntetické dráhy, přesněji z kyseliny chorinové **10**.¹⁵ (**Obr. 10**) Ta zde slouží jako základní stavební látka při této biosyntéze. Prvním krokem je pak transformace **10** za pomoci PhzE – operonů na amino derivát **11**, tyto Phz – operony jsou homodimerické enzymy příbuzné anthranilátové syntáze.¹⁸ Dále se pak pomocí operonů PhzD a PhzF přemění na **12** a **13**. Po následné dehydrataci vzniká intermediát **15**. Za katalýzy dalšího operonu PhzG je pak cesta kalyzována až na výsledné fenazinony **19** a **20**. Tato biosyntetická dráha je navržena na základě biosyntézy fenazinů u několika rodů bakterií.¹⁸



Obrázek 10: Navržená biosyntéza prekurzorů všech komplexních fenazinů jež vychází z chorismové kyseliny 10, známého intermediátu z šikimátové dráhy.¹⁸

2.4 Biomimetický přístup k syntéze fenazinu a fenoxazinonu

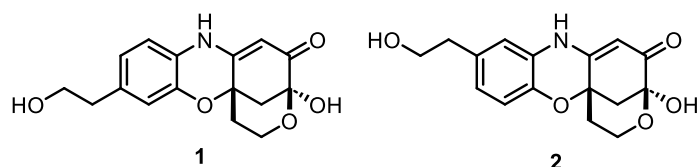
Syntéza fenazinového a fenoxazinového skeletu může probíhat například s využitím CotA-laccasy. Lakázy jsou enzymy obsahující měď a v poslední době jsou čím dál více používány v organické syntéze z důvodu jejich značné stability v organických rozpouštědlech.¹⁹ Z pohledu „klasické“ organické syntézy, je navržených přístupů k fenazinům a fenoxazinonům nepřehledné množství.¹⁷ Viz níže ale předkládám pouze biomimetický způsob.¹⁹ (Obr. 11) V případě diamino benzenů **21a**, vzniká nejprve aminoxy radikál, který dimerizuje za vzniku fenazinu **22**. Hydroxy amino benzen **21b** pak dává vzniku fenoxazinonovému skeletu **23**. Ani jeden z produktů následně nemůže podlehnout aromatizaci z důvodu přítomnosti kvarterního centra.



Obrázek 11: Příprava fenazinového a fenoxazinového skeletu v přítomnosti CotA-laktáz.¹⁹

2.5 Pimeforazin A a B (látky 1 a 2) – náš cíl

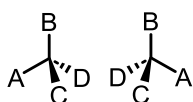
Náš zájem o tento typ látek je způsoben jejich neobjasněným mechanismem účinku jímž působí jako neuroprotektory. To jsou vlastnosti, které mohou chránit centrální nervovou soustavu před akutními nebo chronicky degenerativními poruchami, mezi něž patří například mrtvice. Chronicky degenerativní poruchy jsou epilepsie, Alzheimer, demence nebo třeba Parkinsonova choroba.²⁰ Pimeforazin A a B byl izolován v Japonsku pouze jako racemická směs, tedy jako směs obsahující oba enantiomery. Zajímá nás tedy jaký vliv na biologickou aktivitu budou mít jednotlivé enantiomery. A abychom to zjistili, tak si tyto látky musíme připravit.



Obrázek1: (+/-)-Pimeforazin A (1) a (+/-)-Pimeforazin B (2).

2.6 Chiralita

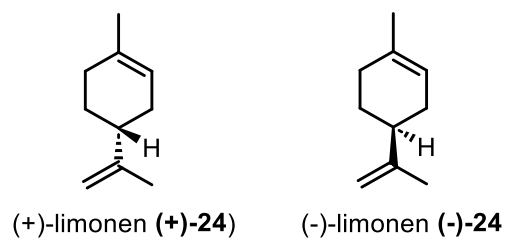
Chirální molekula je taková, která se nedokáže stotožnit se svým zrcadlovým obrazem.²¹ Takovou dvojici molekul (**Obr.12**) si můžeme představit jako pár rukou. Obě ruce mají palec, ukazováček, prostředníček, prsteníček a malíček. Ale pokud se podíváme na svoji například pravou ruku do zrcadla, její obraz se nikdy nebude moci překrýt s původní pravou rukou. Bude se nám totiž zdát, že ruka v zrcadle je naše levá ruka. Tímto způsobem to funguje i v chemii u chirálních molekul, kde ovšem prsty jsou nahrazeny atomy v molekulách. Chirální centrum je zdrojem chirálních molekul.



Obrázek 12: optické antipody.

Typickým příkladem chirálních látek vyskytující se běžně v přírodě jsou například L-aminokyseliny a D-sacharidy. Opačné antipody (jejich zrcadlové obrazy, neboli enantiomery), tedy D-aminokyseliny a L-sacharidy nejsou v přírodě zastoupeny. Přívlasky D a L před názvy pak odkazují na fyzikální vlastnost těchto molekul. Mají schopnost stáčet rovinu polarizovatelného světla do leva (tedy L-enantiomer), nebo do prava (tedy D-enantiomer). Důležitou věcí je, že mají oba enantiomery stejné fyzikální i chemické vlastnosti až na směr stáčení polarizovatelného světla. Zde nastává problém, jelikož prostředí ve kterém chirální látky působí (receptory, enzymy), je chirální. To může způsobit, že oba enantiomery jedné látky mohou mít v organismu naprosto odlišné vlastnosti.²²

Typickým příkladem je například molekula limonenu (**Obr.13**). (+)-limonen (+)-**24** se nachází v kůře citronu a je zodpovědný za typickou „pomerančovou“ vůni. Jeho optický antipod (–)-limonen (–)-**24** pak voní po terpentínu a v přírodě se nevyskytuje.²³



Obrázek 13: (+)-limonen (+)-24 a (-)-limonen (-)-24.

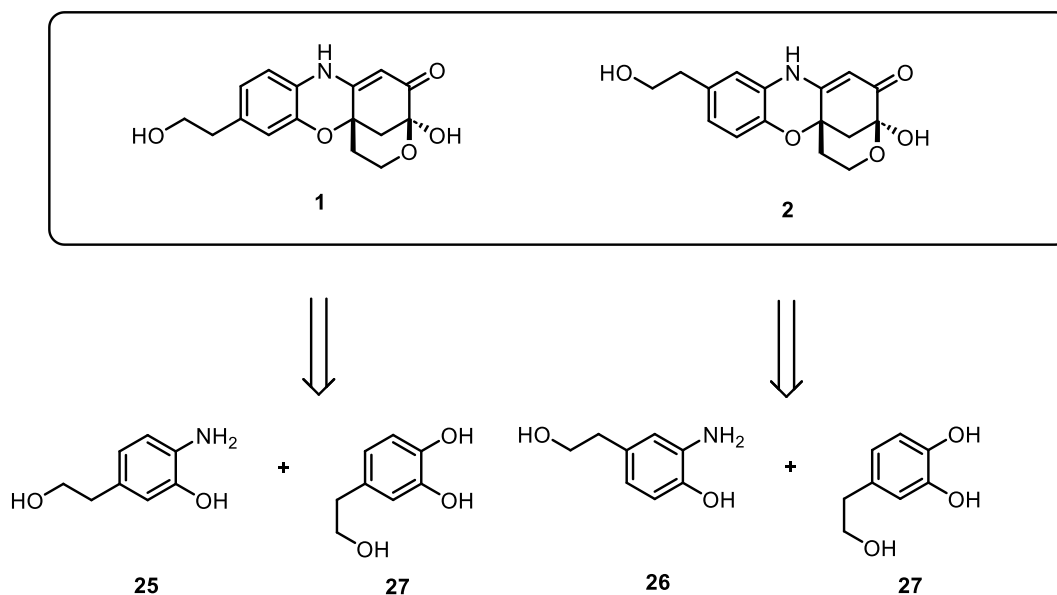
3 Výsledky a diskuse

Cílem mé bakalářské práce je vyvinout syntetické přístupy jež by nám umožnili připravit pimeforazin A a B (sloučeniny **1** a **2**). Sekundární metabolity, které jsou produkovány broukem (Coleoptera) nosatcem olivovým (*Pimelocerus perforatus*). Tyto látky podle předběžných výsledků vykazují neuroprotektivní aktivitu a našim cílem je poté potvrdit jejich strukturu.(Obr.1)

