

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra organické chemie



Syntéza neolignanů s benzofuranovým skeletem

Bakalářská práce

Autor: Lachetová Eliška

Studijní obor: Bioorganická chemie a chemická biologie

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

Olomouc 2019

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem předloženo bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Jiřího Pospíšila, Ph.D, a že jsem použila pramenů, které cituji v seznamu použité literatury.

V Olomouci dne:

.....

Poděkování

Nejvíce ze všech bych chtěla poděkovat mým rodičům a sestře za velkou podporu. Dále mým kamarádům, jak v Olomouci, tak doma.

Také bych chtěla poděkovat mému konzultantovi Mgr. Františku Zálešákovi za cenné rady a trpělivost. KOCH za příjemnou atmosféru v laboratořích, kam se vždy ráda vracím. Velké poděkování také patří mému vedoucímu RNDr. Jiří Pospíšil, Ph.D.

Ráda bych také poděkovala Interní Grantové Agentuře Univerzity Palackého v Olomouci (grant IGA_PrF_2019_027) za finanční podporu mého výzkumu.

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení autora:	Eliška Lachetová
Název práce:	Syntéza neolignanů s benzofuranovým skeletem
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Katedra Organické chemie, Přírodovědecké fakulta, Palackého Univerzita v Olomouci
Školitel:	RNDr. Jiří Pospíšil, Ph.D
Rok obhajoby:	2019

Abstrakt:

Bakalářská práce popisuje vývoj metody založené na radikálovém CDC couplingu využitelných pro syntézu Boehmananu H. Převážně se zabývá přípravu čtyř klíčových výchozích látek vycházejících z vanilinu a kyseliny ferulové. Tyto látky jsou transformovány pomocí radikálové cyklizace na benzofuran. Teoretická část je literárním přehledem zachycujícím výskyt boehmananů a ostatních neoligannů v přírodě, jejich biologickou aktivitu a také popisuje některé obecné metody jejich přípravy.

Klíčová slova:	benzofurany, neolignany, boehmenany, přírodní látky, syntéza
Počet stran:	48
Počet stran příloh:	9
Počet příloh:	1
Jazyk:	Čeština

Bibliographical identification

Author's first name and surname:	Eliška Lachetová
Title:	Synthesis of neolignan with benzofuran skelet
Type of thesis:	Bachelor
Department:	Department of Organic chemistry, Faculty of Science, Palacký Univerzity
Advisor:	RNDr. Jiří Pospíšil, Ph.D
The year of presentation:	2019

Abstract:

The bachelor thesis describes the development of a syntetic method based on the radical CDC coupling that should allow the synthesis of Boehmanan H. It mainly deals with the synthesis of four key building blocks that finds their origin in vanillin and feluric acid. These substances are transformed by radical cyclization to benzofuran. The theoretical part focus on the litterature review about boehmanans and other neolignans occurrence in nature, their biological activity and describes selected general methods of their synthesis.

Key words:	benzofurans, neolignans, boehmanans, natural products, synthessis
Number of pages:	48
Number of appendix pages:	9
Number of appendices:	1
Language:	Czech

Seznam použitých zkratek

Mn (III) TPPOA	acetát tetrafenylporfyrinatomangan (III)
Mn (III) TPPCl	chlorid tetrafenylporfyrinatomangan (III)
DIPEA	diisopropylethylamin
LAH	lithiumaluminiumhydrid
HRP	křenová peroxidáza
SARS	studie vztahu mezi strukturou a aktivitou
AgO	oxid stříbrný
ekv.	ekvivalent
RT	laboratorní teplota
pTSA	<i>para</i> -toulensulfonová kyselina
DCM	dichlormethan
TBDMS	<i>tert</i> -buthyldimethylsilyl
TBATB	tetrabutylamonium tribromid
THF	tetrahydrofuran
m.p.	bod tání
EtOAc	ethylacetát
PCC	pyridinium chlór chromát
NaH	hydrid sodný
LiHMDS	lithium hexamethylsilyl
LDA	lithium diisopropylamid
RVO	rotační vakuová odparka
α_D^{20}	specifická rotace
CDC	křížový dehydrogenační kapling

Obsah

Seznam použitých zkratk	6
1. Úvod	8
1.1 Cíle práce	9
2. Teoretická část	10
2.1 Sekundární metabolity fenyylpropaniodového typu	10
2.1.1 Krátký přehled syntézy benzofuranů	12
2.1.2 Krátký přehled radikálových syntéz neoliganů	14
2.2 Biologická aktivita Boehmenanů	20
2.2.1 Protinádorový účinek	20
2.2.2 Antileishmaniální aktivita	21
2.2.4 Imunochemická aktivita	23
2.2.5 Předcházející práce ve skupině	24
3. Experimentální část	27
3.1 Obecné informace	27
3.2 Příprava fenolického couplingového fragmentu	28
3.3 Příprava MOM chráněného derivátu kyseliny ferulové	30
3.4 Příprava β -keto esteru 4	32
3.5 CDC coupling	35
4. Diskuze	36
4.1 Retrosyntéza	36
4.2 CDC coupling	37
5. Závěr	46
6. Použitá literatura	47

1. Úvod

Přírodní látky rostlinného původu jsou nepřehlednou zásobárnou nových strukturních motivů a látek s různou biologickou aktivitou. Je zajímavé, že na konci 20. století začal převládat názor, že tzv. high-throughput screening velkých knihoven látek, přinese odpověď na všechny naše otázky, co se týče biologické aktivity. Výsledky takto orientovaného výzkumu, ale měli nulový impakt na léčiva skutečně uvedená do praxe. Z tohoto důvodu, byl názor na „vše zachraňující“ high-throughput screening přístup k výzkumu nových léčiv na počátku tohoto milénia přehodnocen. Ukázalo se, že nové a citlivější extrakční metody spojené s lepšími biologickou aktivitou řízenými screeningovými metodami vedou k objevení nových strukturních motivů a „leading compounds“ mnohem častěji. Jako příklad může sloužit výzkum v oblasti sekundárních rostlinných metabolitů fenylypropanoidního typu. Za posledních deset let (2008-2018) bylo izolováno a identifikováno neskutečných 896 strukturně nových biologicky aktivních molekul.

V naší výzkumné skupině se dlouhodobě zabýváme vývojem nových syntetických postupů umožňujících diverzně orientovanou syntézu přírodních látek a jejich derivátů a vývojem nových syntetických metod umožňujících rychlou a modulární syntézu komplikovaných syntetických building bloků. Při návrhu knihoven malých organických látek se spoléháme a inspirujeme přírodními látkami, zatímco v případě syntetických metod se nevyhraňujeme na jednu jedinou oblast, ale spíše se inspirujeme a navrhujeme takové syntetické postupy a metody, které umožňují co nejkratší cestu k cíli. V mém případě se tento zájem zaměřil na skupinu fenylypropanoidních látek patřících do skupiny fenolických sekundárních metabolitů rostlin. V oblasti organické syntézy jsem se zase zaměřila na vývoj nových radikálových couplingů vedoucích k syntéze benzofuranového kruhu.

Cílem mé bakalářské práce je tedy vymýtit cestu k látce ležící na pomyslném průsečíku mezi přírodním motivem a syntetickou metodou. Takovýto „průsečík“ představuje rodina přírodních látek nazvaných obecně boehmenany. Tyto látky vyskytující se např. v keři Piper Regnelli (*Hibicus Canabinnus*) byly detekovány na biologickou aktivitu zaměřených screeningových testech. Biotesty byly při této

příležitosti zaměřené na imunochemickou a protinádorovou aktivitu. Tyto výsledky nás zaujaly, a tak jsme se rozhodli připravit dotyčné přírodní látky s cílem ověřit tyto první údaje. Mým mytickým cílem se stala touha vymýtit cestu umožňující přípravu boehmananu H.

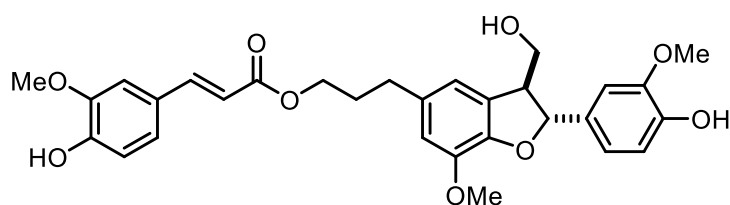
V rámci této bakalářské práce bych chtěla nejprve čtenáři představit v teoretické části vybrané obecné syntetické postupy užívané při syntéze benzofuranů a dihydrobenzofuranů (neolignanů) a následně bych se podrobněji věnovala samotné skupině rostlinných sekundárních metabolitů neolignanů s hlavním zřetelem na jejich biologickou aktivitu. Dále bych čtenáři ráda přiblížila boehmenany, jejich syntézu a biologickou aktivitu, závěrem pak přednesla dosažené výsledky spolu s diskuzí umožňující zařadit můj příspěvek do celkového obrázku naší snahy o přípravu boehmenanů.

1.1 Cíle práce

Jak již bylo zmíněno, cílem mé práce je vykonat pomyslný průzkum přípravy výchozích látek a nastínit možnost jejich propojení na přípravu boehmananu H.

Přesněji jsou cíle mé práce naznačeny níže:

1. Vypracuji rešerši zabývající se syntézou benzofuranů a dihydrobenzofuranů
2. Nastíním cestu k přípravě boehmananu H
3. Charakterizuji všechny připravené látky pomocí dostupných fyzikálně-chemických metod



Obr. 1: Boehmanan H.

2. Teoretická část

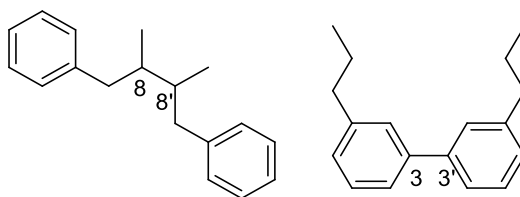
2.1 Sekundární metabolity fenylypropanoidového typu

Piper Regnelli je keř široce rozšířený v tropických oblastech a využívaný v tradiční medicíně. Fytochemické testy provedené u jedinců tohoto druhu ukázaly, že keře obsahují několik tříd fyziologicky aktivních přírodních látek. Pozornost vědců přitáhli k těmto keřům zastánci tradiční čínské medicíny, kteří využívali rozetřené listy těchto keřů jako antidoty při otravě jedovatými houbami. Dále, ale již méně rozmanitěji, tyto rychle rostoucí rostliny našly své uplatnění jako zdroj vlákna celulózy v a papírenském průmyslu.¹



Obr. 2: Keř *Piper regnelli*

Jak již bylo nastíněno *P. regnellii* je zdrojem vysoce biologicky aktivních látek, kde jako nejdůležitější z nich byly identifikovány látky s polyoxidovanými fenylypropanoidními strukturami. Tyto látky patří zejména do skupiny dimerů fenylypropanoidů, lignanů a neolignanů. Je známo, že tyto důležité sekundární rostlinné metabolity mají různé biologické aktivity.² Tyto dimery se obecně dělí na dvě skupiny, lignany a neolignany, a toto rozdělení je založeno na jejich vazebném spojení (spojení dvou monomerů): Lignan je látka spojující monomery pomocí C-8 a C-8' vazbou, všechny ostatní možné dimerizační produkty fenylypropanoidů se pak nazývají neolignany.³

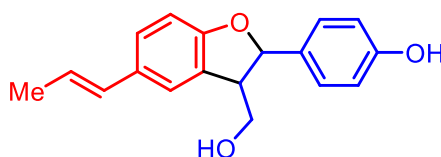


Obr. 3: Struktura 8,8'-lignanu a příklad jednoho z neolignanů – 3,3'-neolignanu.

Jak již bylo poznamenáno, lignany a neolignany vznikají dimerizací fenyl propanoidů. Počátečním krokem oxidační dimerizace je generace radikálu pomocí homolytického štěpení vazby O-H. Vznik radikálu je umožněn stabilizací vzniklého radikálu přes nenasyčený aromatický systém. Následná homo dimerizace vzniklých radikálů vede k tvorbě C-C vazby. Dimerizační proces je samozřejmě nestereoselektivní. Tvorba následných chirálních center probíhá tedy v postdimerizačním procesu, selektivita těchto procesů značně závisí na prostředí, kde k nim dochází. Výsledné lignany a neolignany tedy mohou vzniknout jako opticky čisté, ale i jako racemát.

Dokonce i stejné rostliny mohou produkovat stejný lignan, s různým enantiomerním nadbytkem v závislosti na oblasti, kde rostou (chiotropu). Obecně lignany vykazují antioxidační, protizánětlivé a protinádorové aktivity. Méně často byly některé lignany a neolignan detekovány jako možné látky proti HIV, leishmanii a malárii. Díky těmto potenciálním aplikacím v medicíně se syntéza ligananů a neolignanů těší značné oblibě a byly navrženy různé syntetické metody umožňující syntézu těchto látek a jejich derivátů. Zvláštní možností syntézy těchto látek umožňující syntézu cílového intermediátu je fenolický (phenolic) oxidativní coupling POC (látky s fenol-oxidační vazbou).⁴

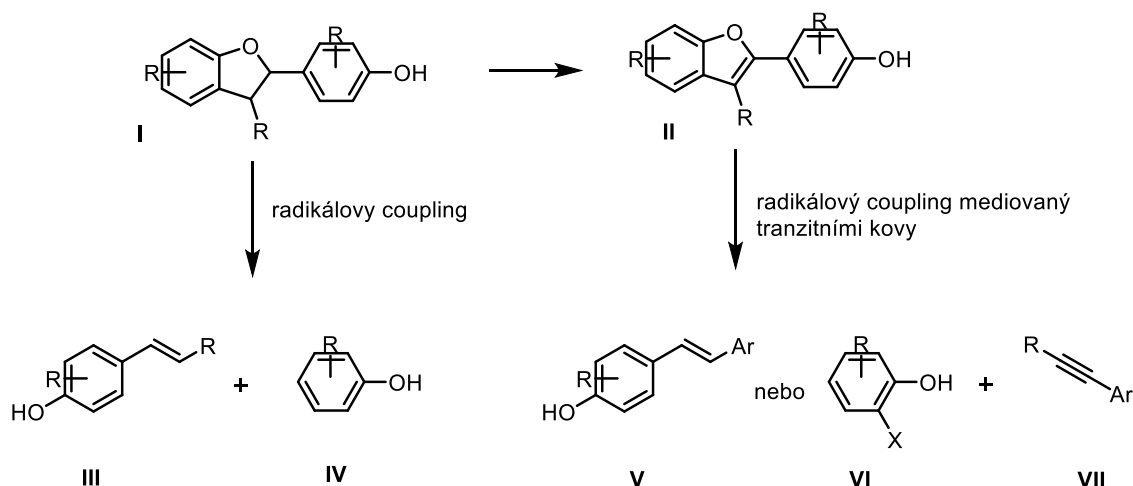
Lignany a neolignany jsou součástí rostlinných extraktů od nepaměti, neb jsou to sekundární metabolity. Mnohé z nich mají významnou biologickou aktivitu vůči molekulárním cílům. Jako typické příklady mohou sloužit phodophillotoxin. Jako typický příklad bych uvedla nedávnou studii, která při extrakci superkritickým CO₂ z keře *Piper regnellii* izolovali a identifikovali několik ligananů a neolignanů přímou cestou. Z těchto látek, bych se zaměřila na conocarpan (Obr. 4). Sloučeninu, která vykazovala aktivitu vůči malárii a tuberkulóze.



Obr. 4: Conocarpan (8,3'-dimer)

2.1.1 Krátký přehled syntézy benzofuranů

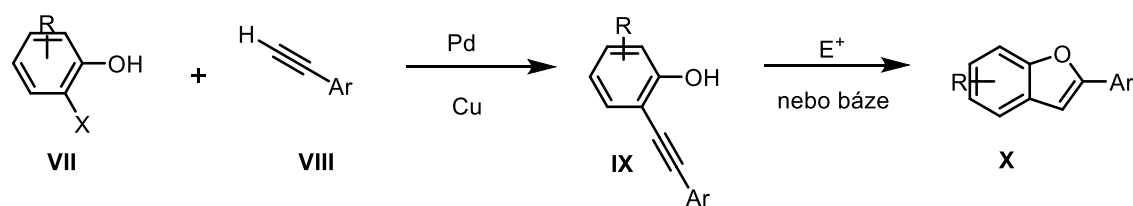
Základní neolignanový skelet (Obr. 5) může být připravena mnoha rozdílnými způsoby. Pokrytí všech možných syntetických postupů je opravdu mimo rozsah této bakalářské práce, a proto se zaměřím pouze na dva nejčastěji používané a představím je na několika příkladech.



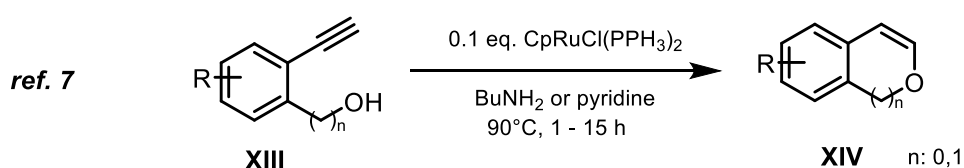
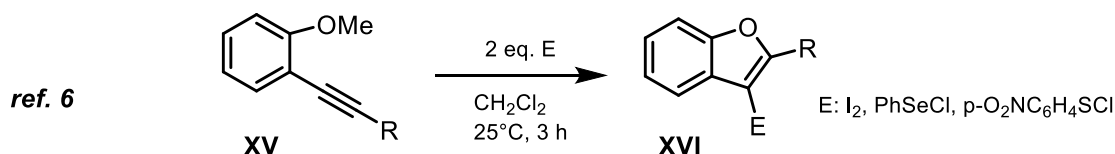
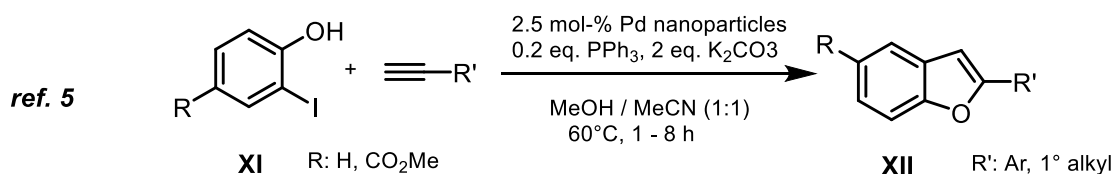
Obr. 5: Syntetické přístupy k benzofuranovému skeletu neolignanů

2.1.1.1 Pomocí tranzitními kovy mediováných cross-couplingových reakcí

Inter a intramolekulární cyklizace zacílená na vznik benzofuranů ve většině případů využívají Sonogashira coupling jako klíčového kroku k přípravě alkynového prekurzoru **X**. Ten je pak cyklizován pomocí intramolekulární adice alkoholu na takto generovaný aryl alkyne (Obr. 6 a Obr. 7).

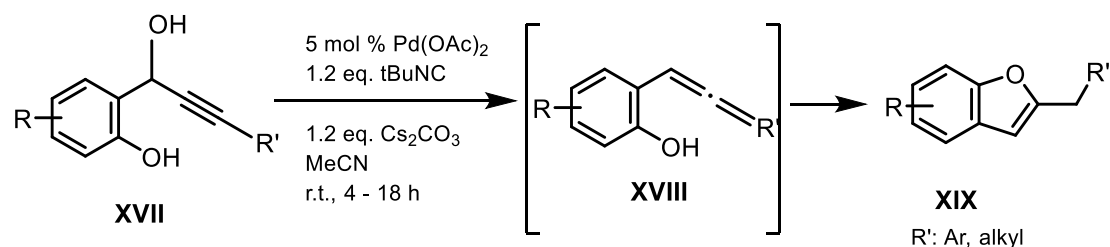


Obr. 6: Intramolekulární adice alkoholu na alkynový motiv – využití Sonogashira couplingu



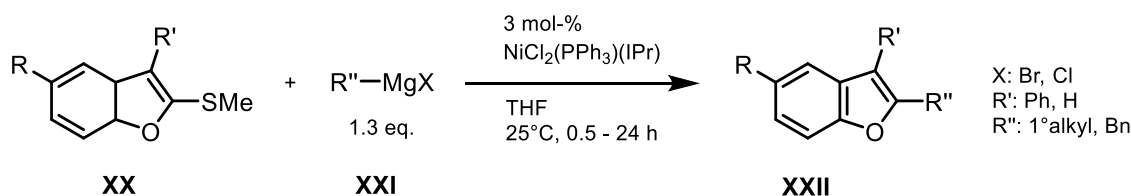
Obr. 7: Typické příklady cyklizačních podmínek spojených s tvorbou benzofuranů⁵⁻⁷

Další možností jak připravit benzofuranové skelety pomocí intramolekulární cyklizace, je např. Pd-mediovaná deshydroxylační syntéza allenulového strukturního motivu. *In situ* generovaný allen **XVIII** následně podléhá spontánní cyklizaci za vzniku benzofuranu **XIX**.



