

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

Katedra organické chemie



**Syntéza přírodních fyto-sloučenin patřících do rodiny  
coumestanů**

*Diplomová práce*

Autor:	Bc. Denisa Vysloužilová
Studijní program:	Chemie
Studijní obor:	Organická chemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Jiří Pospíšil, Ph.D.

Olomouc 2023

## **Bibliografické údaje**

Jméno a příjmení autora:	Bc. Denisa Vysloužilová
Název práce:	Syntéza přírodních fyto-sloučenin patřících do rodiny coumestanů
Typ práce:	Diplomová
Pracoviště:	Katedra organické chemie, Přírodovědecké fakulta, Palackého Univerzita v Olomouci
Školitel:	doc. RNDr. Jiří Pospíšil, Ph.D.
Rok obhajoby:	2023
Abstrakt:	<p>Předložená diplomová práce je zaměřena na vývoj nové univerzální metody pro přípravu coumestanového skeletu. Teoretická část je členěna do tří hlavních kapitol. První z nich se zabývá popisem rostlinných sekundárních metabolitů. V druhé kapitole jsou popsány vlastnosti, biosyntéza a vybraní zástupci coumestanů s popisem jejich biologických aktivit. Dále jsou diskutovány vybrané přístupy syntézy coumestanů. Třetí kapitola popisuje předcházející práci v naší výzkumné skupině. Experimentální část práce soustředí svou pozornost na syntézu coumestanu a jeho derivátů s ohledem na modulárnost a ekonomičnost. V této části práce je také diskutován návrh syntézy a optimalizace jednotlivých reakčních kroků.</p>
Klíčová slova:	coumestany, přírodní látky, Suzuki coupling, Sonogashira coupling, totální syntéza
Počet stran:	87
Počet stran příloh:	12
Počet příloh:	1
Jazyk:	Čeština

## **Bibliographical identification**

Author's first name and surname: Bc. Denisa Vysloužilová

Title: Synthesis of natural phytocompounds belonging to the family of coumestans

Type of thesis: Master

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

Advisor: doc. RNDr. Jiří Pospíšil, Ph.D.

The year of presentation: 2023

Abstract: The presented thesis is focused on the development of a new universal method for the preparation of a coumestan skeleton. The theoretical part is divided into three main chapters. The first of them deals with the description of secondary metabolites of plants. The second chapter describes the properties, biosynthesis and selected representatives of coumestans with a description of their biological activities. Next, selected approaches to the synthesis of coumestans are discussed. The third chapter describes previous work in our research group. The experimental part of the work focusses its attention on the synthesis of coumestan and its derivatives with regard to modularity and economy. In this part of the work, the proposal of synthesis and optimisation of individual reaction steps is also discussed.

Key words: coumestans, natural products, Suzuki coupling, Sonogashira coupling, total synthesis

Number of pages: 87

Number of appendix pages: 12

Number of appendices: 1

Language: Czech

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu. Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry organické chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci, 11. 5. 2023

.....

Bc. Denisa Vysloužilová

## **Poděkování**

Děkuji svému vedoucímu práce, doc. RNDr. Jiřímu Pospíšilovi, Ph.D., za odborné vedení této diplomové práce a za příležitost být součástí jeho výzkumné skupiny.

Mé poděkování dále směřuji ke svému příteli, který mne zahrnuje neustálou láskou a podporou v jakékoliv podobě. Také děkuji mé drahé rodině za jejich lásku, nekonečnou trpělivost a za jejich výchovu. Dále děkuji svým kolegům, kteří mi zpřijemnilí čas strávený v laboratoři a i mimo ni. Na závěr děkuji za finanční podporu svým rodičům a Interní Grantové Agentuře PřF UP (IGA\_PrF\_2023\_20).

---

# Obsah

<b>Seznam zkratk</b> .....	<b>9</b>
<b>1 Úvod</b> .....	<b>11</b>
1.1 Cíle práce .....	12
<b>2 Teoretická část</b> .....	<b>13</b>
2.1 Rostlinné sekundární metabolity .....	13
2.2 Coumestany .....	15
2.2.1 Obecné vlastnosti .....	16
2.2.2 Biosyntéza .....	17
2.2.3 Vybraní zástupci coumestanů a jejich biologická aktivita .....	22
2.2.3.1 Coumestrol ( <b>5</b> ) .....	22
2.2.3.2 Wedelolacton ( <b>36</b> ) .....	23
2.2.3.3 Demethylwedelolacton ( <b>37</b> ) .....	23
2.2.3.4 Psoralidin ( <b>38</b> ) .....	24
2.2.3.5 Glytabastan B ( <b>39</b> ) .....	24
2.2.4 Syntéza coumestanů – vybrané přístupy .....	25
2.2.4.1 První skupina – tvorba furanového kruhu .....	25
2.2.4.2 Druhá skupina – tvorba laktonu .....	26
2.2.4.3 Třetí skupina – oxidace pterocarpanového skeletu .....	27
2.3 Předcházející práce v naší výzkumné skupině .....	28
<b>3 Výsledky a diskuze</b> .....	<b>31</b>
3.1 1. přístup - retrosyntéza .....	31
3.1.1 Syntéza coumestanu <b>3</b> .....	32
3.1.1.1 Kysele katalyzovaná kondenzace .....	32
3.1.1.2 Suzuki coupling .....	33

3.1.1.3	Cyklizační reakce .....	37
3.1.2	Syntéza derivátů coumestanu <b>66</b> .....	37
3.1.2.1	Příprava derivátů salicylaldehydu <b>73</b> .....	38
3.1.2.2	Kysele katalyzovaná kondenzace .....	39
3.1.2.3	Příprava boronové kyseliny <b>71b</b> .....	40
3.2	2. přístup - retrosyntéza.....	41
3.2.1	Syntéza coumestanu <b>3</b> .....	42
3.2.1.1	Počáteční Sonogashira coupling.....	42
3.2.1.2	Druhý Sonogashira coupling .....	47
3.2.1.3	Intramolekulární cyklizace .....	52
3.2.1.4	Tvorba esteru <b>68</b> .....	52
<b>4</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>57</b>
<b>5</b>	<b>Experimentální část .....</b>	<b>58</b>
5.1	Obecné informace .....	58
5.1.1	Vizualizační roztoky pro TLC .....	59
5.2	Syntéza derivátů salicylaldehydu ( <b>73</b> ) .....	59
5.2.1	Syntéza 2-hydroxy-4-methoxybenzaldehydu ( <b>73b</b> ) .....	59
5.2.2	Syntéza 4-(allyloxy)-2-hydroxybenzaldehydu ( <b>73c</b> ) .....	60
5.3	Syntéza derivátů benzofuranu ( <b>72</b> ) .....	61
5.3.1	Syntéza ethyl benzofuran-3-karboxylátu ( <b>72a</b> ) .....	61
5.3.2	Syntéza ethyl 6-methoxybenzofuran-3-karboxylátu ( <b>72b</b> ).....	62
5.4	Syntéza (3-(ethoxykarbonyl)benzofuran-2-yl)boronové kyseliny ( <b>71a</b> ) .....	63
5.5	Syntéza 2-bromanisolu ( <b>69a</b> ) .....	64
5.6	Syntéza ethyl 2-(2-methoxyfenyl)benzofuran-3-karboxylátu ( <b>68</b> ) .....	65
5.7	Syntéza coumestanu ( <b>3</b> ) .....	66
5.8	Syntéza 1,2-bis(2-methoxyfenyl)ethynu ( <b>84</b> ) .....	67
5.9	Syntéza 2-(2-methoxyfenyl)benzofuranu ( <b>83</b> ).....	68

5.10	Syntéza 2-(2-methoxyfenyl)benzofuran-3-karbaldehydu ( <b>98</b> ) .....	69
5.11	Syntéza 2-(2-methoxyfenyl)benzofuran-3-karboxylové kyseliny ( <b>102</b> ).....	70
5.12	Syntéza ethyl 2-(2-methoxyfenyl)benzofuran-3-karboxylátu ( <b>68</b> ) .....	71
<b>6</b>	<b>Použitá literatura .....</b>	<b>72</b>
<b>7</b>	<b>Příloha.....</b>	<b>76</b>



---

## Seznam zkratek

CC	sloupcová chromatografie ( <i>column chromatography</i> )
CDC	křížený dehydrogenační coupling ( <i>cross dehydrogenative coupling</i> )
CDCl <sub>3</sub>	deuterovaný chloroform
CI	<i>chalkonizomeráza</i>
CR	<i>chalkonreduktáza</i>
CS	<i>chalkonsyntáza</i>
C4H	<i>4-hydroxylyáza</i>
DCM	dichlormethan
DDQ	2,3-dichlor-5,6-dikyanbenzochinon
deg.	degradace
DH	<i>dehydratáza</i>
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethyl sulfoxid
dppf	1,1'-bis(difenylfosfino)ferrocen
ekviv.	ekvivalent
grad.	gradient
HRMS	hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením ( <i>high-resolution mass spectrometry</i> )
IFR	<i>isoflavonreduktáza</i>
IFS	<i>isoflavonsyntáza</i>
kat.	katalýza
LDA	diisopropylamid lithný
MOM	methoxymethyl ether
m. p.	bod tání ( <i>melting point</i> )
MS	hmotnostní spektrometrie ( <i>mass spectrometry</i> )
MW	mikrovlnné záření
n. a.	neanalyzováno ( <i>not analyzed</i> )
n. d.	nedetekováno ( <i>not detected</i> )
NIS	<i>N-jodsukcinimid</i>

NMR	nukleární magnetická resonance ( <i>nuclear magnetic resonance</i> )
n. p.	neprobíhá ( <i>not in progress</i> )
<i>PAL</i>	<i>fenylalaninamoniumlyáza</i>
ppm	parts per million
$R_f$	retenční faktor
rt	laboratorní teplota ( <i>room temperature</i> ), 23 °C
RVO	rotační vakuová odparka
TFA	trifluoroctová kyselina
TMS	trimethylsilyl
THF	tetrahydrofuran
TLC	chromatografie na tenké vrstvě ( <i>thin-layer chromatography</i> )
<i>4CL</i>	<i>4-kumarát-koenzym A ligáza</i>
1,2-DCE	1,2-dichlorethan
<i>12'H</i>	<i>isoflavon 2'-reduktáza</i>
1,10-phen	1,10-fenantrolin

---

# 1 Úvod

Přemýšleli jste někdy o tom, proč se cítíme v přírodě tak příjemně? Proč zde zanecháváme nepříjemné starosti a čerpáme potřebnou pozitivní energii? Určitě jste přišli na to, že to mají na svědomí zelené rostliny. Jak by nám také nebylo dobře, když my sami jsme součástí přírody, třebaže si to mnohdy ani neuvědomujeme. Doba se mění a vztah k rostlinám s sebou přináší i spoustu etických a filozofických otázek. Přestává být strom živou bytostí, když se do něj zasekne pila? Jakou energii nám přináší ve formě dřeva, které nás obklopuje? Jak bytostně jsme s rostlinami spjati, když nám v podobě kávy, čaje nebo třeba ovoce a chleba denně voní na stole? Schopnost přírody vytvářet komplikované i nekomplikované látky, jak se zdá, nemá meze. Člověk se snaží přírodu jakkoli napodobit či se jí inspirovat, a to platí i pro farmaceutický průmysl. V průběhu zkoumání oné přírodní látky je vědec dříve či později konfrontován s její syntézou, což může mít různé důvody. Možná chce zkontrolovat správnost nalezené struktury. Možná chce zlepšit naše znalosti o reakcích a chemických vlastnostech molekuly. Pokud má látka praktický význam, může doufat, že syntetická sloučenina bude levnější nebo snadněji dostupná než přírodní produkt. Může být také žádoucí modifikovat detaily v molekulární struktuře za účelem vyšší účinnosti biologické aktivity či snížení nežádoucích vedlejších účinků.<sup>1</sup>

Exkurze do přírody by nebyla úplná, kdyby se v ní neobjevil historický příběh. Zrod totální syntézy nastal v 19. století, kdy německý chemik Friedrich Wöhler v roce 1828 náhodně provedl syntézu močoviny *de novo* mimo živý systém, jednoduše po zahřátí kyanatanu draselného se síranem amonným.<sup>2</sup> Paradigma té doby bylo, že organické, přírodě podobné látky lze tvořit pouze živými bytostmi, bylo zlomeno. Syntéza kyseliny octové z elementárního uhlíku Hermannem Kolbem v roce 1845 je druhým velkým úspěchem v historii totální syntézy.<sup>3</sup> Mezi přelomové úspěchy v historii totální syntézy 19. století patří celková syntéza rostlinného červeného barviva alizarinu od Graebeho a Liebermanna z roku 1869<sup>4</sup>, či rostlinného modrého barviva indiga od Baeyere z roku 1878<sup>5</sup>, a konečně totální syntéza D-(+)-glukózy z roku 1890<sup>6</sup> od druhého držitele Nobelovy ceny za chemii, Emila Fischera, která je nejen pozoruhodná složitostí cíle, který poprvé zahrnoval stereochemické prvky, ale také

značnou stereochemickou kontrolu, která ji doprovázela. Od té doby chemici syntetizovali nespočet významných a praktických bioaktivních přírodních produktů. Totální syntéza komplexních přírodních produktů stále zůstává jednou z nejvíce vzrušujících a dynamických oblastí výzkumu.<sup>7</sup> Syntéza takových komplexních molekul spojená s pokrokem v syntetických strategiích hraje v moderní civilizaci klíčovou roli. Z fundamentálního hlediska je totální syntéza autentickou platformou pro prokázání nových metodologií a nových strategií či způsobu myšlení. Totální syntéza také pěstuje porozumění základním principům chemie: jak a proč probíhají reakce, vztahy mezi tvarem a funkcí molekuly, stereochemické aspekty a související problémy. Syntetická organická chemie je nyní spojena s biologií, lékařskou chemií a materiálovými vědami. Tato oblast chemie tak nepřetržitě čelí výzvě nových chemických řešení ze zdánlivě neomezené knihovny molekulárních architektur přírody. Současně se postup totální syntézy také krok za krokem obohacuje o nově vyvinuté syntetické strategie, činidla, katalyzátory, analytickou instrumentaci a tak mění původní cíl totální syntézy – potvrdit strukturu izolovaného přírodního produktu spíše za zkoumání a objevování nových chemických postupů na cestě k cílovým molekulám. Farmaceutický průmysl pak například aplikuje získané znalosti k objevování a výrobě nových léků pro prospěch společnosti.