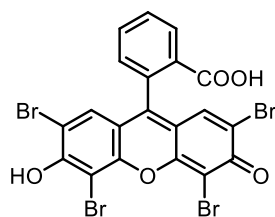
3.1 Retrosyntéza

Retrosyntéza pimeforazinu A (**1**) a pimeforazinu B (**2**) je založena na fotochemické reakci, která je katalyzovaná eosinem Y. Eosin Y (**31**) je silný fotochemický aktivátor malých organických molekul, který funguje na principu přenosu energie.²⁴ Ve fotochemických reakcích dochází k pohlcení světelné energie a její přeměně na energii chemickou, kdy dojde k přenosu jednoho elektronu za vzniku reaktivních meziproductů.²⁴

Klíčovým krokem syntézy je tedy fotochemicky iniciovaná kondenzace mezi difenoly a *orto*-hydroxyanilininy, která vede k tvorbě tetraacyklického kondenzovaného skeletu. Následná intramolekulární cyklizace tohoto intermediátu pak poskytuje cílové molekuly.



Obrázek 14: Schéma retrosyntézy pimeforazinu A (**1**) a B (**2**).



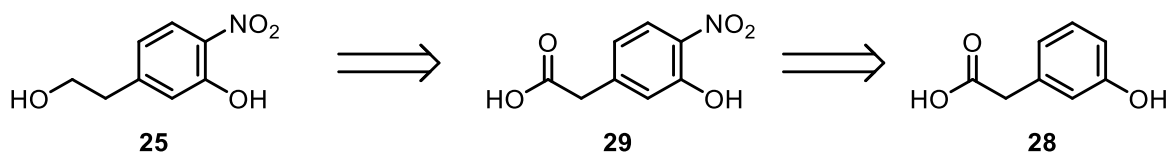
31

Obrázek 15: Eosin Y.

Z praktického hlediska pak pro pimeforazin A (**1**) vycházíme z výchozích látek **25** a **27**. Retrosyntéza pimeforazinu B (**2**) je zaožena na látce **27**, ale na rozdíl od pimeforazinu A je zde druhou výchozí látkou molekula **26**. Diskusní část se bude věnovat přípravě výchozích látek **25**, **26**, a **27** jejichž přípravou jsem se zabýval a jež jsou nezbytné pro přípravu pimeforazinu A (**1**) a B (**2**).

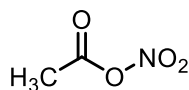
3.2 Příprava 3-hydroxy-4-nitro-fenylactové kyseliny **29**

Nejprve jsme se zaměřili na přípravu fenolu **25**, který jsme chtěli připravit z odpovídající karboxylové kyseliny **29**, která měla být dostupná nitrací odpovídajícího fenolu **28**.



Prvním krokem tedy byla nitrace komerčně dostupné kyseliny 3-hydroxy-fenylactové **28** (Tabulka 1). První a zároveň nejjednodušší postup, který nás napadl byla nitrace pomocí 4.6 ekviv. kyseliny dusičné (HNO_3). Reakční směs se zahřívala a začala oranžovět. Po ukončení reakce a zpracování výsledků jsme se dozvěděli na základě analýzi ^1H NMR spektra surové reakční směsi, že produkt se rozložil. Měli jsme za to, že kyselina v roztoku směsi figurovala jako příliš silné oxidační činidlo, které rozložilo celou reakční směs.

V další reakci jsme tedy použili k nitraci kyseliny 3-hydroxy-4-nitro-fenylactové **29** spolu s kyselinou dusičnou i kyselinu octovou. Takto připravená směs kyseliny dusičné a kyseliny octové nejprve reaguje spolu za vzniku acetylnitrátu **30**. Acetylnitrát **30** je mnohem mírnější nitrační činidlo, a proto jsme doufali, že by mohlo dojít k mononitraci kyseliny 3-hydroxyfenylactové **28** do polohy 4. Nitrace sice proběhla, ale probíhala do více poloh. Výsledkem této reakce tedy byla polynitrace, kdy vzniklo mnoho produktů, které by od sebe šly jen těžce oddělit.



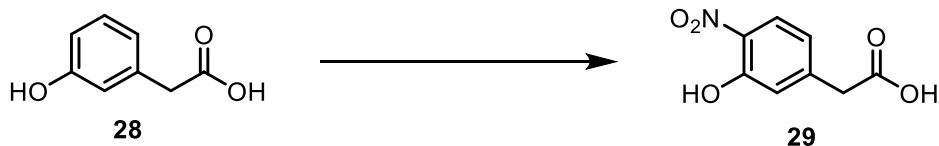
30

Obrázek 16: Acetylnitrát.

Proto jsme se rozhodli použít jinou nitrační směs. V tomto případě jsme použili směs kyseliny dusičné a acetanhydridu. Princip této nitrace by měl být stejný jako v případě s kyselinou octovou. Měl by tedy vzniknout nejprve acetylnitrát, díky kterému by nitrace probíhala hladce. Díky struktuře kyseliny 3-hydroxyfenyloctové **28** jsme předpokládali, že nitrace bude probíhat pouze do polohy 3, jelikož tato poloha je spolu s polohou 4 řízena elektronicky (hydroxy skupina řídí elektrofilní substituci do poloh *ortho* a *para*), ale poloha 4 je navíc stericly bráněná. Tato teorie se ovšem neukázala jako pravdivá, jelikož i na dále probíhala nitrace hned do několika poloh a vznikala směs produktů jež šli obtížně identifikovat. Reakci jsme se pokoušeli optimalizovat upravením poměrů ekvivalentů směsi acetanhydridu a kyseliny dusičné přidávané k výchozí látce, nicméně žádná úprava reakce nezabránila polynitraci. Produktem vždy byly polynitrované kyseliny.

Výsledky s reakčními podmínkami týkající se konkrétní nitrace kyseliny 3-hydroxyfenyloctové byly zaznamenány do **tabulky 1**.