Obr. 8: Dehydroxylativní intramolekulární cyklizace.⁸

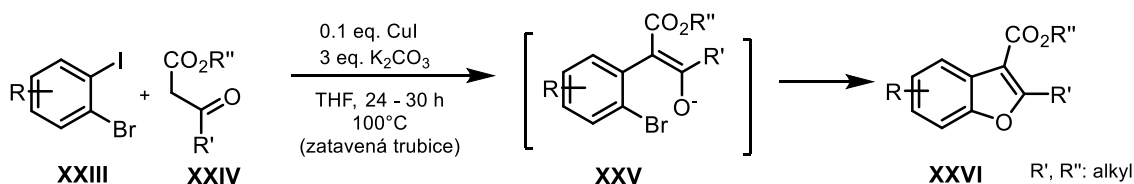
Obdobně lze připravit substituované benzofurany **XXII** z derivátů thioderivátů **XX** pomocí Ni – katalyzovaného cross-couplingu s Grignárovými činidly (Kumada coupling, Obr. 9).



Obr. 9: Příprava benzofuranů **XXII** pomocí Ni-katalyzovaného Kumada couplingu⁹

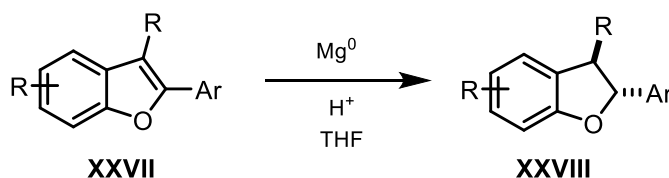
Speciálním případem tranzitními kovy mediovaného intermolekulárního couplingu je reakce mezi dihalogenidem **XXIII** a β-ketoesterem **XXIV**. V tomto případě dochází

nejprve v přítomnosti Cu^{I} solí a báze k Ullmanovu couplingu mezi aryl jodidem **XXIII** a C-nukleofilním keto esterem **XXIV** ke vzniku intermediátu **XXV**. Ten podléhá *ipso* substituční cyklizační reakci (S_{Ar} – adičně-eliminální mechanismus) za vzniku benzofuranového kruhu **XXVI**. Reakce musí být prováděna za absence O_2 , který způsobuje oxidace $\text{Cu}^{\text{I}} \rightarrow \text{Cu}^{\text{II}}$ a zamezuje tak inserci Cu^{I} o vazby uhlík-brom (Obr. 10).¹⁰



Obr. 10: Příprava 2,3-disubstitovaných benzofuranů pomocí tandemové reakce Ullmanův coupling/ S_{Ar} ¹⁰

U všech těchto postupů, ale nakonec musí dojít k redukci vazby C2-C3, tak aby vznikl *trans* substituovaný 2,3-dihydrobenzofuran **XXVIII** (Obr. 11). K dnešnímu dni existuje pouze jeden typ reakčních podmínek umožňující *trans* redukci¹¹, který je založen na redukci mediované pomocí Py kovu.

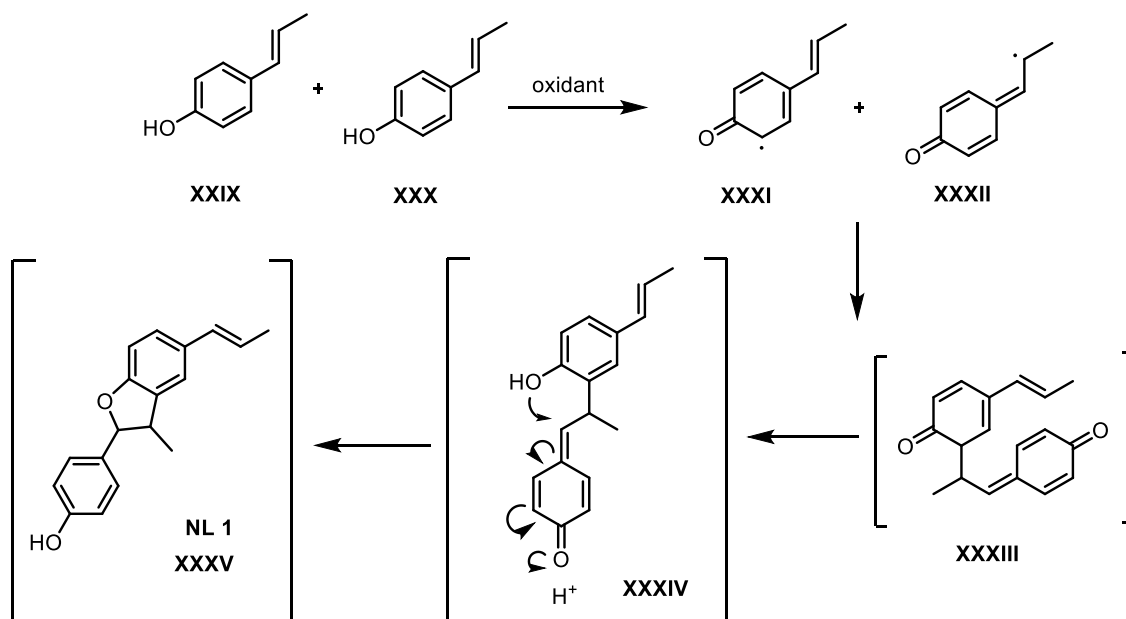


Obr. 11: Jediný systém umožňující selektivní *trans* redukci benzofuranů **XXVII**¹¹

2.1.2 Krátký přehled radikálových syntéz neoliganů

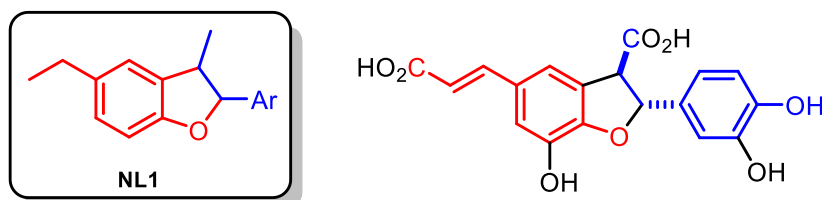
V přírodě jsou lignany a neolignany dimery 4-hydroxyskořicových kyselin (HCA) a jejich analogů obsahujících další hydroxy skupiny na aromatickém jádře. Jejich biosyntéza vycházející z těchto látek je mediována pomocí peroxidáz a lakkáz a probíhá via fenol-založeného oxidačního couplingu (POC). Při této reakci nejprve vznikne C-C vazba spojující atomy uhlíku C5 (první monomer) a C8' (druhý monomer, označení C8' je zde pro odlišení druhého monomeru). Takto vzniklý adukt **XXXIII** podléhá následné neenzymatické cyklizační reakci, která vnáší do molekuly pozorovanou stereo informaci (Obr. 12). Na Obr. 12 je znázorněna dimerizace 5-8', která po následné cyklizaci vede ke vzniku nového neoliganu obecného vzorce **NL1** (NL1 pro nejčastěji se vyskytující typ neoliganového skeletu). Jak již bylo zmíněno, následná post-dimerizační cyklizace je neenzymatického typu. Ovšem takto vzniklý sekundární metabolit samozřejmě může, a také postupuje dalším enzymatickým oxidativním reakcím což má za následek, že

prvotní neolignanové molekuly jsou následně modifikovány a poskytují tak mnoho látek s velkou strukturní rozmanitostí a také biologickou aktivitou.¹²



Obr. 12: Fenolický oxidativní coupling (POC) probíhající pomocí radikálového mechanismu. Zde je mechanismus ukázán na příkladu 5,8'-dimerizačního procesu, který poskytuje neolignan 2,3-dihydrofuranového typu známého pod označením NL1 (neolignan 1 – tzn nejčastěji se vyskytující neolignanový skelet).

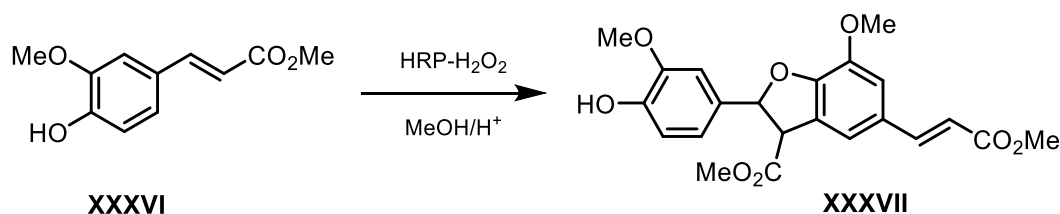
V této části teoretické části mé bakalářské práce se dále zaměříme na syntézu 2,3-dihydrobenzofuranů typu **NL1** v nichž je vazba 5-8' tvořena v prvním kroku syntézy (Obr. 13).



Obr. 13: Obecný vzorec neoliganu 2,3-dihydrobenzofuranového typu (**NL1**) spolu s typickým příkladem dimeru vzniklého POC homocouplingem z kyseliny ferulové.

V přírodě je tento typický neolignanový motiv připravován pomocí enzymů. Logicky tedy, mnoho syntetických metod přípravy neolignanů tohoto typu je založeno na využití izolovaných enzymů (např. HRP oxidáz nebo lakáz), a protože enzymy produkují tyto látky pomocí radikálového oxidativního couplingu, tedy radikálové homodimerizační reakce, syntetičtí chemici se zaměřili na vývoj radikálových oxidativních reakcí. A není lepšího oxidativního činidla, než je kyslík (oxidační činidlo využívané v přírodě enzymy). Takto se například inspirovali Cilliers a Singleton, kteří ponechali reagovat alkalický vodný roztok **XXXVI** s O_2 a identifikovali řadu produktů POC označených jako caffeiciny. Jeden z nich, označený caffeicin F (A), je neolignan typu 2,3-dihydrobenzofuran NL1 (Obr. 14). Chioccarra a spolupracovníci¹³ podrobili **XXXVI**

oxidativní reakci za použití HRP-H₂O₂ (křenová peroxidáza) ve vodném pufru (pH 3)/MeOH 10/90 (V/V) a získal benzofuranoidní dimer **XXXVII** ve výtěžku 30%.

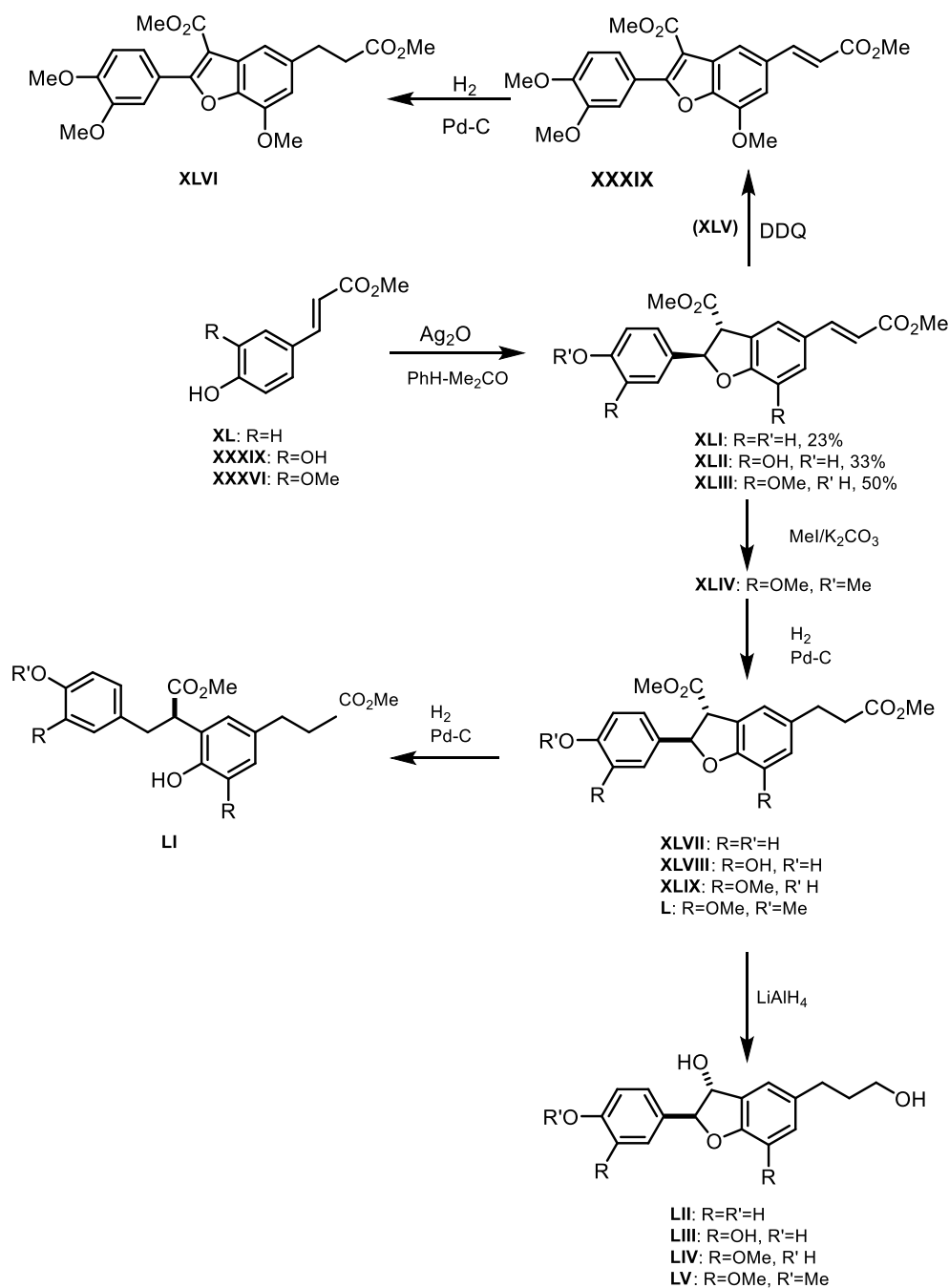


Obr. 14: Syntéza neolignanů prostřednictvím enzymatické oxidativní dimerizace.

Obecná reakce může být také provedena za použití jodosyl benzenu v přítomnosti Mn(III)TPPOAc jako katalyzátoru nebo stechiometrického množství jodosyl benzenu s MnTPPCI nebo dokonce v nadbytku H₂O₂ s MnTPPCI.¹³ Cílový benzofuran, pak byl izolovaný ve výtěžcích 22 %, 36 % a 25 %.

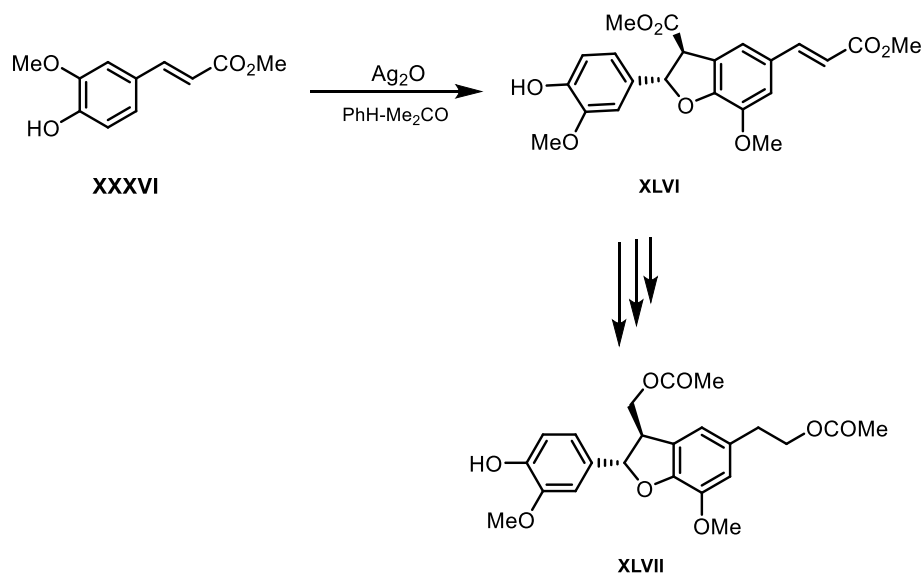
Obdobně lze katalyzovat reakce derivátů kyseliny kumarové **XXXVIII-XL**, za přítomnosti Ag₂O ve směsi benzen/acetone (Obr. 15). Tato dimerizace poskytne cílové dimery, benzofurany **XLI-XLIII** anebo **XLIV**. Následné postdimerizační modifikace spojené s oxidací, resp. redukcí násobných vazeb na benzofuranovém kruhu, anebo propylovém postranním řetězci poskytly dalších 11 neolignanových derivátů.¹⁴

Cílové molekuly následně vykazovaly silné inhibiční vlastnosti při oxidaci lipidů, jak v homogenizátu mozku potkana, tak v mikrosomech krysích jater. Další studie prokázaly, že látky podobné přírodnímu neoliganu Schizotenuinu D, mají silné inhibiční účinky na lipidovou peroxidaci.^{14,15}



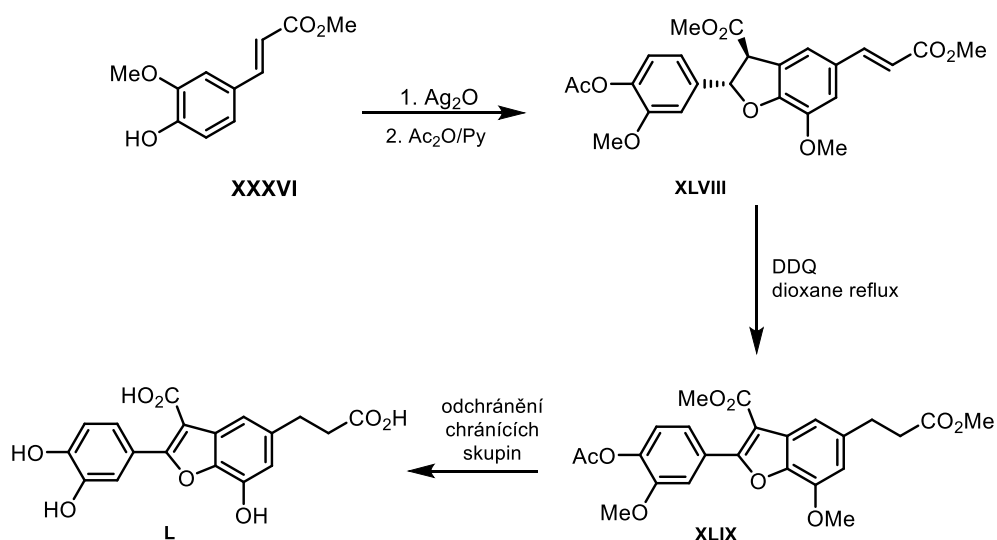
Obr. 15: Syntéza benzofuranů NL1 typu založených na POC reakci methylesterů HCA mediovaných pomocí Ag₂O.

Obdobně Pieters et. al.¹⁶ připravili deriváty homodimerních neolignanů a otestovali je na jejich protinádorovou aktivitu na 60-ti lidských nádorových buněčných liniích. Dihydrobenzofuranový dimer **XLII** se ukázal být nejúčinnější. Zde je také potřeba upřesnit, že *2R*, *3R* enantiomer byl aktivnější a to až 5 krát víc, než *2S*, *3S* enantiomer. Následné studie ukázaly, že obecně dihydrobenzofuranové deriváty jsou bioaktivní, a že jejich mechanismus účinku zahrnuje inhibici polymerace tubulinu. Carunchio a spolupracovníci¹⁸ ukázali, že látka **XXXVI** může být dimerizována také za katalýzy pomocí lakkáz ve vodném EtOH (pH = 6,0).



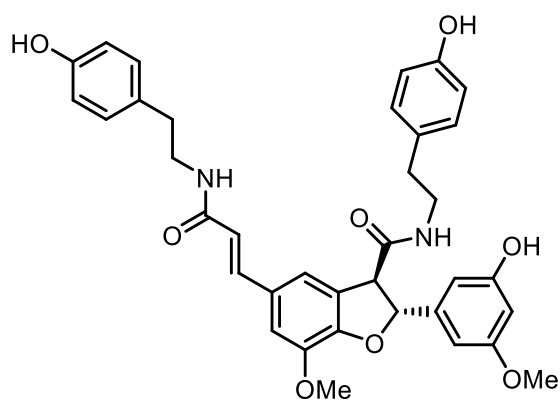
Obr. 16: Syntéza (\pm) látky **XLVII**

Radikálově iniciována dimerizace methyl esteru kyseliny ferulové **XXXVI**, bylo také využito při totální syntéze neolignanů tiruneesiinu.^{18,16}



Obr. 17: Syntéza benzofuranového jádra schizotenuinů.

Následná oxidace dimerizovaných produktů, neolignanů **XLVIII**, může následně poskytnout zajímavé biologicky aktivní látky, jako je např. látka **XLIX**, která působí inhibičně na 3 α -hydroxysteroid dehydrogenázu.¹⁵



Obr. 18: Struktura thoreliamidu A.