V rámci mé diplomové práce se zaměřuji právě na látky rostlinného původu, konkrétně na rostlinné sekundární metabolity – coumestany, jenž mnohdy patří mezi molekulární cíle totální syntézy. Záměrem tohoto projektu je vyvinout konvergentní a přímočarou syntézu vedoucí k přípravě coumestanů a jejich derivátů. Vykazují totiž i zajímavou biologickou aktivitu, což patří mezi hlavní důvody jejich syntézy a studie.

## 1.1 Cíle práce

Na počátku řešení této práce byly vytyčeny následující cíle:

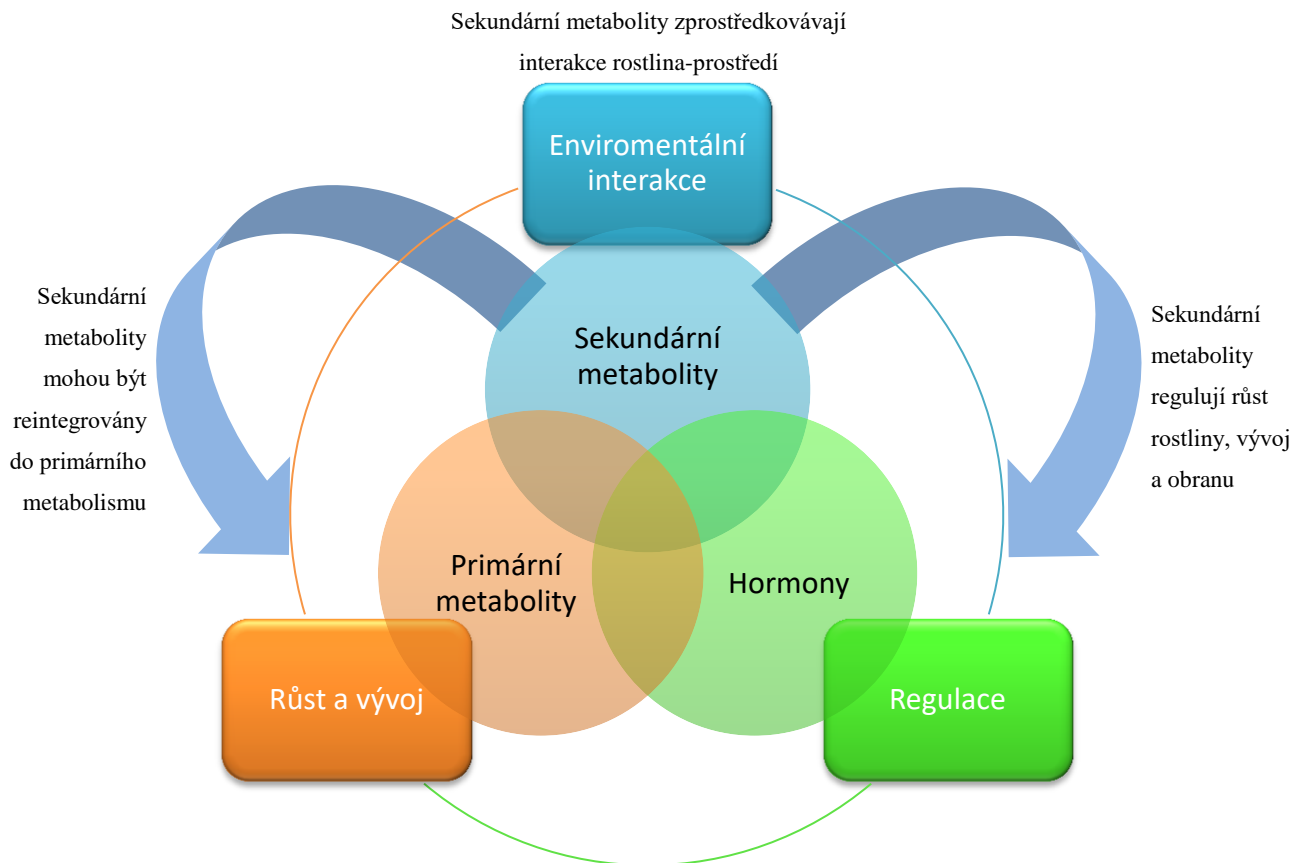
1. Vypracovat literární rešerši zabývající se syntézou a biologickou aktivitou coumestanů.
2. Připravit vybrané deriváty coumestanů, zejména pak látek odvozených od coumestanu a coumestrolu.
3. Charakterizovat všechny připravené látky pomocí dostupných fyzikálně-chemických metod.

---

## 2 Teoretická část

### 2.1 Rostlinné sekundární metabolity

Rostlinná říše produkuje statisíce organických sloučenin, které na základě předpokládaných funkcí výzkumná komunita klasifikovala do tří zastřešujících skupin (Obr. 1): hormony, které regulují procesy v organismu; primární metabolity, které jsou přímo nezbytné pro život rostliny; a sekundární metabolity, které zprostředkovávají interakci rostlina-prostředí. Přesné biochemické hranice mezi těmito třemi třídami látek však doopravdy nelze stanovit a ani se o to nikdy nikdo plně nepokusil.

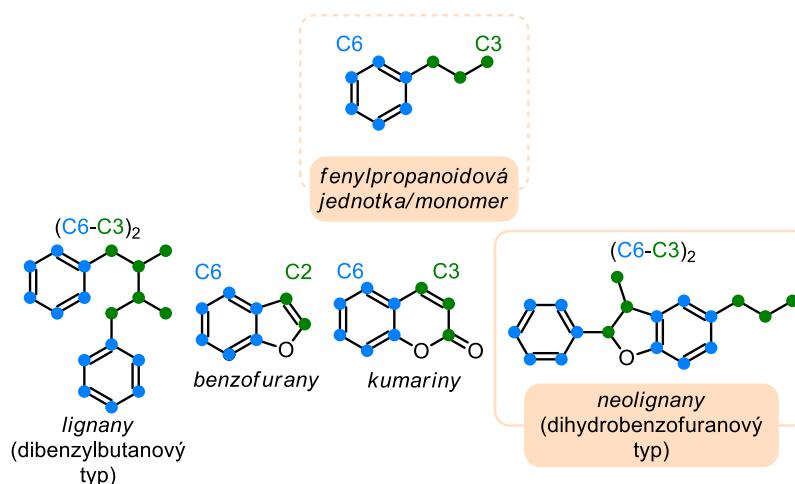


**Obr. 1:** Funkční klasifikace organických sloučenin v rostlinách – sekundární metabolity, primární metabolity a hormony

Rostlinné hormony jsou definovány jako malé organické sloučeniny, které regulují procesy v organismu, včetně produkce ostatních metabolitů, interakcí s receptorovými proteiny.<sup>8</sup> Rostlinné primární metabolity mají zásadní roli spojenou s fotosyntézou, dýcháním, růstem a vývojem, a nachází se v těle rostliny ve vysokých koncentracích. Oproti tomu produkce rostlinných sekundárních metabolitů je značně nižší. Ty jsou strukturně různorodé a mnohé jsou distribuovány mezi velmi omezený počet druhů v rámci rostlinné říše. I když byly dlouho ignorovány, jejich funkce v rostlinách nyní přitahuje pozornost, protože některé mají klíčovou roli např. při ochraně rostlin před UV, býložravci a mikrobiální infekcí; působí jako atraktanty pro opylovače a zvířata dispergující semena. Rostlinné sekundární metabolity jsou také zajímavé, protože se používají jako barviva, vlákna, lepidla, oleje, vosky, ochucovadla, léky a parfémy a jsou považovány za potenciální zdroje např. nových přírodních léčiv, antibiotik, insekticidů a herbicidů.<sup>9</sup>

Na základě jejich biosyntetického původu lze sekundární metabolity rostlin rozdělit do tří hlavních skupin: a) flavonoidy a příbuzné fenolické a polyfenolické sloučeniny, b) terpenoidy a c) alkaloidy obsahující dusík a sloučeniny obsahující síru.<sup>10</sup>

Nejběžnější typy rostlinných fenolických látek lze přehledně klasifikovat například podle počtu uhlíků a jejich vzájemných vazeb. V této práci se však zaměřuji na fenylypropanoidové dimery – neolignany, přesněji na coumestany (Obr. 2).<sup>11</sup>



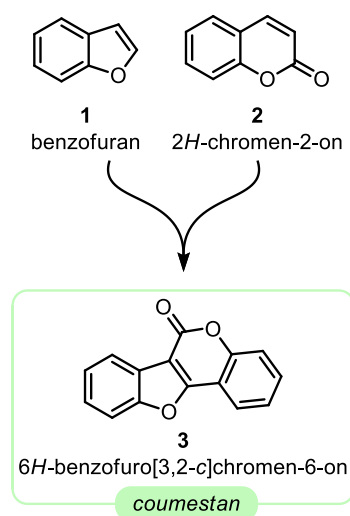
**Obr. 2:** Vybrané typy fenylypropanoidů s charakteristickými strukturami

## 2.2 Coumestany

Fenylpropanoidy tvoří velmi rozsáhlou skupinu rostlinných sekundárních metabolitů, pozoruhodných svojí bohatou strukturní variabilitou a značně širokým rozsahem biologických funkcí a účinků, a to jak v rostlině samotné, tak i působením na organismy jiných druhů. Chemická rozmanitost fenylpropanoidů není náhodná, ale je výsledkem specificky vyvinutých a řízených biogenetických drah, které se promítají do příslušných rostlinných metabolismů.<sup>12</sup>

Fenylpropanoidové jednotky dávají možnost vzniku dimerů rozličných typů, mezi které patří lignany a neolignany. Lignany vznikají oxidativní dimerizací dvou fenylpropanoidových monomerů spojených centrálními uhlíky jejich propanových bočních řetězců (C-8 a C-8'). Všechny jiné spojení, jako je např. přímé spojení fenylů nebo jejich spojení skrze jednu nebo dvě etherové vazby, dává vzniku neolignanů.<sup>13</sup>

Mezi neolignany právě patří tetracyklické aromatické sloučeniny – coumestany. Fúzí benzofuranu **1** s chromen-2-onem **2** (známý pod triviálním názvem – kumarin) vzniká základní kostra coumestanů – 6*H*-benzofuro[3,2-*c*]chromen-6-on **3** (Obr. 3).<sup>14</sup>

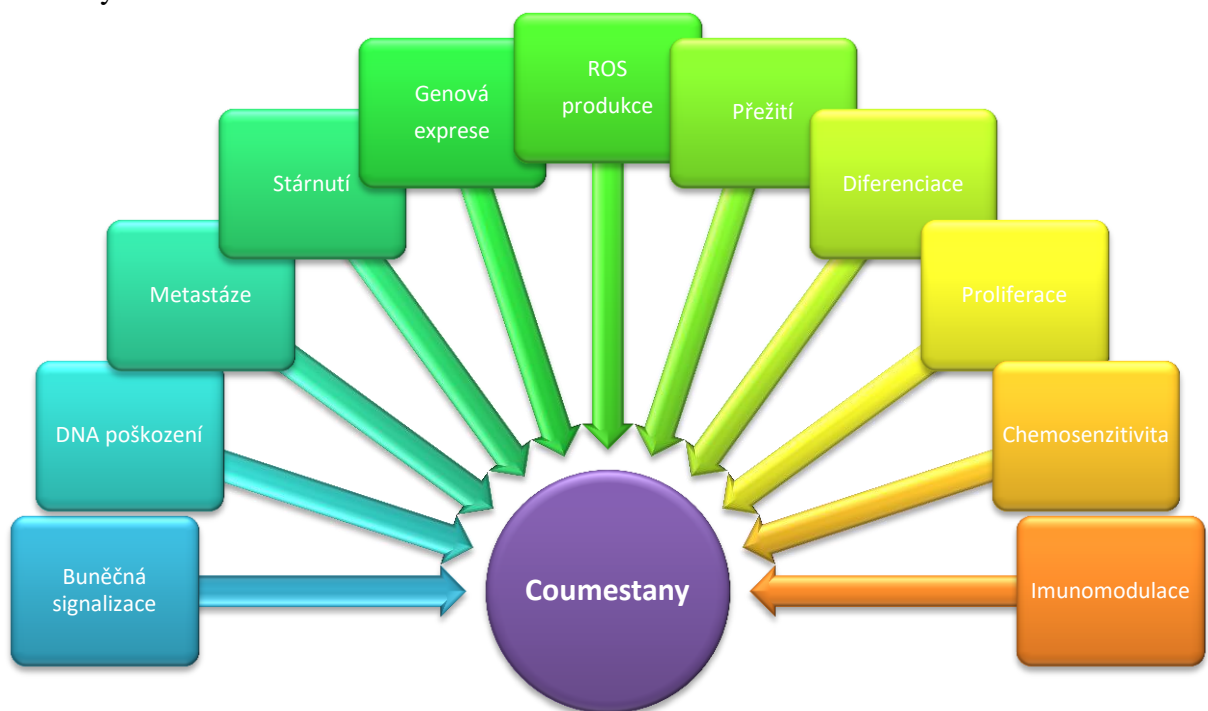


**Obr. 3:** Základní kostra coumestanů – 6*H*-benzofuro[3,2-*c*]chromen-6-on **3**

## 2.2.1 Obecné vlastnosti

Coumestany byli poprvé izolovány extrakcí v 50. letech 20. století z tolíce vojtěšky (mezinárodně alfalfa), jetele plazivého, srhy laločnaté a košťavy stříbrné.<sup>15</sup> Dále se tyto fyto-sloučeniny nachází v různém množství v námi běžně konzumovaných potravinách, jako jsou např. produkty obsahující sójovou mouku – pizza, bílý chléb či v luštěninách – fazole, v ovoci – pomeranč, grapefruit a v mnoha dalších.<sup>16</sup>