Tabulka 1: optimalizace nitrace kyseliny 3-hydroxyfenyloctové **28**



Řádek	Reakční podmínky	výsledek
1	HNO ₃ (4,6 ekviv.)	Rozklad VL
2	HNO ₃ (4,8 ekviv.) Kyselina octová, 0 °C	Směs produktů
3	HNO ₃ (1 ekviv.), Acetanhydrid (1,5 ekviv.)	Směs produktů
4	HNO ₃ (2 ekviv.), Acetanhydrid (3 ekviv.)	Směs produktů

Z důvodu neúspěšné nitrace jsme se rozhodli tento přístup dočasně opustit a věnovat se mezitím syntéze substrátu vhodného pro syntézu pimeforazinu B.

3.3 Příprava 3-amino-4-hydroxyfenethyl alkoholu **26**

V případě syntézy alkoholu **26** jsme chtěli předejít problémům s nitrací odpovídající karboxylové kyseliny a tedy jsme se rozhodli nejprve připravit odpovídající polyhydroxylovaný skelet. Rozhodli jsme se tedy začít syntézu alkoholu **26** redukcí kyseliny 4-hydroxyfenyloctové **32** pomocí LiAlH_4 rozpuštěném v THF za zvýšené teploty. Viz tabulka 2. Produktem této reakce byla skutečně redukovaná karboxylová kyselina. Tato kyselina je komerčně dostupná, ale její syntéza (později byla koupena) mi sloužila k tomu abych (a) se načil pracovat se samozápalnými látkami, a (b) abychom si vyzkoušeli jak dané transformace budou probíhat na těchto substrátech nejenom z pohledu reaktivity, ale zejména reakčního work upu. Na této reakci jsme si dále vyzkoušeli, že podobné kyseliny půjdou redukovat bez větších problémů. Tato informace se nám poté hodila, při redukcí obdobné kyseliny 3,4-dihydroxyfenyloctové, potřebné k finální syntéze pimeforazinu jak A, tak i B. Produkt této reakce byl velmi čistý a nebylo potřeba jej dále čistit.

Tabulka 2: reakční podmínky redukce kyseliny 4-hydroxyfenyloctové

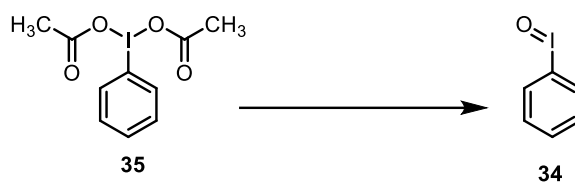


Řádek	Reakční podmínky	Výtěžek reakce
1	LiAlH_4 (1.5 ekviv.), THF (2.eq)	48 %

3.3.1 Příprava Iodosobenzenu **34**

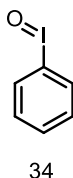
Dalším krokem k přiblížení se k 3-amino-4-hydroxyfenethyl alkoholu **26** byla nitrace alkoholu **33**. Z již předešlých pokusů nitrace velmi podobné látky jsme se rozhodli použít zcela jiný způsob nitrace. Selektivní nitrace pomocí idosobenzenu (**Obr. 17**).²⁵ Tato reakce byla lákavá nejen z pohledu její selektivity, ale také jelikož je velmi šetrná k okolnímu prostředí. Reakční směs nemusí být zahřívána a probíhá za běžných laboratorních podmínek. Pro přípravu idosobenzenu **34** jsme použili (diacetoxyjod)benzen. Reakce probíhala přes noc a byla potřeba ji jednou optimalizovat, jelikož poprvé došlo k rozložení produktu. Optimalizace probíhala podle tabulky 3. Při samotné reakci se pak ukázalo, že problémem při přípravě této látky není ani tak její tvorba, ale izolace. Vše se nakonec povedlo zvládnout a byl jsem schopen izolovat danou látku v 88% výtěžku.

Tabulka 3: Optimalizace přípravy iodosobenzenu 34

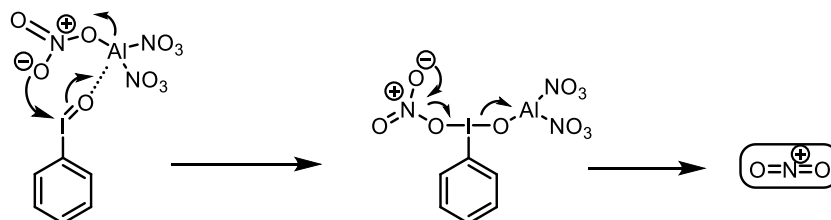


Řádek	Reakční podmínky	Čas (hod)	Výsledek/výtěžek
1	NaOH (21.3 ekviv.)	18	rozklad
2	NaOH (5.31 ekviv.)	2,5	88 %

Iodosobenzen bude při nitraci fenolu sloužit k tomu, aby vytvořil kationt NO_2^+ . Bude se tedy jednat o elektrofilní substituci. Tvorba výše zmíněného kationtu je znázorněna viz **obrázek 18**.



Obrázek 17: Iodosobenzen.

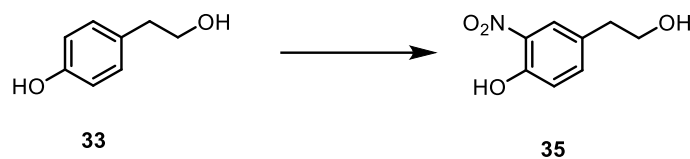


Obrázek 18: mechanismus tvorby NO_2^+ pro elektrofilní substituci převzaté z článku od Kevin A. Juárez-Ornelas, J. Oscar C. Jiménez-Halla, et al., Iodine(III)-Catalyzed Electrophilic Nitration of Phenols via Non-Brønsted Acidic NO_2^+ Generation.²⁵

3.3.2 Nitrace 4-hydroxyfenethyl alkoholu 33

Samotná nitrace pomocí iodosobenzenu proběhla velmi úspěšně. Produkt byl vyizolován a přečištěn. Výtěžky reakce byl zaznamenán do tabulky 4.

Tabulka 4: nitrace 4-hydroxyfenethyl alkoholu



Řádek	33 [mmol]	Reakční podmínky	Výtěžek [%]
1	2,5	PhIO (0.25 ekviv.), Al(NO ₃) ₃ (0.35 ekviv.)	54 %
2	15	PhIO (0.25 ekviv.), Al(NO ₃) ₃ (0.35 ekviv.)	91 %

3.3.3 Redukce 3-nitro-4-hydroxyfenethyl alkoholu 35

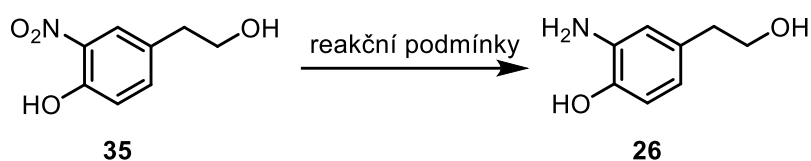
Abychom získali potřebný amin **26**, museli jsme nitro derivát získaný z minulé reakce **35** redukovat. Způsobů, jak redukovat nitro skupinu na aromatickém skeletu je mnoho. Způsob, který jsme vybrali jako první byla nitrace pomocí LiAlH₄. Redukce nitro skupiny probíhala tak, že jsme nejprve rozpustili výchozí látku v THF a nechali reagovat 6 hodin. Po ukončení reakce (hlídání průběhu pomocí TLC) jsme ze směsi odstranili hlinité soli pomocí vinanu sodno-drasselného. Bohužel se LiAlH₄ ukázal, jako příliš silné redukční činidlo. Výsledným produktem reakce tedy byla směs dále nespecifikovatelných látek.