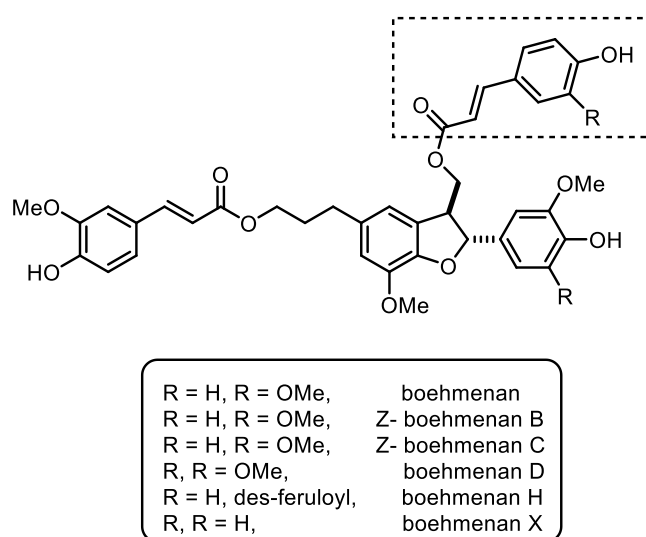
Dalším příkladem dihydrobenzofuranoidní biologicky aktivní látky thoreliamid A, který byl izolován v opticky neaktivní formě (jako racemát)¹⁹, a vykazuje protirakovinnou aktivitu. Série syntetických dihydrobenzofuranových lignanů a příbuzných benzofuranů byla také testovaná na jejich cytotoxicitu v panelu sestávajícím z různých lidských nádorových buněčných linií a na jejich antiprotozoální aktivitu vůči *Leishmania. donovani* (axenové amastigoty).²⁰

2.2 Biologická aktivita Boehmenanů

Již po staletí lidé používali léčivou rostlinu *Piper Regnelli* známou též jako kenaf, k léčbě modřin, biliózních onemocnění, horečky a puerperie. Listy kenafu byly používány také při léčbě dyzenterie, poruch srážlivosti krve a při bolestech v krku.²¹

Fytotoxická a fungitoxická aktivita byla nalezena také ve frakcích esenciálních olejů. Ukázalo se, že vodný extrakt této rostliny má hematologické a antioxidační vlastnosti. Kromě toho bylo ukázáno, že vodný extrakt z listů kenafu má u potkanů hepatoprotektivní vlastnosti, umožňující ochranu při poškození jater způsobené tetrachlormethanem a paracetamolem.²¹

Údaje o cytotoxické aktivitě ukázaly, že boehmenan H a threokarolignan K, jsou neúčinnějšími sloučeninami testovaných látek. Na základě těchto dat u testovaných látek lze naznačit, že přítomnost dihydrofuranového kruhu v konjugaci s ferulovou skupinou významně zvyšuje aktivitu.²²



Obr. 19: Zástupci třídy boehmenanů.

2.2.1 Protinádorový účinek

Testované látky pro stanovení cytotoxických účinků z extraktu ze semen kenafu a následně i oleje kenafu, byly vybrány na základě kolorimetrických testů založených na 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromidu (MTT) a sulforhodaminu B (SRB). Ukázalo se, že MTT je mimořádně vhodné zejména ke studiu *in vitro* účinků lymfokinů a následně i k měření chemosenzitivity lidských nádorových buněčných liniích. SRB je užitečný test cytotoxicity pro *in vitro* diagnostické studie.

SRB je aminoxanthenové barvivo, které se váže na bazické aminokyselinové zbytky v proteinech prostřednictvím svých dvou sulfonových skupin za mírně kyselých podmínek a disociuje za bazických podmínek. Testy MTT a SRB jsou běžné metody pro screening *in vitro* protinádorových léčiv. Tento výzkum spolu spojený s poznatky zjištěnými na základě tradiční medicíny naznačuje, že semeno kenafu může být slibným zdrojem protinádorových činidel. Testovaná frakce byla považována za vhodnou k dalšímu výzkumu a proto extrakty z KSE (listy) a KSO (olej) byly dále testovány a jejich jednotlivé složky separovány a pak odděleně testovány.²³

Extrakt získaný za pomoci superkritického CO₂ byl pak testován na buněčných liniích (M4T1), HeLa, karcinom plic (A549) a leukaemická (MOLT-4). Bylo ukázáno, že tento extrakt obsahoval směs aktivních látek jako jsou mastné kyseliny, fenolové kyseliny, fytoosteroly a tokoferoly. Nyam et al. pak v tomto extraktu identifikoval sedm hlavních fenolických sloučenin: kyselinu gallovou, kyselinu *p*-hydroxybenzoovou, kyselinu kofeinovou, kyselinu vanilovou, kyselinu syringovou, kyselinu *p*-kumarovou a kyselinu ferulovou. Dále byly přítomny mnohé další deriváty fenolů. Tento typ experimentu nám pak ukázal, že nepřekvapivě polyfenoly jsou hlavními sekundárními metabolity s antioxidačními a antiproliferačními účinky. Tyto molekuly tak na buňkách mohou působit jako činidla blokující karcinom, brání zahájení karcinogenního procesu a inhibující podporu a progresi rakoviny. Ve výše citované studii obsahoval extrakt KSE vyšší obsah fenolů než KSO. Zároveň cytotoxická aktivita byla jednoznačně vyšší. Toto zjištění ukázalo, že fenolické sloučeniny v kenafovém semeni jsou zodpovědné za cytotoxické vlastnosti těchto rostlin.^{23,24}

2.2.2 Antileishmaniální aktivita

Leishmanióza je tropické a subtropické onemocnění způsobené parazitem rodu *Leishmania*. V závislosti na imunitním stavu hostitele a druhů parazitů se onemocnění může projevit ve třech různých klinických formách: kožní (často způsobené *Leishmania amazonensis*), deformující muko-kožní (často způsobené parazitem *Leishmania braziliensis*) či fatální viscerální (způsobované parazitem *Leishmania donovani*).²⁵

Stejně jako u některých dalších tzv. „Zanedbaných onemocnění“ způsobených protozoálními parazity, jako je malárie (*Plasmodium falciparum*) či Africká trypanozomiáza (*Trypanosoma cruzi*), jsou ovšem onemocnění způsobené těmito organizmy značně upozaděny z důvodu ekonomické zaostalosti daných oblastí. Tedy,

dostup léčby spolu s možnostmi léčby takto komplexních onemocnění je dosti nemožné kvůli nedostatku účinných a cenově dostupných léků. Zároveň samozřejmě dochází ke zvyšování odolnosti parazitů vůči známým lékům a léčivům. Onemocnění leishmaniózou má endemický výskyt a vyskytuje se v 88 tropických a subtropických zemích, kde je tak ohroženo na 350 milionů lidí.

Navzdory nedávným pokrokům v nových antileishmaniálních látkách vyžaduje léčba všech formách leishmaniózy několik, potenciálně toxických a bolestivých injekcí léčiva založeného na pentavalentních antimonátech.²⁵

Tato látka je nejenom toxická ale její účinnost je i nadále snižována zvyšující se rezistencí parazitů na tento typ léčby. Při hledání nových léků proti leishmanióze byly popsány aktivní přírodní látky a jejich deriváty a to včetně neolignanů. Nejvyšší účinnost byla pozorována u některých β -ketosulfidů, jako je (3,4-dimethoxy) -8- (4'-methylthiofenoxo) –propiofenon. Tyto látky jsou silným inhibitorem polymerace tubulinu a působí na kolchicin. Tubuliny u lidí a parazitů mají odlišnou primární aminokyselinovou sekvenci a tedy polymerační vlastnosti. Výše zmíněná studie, pak potenciálně umožňuje využít vlastnosti neolignanů k inhibici mikrotubulů.²⁵

Syntetické dihydrobenzofuranové lignany a příbuzné benzofurany, které obsahují známý farmakofor pro inhibici polymerace tubulinu v místě kolchicinu, (dvě variabilní aromatické domény, rovněž uspořádaných linkerů) byly prokázány jeho aktivní látky proti lidským nádorovým buněčným liniím s antitubulinovými vlastnostmi. Odlišné vztahy mezi strukturou a aktivitou těchto látek při interakcích s lidským a protozoálním tubulinem, a tudíž i pro cytotoxicitu na lidských buňkách a prvocích, dávají naději, že tyto látky mohou být vyvinuty v nové antileishmaniální produkty. Vyhodnocení dat a porovnání antiprotozoálních (antiplasmodiálních, antitrypanosomálních a antileishmaniálních) cytotoxických vlastností řady známých a nově syntetizovaných dihydrobenzofuranových lignanů a benzofuranových derivátů následně umožnila aplikovat analýzu struktury a aktivity (QSAR) založené na Quasar modelování povrchových receptorů a navrhnout struktury nových slibných antileishmaniálních sloučenin.²⁶

2.2.3 Wnt/ β -Cateninová signalizace a onemocnění

Wnt signální dráha moduluje četné biologické procesy a její nadměrná aktivace souvisí s různými druhy onemocnění. Proto inhibice Wnt signálu může být účinnou strategií při léčbě těchto onemocnění. Buněčný luciferázový test zaměřený na signál Wnt

(TOP test) ukázal, že extrakt z *Hibiscus ficulneus* (znám jako pižmový sléz) inhibuje signál Wnt. Biologickou aktivitou řízená extrakce pomocí MeOH z rostlin kmene *H. ficulneus* poskytla čtyři známé lignany společně s kyselinou myricerovou. Sloučeniny účinně inhibovaly signál Wnt a vykazovaly cytotoxicitu na obou buňčných liniích závislých na Wnt (HCT116) a Wnt-independentní (RKO). Western blot analýza ukázala, že tyto látky snížily expresi plného, cytosolového a nukleárního β -cateninů spolu s c-myc v buňkách. Výsledky tak naznačují, že mohou inhibovat signál Wnt snížením hladin β -cateninů.²⁷

Kaskáda přenosu signálu WNT řídí nesčetné množství biologických jevů během vývoje a dospělosti všech zvířat a lidí. Paralelně aberantní signalizace Wnt je základem pro širokou škálu patologií. Většina savčích genomů, včetně lidského genomu, má 19 Wnt genů, které spadají do 12 podskupin Wnt.²²

2.2.4 Imunochemická aktivita

Makrofágy jsou typ diferencovaných buněk tkáně, které pocházejí z krevních monocytů. Buňky mají několik funkcí: (1) odstranění buněčných úlomků, (2) zabíjení patogenních mikroorganismů a (3) zpracování antigenů. Proto je aktivace makrofágů klíčovou událostí pro účinnou vrozenou imunitu. Když je tělo stimulováno buď patologickými podněty nebo poraněním, makrofágy se aktivují interakcí mezi povrchovými receptory a stimuly. Plná aktivace buněk také vyžaduje řadu intracelulárních signalizačních událostí řízených signalizačními enzymy, jako jsou proteinové tyrozin kinázy.

Makrofágy uvolňují četné protizánětlivé cytokiny, chemokiny, chemo atraktanty a cytotoxické molekuly. Velké množství makrofágů může způsobit kolaterální nebo těžké poškození spojené se zánětlivými onemocněními, jako je septický šok, revmatoidní artritida a arterioskleróza. Úspěšné řešení některých závažných stavů, proto závisí na účinné regulaci funkcí makrofágů.²⁸

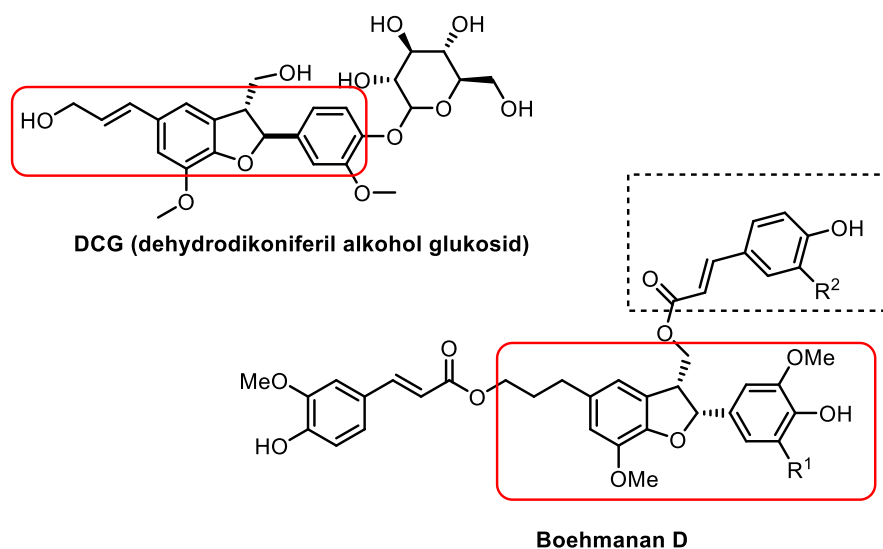
U *Hibiscus cannabinus* studie naznačuje, že farmakologické účinky extraktu (léčení horečky, bolesti, úplavice, biliózních stavů a hepatitidy), mohou být zprostředkovány imunofarmakologickou selektivitou směrem k většině zánětlivým mediátorům. Celkové inhibiční účinky na funkční aktivaci makrofágů a zánětlivých podnětů nás však vedou k záměru považovat kenaf za slibnou protizánětlivou léčivou rostlinu schopnou léčit akutní nebo chronické záněty způsobené makrofágy (např.

septický šok a revmatoidní artritidu). Přestože molekulární mechanismus, kterým frakce z *H. cannabinus* inhibují prozánětlivé reakce, nebyl zcela objasněn, některé z látek způsobující tento typ interakcí byly identifikovány. ¹

2.2.5 Předcházející práce ve skupině

Cílem našeho výzkumu ve skupině je aplikovat takový postup, resp. metodu, která by byla vhodná pro syntézu benzofuranových skeletů obsažených v přírodních látkách (lignany a neolignany) a derivátech dihydrodikoniferilglukózy (**DCG**) (Obr. 20). Náš zájem o **DCG** byl způsoben jeho možnou aktivitou. Bylo totiž navrženo, že jeho deriváty mohou působit jako cytokininy (fytohormony) v signálních drahách rostlin.

Druhým cílem našeho zájmu jsou boehmenany (Obr. 19). Tyto látky byly identifikovány díky extrakčně řízeným biologickým testům různých rostlinných extraktů používaných v tradiční čínské medicíně.

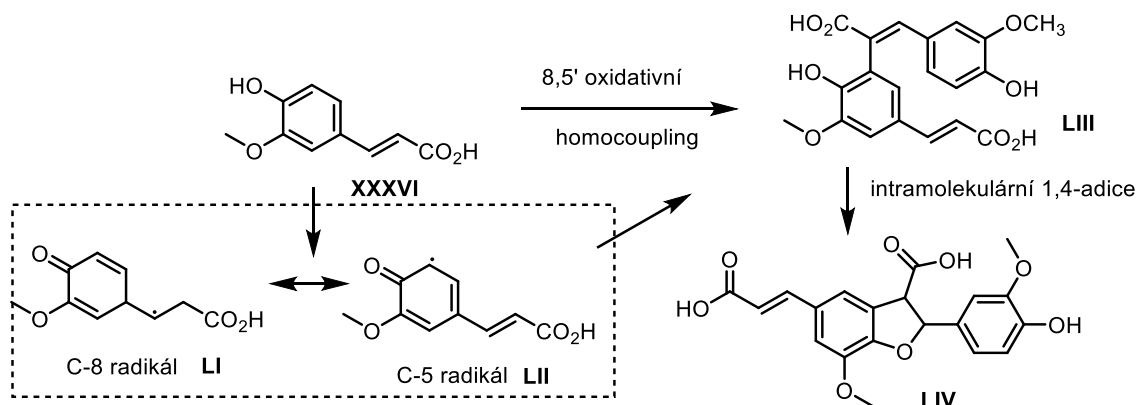


Obr. 20: Struktury DCG (dehydrodikoniferil alkohol glukosid) a boehmananu D

Naším cílem je tedy vyvinout novou syntetickou dráhu vedoucí k přípravě kostry dihydrobenzofuranového jádra (Obr. 20). Náš přístup by měl být založen na modulárním přístupu tak, aby oba aromatické kruhy skeletu mohly být nezávisle modifikovány již před syntézou celého dimeru.

Tento postup tedy *per say* vylučuje všechny homodimerizační metody běžně využívané při syntéze těchto skeletů (viz dříve, Obr. 21). Na druhou stranu metoda založená na oxidativní adici generovaných radikálů umožňuje rychlou, krátkou a velmi efektivní instalaci cílového benzofuranového skeletu přírodních neolignanů. Z tohoto

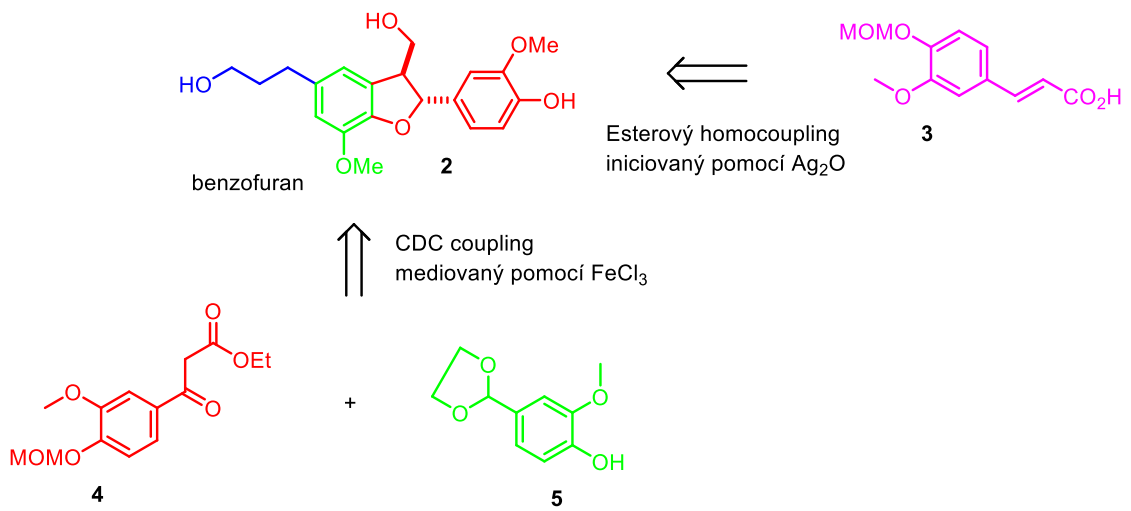
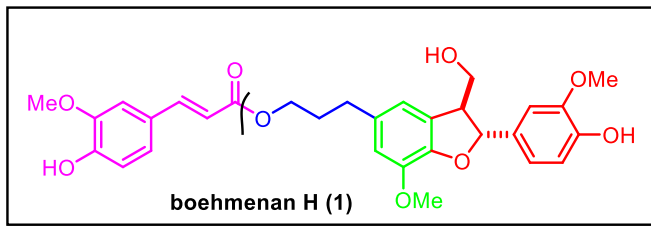
důvodu jsme se i tak rozhodli založit náš přístup na oxidativní adici katalyzované železem (III).



Obr. 21: Oxidativní homocoupling ferulových radikálů.

Syntéza cílové struktury neolignanů (Obr. 22) byla tedy založena na CDC couplingu aldehydu **5** a β -ketoesteru **4**. Obdobně, pomocí homocouplingové reakce mohla být syntéza založena na esteru **3**. Tento ester může být lehce připraven dle námi nedávno vyvinutého protokolu³⁵ založeném na využití mikrovlnného záření. Syntéza vychází z vanilinu a poskytuje cílený produkt v 98% a vynikající E/Z selektivitě (> 98:1). Reakční partneři pro CDC-couplingovou reakci, aldehyd **5** a β -ketoester **4**, pak také mohou být připraveni z vanilinu (ketoester **4** ve 3 krocích a celkovém výtěžku 18 %).²⁹

V předchozí práci naší skupiny jsme vyvinuli obecný postup ke klíčovému skeletu DCG a boehmenanů. Bohužel se však ukázalo, že tento postup generuje cílové struktury ve velice nízkém výtěžku. Z tohoto důvodu jsme se zaměřili na nový přístup k tomuto problému, který by nám umožnil připravit tyto látky pomocí modifikovaného postupu. Toto naše snažení tak bude cílem další části této práce.