Studie na lidech, zvířatech a systémech buněčných kultur naznačují, že tyto látky hrají důležitou roli např. při prevenci symptomů menopauzy, osteoporózy, rakoviny a srdečních chorob. Navrhované mechanismy účinku zahrnují také estrogenní a antiestrogenní účinky, indukci diferenciac rakovinných buněk, inhibici aktivit tyrosinkinázy a DNA topoizomerázy, potlačení angiogeneze a antioxidační účinky.<sup>17</sup> Molekulární mechanismy zprostředkovávající jejich účinky na rakovinné buňky jsou shrnuty na Obr. 4.<sup>14</sup>

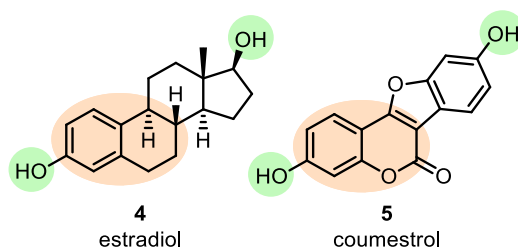


**Obr. 4:** Aktivity coumestanů související s rakovinou (převzaté a upravené z Nehybová et al. 2014)

Díky výše zmíněnému estrogennímu účinku se coumestany řadí mezi fytoestrogeny, mezi které patří také např. flavony, flavanony, chalkony či lignany.<sup>18</sup> Biologická aktivita fytoestrogenů se odvozuje z její strukturní podobnosti s lidskými steroidními estrogeny – např. estradiol **4** (Obr. 5), s nimiž sdílí analogické funkční



skupiny v obdobné topologii, jež jim zajišťuje obdobné vazebné schopnosti k estrogenovým receptorům  $\alpha$  a  $\beta$ .



**Obr. 5:** Strukturní podobnost estrogenu estradiolu **4** s fytoestrogenem coumestolem **5**

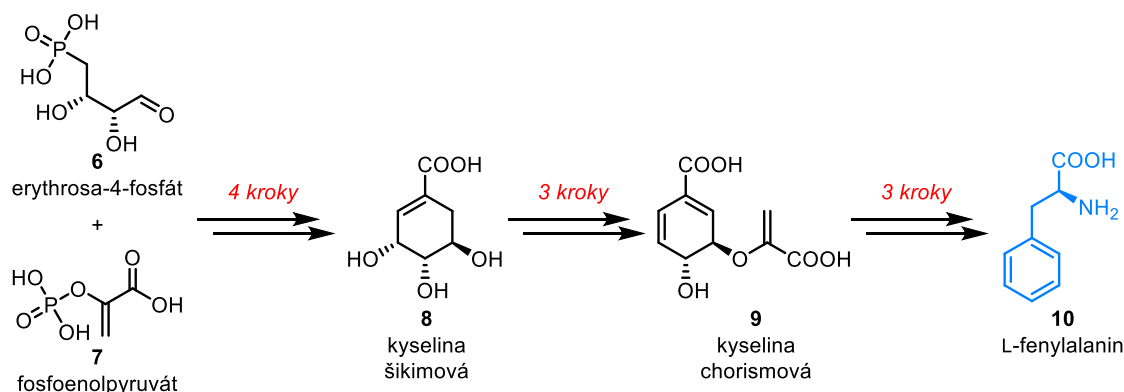
Navíc fytoestrogeny mají podobnou polaritu a molekulovou hmotnost jako estrogeny. Významným rysem chemické struktury fytoestrogenů je pak přítomnost fenolového kruhu, který je obecně nezbytným předpokladem pro vazbu na estrogenový receptor.<sup>19</sup> Coumestany mohou být tak prospěšné při nástupu nebo během menopauzy, která je způsobena prudkým poklesem produkce estrogenních hormonů ve vaječnicích. Obecně se má za to, že snížení gonadálních estrogenů v ženském těle způsobuje řadu fyziologických změn, které mají za následek symptomy, jako jsou návaly horka, atrofická vaginitida (zánět pochvy z nedostatku ženských pohlavních hormonů) a vaginální suchost, a které přispívají k rozvoji osteoporózy a zvýšenému riziku koronárního srdečního onemocnění.<sup>20</sup> Tyto změny lze zvrátit systémově podávanými exogenními estrogeny – coumestany.<sup>17</sup>

### 2.2.2 Biosyntéza

Rostliny mají obrovskou schopnost *de novo* syntetizovat sekundární metabolity z jednoduchých prekurzorů primárního metabolismu prostřednictvím důmyslné sekvence reakcí katalyzovaných specifickými enzymy, které vykazují vysokou substrátovou specifitu.<sup>21</sup>

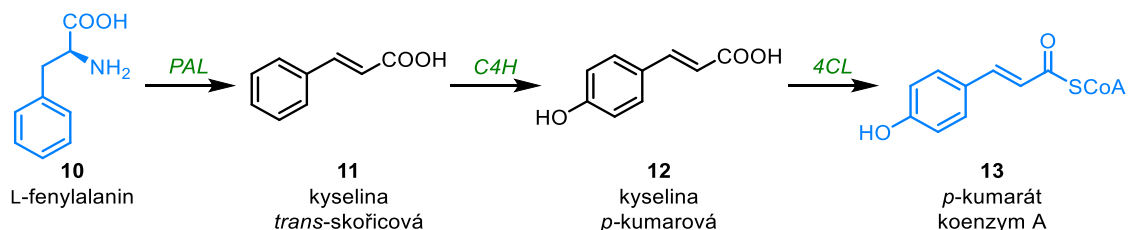
Biosyntéza coumestanů začíná šikimátovou dráhou, která spojuje metabolismus sacharidů s biosyntézou aromatických látek. Následně pokračuje fenyylpropanoidovou dráhou, která zahrnuje biogenezi různých fenolických sloučenin.<sup>22</sup> Šikimátová dráha se nachází pouze u mikroorganismů a rostlin, nikoli u zvířat. V sekvenci sedmi metabolických kroků jsou erythrosa-4-fosfát **6** a fosfoenolpyruvát **7** přeměněny na kyselinu chorismovou **9**, přes vznik kyseliny šikimové **8** (Obr. 6). Kyselina chorismová

**9** je považována za prekurzor aromatických kyselin (L-fenylalanin **10**, L-tryptofan, L-tyrosin) a mnoho dalších aromatických sekundárních metabolitů.<sup>23</sup>



**Obr. 6:** Klíčové intermediáty šikimátové dráhy

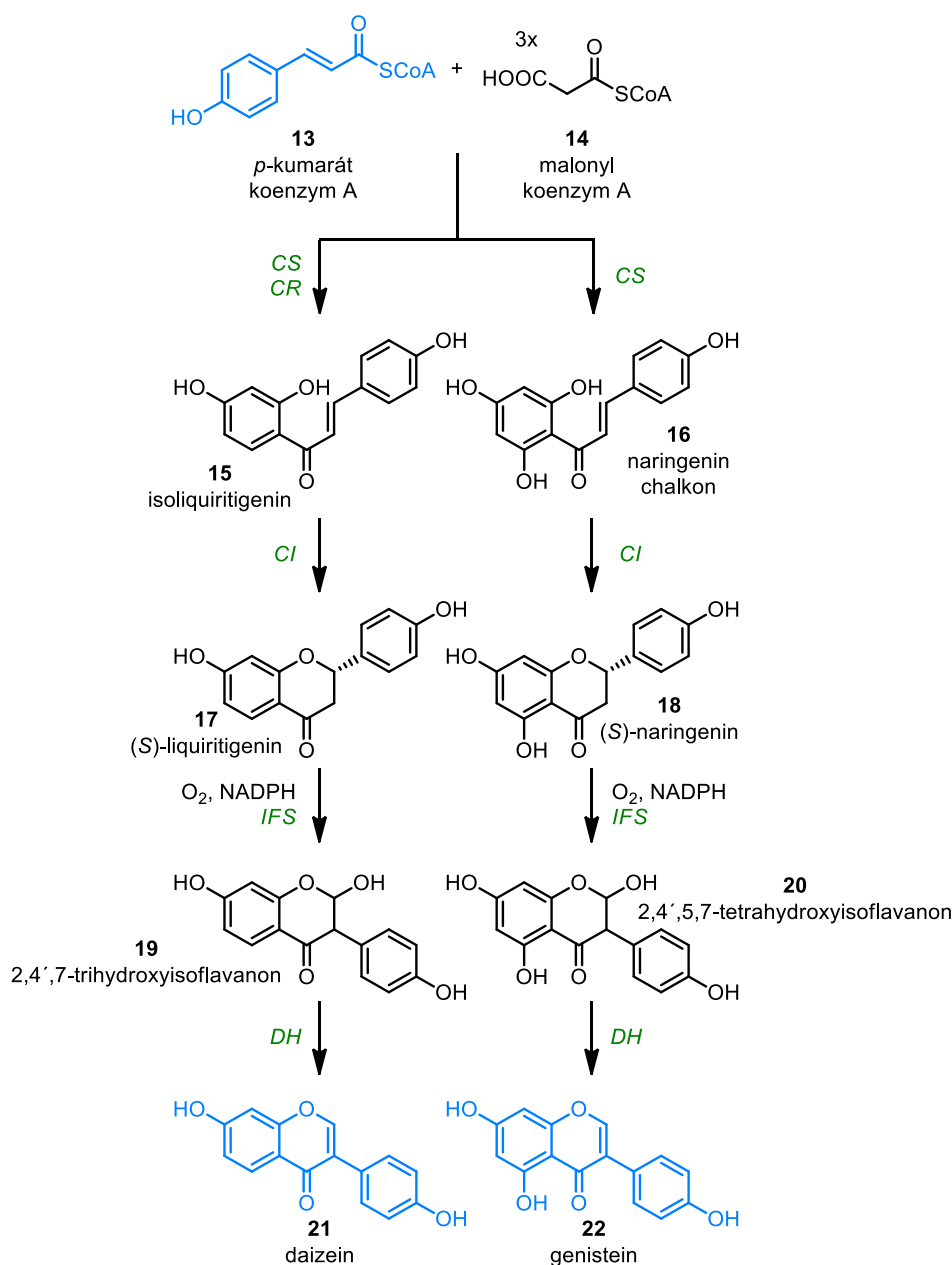
Dále následuje tříkroková biosyntéza L-fenylalaninu **10**<sup>24</sup>, který poté podléhá v cytoplazmě neoxidativní deaminační reakci *fenylalaninamoniumlyázou* (*PAL*) na kyselinu *trans*-skořicovou **11** a amoniak<sup>25</sup>, což je začátek fenylypropanoidové dráhy, která je pro všechny coumestany stejná (Obr. 7).



**Obr. 7:** Klíčové intermediáty počátku fenylypropanoidové dráhy (*PAL* = *fenylalaninamoniumlyáza*, *C4H* = *4-hydroxylyáza*, *4CL* = *4-kumarát-koenzym A ligáza*)

Na molekulu kyseliny *trans*-skořicové **11** se připojuje hydroxylová funkční skupina a přeměňuje se tak na 4-hydroxyskořicovou kyselinu **12** (známá pod triviálním názvem – kyselina *p*-kumarová) prostřednictvím *4-hydroxylyázy* (*C4H*). Posléze reakcí kyseliny *p*-kumarové **12** a *4-kumarát-koenzym A ligázy* (*4CL*) vzniká *p*-kumarát koenzym A **13**.

Biosyntetická dráha se dále rozbíhá do dvou směrů v závislosti na rovnováze mezi enzymy *chalkonsyntázou* (*CS*) a *chalkonreduktázou* (*CR*) (Obr. 8).