Další metodou, kterou jsme na redukci látky **35** použili byla redukce pomocí slabšího redukčního činidla NaBH₄ ve spojení s Pd/C. Po zpracování reakční směsi a vyhodnocení výsledků jsme bohužel zjistili, že i během tohoto postupu dochází k redukci celé výchozí látky, a tudíž nevzniká potřebný amin.

Jako další redukční činidlo jsme zvolili pouze Pd⁰. Redukovali jsme tím způsobem, že jsme nejprve rozpustili nitro derivát v EtOAc a poté přidali Pd/C. Argonovou atmosféru jsme poté vyměnili za vodíkovou. Reakční směs jsme nechali 48 hodin míchat. Tato redukční metoda se nám osvědčila. Produkt **26** byl velmi čistý a nebyla třeba ho dále purifikovat.

Reakce vedoucí k redukci látky **35** na látku **26** jsme poté zaznamenali pro zjednodušení do tabulky 5.

Tabulka 5: reakce vedoucí k přípravě látky 26

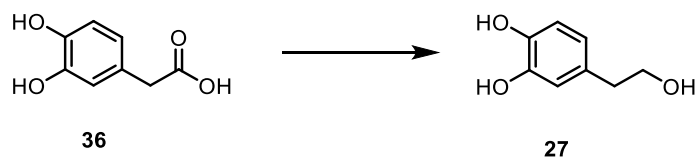


Řádek	Reakční podmínky	Čas reakce [hod]	Výsledek/výtěžek
1	LiAlH ₄ (4 ekviv.), THF (0.1 ekviv.)	6	Rozklad VL
2	NaBH ₄ (2 ekviv.), Pd/C (0.01 ekviv.), NaOH (2 ekviv.), H ₂ O (1 ekviv.)	4	Rozklad VL
3	Pd/C (0.016 ekviv.), EtOAc (1 ekviv.)	48	73 %
4	Pd/C (0.016 ekviv.), EtOAc (1 ekviv.)	46	61 %

3.4 Příprava 3,4-dihydroxyfenethyl alkoholu 27

Pro přípravu 3,4-dihydroxyfenethyl alkoholu 27 jsme zredukovali kyselinu 3,4-dihydroxyfenyloctovou 36. Jak jsme již předpokládali vzhledem k předchozím reakcím na podobné bázi, tak tato reakce proběhla bez žádných potíží. 3,4-dihydroxyfenethyl alkohol se nám podařilo připravit čistý bez nečistot. Tento alkohol je jedním z klíčových komponentů pro přípravu pimeforazinu A i B. Reakce probíhala podle tabulky 6.

Tabulka 6: příprava 3,4-dihydroxyfenethyl alkoholu

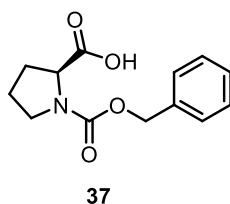


Řádek	Reakční podmínky	Výtěžek [%]
1	LiAlH ₄ (3 ekviv.), THF (2h)	77 %

3.5 Esterifikace připravených alkoholů **26**, **27**

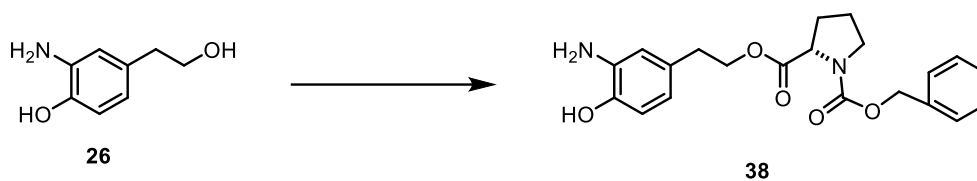
Naším cílem je připravit obě přírodní látky ve formě jednoho enantiomeru. Nikoliv jako směs obou enantiomerů. Jednou, a asi tou nejjednodušší cestou jejich přípravy, je modifikovat připravené prekursory pro samotnou fotochemickou reakci jako jejich estery, kde acylová část molekuly ponese na sobě chirální pomocnou skupinu. Po následné fotoadici pak budou vznikat cílové molekuly ve formě diastereoizomerů, jež půjdou snadno oddělit. Následná intramolekulární cyklizace (tvorba 4-tého kruhu) pak poskytne cílové přírodní látky jako homoizomery – právě jeden enantiomer. Při esterifikaci jsme si museli dát pozor na to, aby nedošlo k polyesterifikaci, jelikož na alkoholech **26** a **27** se vyskytují nejméně 2 hydroxylové skupiny. Konkrétně dvě na molekule **26** a 3 hydroxylové skupiny na molekule **27**. Karboxylová skupina, která by vyhovovala našim požadavkům musela být tedy chirální a nesměla nikterak interferovat s následnou fotochemickou reakcí. Proto jsme zvolili *N* – karbobenzyloxy – L – prolin.

Na esterifikaci obou zmíněných alkoholů jsme použili stejný postup. Nejprve jsme přidali k DCC naši chirální kyselinu **37** ve směsi s DMAP v CH₂Cl₂. Tento krok jsme prováděli za 0 °C. Po 5 minutách jsme přidali náš alkohol **26** (**Tabulka 6**) nebo **27** (**Tabulka 7**) rozpuštěný také v CH₂Cl₂. Takto připravenou reakční směs jsme poté míchali 16 hodin. Bohužel, ani v jednom případě nedošlo k pouhé esterifikaci alkoholu, a výsledkem reakce byla pouze neidentifikovatelná směs produktů.



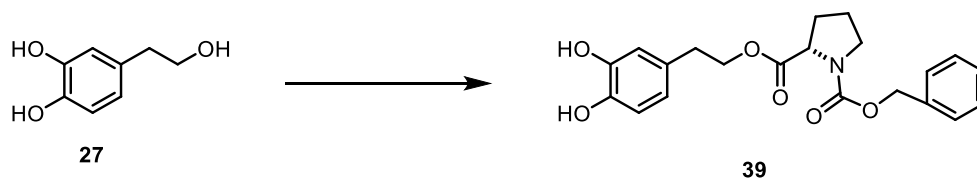
Obrázek 19: *N*-karbobenzyloxy-*L*-prolin (**37**).

Tabulka 6: reakční podmínky esterifikace alkoholu 26



Řádek	Reakční podmínky	Čas reakce (hod)	Výsledek
1	DMAP (0.1 ekviv.), DCC (1 ekviv.), CH ₂ Cl ₂ (1 ekviv.), CH ₂ Cl ₂ (1 ekviv.)	18	Směs produktů

Tabulka 7: reakční podmínky esterifikace alkoholu 27



Řádek	Reakční podmínky	Čas reakce (hod)	Výsledek
1	DMAP (0.1 ekviv.), DCC (1 ekviv.), CH ₂ Cl ₂ (1 ekviv.), CH ₂ Cl ₂ (1 ekviv.)	18	Směs produktů

V tomto okamžiku se ale můj čas práce v laboratoři již nebezpečně nachýlil ke konci a moje dobrodružství, které mělo vést k přípravě intermediátů vedoucích v budoucnosti k syntéze výše zmíněných přírodních látek **1** a **2** se zde zastavilo.