Obr. 22: Retrosyntéza cílového boehmenanu H

3. Experimentální část

3.1 Obecné informace

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

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

K měření NMR spekter byl použit spektrometr JEOL ECA400II pracující při frekvenci 399,78 MHz (^1H) a 100,53 MHz (^{13}C). Měření byla prováděna za laboratorní teploty, přičemž vzorky byly rozpuštěny a následně měřeny v jednom z následujících rozpouštědel: aceton- d_6 , CDCl_3 anebo DMSO- 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 nedeuterovaných rozpouštědel v daném rozpouštědle jsou následující: CDCl_3 (7,27 ppm), DMSO- d_6 (2,52 ppm) . Ve spektrech ^{13}C bylo využito ke kalibraci charakteristického signálu atomu ^{13}C substituovaného atomy vodíku 2H. Chemické posuny jsou následující: CDCl_3 (77,23 ppm, prostřední signál), DMSO- d_6 (39,52 ppm, prostřední signál). Finální produkty byly purifikovány pomocí kolonové chromatografie na silikagelu (viz výše). Měření hmotnostních spekter bylo realizováno na přístroji značky Waters (Q-TOF MICRO). Elementární analýzy byly provedeny na přístroji EA1112 Flash analyser (Thermo-Finnigan). Teploty tání byly měřeny na přístroji SMP 30 (Stuart®) a nejsou korigovány. Průběh reakcí byl monitorován pomocí tenkovrstvé

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

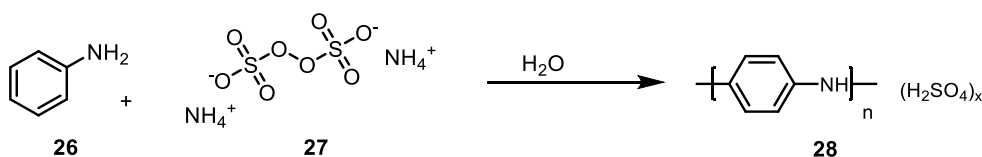
Vizualizační roztoky pro TLC

Metody přípravy:

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

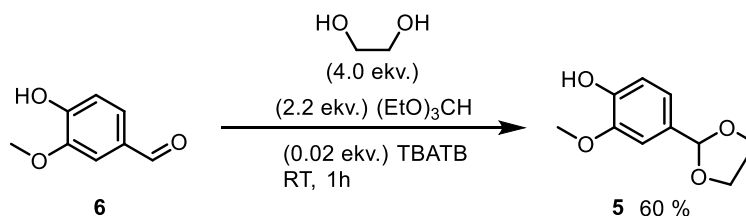
3.2 Příprava fenolického couplingového fragmentu

3.2.1 Příprava polyanilinsulfátu³¹



Anilin (2,3 ml) byl smíchán s destilovanou vodou (100 ml) a peroxodisíranem sodným (5,71 g) rozpuštěný v destilované vodě (100 ml). Roztok byl po 15 minutách zfiltrován a filtrační koláč byl promyt vodou (2 x 20 ml) a acetonem (2 x 20 ml). Vznikl černý prášek (2,1 g), který byl uchován v exikátoru.

3.2.2 Chránění aldehydové skupiny pomocí ethylenglykolu³²



Vanilin (100 mg, 0,66 mmol, 1.0 ekv) byl přidán k roztoku ethylen glykolu (0,300 ml, 8.0 ekv) a $(\text{EtO})_3\text{CH}$ (0,480 ml, 4.4 ekv) a výsledný roztok byl míhán při RT a TBATB (12,67 mg, 0.04 ekv) byl přidán ve třech částech a ponechán reagovat 1 hodinu. Reakce

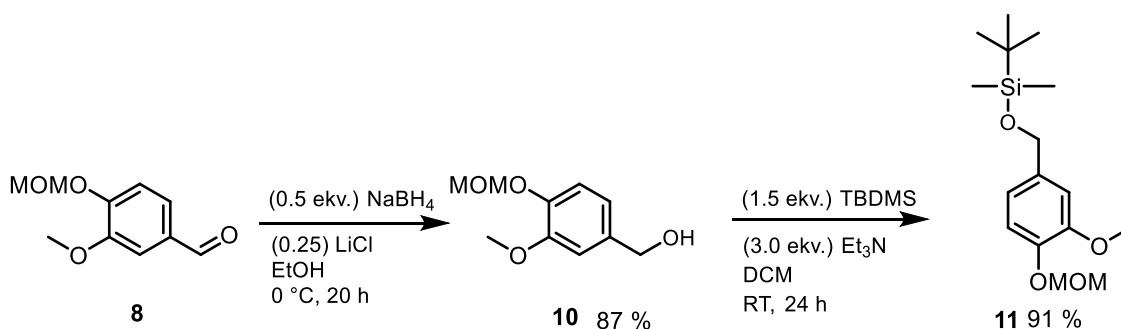
byla ukončena přidavkem vody (10 ml) a vzniklá směs byla extrahována pomocí EtOAc (3 x 15 ml), sušena nad MgSO₄ a odpařena na RVO. Surový produkt obsahoval 77 mg (60 %) nažloutlého oleje.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm) = 3.84 (s, 3H), 3.96 – 4.18 (m, 5H), 5.73 (s, 1H), 6.80 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.06 (ddd, *J* = 7.5, 1.5, 0.7 Hz, 1H), 8.43 (s, 1H).

¹³C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm) = 56.2, 65.2, 103.3, 110.4, 115.1, 120.8, 132.2, 146.9, 147.4.

MS (ES⁺), *m/z* (%): 197 [M+H]⁺, 235 [M+K]⁺

3.2.3 Chránění aldehydové skupiny pomocí redukce³³ a následné reakce s TBDMS³⁴



Vanilin **8** (200 mg, 1,02 mmol, 1.0 ekv) byl přidán k ethanolu (0,25 ml,) a do vzniklého roztoku ochlazeného na 0 °C (voda/led) byl přidán NaBH₄ (10 mg, 0.26 mmol, 0.5 ekv) a LiCl (5,6 mg, 0,13 mmol, 0.05 ekv). Výsledná směs byla ponechána míchat 20 hodin, následně byl roztok odpařen na RVO. Následně byla přidána H₂O (3 ml) a výsledný roztok byl extrahován pomocí EtOAc (3x5 ml), sušen nad MgSO₄, filtrován a odpařen na RVO. Poté byla provedena purifikace pomocí sloupcové chromatografie na SiO₂ pomocí hexan:EtOAc = 2:1. S výtěžkem 87 %.

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.11 (dd, *J* = 8.2, 5.4 Hz, 1H), 6.95 (dd, *J* = 5.0, 2.0 Hz, 1H), 6.85 (dd, *J* = 8.2, 2.0 Hz, 1H), 5.21 (d, *J* = 2.7 Hz, 2H), 3.89 (d, *J* = 1.1 Hz, 3H), 3.50 (s, 3H), 1.54 (s, 1H), 1.48 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H). ¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 150.00, 146.06, 135.40, 119.50, 116.46, 110.89, 95.62, 65.37, 56.28, 55.96.

Takto připravený alkohol **10** (50 mg, 0,25 mmol, 1.0 ekv) byl smíchán s DCM (2 ml) a do výsledného roztoku byl přidán Et₃N (0,105 ml, 3.0 ekv) následovaný pomocí TBDMSCl (87 mg, 1.5 ekv). Reakce byla ukončena po 24 hodinách přidavkem vody (5 ml) a fáze byly separovány. Vodná fáze byla extrahovaná pomocí CH₂Cl₂ (3x10 ml), sušena nad MgSO₄ a odpařena na RVO. S výtěžkem 91 %.

^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm) = 7.11 (dd, J = 8.2, 5.4 Hz, 1H), 6.95 (dd, J = 5.0, 2.0 Hz, 1H), 6.85 (dd, J = 8.2, 2.0 Hz, 1H), 5.21 (d, J = 2.7 Hz, 2H), 3.89 (d, J = 1.1 Hz, 3H), 3.50 (s, 3H), 1.54 (s, 1H), 1.48 (d, J = 6.4 Hz, 2H).

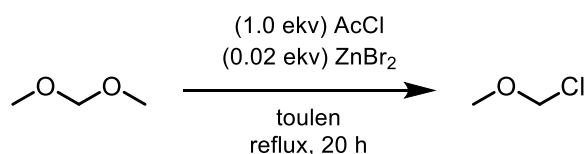
^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm) = 118.67, 116.78, 110.39, 96.12, 65.19, 56.59, 56.23, 26.40.

MS (ES⁺), m/z (%): 313 [M+H]⁺, 352 [M+K]⁺.

HRMS (ESI⁺) *calcd.* pro C₁₆H₂₉O₄Si [M+H]⁺: 313.1830, nalezeno 313.1830.

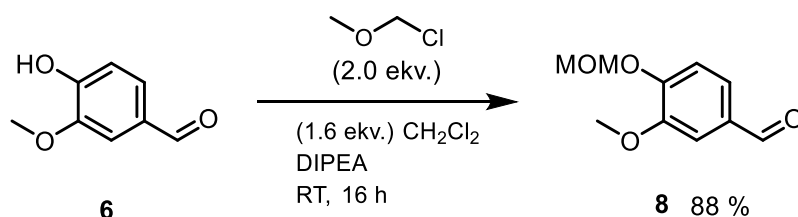
3.3 Příprava MOM chráněného derivátu kyseliny ferulové

3.3.1 Příprava zásobního roztoku MOM-Cl v toluenu



Trojhrdlá 500 ml baňka s magnetickým míchadlem, teploměrem, zpětným chladičem a příkapávací nálevkou, byla opatřena argonovým balónkem. Do této baňky byl umístěn dimethoxymethan (22,1 ml, 250 mmol, 1.0 ekv), toluen (66 ml, 3,8 M vůči dimethoxymethanu) a ZnBr₂ (bezvodý, 5,6 mg, 0,01 ekv). Acetyl chlorid (17,8 ml, 250 mmol, 1.0 ekv) byl umístěn do příkapávací nálevky, a poté postupně přidán do reakční směsi v průběhu 15 minut. Příkapávací nálevka byla následně promyta malým množstvím toluenu (5 ml). Reakce byla exotermní a teplota uvnitř reakční směsi rostla až na 45 °C a následně se sama ochladí na RT v průběhu 2-3 hodin. V tomto okamžiku byla reakce skončena. Výsledný roztok byl připraven k použití a dle ^1H NMR byl ohodnocen jako 2.1 M roztok.

3.3.2 Syntéza MOM chráněného vanilinu



Roztok vanilinu (10,0 g, 65,7 mmol, 1.0 ekv) v CH₂Cl₂ (66 ml, 1.0 M vůči vanilinu) byl ochlazen na 0 °C (lázeň voda/led) a DIPEA (18,3 ml, 105 mmol, 1.6 ekv, 2,1M roztok

v toluenu) byl pomalu přidán po 15 minutách byla chladicí lázeň odebrána a výsledná reakční směs byla ponechána míchat po dobu 16 hodin při RT. Nasycený roztok NH₄Cl (50 ml) byl přidán a výsledné vrstvy byly separovány. Vodná fáze byla extrahovaná pomocí CH₂Cl₂ (3x50 ml) a spojené organické vrstvy jsou promyty pomocí solanky (50 ml), sušeny nad Na₂SO₄, zfiltrovány a odpařeny na RVO. Získali jsme surový čistý produkt 11,4 g (88 %).

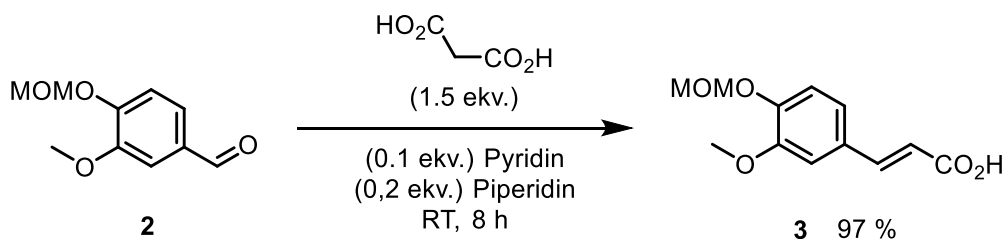
¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 9.86 (s, 1H), 7.44 – 7.41 (m, 2H), 7.28 (s, 1H), 5.32 (s, 2H), 3.94 (s, 3H), 3.52 – 3.51 (s, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 191.12, 152.09, 150.15, 131.16, 126.56, 114.74, 109.56, 95.09, 56.63, 56.14.

MS (ES⁺), m/z (%): 197 [M+H]⁺, 235 [M+K]⁺.

HRMS (ESI⁺) *calcd.* pro C₁₀H₁₃O₄ [M+H]⁺: 197.0808, nalezeno 197.0809.

3.3.3 Syntéza derivátu kyseliny felurové **3**



Chráněný aldehyd **2** (500 mg, 25.5 mmol, 1.0 ekv) a kyselina malonová (530 mg, 51.0 mmol, 1.5 ekv) byly rozpuštěny ve Schlenckově nádobě v bezvodém pyridinu (0,85 ml, 3.0 M vůči **2**) za laboratorní teploty a výsledný roztok byl míchán po dobu 5 minut. Do tohoto roztoku byl přidán piperidin (50,4 μl, 5.1 mmol, 0.2 ekv) a výsledná směs byla míchána při 85 °C po dobu 8.5 hodin. Reakční směs byla poté ochlazena na RT a obsah byl vylit na směs voda/led (100 g/150 ml v kádince o objemu 500 ml). Výsledná směs byla míchána po dobu 5 minut a pH směsi bylo okyseleno na pH=3 pomocí 1 M roztoku HCl. Po rozpuštění ledu byla vyloučená karboxylová kyselina zfiltrována a sušena při 30 °C ve vakuové sušárně. Kyselina **3** byla ve formě průhledného oleje, 403 mg (97 %).

B.t. = 133 – 134 °C

¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm) = 7.72 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 7.16 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.11 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 7.08 (q, *J* = 1.8 Hz, 1H), 6.33 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 5.26 (s, 2H), 3.91 (s, 3H), 3.50 (s, 3H).

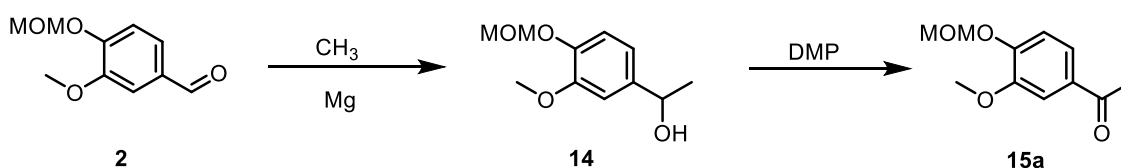
^{13}C NMR (100 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm) = 55.3, 56.1, 92.2, 112.1, 114.3, 121.2, 123.5, 128.0, 144.5, 148.9, 149.7, 168.2.

MS (ES^+), m/z (%): 239 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$, 277 [$\text{M}+\text{K}$] $^+$.

HRMS (ESI^+) *calcd.* pro $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_5$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$: 238.0841, nalezeno 238.0843.

3.4 Příprava β -keto esteru 4

3.4.1 Syntéza založená na Claisenově kondenzaci



Metoda A

V prvním kroce byl přidán jodmethan (37,5 ml,) a hořčík (14,5 mg, 0.6 mmol, 3 ekv), po refluxu (30 minut) a chlorid lithný (5,6 mg, 0,13 mmol, 0.05 ekv), směs byla ochlazená na $0\text{ }^\circ\text{C}$ byl po kapkách přidán roztok chráněného aldehydu **2** (100 mg, 0.51 mmol, 1.0 ekv) v suchém etheru. Ponechán refluxovat dalších 30 minut. Následně byla přidána solanka a roztok byl tři krát promyt EtOAc, následně byl sušen pomocí MgSO_4 a odpařen na RVO. Přechištění pomocí sloupcové chromatografie (hexan:EtOAc=4:1) a poskytl 57 mg (47 %) bílého produktu **14**.

Metoda B

Roztokem **8** (100 mg, 45,78 mmol, 1.0 ekv) v suchém etheru (10 ml) byl ochlazen na $0\text{ }^\circ\text{C}$ a MeLi (2.0 M roztok v Et_2O , 0,45 ml, 72,3 mmol, 3 ekv) byl přidán. Po dvou hodinách byla reakce ukončena přidáním vody (10 ml). Roztok byl extrahován Et_2O (3x10 ml), promyt solankou (10 ml), sušen nad Na_2SO_4 , zfiltrován a odpařen na RVO. Přechištění pomocí sloupcové chromatografie hexan:EtOAc= 4:1. Reakce poskytla produkt **14** (107 mg, 72%).

^1H NMR (400 MHz,) δ 7.11 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 6.97 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 6.87 (ddd, $J = 8.2, 2.0, 0.6$ Hz, 1H), 5.22 (s, 2H), 3.90 (s, 3H).

^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 150.00, 146.06, 135.40, 119.50, 116.46, 110.89, 95.62, 65.37, 56.28, 55.96.

MS (ES^+), m/z (%): 213 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$, 251 [$\text{M}+\text{K}$] $^+$.

HRMS (ESI^+) *calcd.* pro $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{O}_4$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$: 213.1121, nalezeno 213.1123.

Sekundární alkohol **14** (80 mg, 18,86 mmol, 1.0 ekv) byl rozpuštěn v CH₂Cl₂ (10 ml) a DMP (176 mg, 0,41 mmol, 1.1 ekv) byl přidán za RT. Reakce byla míchaná po dobu 10 minut a výsledný roztok byl zfiltrován přes Celite® a odpařen na RVO. Surový produkt byl následně čištěn pomocí sloupcové chromatografie hexan:EtOAc = 4:1. Výsledkem byla oranžová látka **15a** (59 mg, 73%).

B.t. = 52 – 54°C

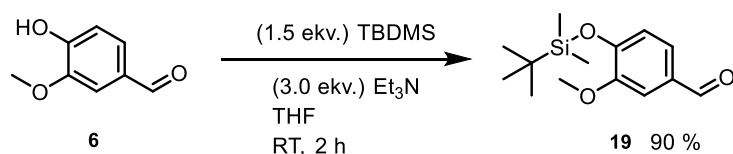
¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm) = 7.55 – 7.49 (m, 2H), 7.17 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 5.29 (s, 2H), 3.93 (s, 3H), 3.50 (s, 3H), 2.56 (s, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm) = 197.1, 151.0, 149.8, 123.10, 114.47, 110.65, 95.10, 56.53, 56.12, 26.38.

MS (ES⁺), *m/z* (%): 211 [M+H]⁺, 249 [M+K]⁺.

HRMS (ESI⁺) *calcd.* pro C₁₁H₁₅O₄ [M+H]⁺: 211.0965, nalezeno 211.0958.

3.4.2 Syntéza TBS chráněného β-ketoesteru via Claisenovu kondenzací



Vanilin (1 g, 5,8 mmol, 1.0 ekv) smíchán s DCM (25 ml) a TBDMS (2,2 ml, 1.5 ekv), postupně byl přidáván triethylamin (2,7 ml, 3.0 ekv). Reakce byla míchaná při RT po dobu 3 hodin. Následně byla pro ukončení reakce přidána voda a roztok byl tři krát promyt DCM, vysušen MgSO₄ a odpařen na RVO, aby poskytl produkt **19** (1,4 g, 90 %) jako bezbarvou kapalinu.

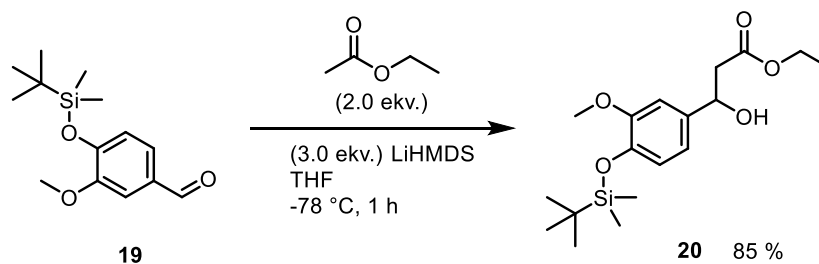
¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm) = 9.85 (s, 1H), 7.40 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 7.37 (dd, *J* = 8.0, 2.0 Hz, 1H), 6.96 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 3.87 (s, 3H), 1.00 (s, 9H), 0.19 (s, 6H).

¹³C NMR (125 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm) = -4.3, 18.6, 25.7, 56.1, 111.6, 118.7, 128.2, 131.7, 149.1, 150.7, 192.0.

MS (ES⁺), *m/z* (%): 267 [M+H]⁺, 306 [M+K]⁺.

HRMS (ESI⁺) *calcd.* pro C₁₄H₂₃O₃Si [M+H]⁺: 267.1411, nalezeno 267.1415.

Adice na aldehyd 19.



Bezvodý EtOAc (0,744 ml, 7,57 mmol, 1.2 ekv) byl smíchán s LiHMDS (7,56 ml, 1 M, 1.2 ekv) v THF (25 ml) a výsledný roztok byl ochlazen na -78 °C. Při této teplotě byla reakce ponechána míchat po dobu 30 minut. Následně byl postupně do roztoku přidáván roztok ochráněného aldehydu **5** (1,7 g, 6,32 mmol, 1.0 ekv) v THF a reakce byla ponechána reagovat po dobu 20 minut. Následně byl roztok tři krát promyt DCM, vysušen MgSO₄ a odpařen na RVO, aby poskytl adukt – alkohol **20** (1,8g, 85 %.).

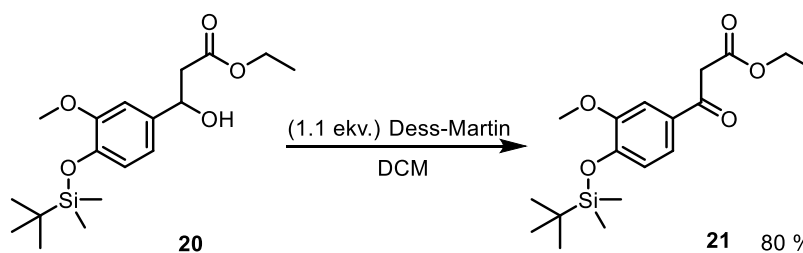
¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm) = 6.91 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 6.84 – 6.75 (m, 2H), 5.07 (dd, *J* = 9.1, 3.7 Hz, 1H), 4.18 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.81 (s, 3H), 3.19 (s, 1H), 2.79 – 2.65 (m, 2H), 1.26 (td, *J* = 7.3, 2.8 Hz, 6H), 0.98 (s, 9H), 0.15 – 0.13 (m, 6H).

¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm) = -4.5, 14.4, 18.6, 25.9, 43.6, 55.7, 61.1, 70.5, 109.8, 118.2, 121.0, 136.2, 151.3, 172.8.

MS (ES⁺), *m/z* (%): 356 [M+H]⁺, 394 [M+K]⁺.

HRMS (ESI⁺) *calcd.* pro C₁₈H₃₁O₅Si [M+H]⁺: 355.1935, nalezeno 355.1940.

Oxidace alkoholu na keton 21.



Následná oxidace pomocí reakce Dess-Martinového činidla (3,12 g, 7,35 mmol, 1.1 ekv) v roztoku DCM a látky **20** (2,30 mg, 6,47 mmol, 1.0 ekv) za RT. Po dobu 30 minut. Reakce byla ukončena a výsledný roztok filtrován přes Celite[®] a následně sušen pomocí MgSO₄ a odpařen na RVO. Přečištěn pomocí sloupcové chromatografie (hexan:EtOAc = 5:1). Výsledkem byla pevná oranžová látka (1,8 g, 80%).

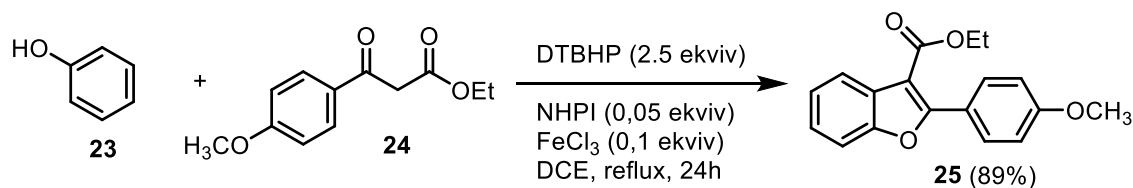
¹H NMR (400 MHz,) δ 7.52 (d, *J* = 2.1 Hz, 2H), 7.44 (dd, *J* = 8.3, 2.1 Hz, 2H), 6.88 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 4.21 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H), 3.94 (s, 4H), 3.86 (s, 6H), 1.25 (t, *J* = 7.1 Hz, 7H), 0.99 (s, 18H), 0.18 (s, 11H).

¹³C NMR (101 MHz,) δ 191.97 (s), 151.35 (s), 150.83 (s), 142.53 (s), 130.26 (s), 123.33 (s), 120.48 (s), 111.40 (s), 61.57 (s), 55.60 (s), 45.94 (s), 25.74 (s), 18.65 (s), 14.24 (s).

MS (ES⁺), *m/z* (%): 354 [M+H]⁺, 392 [M+K]⁺.

HRMS (ESI⁺) *calcd.* pro C₁₈H₂₉O₅Si [M+H]⁺: 353.1779, nalezeno 353.1775.

3.5 CDC coupling



V bezvodém DCE byl rozpuštěn β -ketoester **24** (4,5 mmol, 1 equiv.) a fenol **23** (4,9 mmol, 1,1 equiv.). Do této směsi byl přidán NHPI (0,225 mmol, 0,05 equiv.) a FeCl₃ (0,45 mmol, 0,1 equiv.), rychle následovaný roztokem DTBP (11,24 mmol, 2,5 equiv.) v 5 ml DCE. Reakční směs byla pak zahřívána na 80°C a ponechána při této teplotě po dobu 20 hodin. Po skončení reakce a zchladnutí na laboratorní teplotu byla reakční směs zfiltrována přes Celite® a filtrační koláč byl promyt 10 ml nasyceného roztoku Na₂CO₃. Organická vrstva byla oddělena a vodní vrstva byla extrahována pomocí CH₂Cl₂ (2× 15 ml). Organické vrstvy byly spojeny, sušeny nad bezvodým MgSO₄ a odpařeny na RVO. Reakční směs byla následně čištěna pomocí kolonové chromatografie na silikagelu a poskytla cílovou látku **25** v 89 % výtěžku.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 8.06-8.05 (m, 3H), 8.10-8.05 (m, 1H), 7.53-7.50 (m, 1H), 7.35-7.32 (m, 2H), 7.01 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 4.42 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 3.89 (s, 3H), 1.44 (t, J = 7.1 Hz, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) = 164.2, 161.2, 161.0, 153.5, 131.2, 127.3, 124.8, 123.8, 122.5, 122.0, 113.5, 110.9, 107.7, 60.5, 53.4, 14.3.

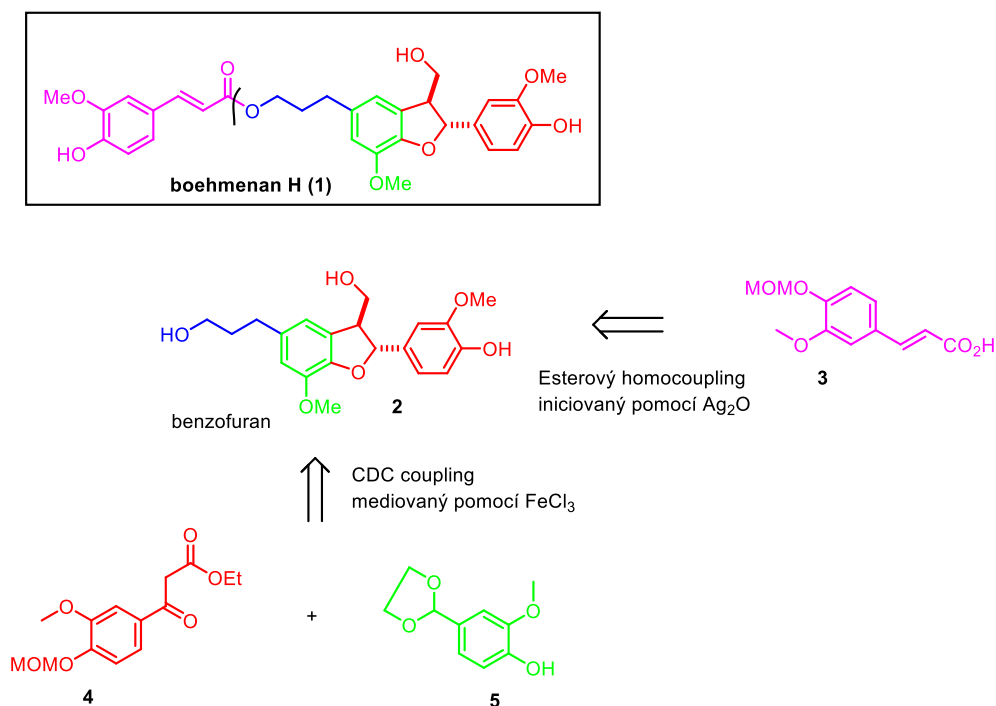
MS (ES⁺), m/z (%): 297 [M+H]⁺, 335 [M+K]⁺.

HRMS (ESI⁺) *calcd.* pro C₁₈H₁₇O₄ [M+H]⁺: 297.1121, nalezeno 297.1124.

4. Diskuze

4.1 Retrosyntéza

Retrosyntéza naší cílové molekuly, boehmenanu H (**1**), je naznačena na (Obr. 22). Naše retrosyntéza je navržena jako konvergentní, a tedy příprava cílové látky není lineární, ale skládá se z několika klíčových kroků, umožňujících konvergentní spojování jednotlivých klíčových intermediátů. Z pohledu syntézy tedy posledním klíčovým krokem (z pohledu retrosyntézy prvním krokem) je esterifikace benzofuranového intermediátu **2** pomocí kyseliny ferulové. Benzofuran **2**, pak bude možné připravit pomocí dvou různých metod: již publikované homodimerizační reakce vycházející z intermediátu **3**,²⁹ anebo pomocí konvergentního CDC couplingu intermediátů **4** a **5**. Oba tyto postupy jsou založeny na využití radikálových couplingových reakcí, které v prvním případě poskytují již cílový intermediát **2**, zatím co ve druhém případě dávají za vznik plně konjugovanému benzofuranovému skeletu, který se musí ještě následně redukovat, aby poskytl kýženou *trans* konfiguraci na dihydrofuranovém skeletu. Tento druhý postup, je pak hlavní náplní této bakalářské práce.



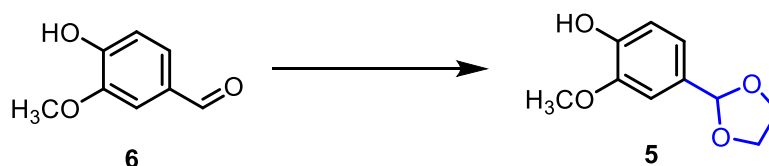
Obr. 25: Retrosyntetická analýza molekuly boehmenanu H (**1**)

4.2 CDC coupling

4.2.1 Příprava fenolů pro CDC coupling

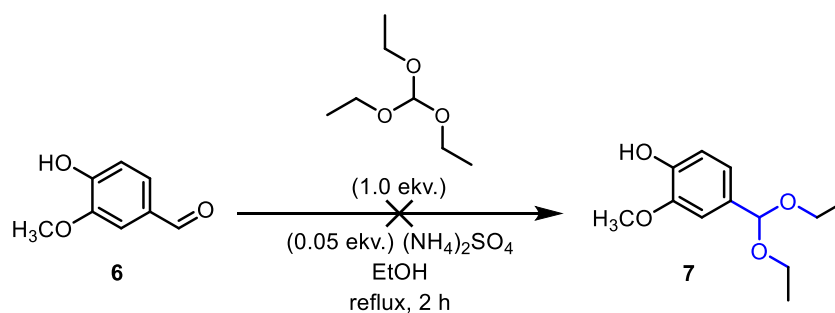
Prvním klíčovým krokem našeho syntetického přístupu je tedy CDC couplingová reakce mezi β -ketoesterem **4** a fenolem **5**. Nejprve jsme se tedy zaměřili na syntézu fenolu **5**. Cílem naší práce bylo připravit fenol **5** tak, aby nejenom umožňoval CDC coupling, ale také, aby nám pomohl vyřešit cílové ochránění produktu CDC couplingu. To znamená, že jsme potřebovali takovou chránící skupinu, který by šla odstranit v přítomnosti MOM-skupinou ochráněného fenolického hydroxyly. Náš výběr tedy padl na acetylovou funkční skupinu. S tímto cílem jsme se zaměřili na postup využití standartních chránících metod vanilinu **6** popsáných v literatuře. Nejprve jsme se pokusili zavést cyklickou acetalovou chránící skupinu standartní H^+ katalyzovanou acetylační reakcí (Tabulka 1). Bohužel standartní metody nevedly ke kýženému výsledku a tvorba produktu **5** nebyla pozorována (vstupy 1 a 2).²¹ Neúspěšným se ukázalo také využití polyaminsulfátu, jako katalyzátoru (vstup 3)²² a až aplikování katalytického množství TBATB-reagentu umožnilo přípravu cílové molekuly **5** v 60% výtěžku (vstup 4).²³

Tabulka 1: Syntéza fenolového partnera pro coupling – fenolu **5**



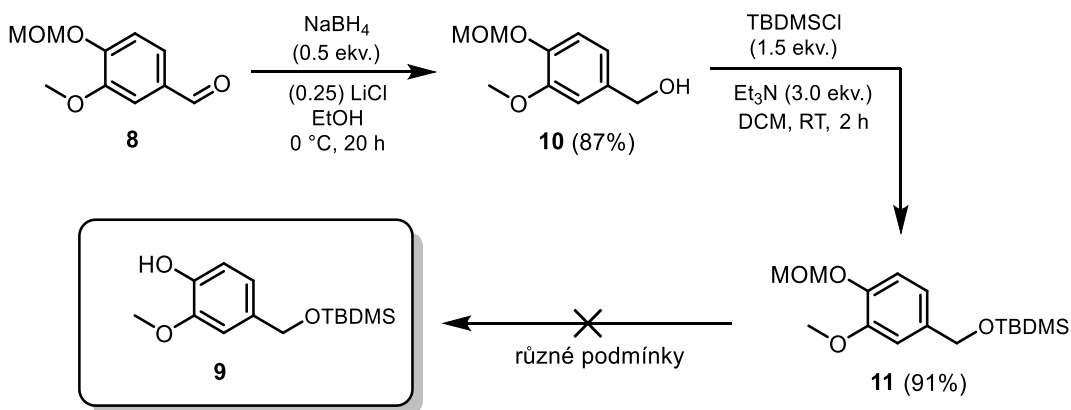
Vstup	Podmínky	Výtěžek [%]
1 ²¹	HO-CH ₂ CH ₂ -OH (4.0 ekviv), <i>p</i> TSA (1.0 ekviv), reflux, toluene, 7h	n.r.
2	HO-CH ₂ CH ₂ -OH (4.0 ekviv), <i>p</i> TSA (0,1 ekviv), reflux, toluene, 7h	n.r.
3 ²²	HO-CH ₂ CH ₂ -OH (4.0 ekviv), <i>polyanilin sulfát</i> (0,04 ekviv), (EtO) ₃ CH, ethylenglycol, RT, 2h	n.r.
4 ²³	(EtO) ₃ CH (1.0 ekviv), TBAT (0,01 ekviv), ethylenglycol, RT, 24h	60%

Z důvodu lepší odstranitelnosti aldehydické chránící skupiny, jsme se také zaměřili na přípravu necyklického acetalu. Bohužel v tomto případě se nám nepovedlo cílovou látku **7** připravit, a to ani s využitím podmínek uvedených v Tabulka 1, vstup 4 (Obr. 23).



Obr. 23: Syntéza fenolu **7**²⁹

Následně jsme se také zaměřili na využití MOM-chráněného vanilinu **8**, jako prekurzoru k novému fenolu **9** (Obr. 24). Fenol **9** by pak měl splňovat podmínky snadně ochranného benzylického alkoholu, který bude následně po CDC couplingu snadno oxidovatelný na odpovídající aldehyd.



Obr. 24: Příprava fenolu **9**.

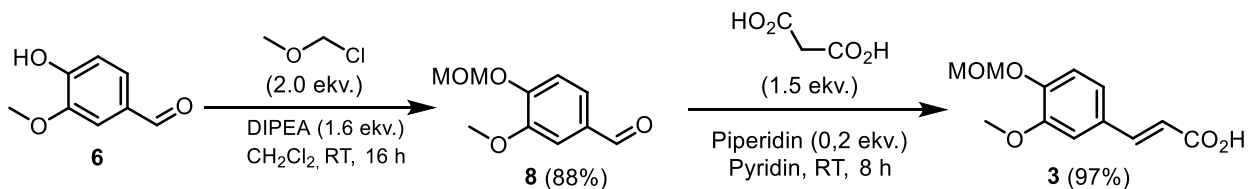
Syntéza tak započala z aldehydu **8**, který byl selektivně zredukován pomocí NaBH_4 v přítomnosti katalytického množství LiCl (chelátování MOM skupiny a methoxy skupiny). Výsledný benzylický alkohol **10**, byl následně ochráněn pomocí TBDMS skupiny na ether **11** v 91% výtěžku. Bohužel následný krok, selektivní ochránění MOM skupiny ve sloučenině **11** se ukázal jako problematický a za všech zkušebních podmínek, (TBAF, $\text{HF}\cdot\text{Et}_3\text{N}$, FeCl_3 , etc.) docházelo jak k ochránění TBDMS skupiny, tak k ochránění MOM-chránící skupiny (Obr. 24). Tudíž byl tento postup opuštěn.

4.2.2 Syntéza MOM-chráněného vanilinu **8** a MOM-chráněné kyseliny ferulové **3**

Následně jsme se zaměřily na přípravu MOM-chráněného vanilinu **8**, který jsme potřebovali připravit jako prekurzor pro syntézu derivátu kyseliny ferulové **3** a později jsme jej využili při zamýšlené přípravě fenolu **9** (Obr. 24).

Celkově lze říci, že syntéza kyseliny ferulové **3**, která bude sloužit jako partner ve druhém klíčovém kroku syntézy boehmenanu H, probíhala bez problémů (Obr. 25).

Vanilin **6** byl tedy reagován s *in situ* připraveným MOM chloridem za přítomnosti Hünigovy báze (DIPEA) v CH₂Cl₂ a poskytla cílový aldehyd **8** v 88% výtěžku. Následná Knoevenagelova kondenzace aldehydu **8** s kyselinou malonovou v přítomnosti piperidinu pak poskytla cílovou kyselinu ferulovou **3** v 97% výtěžku.

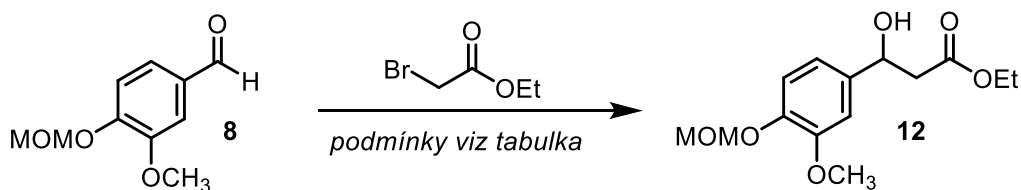


Obr. 25: Syntéza MOM-chráněné kyseliny ferulové **3**.

4.2.3 Příprava β -keto esterů pro CDC coupling

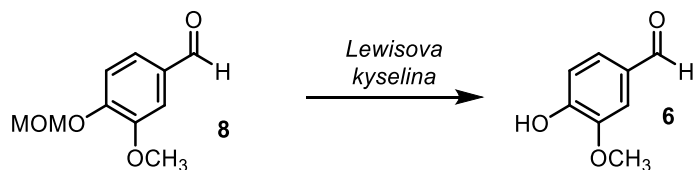
V návaznosti na předcházející práci ve skupině jsme předpokládali, že syntéza β -keto esteru **4** bude relativně jednoduchá.²⁰ Bohužel se ukázalo, že předchozí výsledky, které naznačovali problémy byly pravdivé. V mém případě se totiž nepovedlo připravit pomocí Reformatského reakce ani meziprodukt – β -hydroxy ester **12**. Jediným produktem byly odchráněný aldehyd **6** spolu se stopami odchráněného a následně zredukovaného aldehydu **6** na alkohol **13** (Obr. 26). Tvorbu vanilinu **6** lze vysvětlit odchráněním MOM chránící skupiny díky přítomnosti Lewisovy kyseliny (FeCl₃ nebo Zn^{II}-iontů), zatímco tvorba alkoholu **13** byla pravděpodobně způsobena redukcí aldehydicke funkční skupiny přítomným Zn-prachem v kyselém prostředí.

Tabulka 2: Reformatskiho reakce – syntéza β -hydroxy esteru **12**

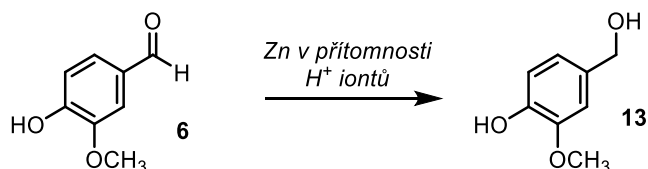


VSTUP	PODMÍNKY	VÝTĚŽEK [%]
1	Zn (10 equiv), BrCH ₂ CO ₂ Et (5 equiv), toluene, 90 °C	>5%
2	Zn (10 equiv), BrCH ₂ CO ₂ Et (5 equiv), THF, 60 °C	>5%
3	Zn (10 equiv), BrCH ₂ CO ₂ Et (5 equiv), THF, 60 °C	>5%
4	FeCl ₃ (3 equiv), Mg (10 equiv), BrCH ₂ CO ₂ Et (2 equiv), THF, 60 °C	>5%
5	FeCl ₃ (3 equiv), Mg (10 equiv), BrCH ₂ CO ₂ Et (2 equiv), THF, RT	>5%
6	FeCl ₃ (3 equiv), Mg (3 equiv), BrCH ₂ CO ₂ Et (2 equiv), THF, RT	>5%

Odchránění MOM chránící skupiny

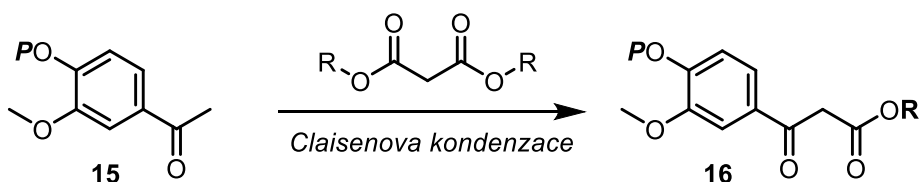


Redukce aldehydu na alkohol



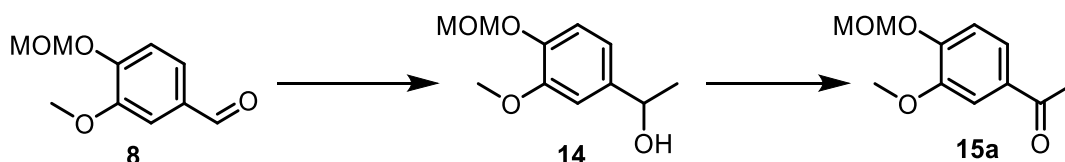
Obr. 26: Možné vysvětlení pozorovaných vedlejších produktů Reformatského reakce

Následně jsme se rozhodli připravit cílovou látku **4** pomocí Claisenovy kondenzace (Obr. 27). K tomuto jsme využili aldehyd **8** který byl pomocí organolithného nebo organohořečnatého reagentu (Tabulka 3, vstupy 1 a 2) převeden na odpovídající benzylický alkohol **14**. Následná oxidace pomocí Dess-Martinova reagentu (DMP), pak poskytla kýžený keton **15a**.