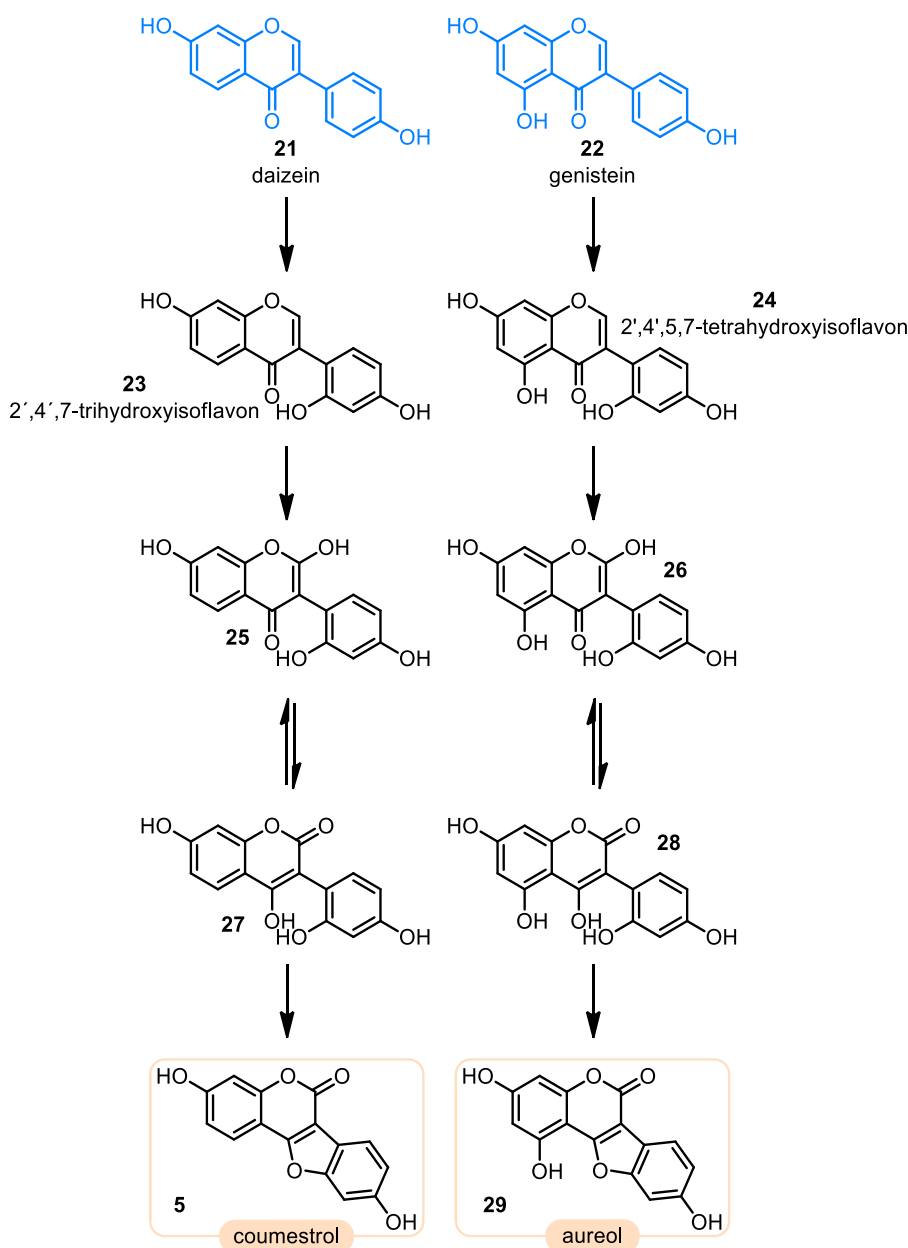


**Obr. 8:** Nástin biosyntézy isoflavonů daizeinu **21** a genisteinu **22** – klíčových výchozích látek pro vznik coumestanů (*CS* = *chalkonsyntáza*, *CR* = *chalkonreduktáza*, *CI* = *chalkonizomeráza*, *IFS* = *isoflavonsyntáza*, *DH* = *dehydratáza*)

Naringenin chalcon **16** vzniká kondenzací „head-to-tail“ *p*-kumarát koenzymu A **13** a tří molekul malonyl koenzymu A **14** v reakci katalyzované *chalkonsyntázou* (*CS*). Dalšími třemi kroky tak lze získat inhibitor angiogeneze a fytoestrogen – genistein **22**. Isoliquiritigenin **15**, substrát pro syntézu coumestanů, je katalyzován jak *chalkonsyntázou* (*CS*), tak i *chalkonreduktázou* (*CR*). *Chalkonizomeráza* (*CI*) katalyzuje přeměnu naringenin chalconu **16** a isoliquiritigeninu **15** na flavanony (*S*)-naringenin **18** a (*S*)-liquiritigenin **17**. Další reakce vyžaduje redukovaný koenzym

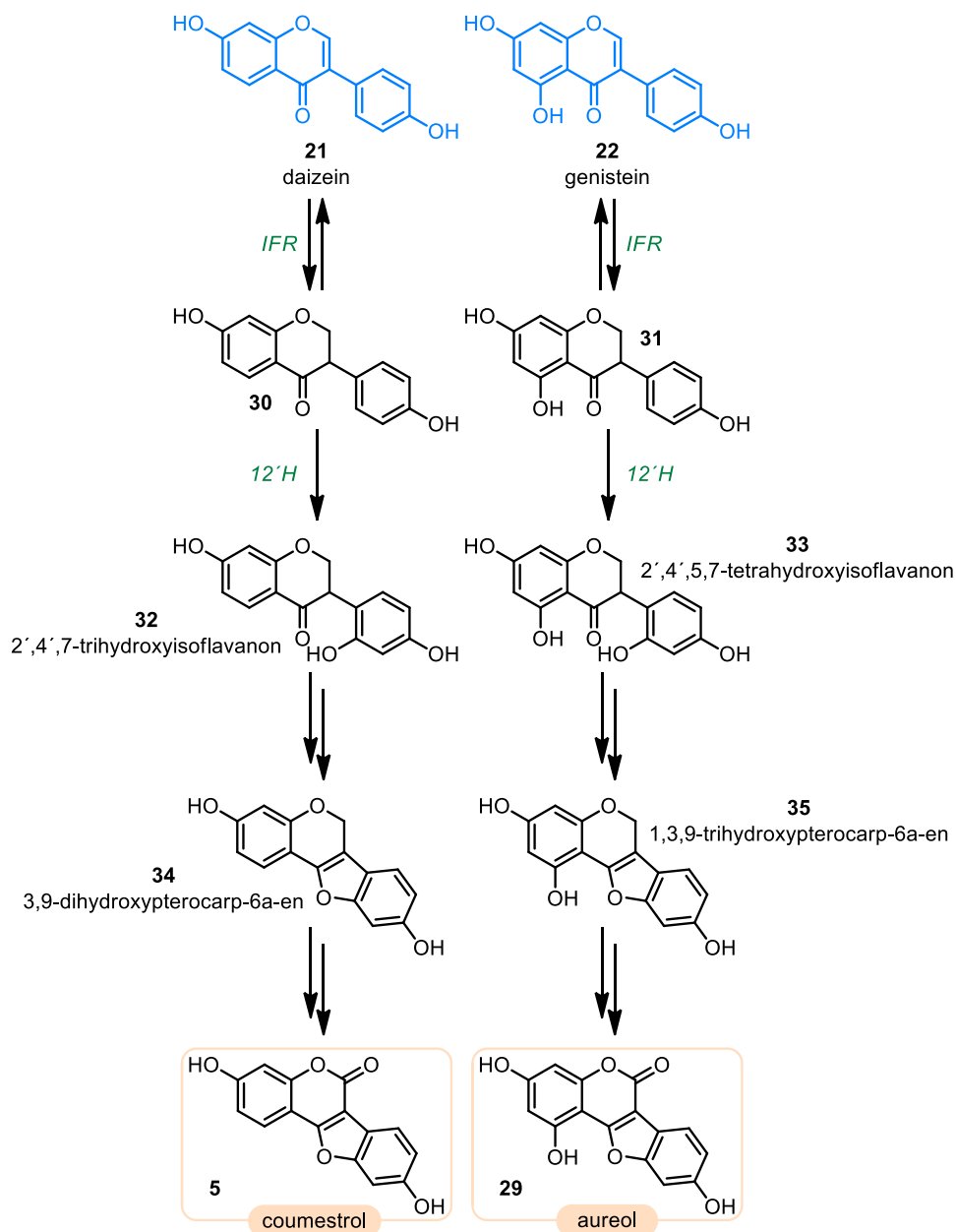
nikotinamidadeninukleotidfosfát (NADPH), molekulární kyslík a je katalyzovaná mikrosomálním enzymem *isoflavonsyntázou* (*IFS*). Dochází k přeměně (*S*)-naringeninů **18** na 2,4',5,7-tetrahydroxyisoflavanon **20** a (*S*)-liquiritigeninů **17** na 2,4',7-trihydroxyisoflavanon **19**. Finální krok biosyntézy vedoucí isoflavonům, genisteinu **22** a daizeinu **21**, je katalyzován enzymem *dehydratázou* (*DH*).<sup>26–28</sup>

V této fázi biosyntézy existují dvě alternativní cesty ke kýženým coumestanům. Jedna cesta se skládá ze tří biosyntetických kroků, které zahrnují klíčovou cyklizaci derivátů kumarinů **27** a **28** (Obr. 9).<sup>29</sup> Z daizeinu **21** lze tedy získat coumestrol **5**<sup>27</sup> a z genisteinu **22** aureol **29**<sup>30</sup>.



**Obr. 9:** První alternativní cesta ke coumestrolu **5** a aureolu **29**

Alternativní biochemickou cestou je pak biosyntéza (Obr. 10) navržená na základě analogie s organickou syntézou a zahrnuje intermediáty **34** a **35**, které jsou deriváty pterocarpanu. Coumestany tak mohou být i produkty oxidace pterocarpanů. Ani jedna z těchto dvou biosyntetických cest nebyla k dnešnímu dni vyvrácena.<sup>29</sup>



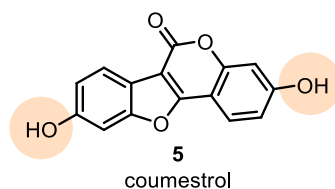
**Obr. 10:** Druhá alternativní cesta ke coumestrolu **5** a aureolu **29** (IFR = isoflavonreduktáza, 12'H = isoflavon 2'-reduktáza)

Pro přehlednost jsem vybrala konkrétně biosyntézu coumestrolu **5** a aureolu **29**. Ostatní coumestany jsou odvozeny od základního skeletu coumestanů. Liší se pouze počtem připojených hydroxylových funkčních skupin na molekule kyseliny *trans*-skořicové **11** a strukturálními modifikacemi intermediátů.

## 2.2.3 Vybraní zástupci coumestanů a jejich biologická aktivita

Rostliny jsou cenným zdrojem biologicky aktivních látek, které mohou pomoci v boji proti nemocem, či v jejich prevenci. Mezi takové látky patří i coumestany. V této kapitole mé diplomové práce jsou shrnuti vybraní zástupci coumestanů, které mají zajímavou biologickou aktivitu. Vykazují totiž nejenom pozoruhodné protirakovinné, antibakteriální či kardiovaskulární účinky, ale jsou známé hlavně kvůli své schopnosti imitovat ženské pohlavní hormony estrogeny. Studie naznačují, že mají potenciál být hodnoceny jako látky spadající do fytoestrogenové hormonální substituční terapie.<sup>31</sup>

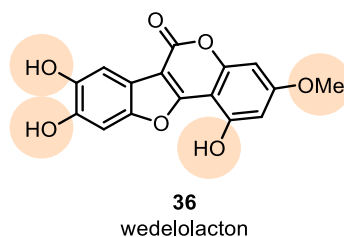
### 2.2.3.1 Coumestrol (5)



**Obr. 11:** Chemická struktura coumestrolu **5** (funkční skupiny, které jsou nad rámec základní tetracycké kostry coumestanů, jsou zvýrazněny)

Coumestrol **5** (Obr. 11) nabyl značného významu od doby, kdy byla prokázána jeho estrogení aktivita. Nejvyšší koncentrace coumestrolu **5** je v klíčcích jetele, který např. spásá dobytek, což mělo za následek zvýšení produkce mléka a masa.<sup>15</sup> Coumestrol **5** je jedním z nejaktivnějších fytoestrogenů, i když podle estrogení aktivity je 100 krát méně aktivní než estradiol **4**. Většina fytoestrogenů interaguje primárně s estrogenovým receptorem  $\alpha$ . Coumestrol **5** má naopak 7 krát vyšší afinitu k estrogenovému receptoru  $\beta$ . Bylo také prokázáno, že coumestrol **5** hraje důležitou roli v patogenezi osteoporózy. Inhibuje *in vivo* resorpční procesy a stimuluje mineralizaci kostní tkáně. Účinek byl studován na buněčné linii MC3T3-E1 na diferenciaci osteoblastů. Coumestrol **5** je rovněž zkoumán jako možná náhrada hormonální terapie a chemoterapie u pacientek s rakovinou prsu. Inkubace MCF-7 (buněčná linie rakoviny prsu) s coumestrolem **5** o koncentraci 20 – 80 nM indukovala reverzní syntézu DNA a tím se potlačil růst buněčné kultury.<sup>32,33</sup>

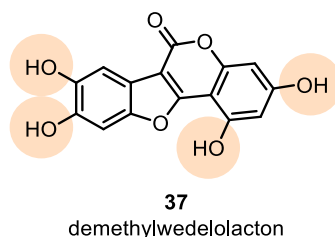
### 2.2.3.2 Wedelolacton (36)