4 Závěr

Má bakalářská práce byla zaměřena na sekundární metabolity. Přesněji sekundární metabolity, které ve svém těle produkuje japonský brouk *Pimelocerus perforatus*. Mým cílem tedy bylo vyvinout syntetické metody jež by nás přiblížili k ultimátnímu cíli připravit a tím i potvrdit navrženou strukturu látek pimeforazinu A a B (**1** a **2**).

V teoretické části jsem se podrobněji věnoval sekundárním metabolitům. To znamená, co vůbec sekundární metabolity jsou a kde se v přírodě nacházejí. Dále jsem se věnoval jejich dělení a ke každé kategorii uvedl několik zástupců.

V experimentální části jsem se zaměřil na přípravu výchozích látek nezbytných k fotochemické adici a tvorbě kýženého základního skeletu pimeforazinu B (**2**). Následná příprava odpovídajících esterů mi zatím bohužel nevyšla, ale tento krok spolu s následnou fotochemickou adicí bude již předmětem dalšího projektu. Bohužel na další kroky v syntéze mi již nezbyl čas. Samotné získání obou zmíněných alkoholů však беру jako úspěch.

5 Experimentální část

5.1 Obecné informace

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

Pro sloupcovou chromatografii (CC) bylo využito silikagelu jako stacionární fáze a směsi hexanu (Hex.):EtOAc (V/V), pokudliže není uvedeno jinak, jako mobilní fáze. Eluované frakce byly jímány po 5-30 ml frakcích a jejich obsah byl monitorován pomocí TLC. Frakce obsahující stejný produkt byly spojeny a následně odpařeny na rotační vakuové odparce (RVO).

K měření NMR spekter byl, pokud není uvedeno jinak, použit spektrometr JEOL ECA400II pracující při frekvenci 399,78 MHz (^1H) a 100,53 MHz (^{13}C). Měření byla prováděna za laboratorní teploty, přičemž vzorky byly rozpuštěny a následně měřeny v jednom z následujících rozpouštědel, CDCl_3 nebo aceton- d_6 . Chemické posuny zbytkového signálu nedeuterovaného, resp. ne zcela deuterovaného rozpouštědla sloužily ke kalibraci měřených ^1H NMR spekter. Chemické posuny zbytkových nedeuterovaných resp. částečně deuterovaných rozpouštědel v daném rozpouštědle jsou následující: CDCl_3 (7,26 ppm) a aceton- d_6 (2,05 ppm). Ve spektrech ^{13}C bylo využito ke kalibraci charakteristického signálu atomu ^{13}C substituovaného atomem vodíku ^2H . Chemické posuny jsou následující: CDCl_3 (77,23 ppm, prostřední signál) a aceton- d_6 (29,84 ppm). Finální produkty byly purifikovány pomocí kolonové chromatografie na silikagelu (viz výše).

Měření hmotnostních spekter bylo realizováno na přístroji značky Waters (Q-TOF MICRO). Elementární analýzy byly provedeny na přístroji EA1112 Flash analyser ("Thermo-Finnigan). Teploty tání byly měřeny na přístroji SMP 30 (Stuart[®]) a nejsou korigovány.

Průběh reakcí byl monitorován pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC) na silikagelu. Pro tento typ operace byly použity aluminiové desky pokryté silikagelem 60 SIL G/UV254 s fluorescentním indikátorem (Machery-Nagel). Jednotlivé sloučeniny přítomné v reakční směsi byly dále vizualizovány pomocí vizualizačních roztoků.

5.1.1 Vizualizační roztoky pro TLC

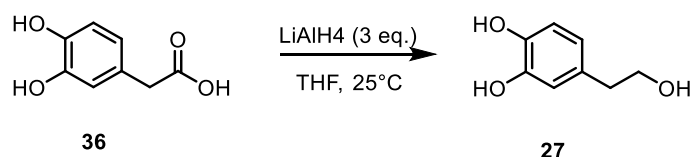
- Metody přípravy:

Zásaditý roztok KMnO₄ byl připraven rozpuštěním 9 g KMnO₄ a 20 g K₂CO₃ ve 150 ml 10 % NaOH.

Vanilinový roztok byl připraven rozpuštěním 2 g vanilinu ve 100 ml ethanolu obsahující 1 ml koncentrované H₂SO₄.

Hannesianův vizualizační roztok byl připraven rozpuštěním 12 g kyseliny fosfomolybdenové v 250 ml ethanolu.

5.2 Syntéza 3,4-dihydroxyfenethyl alkoholu 27



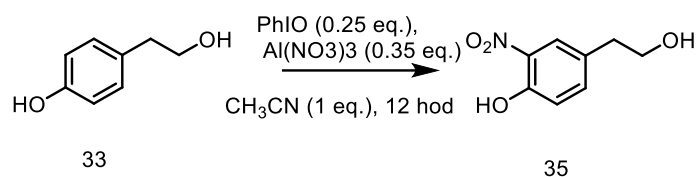
Do trojhrdlé baňky s chladičem se přidá směs LiAlH₄ (2.031 g, 53.5 mmol, 3 ekv.) a THF (36 mL, 17.8 mmol, 1 ekv.). Za stálého míchání a chlazení se přidává směs výchozí látky **36** (v THF (36 mL, 17.8 mmol, 1 ekv.) během 1.5 hodiny. Po dokapání se směs zahřívá 2.5 hodin na 67 °C. Poté necháme zchladnout. Po dokončení je směs okyselena na pH 2 (kontrola pomocí pH papírku) a je přidána voda (25 mL). Výsledná směs je extrahována EtOAc (3 x 90 mL) a spojené organické fáze jsou promyty pomocí H₂O (21 mL), NaHCO₃ (70 mL) a solanky (70 mL). Dále je směs sušena nad Na₂SO₄ a odpařena. Zbytečné rozpouštědlo jsme poté odpařili na RVO. Bylo získáno 2.12 g tmavě hnědé, olejovité látky v kvantitativním výtěžku 77 %.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 8.59 (broad s, 1H), 8.55 (broad s, 1H), 6.64 – 6.50 (m, 2H), 6.40 (dd, *J* = 7.9, 1.7 Hz, 1H), 4.48 (t, *J* = 4.9 Hz, 1H), 3.47 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.47 (dd, *J* = 3.9, 2.1 Hz, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 144.9, 143.4, 130.2, 119.5, 116.3, 115.4, 62.7, 38.6.

HRMS pro C₈H₁₀O₃ pro [M+K]⁺: 155.168, nalezené 155.0703.

5.3 Syntéza 3-nitro-4-hydroxyfenethyl alkoholu 35



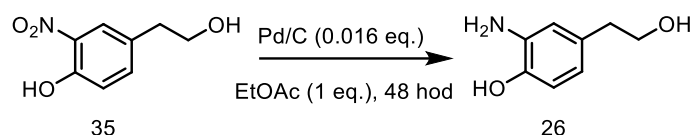
Ve 150 mL kulaté baňce se rozpustí PhIO (796 mg, 3.62 mmol, 0.25 ekviv.) v CH₃CN (96.5 mL, 14.5 mmol, 1 ekviv.). Poté přidáme Al(NO₃)₃ (1900 mg, 5.07 mmol, 0.35 ekviv.) a mícháme 10 minut. Směs ochladíme na 0 °C. Poté přidáme fenol **33** (2,0 g, 14.5 mmol, 1 ekviv.) Reakční směs ohřejeme na laboratorní teplotu a necháme míchat přes 12 hodin (ukončení reakce se sleduje pomocí TLC). Poté přidáme solanku (250 mL) a extrahujeme ethylacetátem (3 x 100 mL). Vysušíme pomocí Na₂SO₄, přefiltrujeme a necháme odpařit přebytečné rozpouštědlo na RVO. Produkt přečistíme na chromatografické koloně (SiO₂, DCM:MeOH = 100→100:1→ 50→1→25:1) a izolovaný jako nažloutlá pevná látka (1.27 g, 48 %)

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm): 10.48 (s, 1H), 7.98 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 7.48 (dd, *J* = 8.6, 2.2 Hz, 1H), 7.12 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 3.89 (t, *J* = 6.3 Hz, 3H), 2.87 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H).