Obr. 27: Claisenova kondenzace poskytující keto ester **16**.

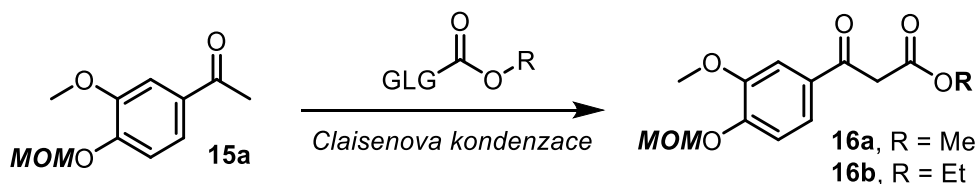
Tabulka 3: Příprava ketonu **15a**.



Vstup	Podmínky	Výtěžek [%]	Vstup	Podmínky	Výtěžek [%]
1	MeMgI (1,1 ekviv), Et ₂ O, 0°C až reflux, 2h	45%	3	PCC (1,5 ekviv), CH ₂ Cl ₂ , RT, 9h	8%
2	MeLi (2,0 ekviv), THF, 0°C, 2h	72%	4	DMP (1,1 ekviv), CH ₂ Cl ₂ , RT, 3h	73%

Následně byl takto získaný keton **15a** ponechán reagovat s dimethyl nebo diethylkarbonátem v přítomnosti vybraných bází (Tabulka 4). Bohužel tvorba kýžených produktů **16a** nebo **b** nebyla za žádných testovaných podmínek pozorována.

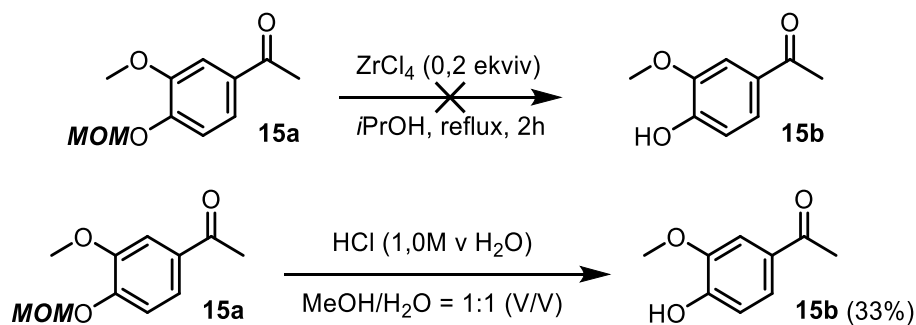
Tabulka 4: Claisenova kondenzace vycházející z ketonu **15a**.



Vstup	R	Podmínky	Výtěžek [%]
1	CH ₃	dimethylkarbonát (2.0 ekv.), NaH (3.0 ekv.), toulen, reflux, 1 h	>5%
2	CH ₃	dimethylkarbonát (3.0 ekv.), NaH (3.0 ekv.), toulen, RT 5h, pak reflux 10 h	>5%
3	CH ₃	dimethylkarbonát (5.0 ekv.), NaH (3.0 ekv.), toulen, RT 5h, pak reflux 10 h	>5%
4	CH ₃	dimethylkarbonát (1,5 ekv.), LDA (3.0 ekv.), THF, -78°C (1h) pak RT 5h, pak reflux 10 h	>5%
5	CH ₃	dimethylkarbonát (1,2 ekv.), LDA (3.0 ekv.), THF, -78°C (1h) pak RT 5h	>5%
6	Et	ethylchlorformiát (2.0 ekv.), NaH (4.0 ekv.), toulen, reflux, 1 h	>5%
7	Et	ethylchlorformiát (1,5 ekv.), NaH (5.0 ekv.), toulen, RT pak reflux, 10 h	>5%
8	Et	ethylchlorformiát (1,5 ekv.), LiHMDS (5.0 ekv.), toulen, -70°C pak RT, 5h	>5%
9	Et	ethylchlorformiát (2,0 ekv.), LiHMDS (5.0 ekv.), toulen, -70°C pak RT, 5h, pak reflux 10h	>5%
10	Et	ethylchlorformiát (1,5 ekv.), LDA (5.0 ekv.), toulen, -70°C pak RT, 5h	>5%
11	Et	ethylchlorformiát (2,0 ekv.), LDA (5.0 ekv.), toulen, -70°C pak RT, 5h, pak reflux 10h	>5%

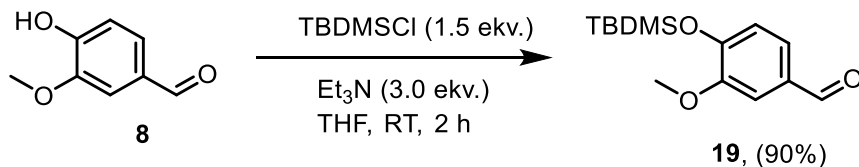
V tomto okamžiku jsme začali uvažovat o možnosti, že MOM chránicí skupina je zodpovědná za veškeré naše problémy. Spekulovali jsme, že její chelatační schopnosti způsobují koordinaci kationtu, která vyústí v *in situ* tvorbu dimerů a trimerů – nereaktivních komplexů obdobných těm, co mohou být nalezeny v roztocích

organolithných sloučenin v THF. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli připravit keton **15b**, který nemá žádnou chránicí skupinu na fenolu (Obr. 28). Keton **15b** byl připraven v malém neoptimalizovaném výtěžku 33% a okamžitě jsme otestovali jeho reaktivitu v Claisenově kondenzaci s dimethylkarbonátem. Bohužel i v tomto případě nebyl cílový adukt **17** pozorován (Tabulka 5, vstupy 1 až 10).

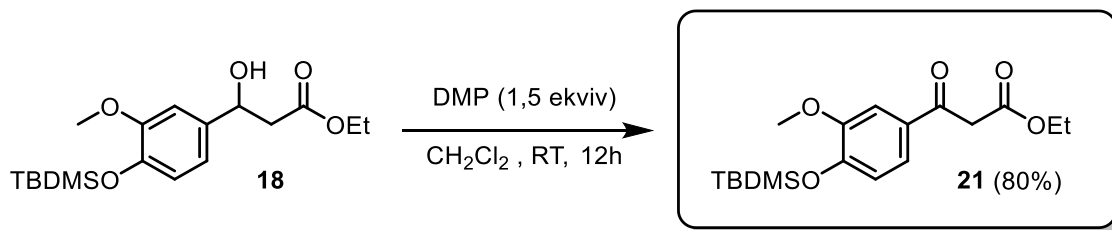


Obr. 28: Odchraňování MOM chránicí skupiny na ketonu **15a**. Syntéza fenolu **15b**.

Na základě těchto výsledků jsme se tedy nakonec rozhodli změnit strategii a vrátit se k původnímu záměru připravit cílový β -keto ester **8** pomocí dvoukrokové syntézy skládající se z adice enolátu na aldehyd následované oxidací získaného alkoholu na keton (Tabulka 2). Jako vhodný enolát jsme si vybrali ten generovaný z ethyl acetátu pomocí nukleofilní báze LiHMDS (Tabulka 6). Bohužel se ukázalo, že cílová molekula **18** takto nelze připravit (vstupy 1 až 3). Z tohoto důvodu jsme tedy připravili v 90% výtěžku z vanilinu **6** TBDMS chráněný vanilin **19** a využili jej jako substrát pro adici lithium enolátu (vstup 4). V tomto případě se ukázala reakce jako úspěšná a cílová látka byla izolována v 85% výtěžku. Následná oxidace pomocí Dess-Martinova reagentu, pak poskytla cílový β -keto ester **21** v 80% výtěžku.

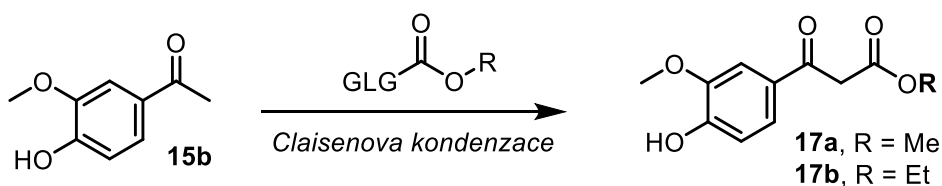


Obr. 29: Zavedení TBDMS chránicí skupiny na fenolickou funkční skupinu.



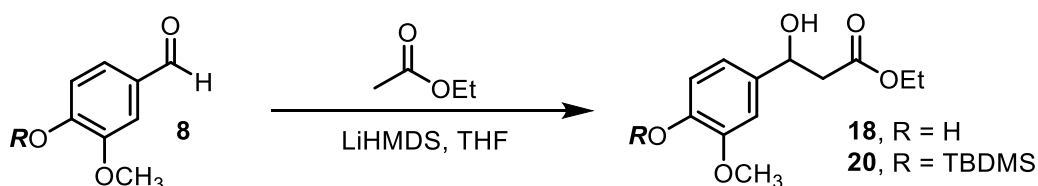
Obr. 30: Syntéza β -keto esteru **21**.

Tabulka 5: Claisenova kondenzace ketonu **15b**.



Vstup	R	Podmínky	Výtěžek [%]
1	CH ₃	dimethylkarbonát (2.0 ekv.), NaH (3.0 ekv.), toulén, reflux, 1 h	>5%
2	CH ₃	dimethylkarbonát (3.0 ekv.), NaH (3.0 ekv.), toulén, RT 5h, pak reflux 10 h	>5%
3	CH ₃	dimethylkarbonát (5.0 ekv.), NaH (3.0 ekv.), toulén, RT 5h, pak reflux 10 h	>5%
4	CH ₃	dimethylkarbonát (1,5 ekv.), LDA (3.0 ekv.), THF, -78°C (1h) pak RT 5h, pak reflux 10 h	>5%
5	CH ₃	dimethylkarbonát (1,2 ekv.), LDA (3.0 ekv.), THF, -78°C (1h) pak RT 5h	>5%
6	Et	ethylchlorformiát (2.0 ekv.), NaH (4.0 ekv.), toulén, reflux, 1 h	>5%
7	Et	ethylchlorformiát (1,5 ekv.), NaH (5.0 ekv.), toulén, RT pak reflux, 10 h	>5%
8	Et	ethylchlorformiát (1,5 ekv.), LiHMDS (5.0 ekv.), toulén, -70°C pak RT, 5h	>5%
9	Et	ethylchlorformiát (2,0 ekv.), LiHMDS (5.0 ekv.), toulén, -70°C pak RT, 5h, pak reflux 10h	>5%
10	Et	ethylchlorformiát (1,5 ekv.), LDA (5.0 ekv.), toulén, -70°C pak RT, 5h	>5%

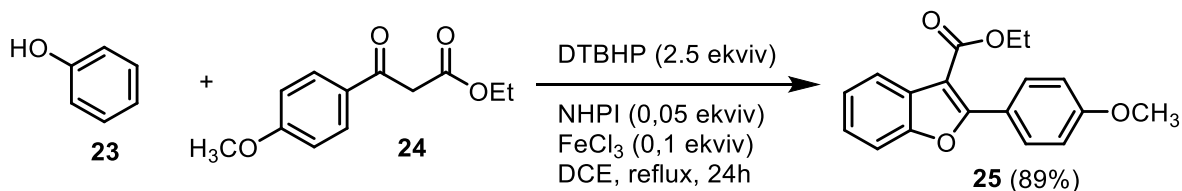
Tabulka 6: Syntéza cílových β -hydroxy esterů **18** a **20**.



VSTUP	R	PODMÍNKY	VÝTĚŽEK [%]
1	H	LiHMDS (1,2 equiv), EtOAc (1,2 equiv), THF, -78 °C, 1h	>5%
2	H	LiHMDS (2,0 equiv), EtOAc (2,0 equiv), THF, -78 °C, 1h	>5%
3	H	LiHMDS (4,0 equiv), EtOAc (15 equiv), THF, -78 °C, 1h	>5%
4	TBDMS	LiHMDS (1,2 equiv), EtOAc (1,2 equiv), THF, -78 °C, 1h	85% %

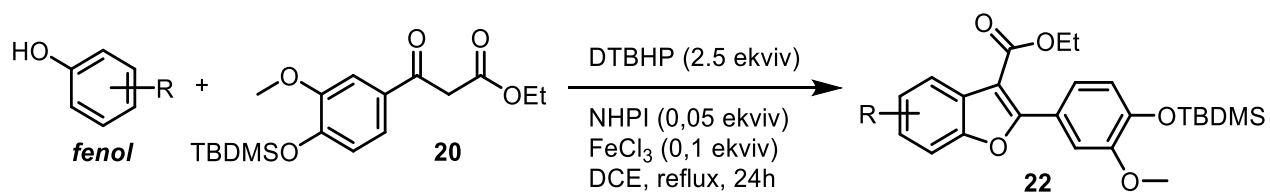
Majíce k dispozici fenoly **6**, **9**, a **13** a β -keto ester **20**, klíčový CDC coupling mohl být otestován (Tabulka 7). Bohužel se ukázalo, že za námi testovaných podmínek ani jedna z testovaných kombinací ketoester/fenol neposkytuje cílový benzofuran **22**. V případě aldehydu **6** tato situace nebyla překvapivá, protože pro to, aby radikálový coupling probíhal je zapotřebí mít elektronově bohatý fenol (tedy žádná elektron akceptorní skupina). Na druhou stranu, že fenoly **9** a **13** neposkytují žádný produkt bylo více než překvapivé. Pouze v případě aldehydu **9** docházelo v reakční směsi k desilylaci za vzniku fenolu **13**.

Abychom si tedy ověřili správnost podmínek, komerčně dostupný β -keto ester **23**, byl ponechán reagovat s fenolem **24** (Obr. 31). V tomto případě vznikal cílový benzofuran **25** v 89% výtěžku.



Obr. 31: CDC coupling komerčně dostupných látek – ověřovací reakce.

Tabulka 7: Reakce fenolů s β -keto esterem **20** za podmínek CDC couplingu.



Vstup Fenol

Produkt

1	<p>6</p>	<p>22a</p> <p><5%</p>
2	<p>9</p>	<p>22b</p> <p><5%</p>
3	<p>13</p>	<p>22c</p> <p><5%</p>

5. Závěr

Ve své bakalářské práci jsem se zaměřila na rostlinné sekundární metabolity fenylypropanoidového typu, zejména pak jejich 5,8' dimery, neolignany. V teoretické části jsem rozebrala některé jejich nejhlavnější typy syntézy a jejich typické biologické aktivity. Následně jsem se více zaměřila na přírodní lýtky obsahující strukturální motiv benzofuranového jádra – přírodní látku boehmenan H. Po popisu biologických vlastností této látky jsem se zabývala jeho retrosyntézou. Cílem této práce bylo ověřit klíčový krok námi navržené retrosyntézy – radikálový CDC coupling.

Tato reakce již byla sice v literatuře popsána, ale na tomto typu substrátů bohužel nebyla nikdy testována. K tomu, abych to mohla provést jsem připravila 3 typy fenolů s různými chránícími skupinami. Obdobně jsem následně chtěla připravit druhého couplingového partnera, β -keto ester, ale syntéza tohoto intermediátu se ukázala poněkud obtížnější, než jsme čekali. Vyzkoušela jsem 3 různé postupy, které byly založeny na Reformatského reakci či Claisenově kondenzaci, ale pouze adice lithium enolátu generovaného z ethyl acetátu poskytla kýžený produkt.

Bohužel se pak následně ukázalo, že ani jedna kombinace fenol – β -keto ester neposkytuje při radikálovém CDC couplingu benzofuranový produkt. Pakliže ale CDC coupling byl proveden na jednoduchých substrátech, cílený benzofuran byl izolován v 89% výtěžku.

Předpokládáme tedy, že další optimalizací, ale zejména pak dobře navrženou strukturou (substituční vzorec na aromatických jádrech reagujících partnerů) bude umožněno najít kombinaci substrátů, kteří poskytnou cílový produkt, a kteří budou uplatitelní při syntéze boehmenanu H.

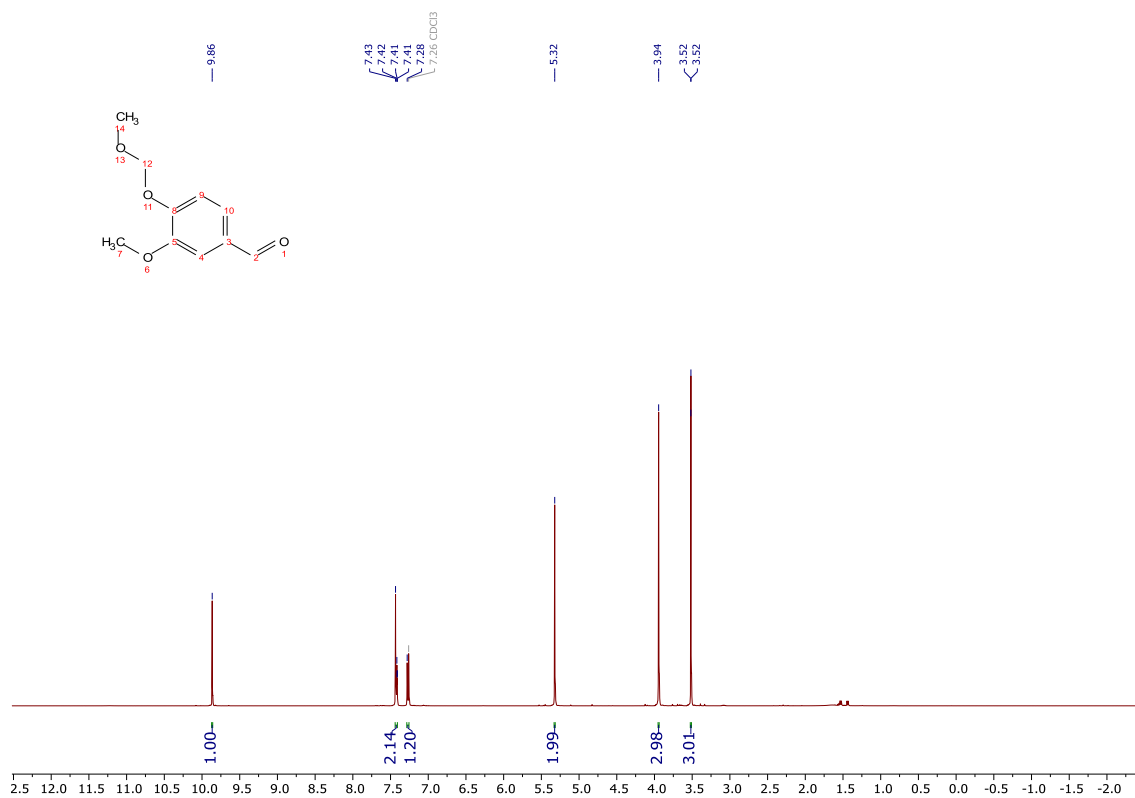
6. Použitá literatura

- (1) Seca, A. M. .; Silva, A. M. .; Silvestre, A. J. .; Cavaleiro, J. A. .; Domingues, F. M. .; Pascoal-Neto. *Phytochemistry* **2001**, *56* (7), 759–767.
- (2) Benevides, P. J. C.; Sartorelli, P.; Kato, M. J. *Phytochemistry* **1999**, *52* (2), 339–343.
- (3) Moss, G. P. *Pure Appl. Chem.* **2007**, *72* (8), 1493–1523.
- (4) Bunzel, M. *Phytochem. Rev.* **2010**, *9* (1), 47–64.
- (5) P. K. Mandali, D. K. Chand, *Synthesis*, **2015**, *47*, 1661-1668.
- (6) D. Yue, T. Yao, R. C. Larock, *J. Org. Chem.*, **2005**, *70*, 10292-10296.
- (7) A. Varela-Fernández, C. González-Rodríguez, J. A. Varela, L. Castedo, Carlos Saá, *Org. Lett.*, **2009**, *11*, 5350-5353.
- (8) M. Rajesh, N. Thirupathi, T. J. Reddy, S. Kanojiya, M. S. Reddy, *J. Org. Chem.*, **2015**, *80*, 12311-12320.
- (9) A. Baralle, S. Otsuka, V. Guérin, K. Murakami, H. Yorimitsu, A. Osuka, *Synlett*, **2015**, *26*, 327-330.
- (10) B. Lu, B. Wang, Y. Zhang, D. Ma, *J. Org. Chem.*, **2007**, *72*, 5337-5341.
- (11) S. Palaniappan, P. Narendar, C. Saravanan, V. J. Rao, *Synlett* **2003**, *2003*, 1793-1796.
- (12) R. Gopinath, S. J. Haque, B. K. Patel, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 5842-5845.
- (13) Chioccaro, F.; Poli, S.; Rindone, B.; Pilati, T.; Brunow, G.; Pietikäinen, P.; Setälä, H. *Acta Chem. Scand.* **1993**, *47*, 610–616.
- (14) Maeda, S.; Masuda, H.; Tokoroyama, T.. *Chem. Pharm. Bull.* **1995**, *43*, 84–90.
- (15) Maeda, S.; Masuda, H.; Tokoroyama, T.. *Chem. Pharm. Bull.* **1994**, *42*, 2500–2505.
- (16) Pieters, L.; van Dyck, S.; Gao, M.; Bai, R.; Hamel, E.; Vlietinck, A.; Lemièrre, G. J. *Med. Chem.* **1999**, *42*, 5475–5481.
- (17) Carunchio, F.; Crescenzi, C.; Girelli, A.M.; Messina, A.; Tarola, A.M. *Talanta* **2001**, *55*, 189–200.
- (18) Subbaraju, G.; Kavitha, J.; Rajasekhar, D.; Hsu, F.-L.; Cheng, K.-T. *J. Chem.* **2007**, *46B*, 357–359.