**Obr. 12:** Chemická struktura wedelolactonu **36** (funkční skupiny, které jsou nad rámec základní tetracyklické kostry coumestanů, jsou zvýrazněny)

Wedelolacton **36** (Obr. 12) byl poprvé izolován v roce 1956 z listů byliny *Wedelia calendulacea*, která pochází z Asie, kde se hojně využívá v tradiční čínské medicíně.<sup>34</sup> Souhrnné studie ukázaly, že wedelolacton **36** má různé působivé farmakologické aktivity, jednou, z nichž je i kardiovaskulární aktivita. V dávce 5 – 40  $\mu\text{M}$  vykazuje wedelolacton **36** silný inhibiční účinek proti proliferaci buněk hladkého svalstva cév, při kterém dochází k zástavě buněčného cyklu v G0/G1 fázi. Rovněž působí proti buněčným liniím rakoviny prsu MDA-MB-231, MDA-MB-468 a T47D tak, že inhibuje proteolytické aktivity proteazomu s hodnotami  $\text{IC}_{50}$  27,8, 12,8 a 19,5  $\mu\text{M}$ . Wedelolacton **36** v koncentraci 2  $\mu\text{g/ml}$  také usnadňuje osteoblastogenezi v mezenchymálních kmenových buňkách kostní dřeně, a zároveň inhibuje osteoklastogenezi v RANKL (člen tumor nekrotizujícího faktoru) indukovaných preosteoklastických buňkách. Tyto studie prokázaly, že wedelolacton **36** má tak pozitivní dopad na kostru.<sup>35</sup>

### 2.2.3.3 Demethylwedelolacton (37)

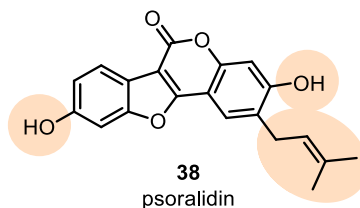


**Obr. 13:** Chemická struktura demethylwedelolactonu **37** (funkční skupiny, které jsou nad rámec základní tetracyklické kostry coumestanů, jsou zvýrazněny)

Demethylwedelolacton **37** (Obr. 13) se přirozeně vyskytuje v drobné bylině *Eclipta alba*, která obývá Indii a Nepál.<sup>36</sup> Demethylwedelolacton **37** má protirakovinné vlastnosti, což bylo zjištěno na lidských buňkách rakoviny prsu MDA-MB-231.

Inhibuje růst, potlačuje buněčnou motilitu a buněčnou invazi buněk MDA-MB-231. Kromě toho demethylwedelolacton **37** snižuje aktivitu a expresi matricových metaloproteináz v buňkách MDA-MB-231. Potlačuje tedy metastáze a kolonizaci plic nádorovými buňkami. Celkově má antiinvazivní růstový účinek na buňky rakoviny prsu.<sup>35</sup>

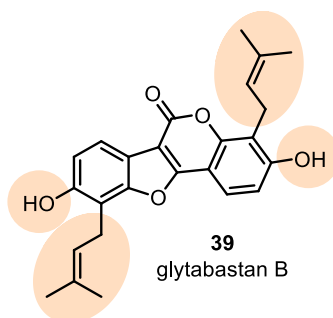
#### 2.2.3.4 Psoralidin (38)



**Obr. 14:** Chemická struktura psoralidinu **38** (funkční skupiny, které jsou nad rámec základní tetracyklické kostry coumestanů, jsou zvýrazněny)

První izolace psoralidinu **38** (Obr. 14) proběhla v roce 1948 ze semen rostliny *Psoralea corylifolia*. Bylo tak zjištěno, že právě psoralidin **38** je biologicky aktivní složkou mnoha indických a čínských tradičních bylinných léků. Psoralidin **38** vykazuje řadu biologických aktivit, jako jsou antioxidační, antibakteriální a antidepresivní aktivity.<sup>37</sup> Byla také prokázána biologická aktivita jako agonisty estrogenového receptoru  $\alpha$  a  $\beta$ , která byla stanovena pomocí relativní hladiny exprese reportérových a endogenních genů v lidských buňkách rakoviny prsu MCF-7.<sup>31</sup>

#### 2.2.3.5 Glytabastan B (39)



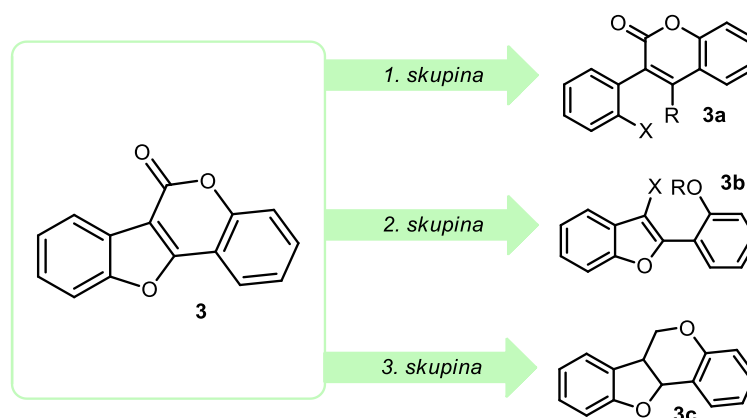
**Obr. 15:** Chemická struktura glytabastanu B **39** (funkční skupiny, které jsou nad rámec základní tetracyklické kostry coumestanů, jsou zvýrazněny)



Kořeny *Glycine tabacina* se v lidovém léčitelství používají k léčbě revmatoidní artritidy a kloubních infekcí. Bylo zjištěno, že glytabastan B **39** (Obr. 15), coumestan izolovaný z této rostliny<sup>38</sup>, výrazně zmírňuje interleukin-1 $\beta$ -indukovaný zánět v lidských synoviálních buňkách SW982 při 3 a 6  $\mu$ M. Glytabastan B **39** také potlačuje osteoklastogenezi, snižuje expresi osteoklastogenních markerů a osteoklasty zprostředkovanou kostní resorpci. Tímto lze říci, že glytabastan B **39** je slibným kandidátem pro vývoj látek pro prevenci a léčbu revmatoidní artritidy.<sup>39</sup>

## 2.2.4 Syntéza coumestanů – vybrané přístupy

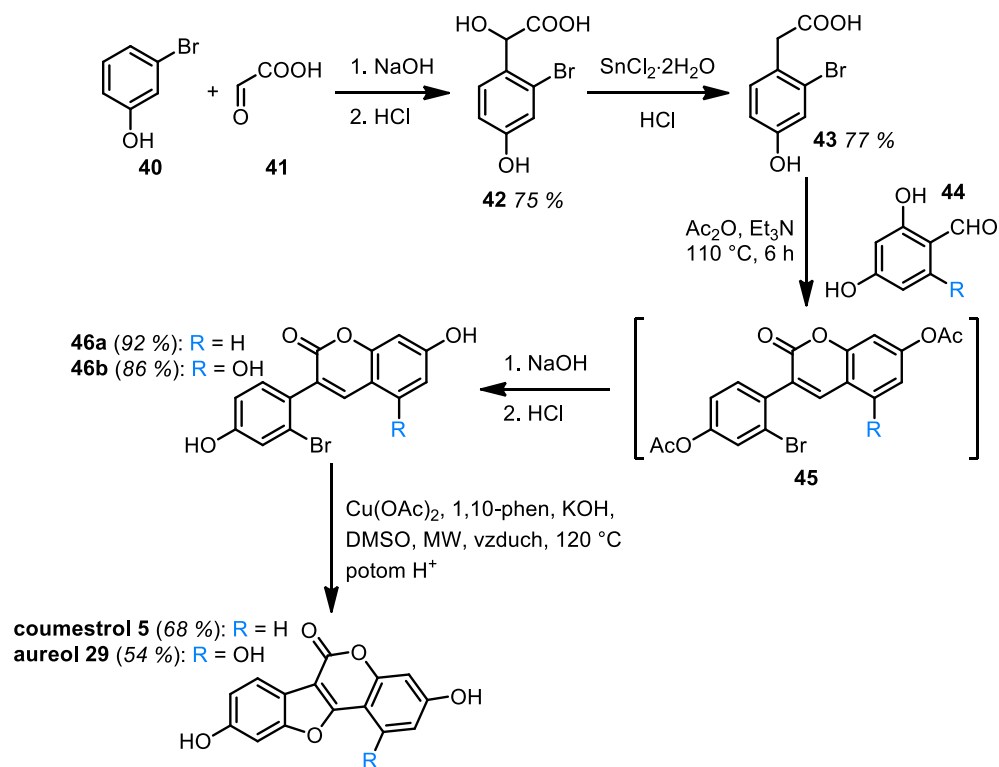
Dostatečně univerzální a ekonomický přístup k syntéze coumestanů nebyl dosud nalezen navzdory relativně jednoduché tetracyklické struktuře a absenci chirálních center. Metody syntézy coumestanů lze rozdělit do tří skupin (Obr. 16). První skupina zahrnuje způsoby, ve kterých se furanový kruh tvoří v posledním kroku na kumarinovém derivátu **3a**. Druhou skupinu tvoří syntetické cesty založené na tvorbě  $\alpha$ -pyronového kruhu v posledním kroku na benzofuranové kostře **3b**; a do třetí skupiny pak patří metody vedoucí přes pterocarpanový systém **3c**, jenž je následně oxidován.



Obr. 16: Rozdělení metod syntézy coumestanů do tří skupin

### 2.2.4.1 První skupina – tvorba furanového kruhu jako klíčový krok

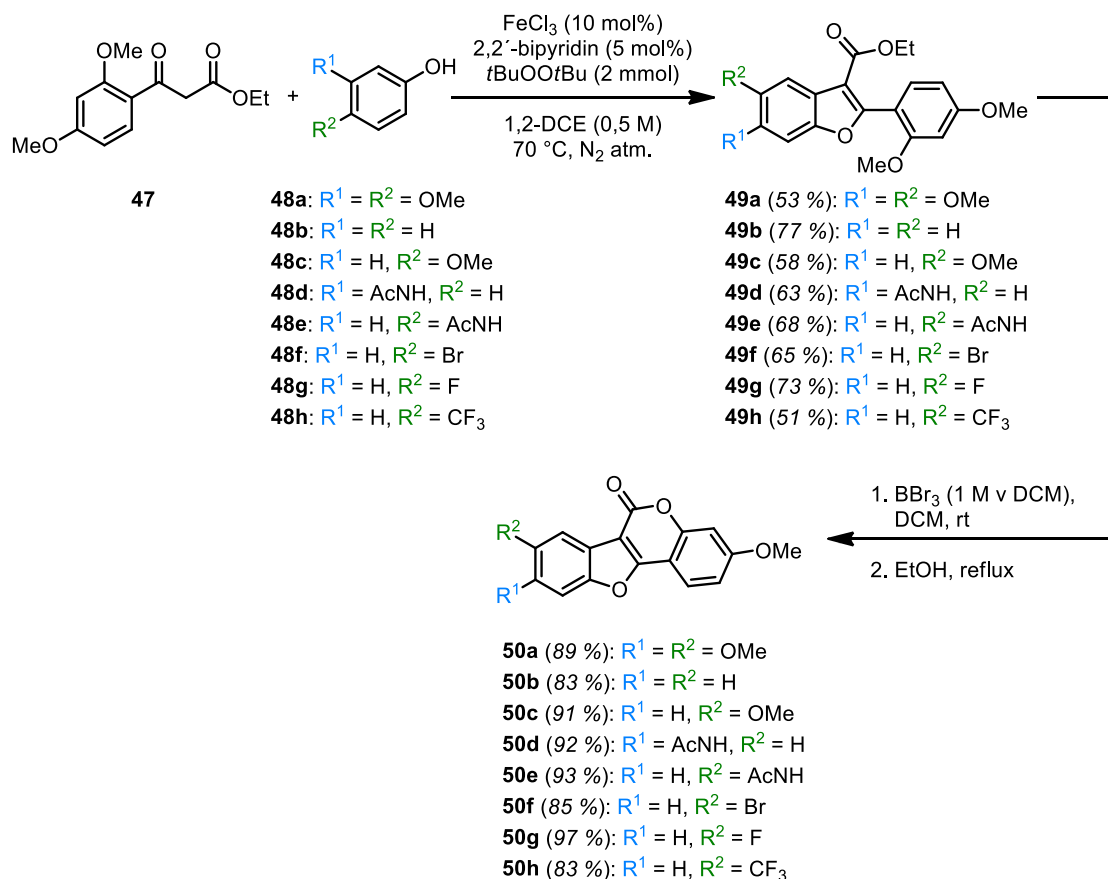
Tato velká skupina syntetických metod přípravy coumestanů je založena na použití kumarinových derivátů jako výchozích látek. Vědecký tým z Univerzity Zhongshan využil tento inovativní přístup při totální syntéze coumestrolu **5** a aureolu **29** (Obr. 17). První krok syntézy začíná Perkinovou kondenzací za vzniku odpovídajícího 2'-brom-3-arylkumarinu **46** a končí mědí katalyzovanou konsekutivní hydroxylací a aerobní oxidační kondenzací iniciovanou mikrovlnným zářením.<sup>30</sup>