¹³C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm): 154.0, 138.8, 133.6, 131.4, 124.9, 120.2, 63.3, 37.9.

HRMS pro C₈H₉N₁O₄ pro [M+K]⁺: 184.16, nalezené 184.06

5.4 Syntéza 3-amino-4-hydroxyfenethyl alkoholu 26



Výchozí látku **35** (876 mg, 4.78 mmol, 1 ekviv.) rozpustíme v EtOAc (36.8 mL, 4.78 mmol, 1 ekviv.) a k této směsi přidáme Pd/C (81.4 mg, 0.0765 mmol, 10%, 0.016 ekviv.). Následně vyměníme argonovou atmosféru za dusíkovou a tu dále vyměníme za vodíkovou. Reakční směs mícháme 48 hodin. Průběh reakce sledujeme pomocí TLC (DCM:MeOH → 6:1). Přefiltrujeme přes celite a promyjeme EtOAc. Výsledný produkt je světle žlutá pevná látka. (444 mg, 61 %)

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm): 5.82 – 5.79 (m, 2H), 5.64 (dd, *J* = 8.0, 2.1 Hz, 1H), 2.86 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.84 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H).

^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 135.5, 126.4, 122.1, 111.1, 108.7, 106.0, 55.2, 30.3.

HRMS pro $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{N}_1\text{O}_2$ pro $[\text{M}+\text{K}]^+$: 154.68, nalezené 154.0862

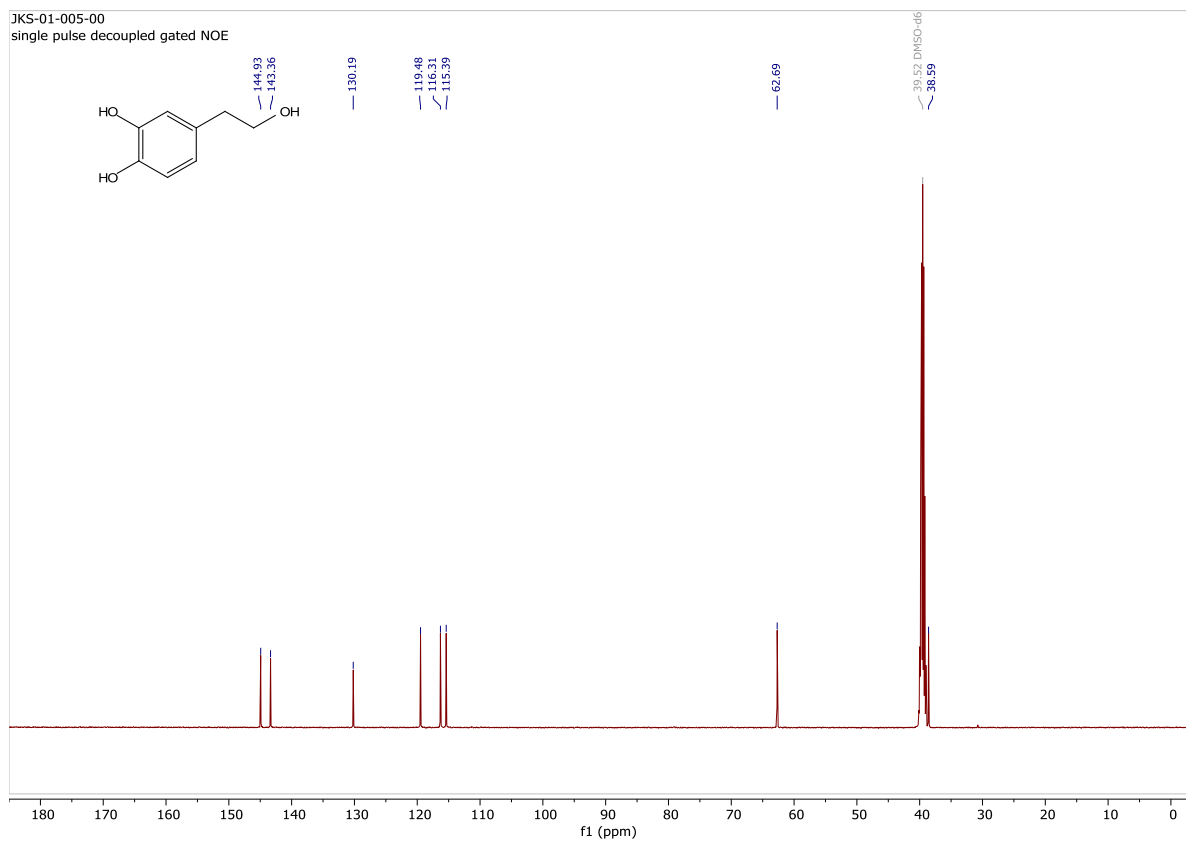
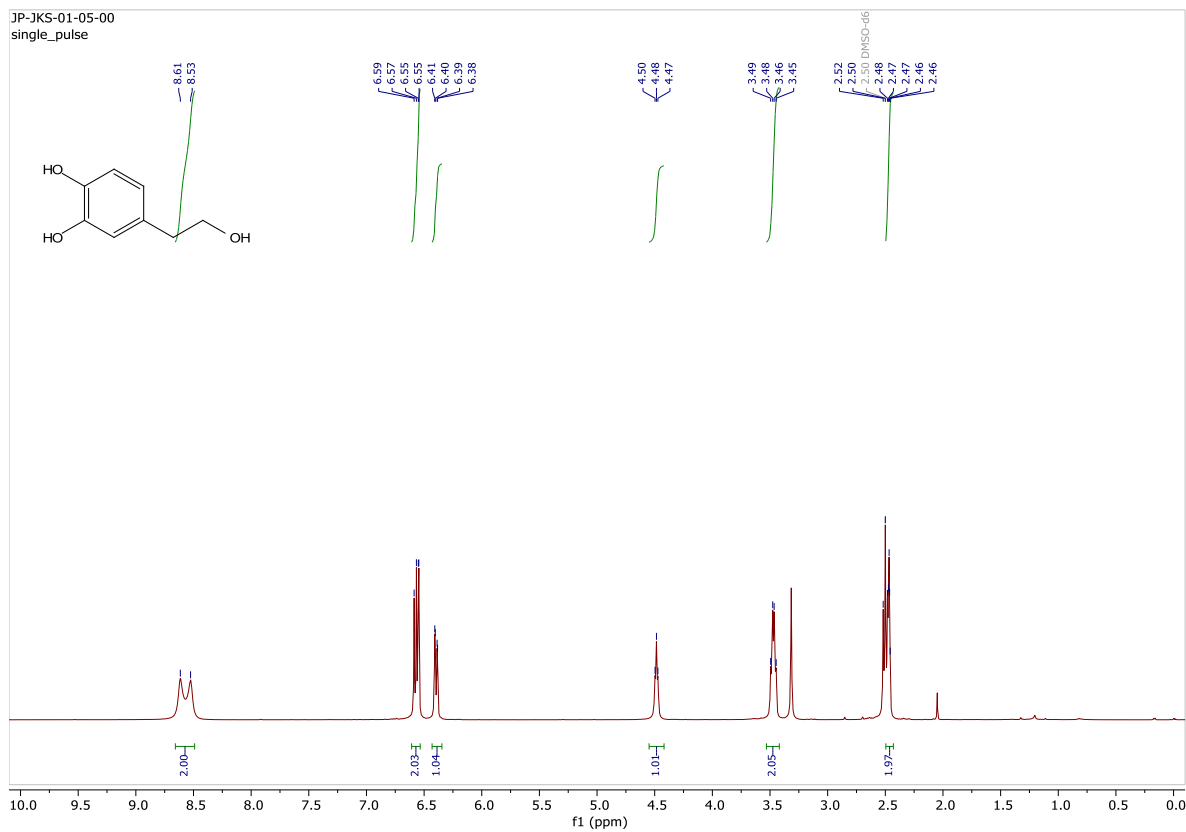
6 Seznam literatury