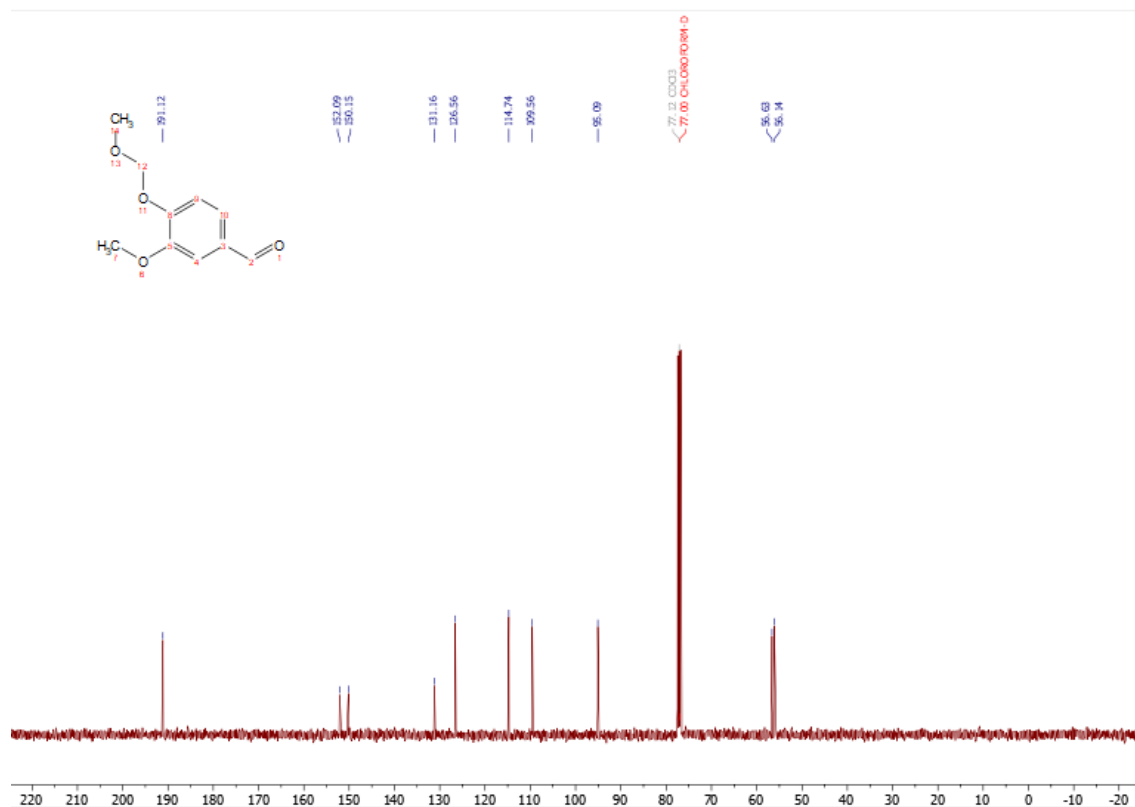
- (19) Ge, F.; Tang, C.-P.; Ye, Y. Lignanamides and sesquiterpenoids from stems of *Mitrephora thorelii*. *Helv. Chim. Acta* **2008**, *91*, 1023–1030.
- (20) Magoulas, G. E.; Papaioannou, D., *Thereof*; 2014; Vol. 19.
- (21) C.-C. Liao, C.-S. Chu, T.-H. Lee, P. D. Rao, S. Ko, L.-D. Song, H.-C. Shiao, J. *Org. Chem.* **1999**, *64*, 4102-4110.
- (22) Shono, T.; Ishikawa, N.; Toume, K.; Arai, M. A.; Ahmed, F.; Sadhu, S. K.; Ishibashi, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25* (14), 2735–2738.
- (23) Wong, Y. H.; Tan, W. Y.; Tan, C. P.; Long, K.; Nyam, K. L. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2014**, *4*, S510–S515.
- (24) Chin, Y. W.; Jones, W. P.; Rachman, I.; Riswan, S.; Kardono, L. B. S.; Chai, H. B.; Farnsworth, N. R.; Cordell, G. A.; Swanson, S. M.; Cassady, J. M.; et al. *Phyther. Res.* **2006**, *20* (1), 62–65.
- (25) Miert, S. Van; Dyck, S. Van; Schmidt, T. J.; Brun, R.; Vlietinck, A.; Lemièrre, G.; Pieters, L. *Bioorganic Med. Chem.* **2005**, *13* (3), 661–669.
- (26) S., A.; A., V.; L., P. *Phytochem. Rev.* **2003**, *2* (3), 201–217.
- (27) Clevers, H.; Nüsse, R. *Cell* **2012**, *149* (6), 1192–1205.
- (28) Lee, Y. G.; Byeon, S. E.; Kim, J. Y.; Lee, J. Y.; Rhee, M. H.; Hong, S.; Wu, J. C.; Lee, H. S.; Kim, M. J.; Cho, D. H.; et al. *J. Ethnopharmacol.* **2007**, *113* (1), 62–71.
- (29) Z. Barbušćáková, H. Kozubíková, F. Zálešák, K. Doležal, J. Pospíšil, *Monatsh. Chem.* **2018**.
- (30) F. V. Singh, T. Wirth, *Synthesis*, **2012**, *44*, 1171-1177.
- (31) Palaniappan, S.; et al, *Polym. Adv. Technol.* **2002**, *13*, 54.
- (32) Gopinath R., *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 5842.
- (33) Seop, M.; et al, *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 382
- (34) Collins, D.; et al, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 3800.
- (35) D. Konrádová, H. Kozubíková, K. Doležal, J. Pospíšil, *Eur. J. Org. Chem.* **2017**, *2017*, 5204-5213.