Obr. 17: Syntéza coumestrolu **5** a aureolu **29** z derivátů kumarinu **46**

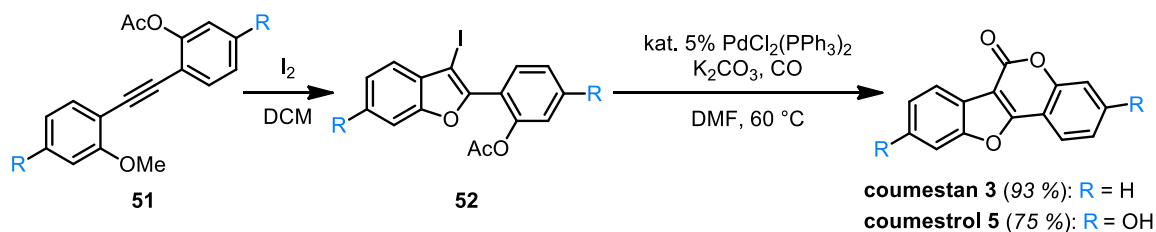
#### 2.2.4.2 Druhá skupina – tvorba laktonu jako klíčový krok

V pořadí druhý typ syntetické cesty vede nejprve přes benzofuranový skelet, který je následně rozšířen o laktonový kruh. Tento postup pak využívá syntetická metoda (Obr. 18) založená na kříženém dehydrogenačním couplingu (CDC) mezi  $\beta$ -ketoesterem **47** a fenolem **48**. Produkt **49** obsahující benzofuran byl poté demethylován a následná intramolekulární laktonizace poskytla produkty coumestanového typu **50**.<sup>40</sup>



**Obr. 18:** Syntéza coumestanů z  $\beta$ -ketoesterů **47** a fenolů **48**

Obdobný přístup využívá syntéza založená na Sonogashira couplingu, jehož pomocí byl získán *o*-alkynylanisol **51**, který následnou jodocyklizací poskytl jodobenzofuran **52** (Obr. 19). Palladiem katalyzovaná intramolekulární laktonizace prostřednictvím inserce oxidu uhelnatého následně vedla ke coumestanovému skeletu.<sup>41</sup>

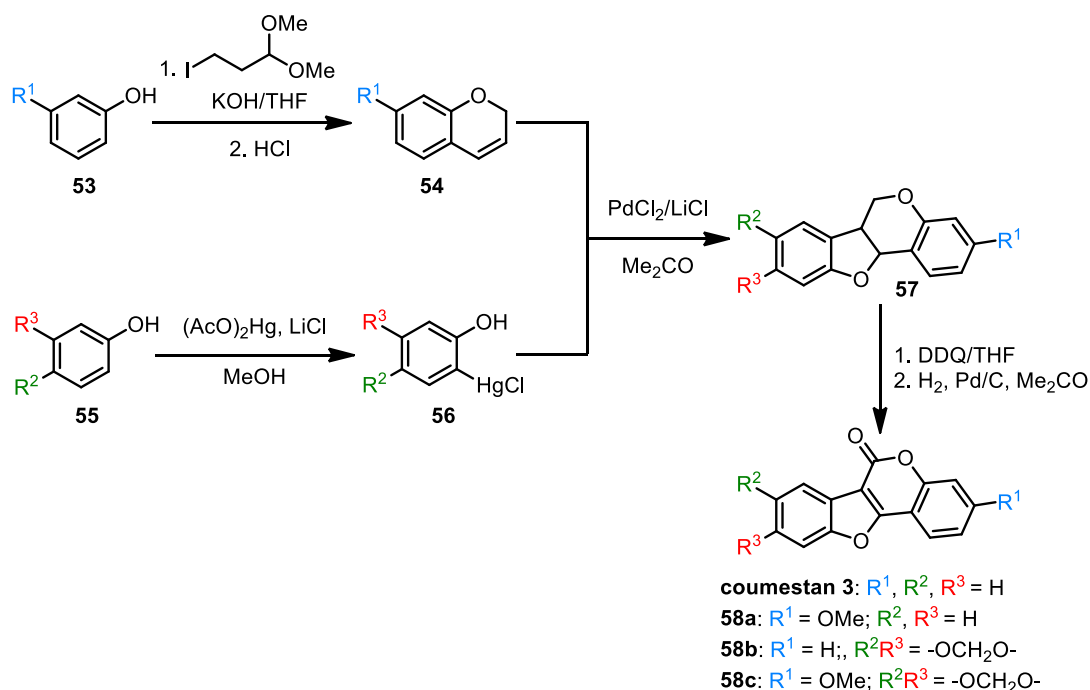


**Obr. 19:** Syntéza coumestanu **3** a coumestrolu **5** z vhodně substituovaného *o*-alkynylanisolu **51**

### 2.2.4.3 Třetí skupina – oxidace pterocarpanového skeletu jako klíčový krok

Oxidace pterocarpanového systému je třetí syntetický přístup, který napodobuje biosyntézu coumestanů v živých systémech. Reakcí substituovaných chromenů **54**

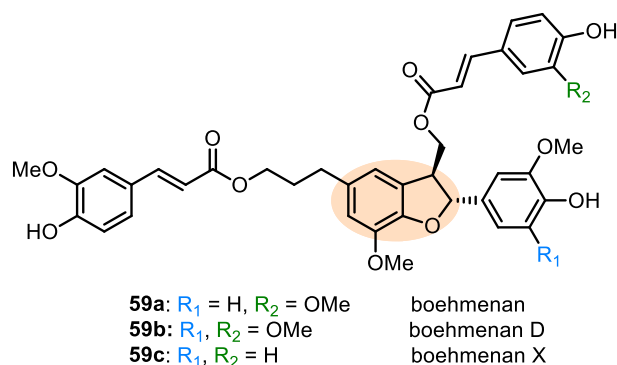
(Obr. 20) se sloučeninami rtuti **56** vznikly různě substituované deriváty pterocarpanu **57**, jejichž oxidací pomocí dichlordikyanbenzochinonem (DDQ) vznikl coumestan **3** a jeho různé deriváty **58**.<sup>33,42</sup>



**Obr. 20:** Syntéza coumestanu **3** a jeho derivátů **58** pomocí oxidace pterocarpanů **57**

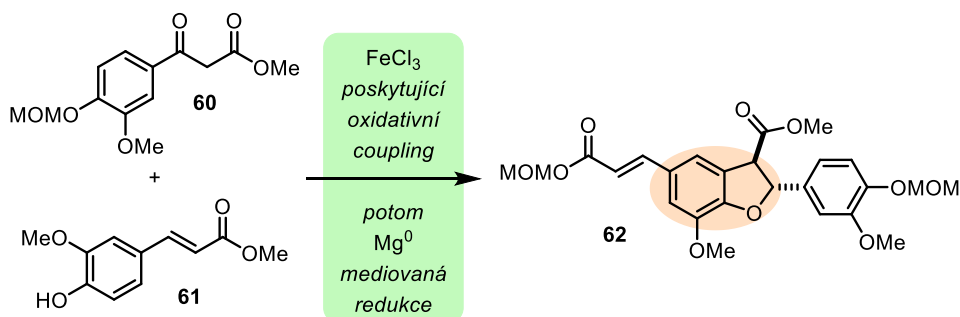
## 2.3 Předcházející práce v naší výzkumné skupině

Výzkum v naší výzkumné skupině kombinuje oblasti organické syntézy, biosyntézy, lékařské chemie a fyzikálně-organické chemie. Jednou ze tří oblastí našeho zájmu jsou rostlinné sekundární metabolity odvozené od fenylylpropanoidů a fenolů. V minulosti jsme se hlavně zaměřili na studium a vývoj nových přístupů vedoucích k neolignanovým skeletům 2,3-dihydrobenzofuranového typu, např. konkrétně na skelet látek známých jako boehmenany **59** (Obr. 21).



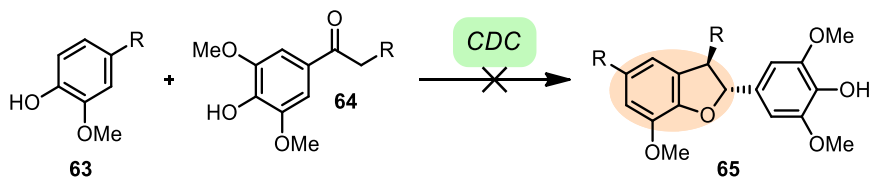
**Obr. 21:** Vybraní zástupci třídy boehmenanů (2,3-dihydrobenzofuranový skelet je zvýrazněn)

Tento výzkum započala Mgr. Hana Kozubíková následovaná Mgr. Danielou Konrádovou Ph.D., a jejichž práce následně byla rozšířena Mgr. Zuzanou Barbuščákovou. V rámci těchto studií, byla vyvinuta metoda založena na  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -mediovaném radikálovém couplingu. Tato metoda však poskytovala nízké výtěžky cílových látek **62** (Obr. 22).<sup>43–45</sup>



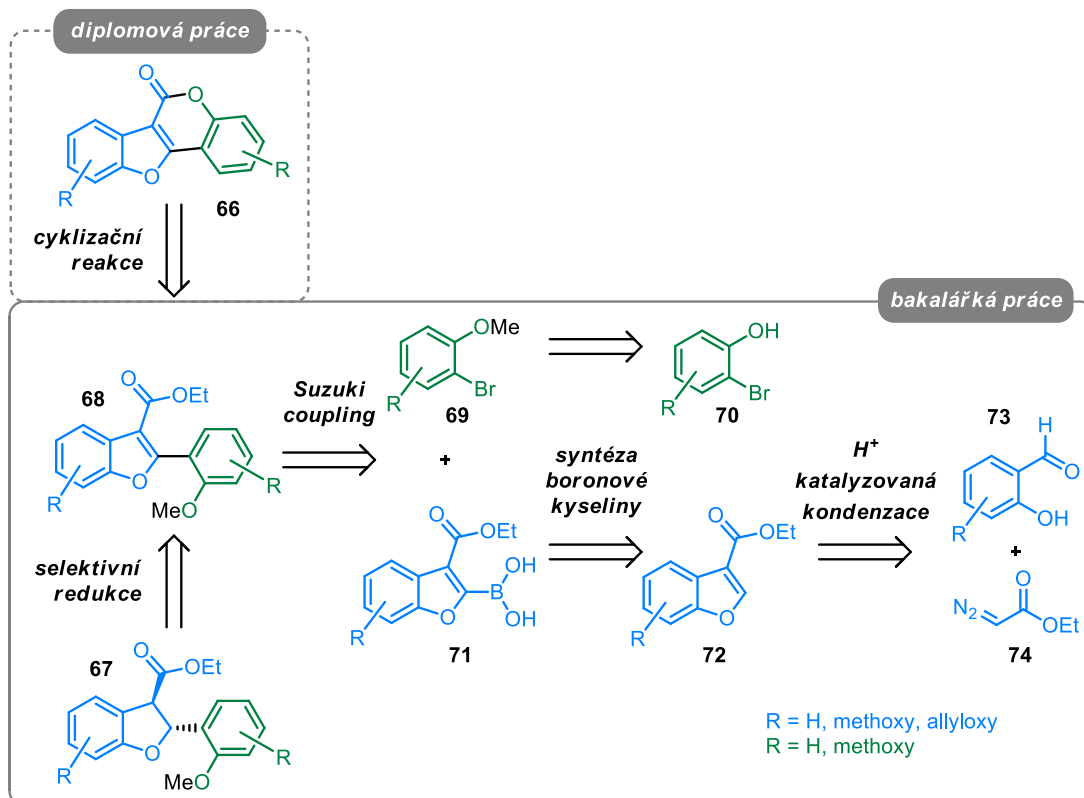
**Obr. 22:** Vyvinutý přístup k neolignanovému skeletu (2,3-dihydrobenzofuranový skelet je zvýrazněn)

Na tuto studii navázali ve svých bakalářských pracích Bc. Pavol Tuna a Mgr. Eliška Lachetová. Klíčovým krokem jejich přístupu byl radikálový křížený dehydrogenační coupling (CDC), který ale neposkytoval 2,3-dihydrobenzofuranový skelet **65** u polysubstituovaných substrátů (Obr. 23).<sup>46,47</sup>



**Obr. 23:** Radikálový křížený dehydrogenační coupling (2,3-dihydrobenzofuranový skelet je zvýrazněn)

Na základě těchto poznatků jsem se následně snažila, v rámci své bakalářské práce, vyvinout konvergentní a přímočarou syntézu vedoucí k přípravě neolignanového skeletu **67** (Obr. 24). Přístup k 2,3-dihydrobenzofuranové kostře byl založen na čtyřech klíčových krocích: kyselé katalyzované kondenzaci salicylaldehydu **73** s diazoesterem **74**, syntéze boronové kyseliny **71**, Suzuki couplingu a redukcí dvojné vazby. Bohužel tento přístup ztroskotal ze sterických důvodů na posledním klíčovém kroku – *trans*-selektivní redukcí 2,3-dvojně vazby v benzofuranovém cyklu **68**.<sup>48</sup>



**Obr. 24:** Retrosyntetický přístup k 2,3-dihydrobenzofuranovému skeletu **67** vyvinutý v rámci mé bakalářské práce a navázání na syntézu coumestanů **66**

I to bylo jedním z důvodů, proč jsme se rozhodli využít získaných zkušeností a znalostí ze syntézy benzofuranového skeletu **68** pro syntézu coumestanové kostry **66**.