- (1) Torres, J. P.; Schmidt, E. W. The Biosynthetic Diversity of the Animal World. *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc. November 15, 2019, pp 17684–17692. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV119.006130>.
- (2) Fujikawa, A.; Ishihara, Y.; Ohta, E.; Nehira, T.; Ômura, H.; Uy, M. M.; Ohta, S. Isolation of Fluorescent Benzoxazines with Neuroprotective Activity from the Olive Weevil *Pimelocerus Perforatus*. *J Nat Prod* **2022**, 85 (12), 2740–2745. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.2c00670>.
- (3) Nair, G.; Raja, S. S. S.; Vijayakumar, R.; Nair, G.; Raja, S. S. S.; Vijayakumar, R. Introductory Chapter: Secondary Metabolites - An Overview. *Secondary Metabolites - Trends and Reviews* **2022**. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.104234>.
- (4) Erb, M.; Kliebenstein, D. J. Plant Secondary Metabolites as Defenses, Regulators, and Primary Metabolites: The Blurred Functional Trichotomy1[OPEN]. *Plant Physiology*. American Society of Plant Biologists September 1, 2020, pp 39–52. <https://doi.org/10.1104/PP.20.00433>.
- (5) Bérdy, J. Bioactive Microbial Metabolites. *The Journal of Antibiotics 2005 58:1* **2005**, 58 (1), 1–26. <https://doi.org/10.1038/ja.2005.1>.
- (6) McMurry John. *Organic Chemistry with Biological Applications*, 3rd ed.; Cengage Learning, 2014.
- (7) Review Articles on the Terpenoids and Steroids in the Journal of Chemical Research and Science Progress. *J Chem Res* **2018**, 42 (9), 494–496. <https://doi.org/10.3184/174751918x15361618048365>.
- (8) *Terpene | Essential Oils, Aromatherapy, Fragrance | Britannica*. <https://www.britannica.com/science/terpene> (accessed 2024-04-30).
- (9) Süßmuth, R. D.; Mainz, A. Nicht-ribosomale Peptidsynthese – Prinzipien Und Perspektiven. *Angewandte Chemie* **2017**, 129 (14), 3824–3878. <https://doi.org/10.1002/ange.201609079>.
- (10) *Amino acid - Reactions, Structure, Synthesis | Britannica*. <https://www.britannica.com/science/amino-acid/Amino-acid-reactions#ref997074> (accessed 2024-04-30).
- (11) *Fatty acid | Definition, Structure, Functions, Properties, & Examples | Britannica*. <https://www.britannica.com/science/fatty-acid> (accessed 2024-04-30).
- (12) Feng, L.; Wang, Y.; Yang, J.; Sun, Y. fan; Li, Y. wei; Ye, Z. hong; Lin, H. bin; Yang, K. Overview of the Preparation Method, Structure and Function, and Application of Natural Peptides and Polypeptides. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. Elsevier Masson s.r.l. September 1, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113493>.
- (13) *Alkaloid | Definition, Structure, & Classification | Britannica*. <https://www.britannica.com/science/alkaloid> (accessed 2024-04-30).
- (14) *Nicotine | Tobacco, Addiction, Poison | Britannica*. <https://www.britannica.com/science/nicotine> (accessed 2024-04-30).
- (15) Laursen, J. B.; Nielsen, J. Phenazine Natural Products: Biosynthesis, Synthetic Analogues, and Biological Activity. *Chem Rev* **2004**, 104 (3), 1663–1685. <https://doi.org/10.1021/cr020473j>.