Příloha 1

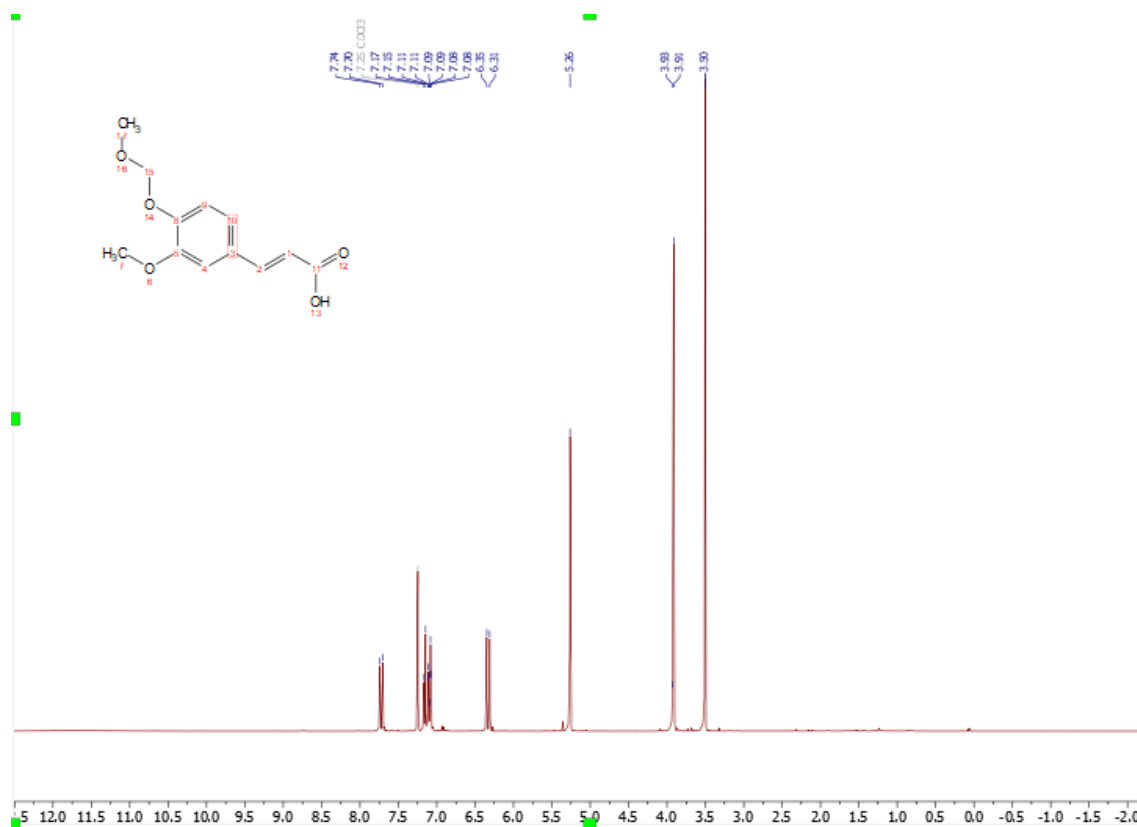
Spektrum 1: ¹H spektrum látky 8



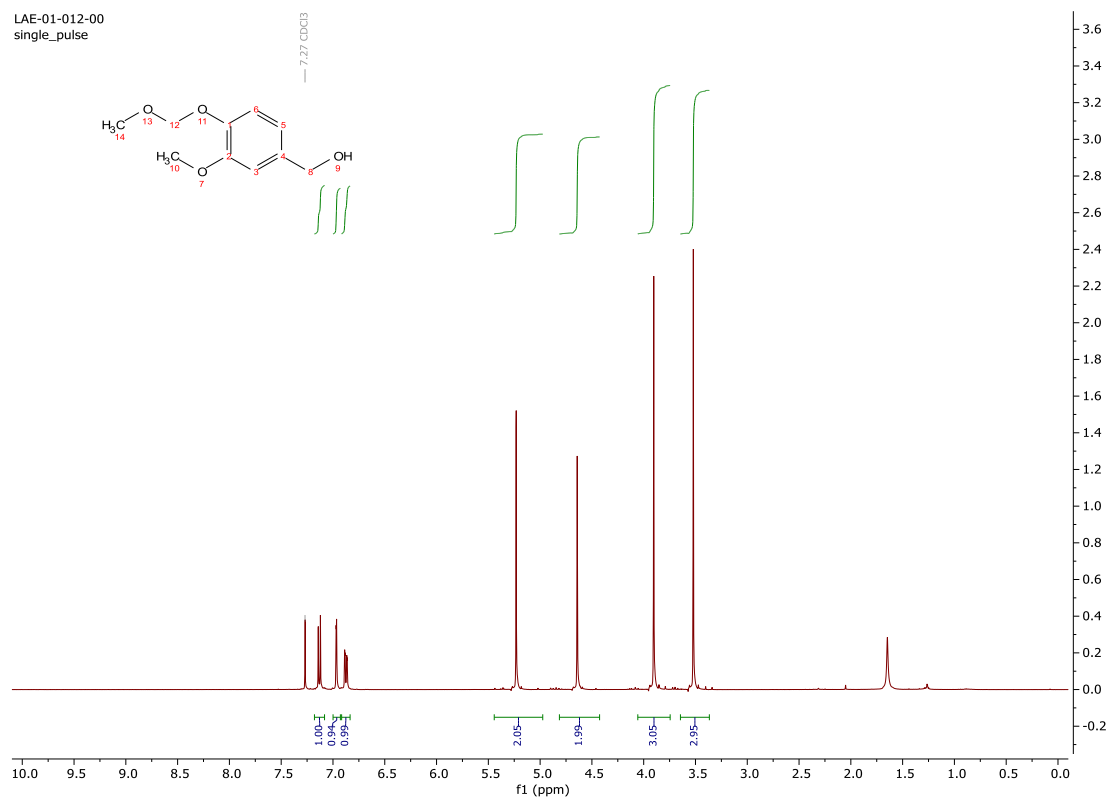
Spektrum 2: ¹³C látka 8



Spektrum 3: ¹H spektrum látky 3



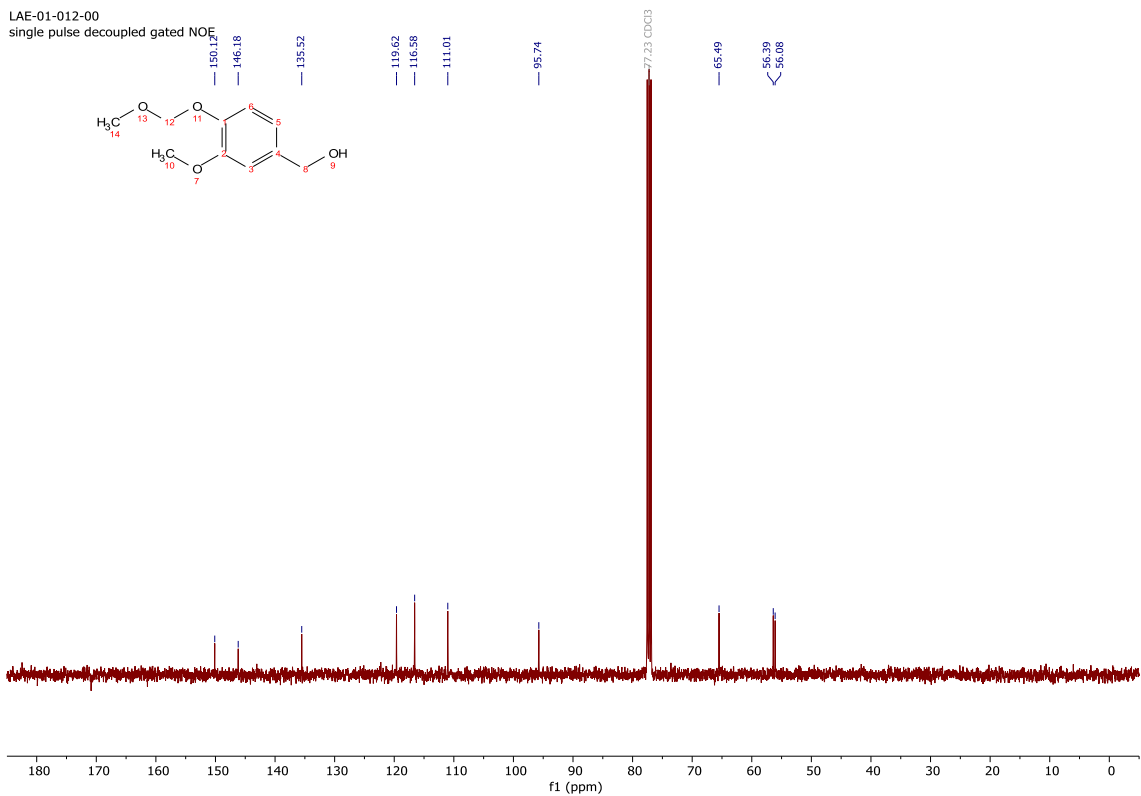
Spektrum 4: ¹H spektrum látky 10



Spektrum 5: ^{13}C látka 10

LAE-01-012-00

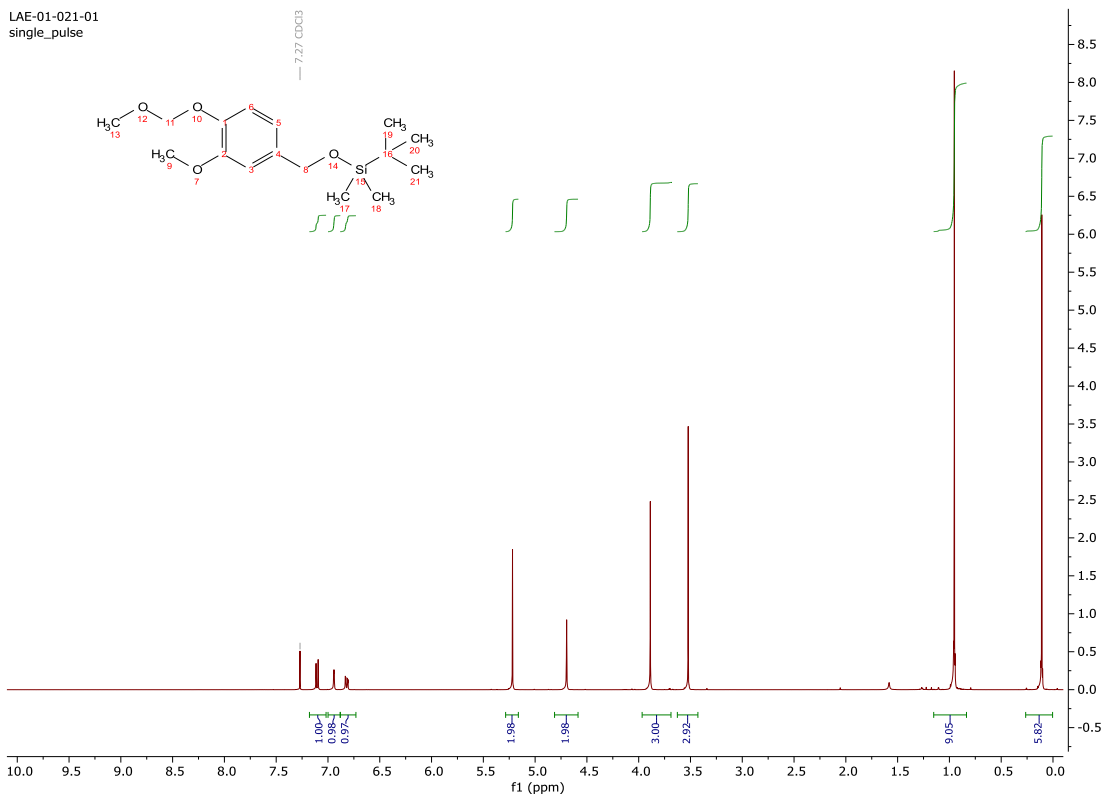
single pulse decoupled gated NOE



Spektrum 6: ^1H spektrum látky 11

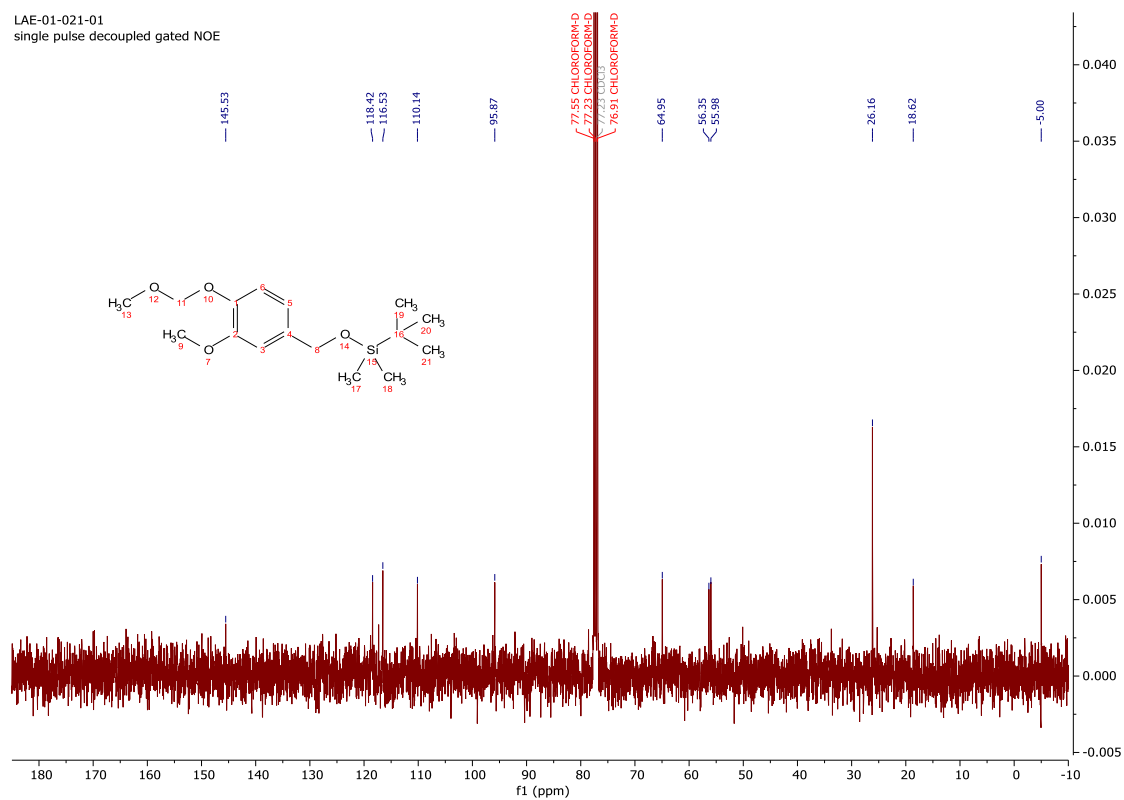
LAE-01-021-01

single_pulse



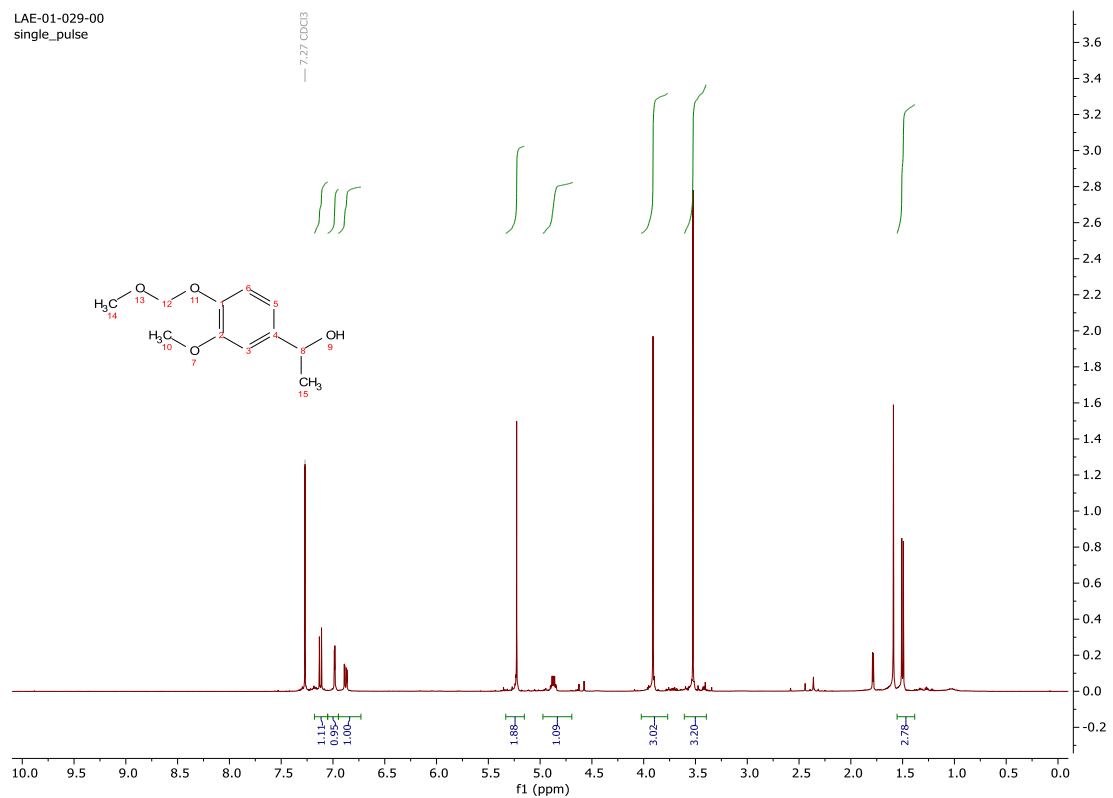
Spektrum 7: ^{13}C látka 11

LAE-01-021-01
single pulse decoupled gated NOE



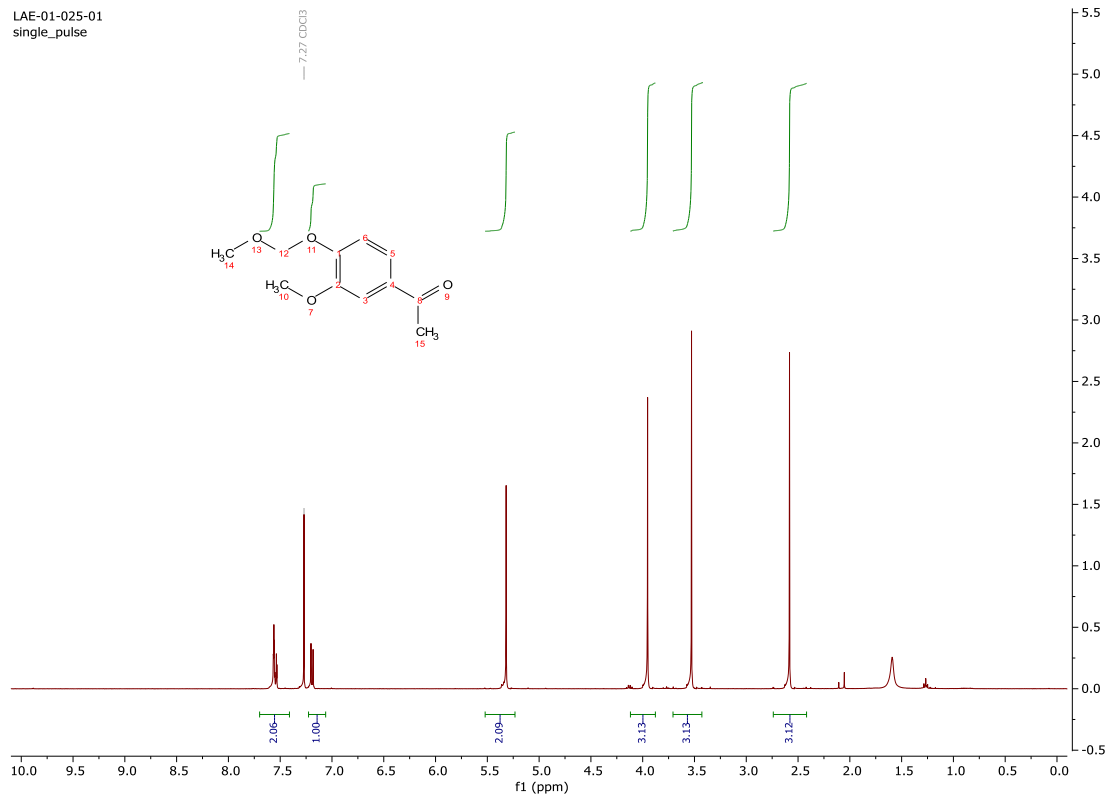
Spektrum 8: ^1H spektrum látka 14

LAE-01-029-00
single_pulse



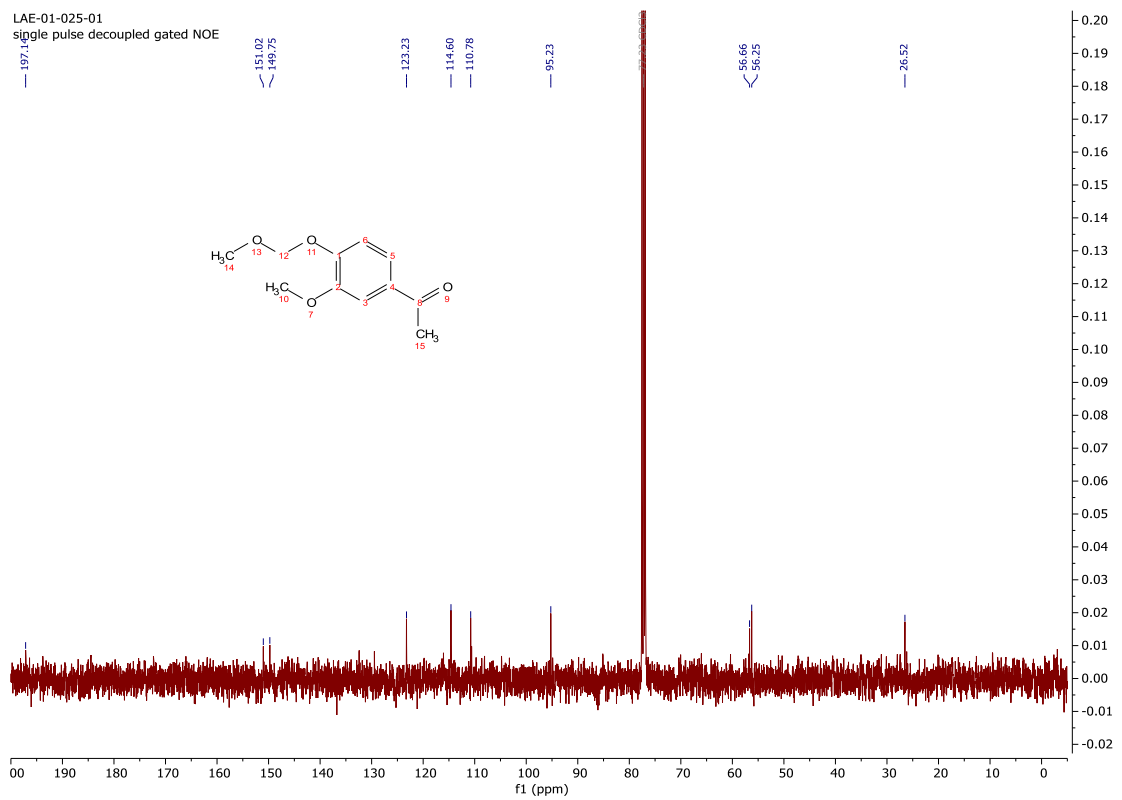
Spektrum 9: ¹H spektrum látky 15a

LAE-01-025-01
single_pulse

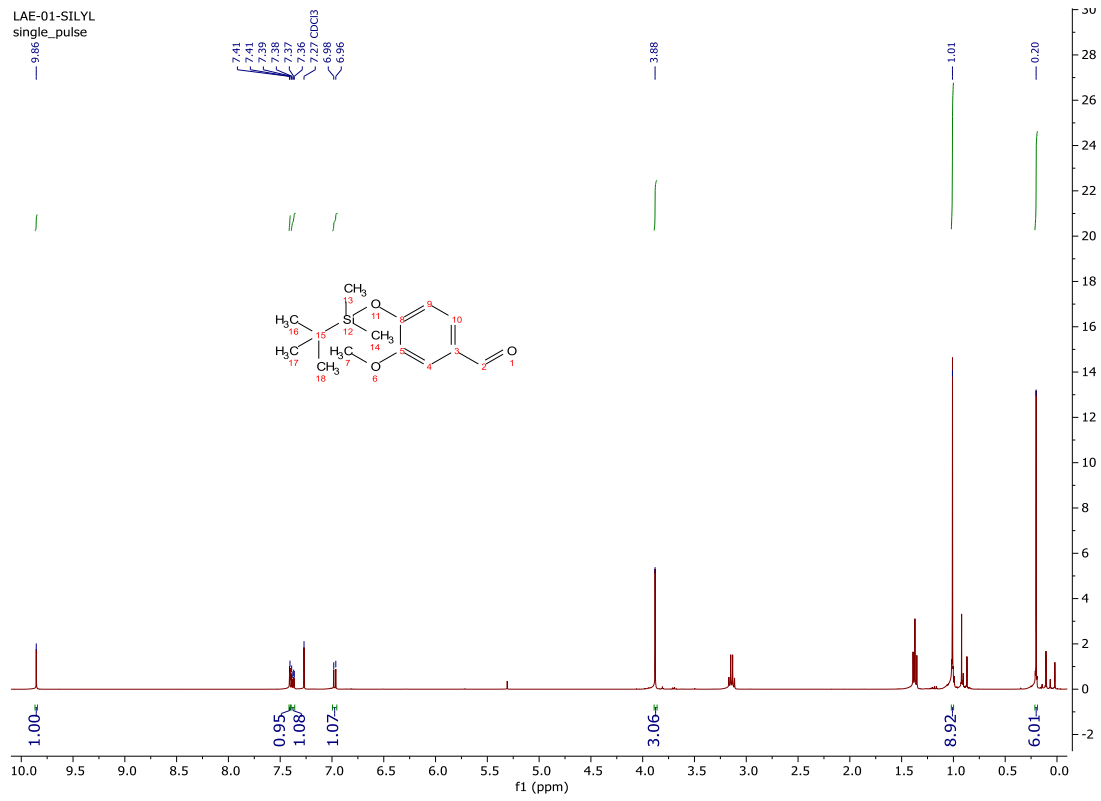


Spektrum 10: ¹³C látky 15a

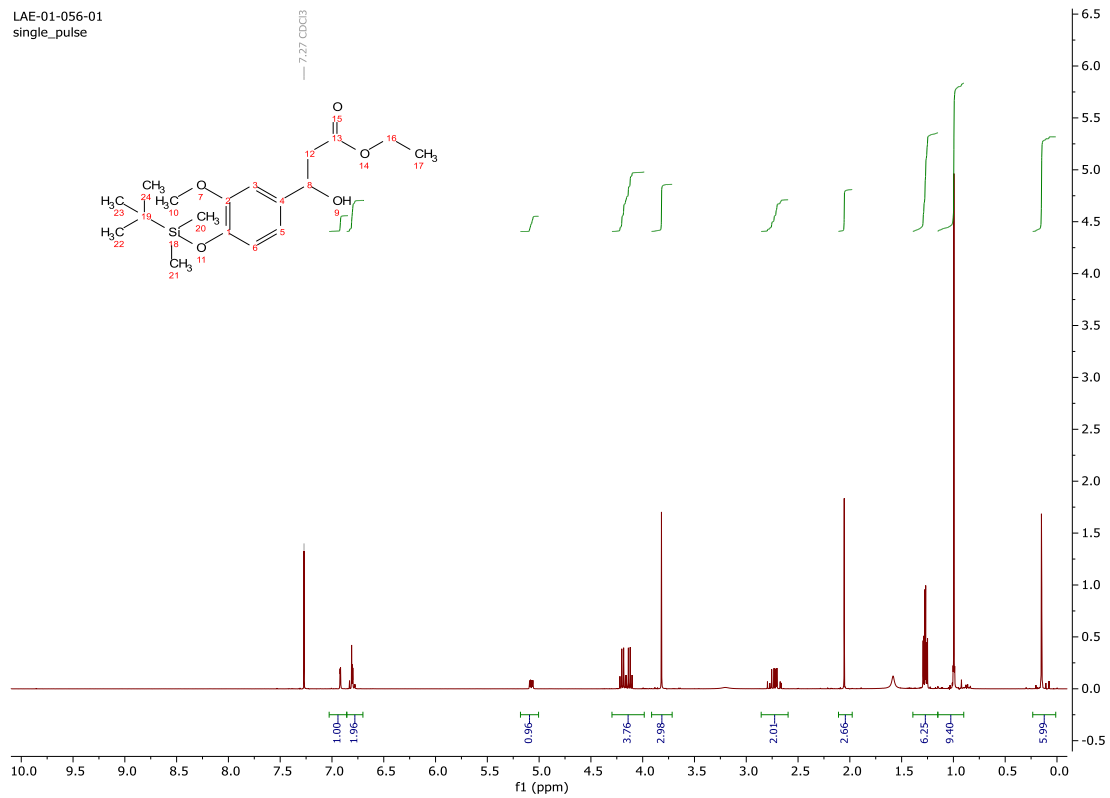
LAE-01-025-01
single_pulse decoupled gated NOE



Spektrum 11: ¹H spektrum látky 19

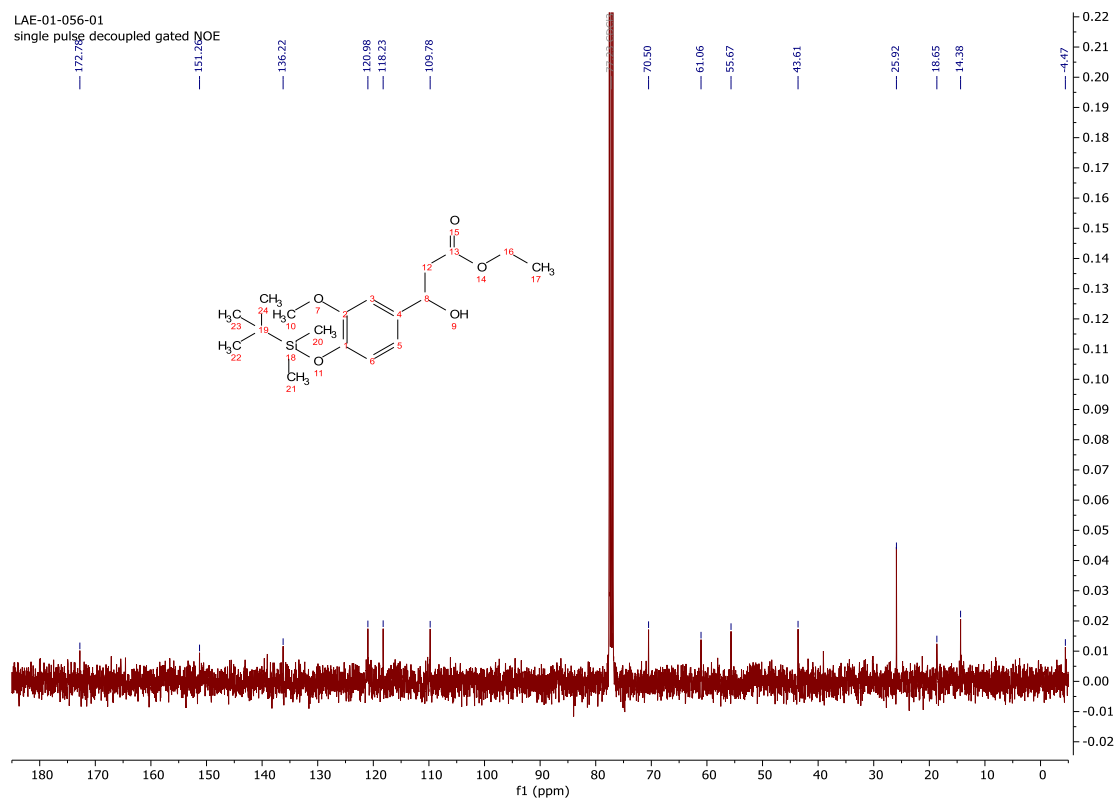


Spektrum 12: ¹H spektrum látky 20



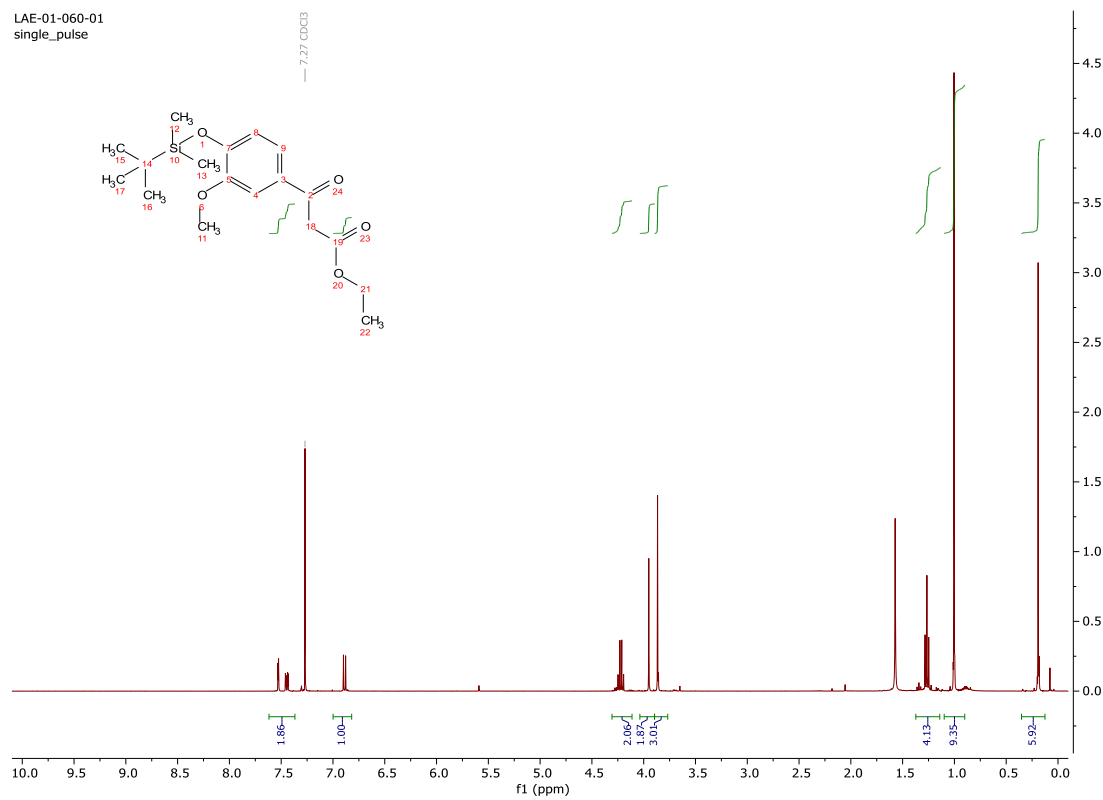
Spektrum 13: ^{13}C látka 20

LAE-01-056-01
single pulse decoupled gated NOE



Spektrum 14: ^1H spektrum látky 21

LAE-01-060-01
single_pulse



Spektrum 15: ¹³C látka 21