## 3 Výsledky a diskuze

Jak již bylo popsáno v úvodní části této diplomové práce, cílem tohoto projektu je vyvinout konvergentní a přímočarou syntézu vedoucí k přípravě coumestanů, zejména pak látek odvozených od coumestanu **3** a coumestrolu **5** (Schéma 1). Dostatečně univerzální a ekonomický přístup k syntéze coumestanů nebyl doposud nalezen, navzdory relativně jednoduché tetracyklické struktuře a absenci chirálních center.

V následujících podkapitolách bych vám, milým čtenářům mé diplomové práce, ráda povyprávěla své putování ke coumestanovému skeletu, protože „kde vůle neschází, cesta se nachází“<sup>49</sup>.

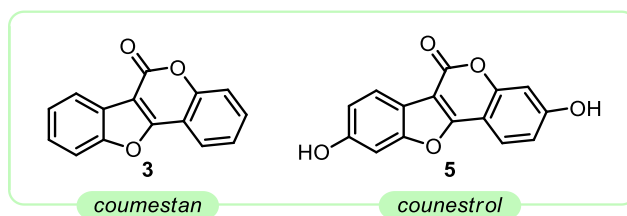
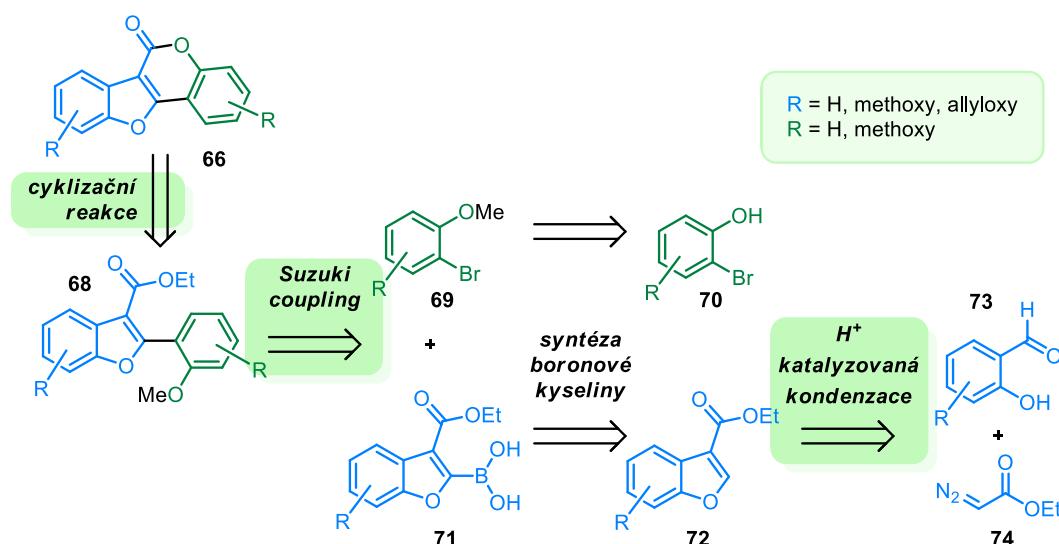


Schéma 1: Struktury cílových molekul – coumestan **3** a coumestrol **5**

### 3.1 1. přístup - retrosyntéza

V rámci své bakalářské práce jsem vyvinula přístup k benzofuranovému skeletu, který jsem následně využila ve své diplomové práci při syntéze coumestanového skeletu (Schéma 2). V minulosti jsme se již několikrát pokoušeli o syntézu 2,3-dihydrobenzofuranového skeletu, které vedli přes vznik benzofuranového skeletu (viz. kapitola 2.3), ale jeden rys měly společný – ani jeden z nich nebyl obecně uplatnitelný. Proto jsme se rozhodli, že náš retrosyntetický přístup musí být co nejobecnější. Při retrosyntetickém plánování jsme tak hlavní důraz kladli na modulární a konvergentní přístup. Tato retrosyntetická cesta je založena na třech klíčových krocích a využívá jak Lewisových kyselin při cyklizační reakci, tranzitních kovů při Suzuki couplingu, tak i Brønstedových kyselin při kysele katalyzované kondenzaci.



**Schéma 2:** První navržená retrosyntéza derivátu coumestanu **66**

Předpokládali jsme tedy, že látka **66** může být připravena intramolekulární laktonizací benzofuranu **68**.<sup>40</sup> Syntéza benzofuranu **68** by byla založena na Suzuki-Miyaura couplingu mezi boronovou kyselinou **71** a odpovídajícím 2-methoxyarylhálogenidem **69**.<sup>50</sup> V tomto kroku bychom mohli zvolit i opačný přístup (benzofuran s hálogenidem a odpovídající arylboronovou kyselinou – modulární přístup), ale z pohledu dostupnosti 2-methoxyarylhálogenidů **69** a z pohledu syntézy borové kyseliny **71** jsme se rozhodli pro tento typ rozpojení. Boronová kyselina **71** může být snadno získána z benzofuranu **72**<sup>51,52</sup> a ten kyselou katalyzovanou kondenzační reakcí salicylaldehydu **73** a diazoesteru **74**<sup>51</sup>.

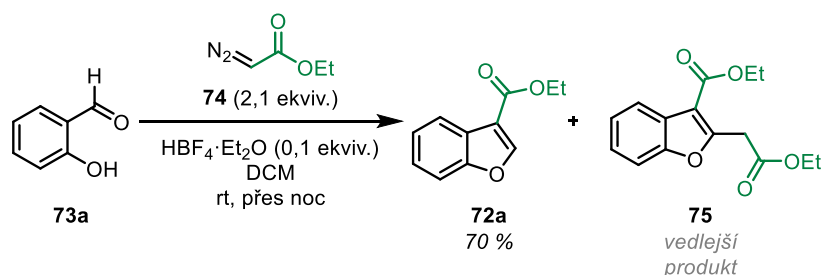
### 3.1.1 Syntéza coumestanu **3**

Svou práci jsem započala syntézou jedné z cílových molekul, a to coumestanem **3**. V následujících podkapitolách jsou popsány jednotlivé kroky syntézy i s jejich optimalizacemi.

#### 3.1.1.1 Kyselou katalyzovaná kondenzace

Počátečním klíčovým krokem našeho syntetického přístupu je kondenzační reakce mezi salicylaldehydem **73a** a ethyldiazoacetátem **74** (Schéma 3). Optimalizované reakční podmínky přípravy ethyl benzofuran-3-karboxylátu **72a** z předchozího bakalářského studia<sup>48</sup> jsem využila a připravila tak výchozí substrát **72a** pro další krok – přípravu boronové kyseliny **71a**.





**Schéma 3:** Optimalizované reakční podmínky přípravy ethyl benzofuran-3-karboxylátu **72a**

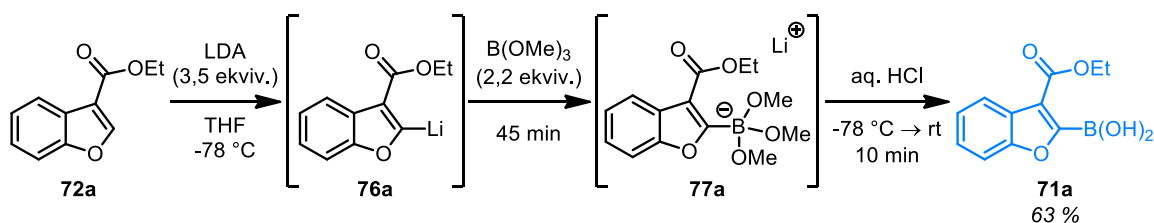
Při optimalizaci reakčních podmínek jsme zjistili, že změnou ekvivalentů a rychlosti přidávání roztoku diazosloučeniny **74** jsme schopni minimalizovat tvorbu vedlejšího produktu **75**. Rozhodli jsme se tedy roztok přidávat kontrolovaným způsobem pomocí injekční pumpy rychlostí 0,06 ml/min. Reakce byla monitorována pomocí TLC a po úplném odreagování výchozí látky **73a** byla zpracována a purifikován prostřednictvím sloupcové kapalinové chromatografie s užitím mobilní fáze hexan/EtOAc 10:1 po sorpci surové látky **72a** na silikagel.

### 3.1.1.2 Suzuki coupling

Po kysele katalyzované kondenzaci vedoucí k benzofuranu **72a** jsme se vrhli na druhý klíčový krok – Suzuki coupling. Abychom mohli tento krok úspěšně uskutečnit, tak jsme si nejprve museli připravit obě výchozí látky – boronovou kyselinu **71a** a 2-methoxyarylháloゲンid **69a**.

#### 3.1.1.2.1 Příprava boronové kyseliny **71a**

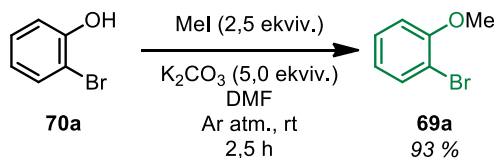
Následně byla zavedena boronová funkční skupina do skeletu benzofuranu **72a** přes organolithný intermediát **76a** (Schéma 4). Jako v předešlém kroku, tak i tyto reakční podmínky byly optimalizovány již během mého bakalářského studia.<sup>48</sup> Byla použita nenukleofilní báze – diisopropylamid lithný, která vygeneruje lithiovaný benzofuran **76a** přímo v reakční směsi. V přítomnosti elektrofilu, trimethylesteru kyseliny borité, se generuje adukt **77a**, který se *in situ* hydrolyzuje na cílovou kyselinu **71a** s celkovým izolovaným výtěžkem 63 %.



**Schéma 4:** Příprava boronové kyseliny **71a** přes organolithný intermediát **76a**

### 3.1.1.2.2 Příprava 2-methoxyarylhalogenidu **69a**

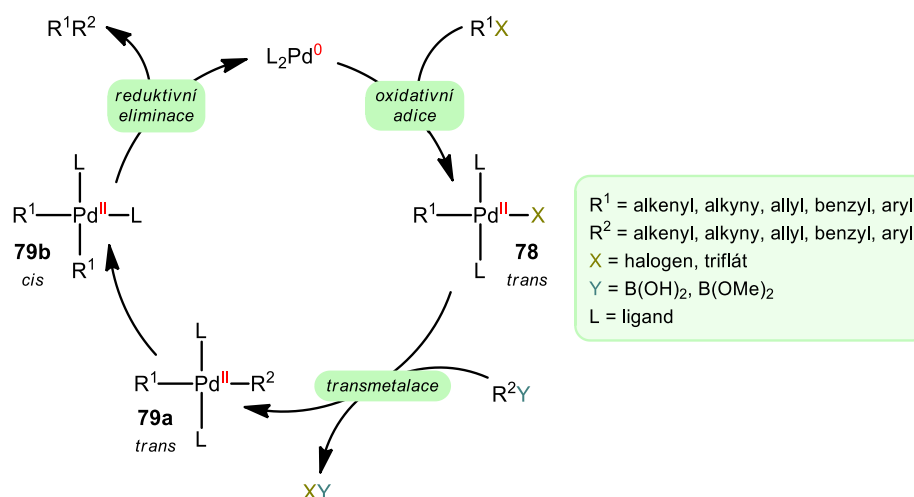
Kontinuálně s přípravou boronové kyseliny **71a** byl připravován i druhý reakční partner, 2-bromanisol **69a** (Schéma 5).<sup>53</sup> Jako výchozí látku jsme zvolili 2-bromfenol **70a**, který byl s pomocí publikovaného protokolu transformován na 2-bromanisol **69a** s výtěžkem 93 %.



**Schéma 5:** Příprava 2-bromanisolu **69a**

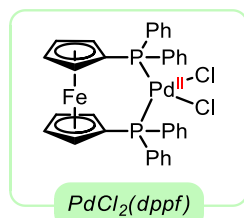
### 3.1.1.2.3 Suzuki coupling – optimalizace couplingového kroku

Suzuki-Miyaura coupling se řadí mezi cross-kopulační reakce<sup>54</sup>, které se vyznačují tím, že jsou katalyzované komplexy přechodných kovů, a u kterých dochází ke spojení dvou fragmentů (organických molekul) za vzniku nové vazby uhlík-uhlík.<sup>55</sup> Mezi reakční komponenty v Suzuki-Miyaura couplingu patří sloučeniny boru (boronová kyselina či její estery), halogen derivát a potřebný palladiový katalyzátor v oxidačním stavu (0), který umožňuje průběh této reakce (Schéma 6). Obecný katalytický cyklus palladiového katalyzátoru v cross-kopulačních reakcích zahrnuje sekvenci po sobě jdoucích transformací – oxidativní adici, transmetalaci a redukční eliminaci. Ačkoli každý krok zahrnuje další procesy včetně výměny ligandů, není pochyb o přítomnosti meziprojektu **78** a **79**. Ty byly charakterizovány izolačními i spektroskopickými analýzami.<sup>56</sup>



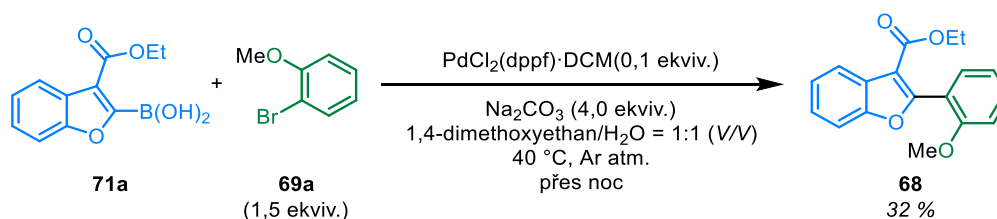
**Schéma 6:** Obecný katalytický cyklus palladiového katalyzátoru při Suzuki-Miyaura couplingu (převzaté a upravené z Miyaura a Suzuki 1995)

Testování reakčních podmínek Suzukiho couplingu byly započaty již na bakalářském studiu na strukturně podobných substrátech.<sup>51</sup> Jako pre-katalyzátor byl použit  $PdCl_2(dppf) \cdot DCM$  (Schéma 7), kde je palladium obsaženo v oxidačním stavu (II). Před reakcí je pak tento komplex *in situ* redukován přítomnou bází na palladium v oxidačním stavu (0), které následně vstupuje do katalytického cyklu.