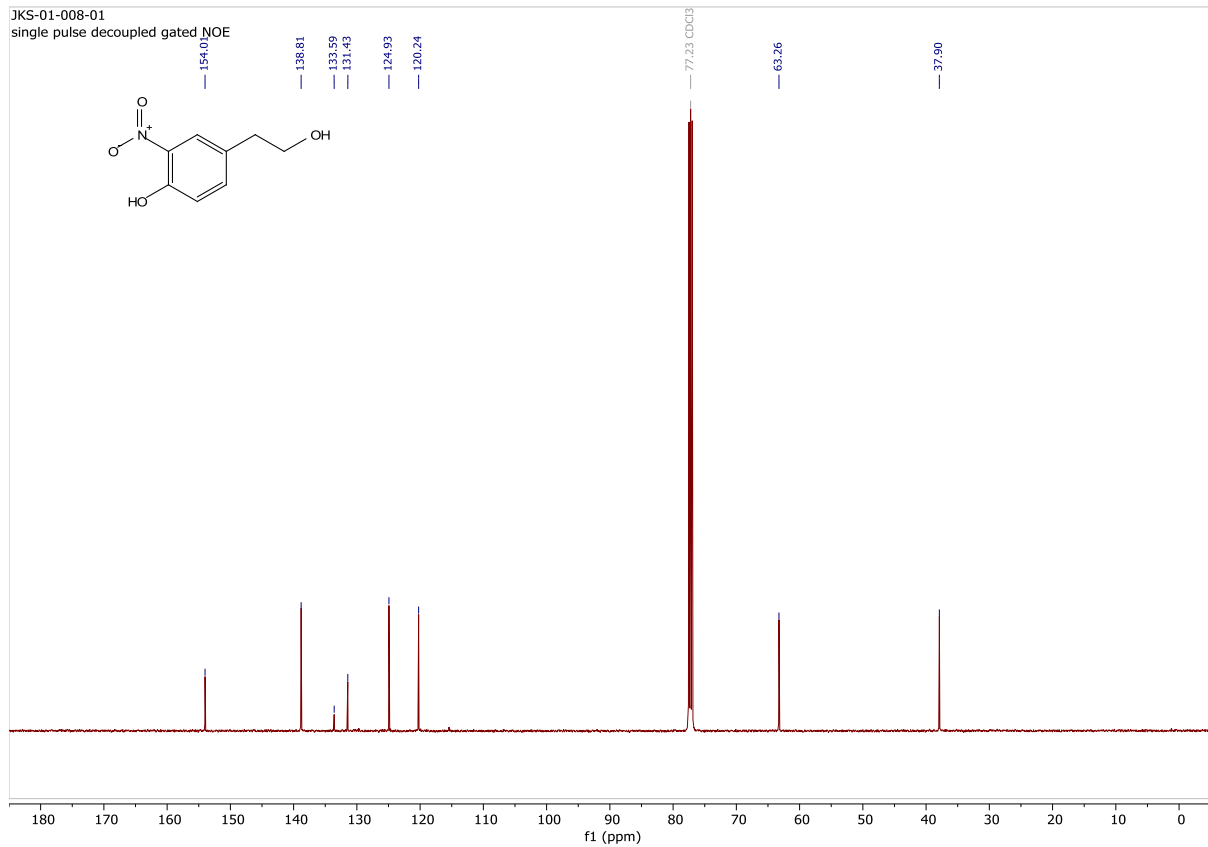
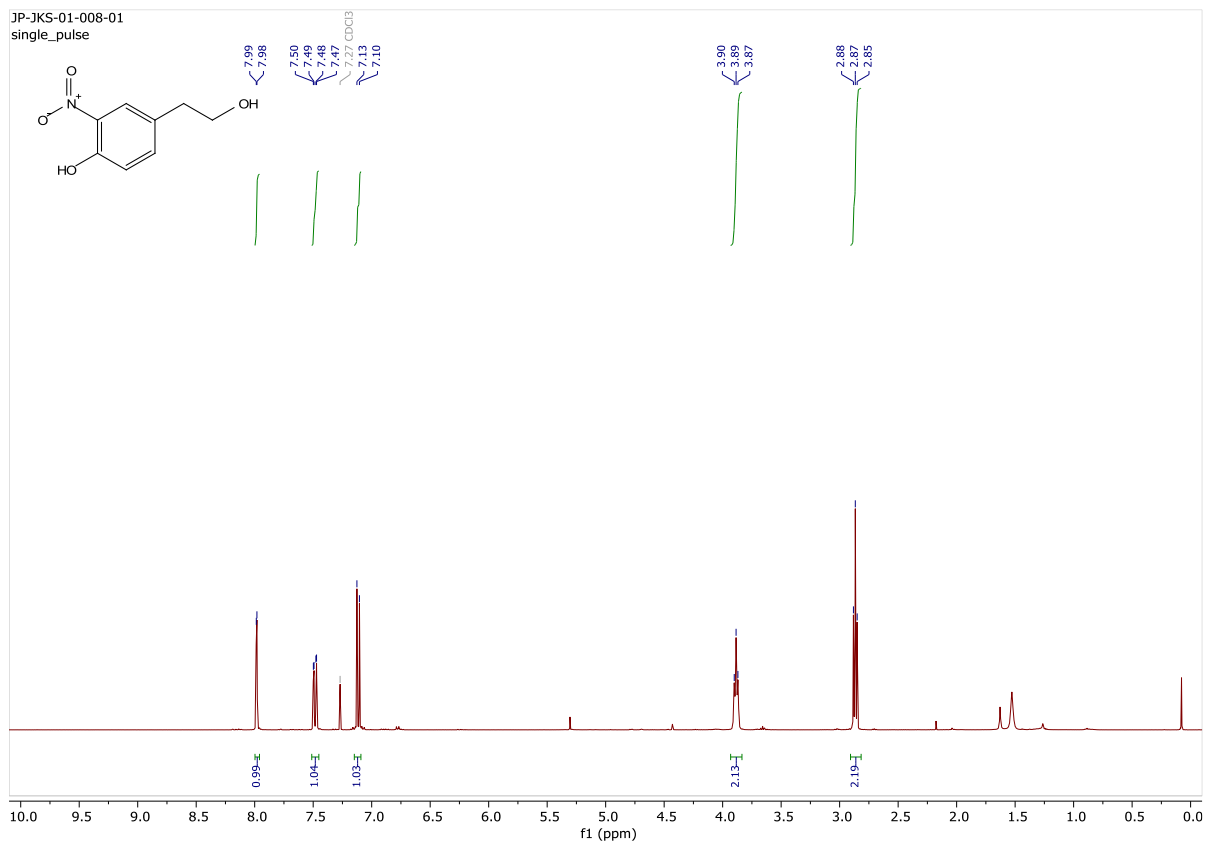
- (16) *Heterocyclic compound* | Definition, Examples, Structure, Nomenclature, Types, & Facts | Britannica. <https://www.britannica.com/science/heterocyclic-compound> (accessed 2024-04-30).
- (17) Kervefors, G.; Becker, A.; Dey, C.; Olofsson, B. Metal-Free Formal Synthesis of Phenoxazine. *Beilstein Journal of Organic Chemistry* **2018**, *14*, 1491–1497. <https://doi.org/10.3762/bjoc.14.126>.
- (18) Blankenfeldt, W.; Parsons, J. F. The Structural Biology of Phenazine Biosynthesis. *Current Opinion in Structural Biology*. Elsevier Ltd September 15, 2014, pp 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2014.08.013>.
- (19) Sousa, A. C.; Conceição Oliveira, M.; Martins, L. O.; Robalo, M. P. A Sustainable Synthesis of Asymmetric Phenazines and Phenoxazinones Mediated by CotA-Laccase. *Adv Synth Catal* **2018**, *360* (3), 575–583. <https://doi.org/10.1002/adsc.201701228>.
- (20) Rehman, M. U.; Wali, A. F.; Ahmad, A.; Shakeel, S.; Rasool, S.; Ali, R.; Rashid, S. M.; Madkhali, H.; Ganaie, M. A.; Khan, R. Neuroprotective Strategies for Neurological Disorders by Natural Products: An Update. *Curr Neuropharmacol* **2018**, *17* (3), 247–267. <https://doi.org/10.2174/1570159x16666180911124605>.
- (21) *Isomerism* | Definition, Types, & Examples | Britannica. <https://www.britannica.com/science/isomerism> (accessed 2024-04-30).
- (22) McConathy, J.; Owens, M. J. Stereochemistry in Drug Action. *Prim Care Companion J Clin Psychiatry* **2003**, *5* (2). <https://doi.org/10.4088/PCC.V05N0202>.
- (23) Kvittingen, L.; Sjursnes, B. J.; Schmid, R. Limonene in Citrus: A String of Unchecked Literature Citings? *J Chem Educ* **2021**, *98* (11), 3600–3607. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.1c00363>.
- (24) Srivastava, V.; Singh, P. P. Eosin y Catalysed Photoredox Synthesis: A Review. *RSC Advances*. Royal Society of Chemistry 2017, pp 31377–31392. <https://doi.org/10.1039/c7ra05444k>.
- (25) Juárez-Ornelas, K. A.; Jiménez-Halla, J. O. C.; Kato, T.; Solorio-Alvarado, C. R.; Maruoka, K. Iodine(III)-Catalyzed Electrophilic Nitration of Phenols via Non-Brønsted Acidic NO₂⁺ Generation. *Org Lett* **2019**, *21* (5), 1315–1319. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.8b04141>.

7 Přílohy

7.1 Kopie ^1H a ^{13}C NMR spekter látky 27



7.2 Kopie ^1H a ^{13}C NMR spekter látky 35



7.3 Kopie ^1H a ^{13}C NMR spekter látky 26