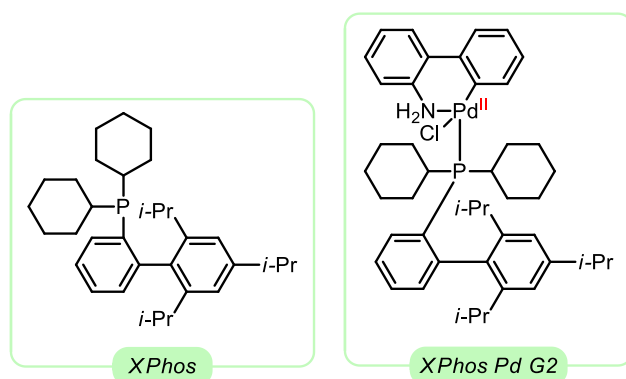
**Schéma 7:** Struktura palladiového pre-katalyzátoru  $PdCl_2(dppf)$

Byly použity reakční podmínky, které jsem optimalizovala během bakalářského studia<sup>48</sup>, ale ukázalo se, že při použití konkrétních substrátů **71a** a **69a** reakce poskytovala nízké výtěžky (Schéma 8).



**Schéma 8:** Suzuki coupling provedený s optimalizovanými reakčními podmínkami během bakalářského studia

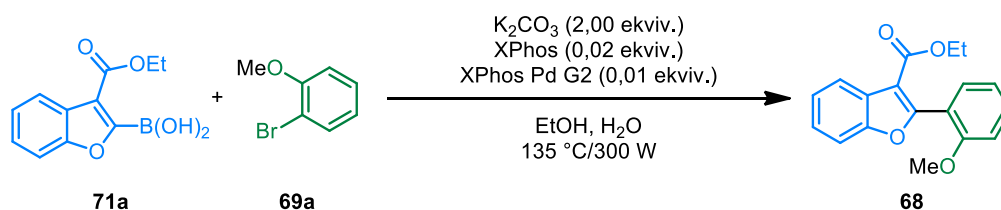
To nás vedlo ke změně reakčního protokolu, kde jsme se inspirovali postupem vyvinutým Mgr. Lukášem Jedinákem, Ph.D.<sup>50</sup>, u kterého se využívá elektronově bohatý a stericky objemný ligand XPhos (Schéma 9). Ten umožňuje v rámci katalytického cyklu rychlejší oxidativní adici palladiového komplexu na substrát a zároveň stabilizuje vzniklý palladiový katalyzátor. Jako zdroj palladia jsme zvolili XPhos Pd druhé generace (Schéma 9).



**Schéma 9:** Struktura ligandu XPhos a struktura zdroje palladia – XPhos Pd G2

Reakce byla prováděna za mikrovlnné iniciace s různými ekvivalenty boronové kyseliny **71a** a po různou reakční dobu (Tab. 1).

**Tab. 1:** Optimalizace reakčních podmínek Suzuki couplingu



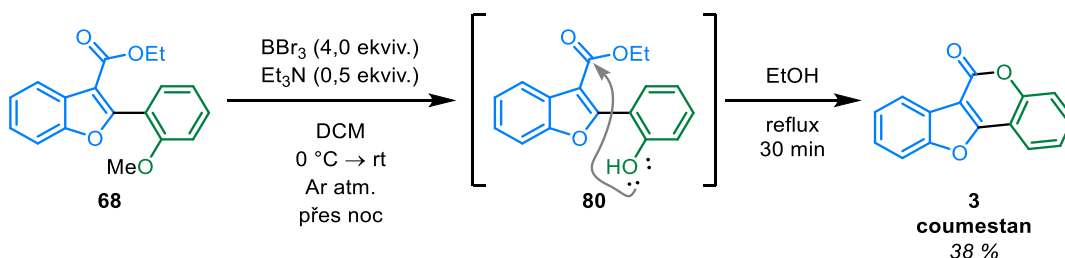
Řádek	Ekvivalenty <b>71a</b>	Čas	NMR poměr <sup>a)</sup> (izolovaný výtěžek <sup>b)</sup> ) látky <b>68</b>
1	2,0 ekviv.	20 min	76 % (n. a. <sup>c)</sup> )
2	2,0 ekviv.	60 min	82 % (n. a. <sup>c)</sup> )
3	1,0 ekviv.	30 min	79 % (n. a. <sup>c)</sup> )
4	1,0 ekviv.	20 min	77 % (48 %)

- a) Udává poměr mezi detekovaným produktem **68** a nečistotou (0 % - přítomna pouze nečistota; 99 % - přítomen pouze produkt **68**). Zjištěno na základě analýzy <sup>1</sup>H NMR spekter surové reakční směsi (bez použití vnitřního standardu).
- b) Odpovídá izolovanému produktu **68** po purifikaci pomocí sloupcové kapalinové chromatografie s užitím mobilní fáze hexan/EtOAc 6:1 po sorpci surové látky **68** na silikagel.
- c) Izolace produktu **68** nebyla po reakci provedena.

Nejlepší podmínky jsou uvedeny na posledním řádku 4 a to při použití jednoho ekvivalentu boronové kyseliny **71a** a reakční doby 20 minut. Výtěžek po purifikaci pomocí sloupcové kapalinové chromatografie činil téměř 50 %.

### 3.1.1.3 Cyklizační reakce

Produkt Suzuki couplingu **68** byl dále podroben poslednímu plánovanému reakčnímu kroku a to intramolekulární laktonizaci (Schéma 10). Tato reakce byla již popsána na stejném substrátu, ale ve zmiňované publikaci výchozí látku **68** připravili kříženým dehydrogenačním couplingem  $\beta$ -ketoesteru a fenolu.<sup>40</sup> Použili jsme jimi vyvinutý deprotektně-laktonizační protokol, který poskytuje coumestan **3** a jemu odpovídající analoga v dobrých výtěžcích.



**Schéma 10:** Poslední reakční krok – intramolekulární laktonizace benzofuranu **68**

Konverze benzofuranu **68** na coumestan **3** byla tedy provedena pomocí „one-pot“ protokolu. Odstranění chránicí methylové skupiny u výchozí látky **68** pomocí  $\text{BBr}_3$  nám poskytlo meziprodukt **80** (neizolován). Poté změnou rozpouštědla DCM za ethanol byl dokončen krok laktonizace a finální bílá krystalická látka **3** byla získána v 38% izolovaném výtěžku.

Cílová látka coumestan **3** byla získána ve čtyřech krocích s celkovým izolovaným výtěžkem 11 %.

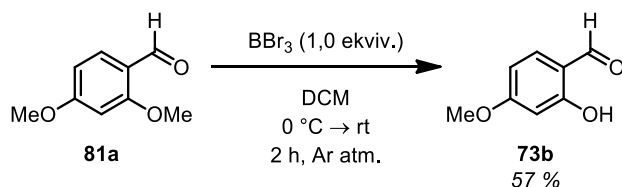
### 3.1.2 Syntéza derivátů coumestanu **66**

Dále jsme se zaměřili na syntézu derivátů coumestanu **66**, přesněji na methoxy **66a** a allyloxy **66b** deriváty.

### 3.1.2.1 Příprava derivátů salicylaldehydu 73

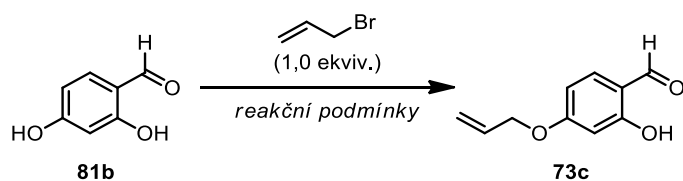
Abychom do coumestanového skeletu **3** zavedli vhodnou funkční skupinu na vytvoření derivátu coumestanu **66**, zvolili jsme konvergentní přístup, při které jsme danou funkční skupinu implementovali přímo do počáteční struktury salicylaldehydu **73**.

Nejprve jsme se zaměřili na syntézu methoxy derivátu coumestanu **66a**, kterou jsme započali přípravou 4-methoxysalicylaldehydu **73b** (Schéma 11).<sup>40</sup> Zvolili jsme stejný postup jako při deprotekcím kroku během cyklizační reakce (viz. kapitola 3.1.1.3). Využili jsme  $\text{BBr}_3$ , který se přikapává do ochlazeného roztoku 2,4-dimethoxybenzaldehydu **81a** v DCM. Reakce poskytovala uspokojivé výtěžky, bez potřeby optimalizace.



**Schéma 11:** Příprava methoxy derivátu salicylaldehydu **73b**

Syntézu allyloxy derivátu coumestanu **66b** jsme zahájili přípravou allyloxy derivátu salicylaldehydu **73c** (Tab. 2). Nejprve jsme použili publikované reakční podmínky<sup>57</sup>, které nám ale neposkytly chtěný produkt **73c** (řádek 1). Analýzou  $^1\text{H}$  NMR spektra surové reakční směsi jsme zjistili, že dochází k tvorbě 2,4-di(allyloxy)benzaldehydu, proto jsme se rozhodli o změnu rozpouštědla – z acetonu na vysokovroucí rozpouštědlo DMF (řádek 2). I tato změna nám ale neposkytla kýžený produkt **73c**. To nás vedlo k vyzkoušení jiného publikovaného protokolu, který využívá  $\text{NaHCO}_3$ , KI a rozpouštědlo acetonitril.<sup>58</sup> Takto jsme získali 4-(allyloxy)-2-hydroxybenzaldehyd **73c** s dostačujícím výtěžkem 44 % (řádek 4).

**Tab. 2:** Příprava allyloxy derivátu salicylaldehydu **73c**

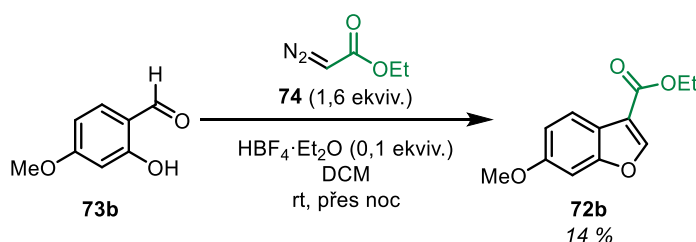
Řádek	Reakční podmínky	Výtěžek <sup>a)</sup> látky <b>73c</b>
1	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (4,0 ekvív.), aceton (0,7M), reflux, 3 h	n. p. <sup>b)</sup>
2	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (4,0 ekvív.), DMF (0,7M), reflux, 3 h	n. p. <sup>b)</sup>
3	NaHCO <sub>3</sub> (1,1 ekvív.), KI (1,0 ekvív.), MeCN (0,7M), 70 °C, 12 h	39 %
4	NaHCO <sub>3</sub> (1,1 ekvív.), KI (1,0 ekvív.), MeCN (0,7M), 70 °C, 12 h	44 %

a) Odpovídá izolovanému produktu **73c** po purifikaci pomocí sloupcové kapalinové chromatografie s užitím mobilní fáze hexan/EtOAc 2:1 po sorpci surové látky **73c** na silikagel.

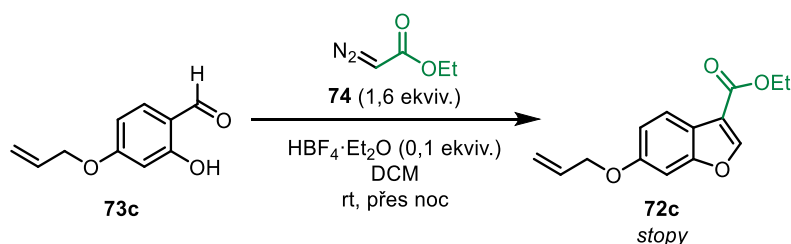
b) Reakce neprobíhá. Nedetekován žádný produkt. Zjištěno na základě analýzy <sup>1</sup>H NMR spekter surové reakční směsi.

### 3.1.2.2 Kysele katalyzovaná kondenzace

Za použití výše zmiňovaných reakčních podmínek pro přípravu benzofuranového skeletu, jenž byly optimalizovány během mého bakalářského studia<sup>48</sup>, jsme se snažili připravit deriváty benzofuranu **72b** (Schéma 12) a **72c** (Schéma 13). Kysele katalyzovanou kondenzací 4-methoxysalicylaldehydu **73b** s diazoesterem **74** byl získán kýžený produkt **72b** ve velmi nízkých izolovaných výtěžcích.

**Schéma 12:** Příprava methoxy derivátu benzofuranu **72b**

V případě 4-allyloxysalicylaldehydu **73c** reakce poskytovaly chtěný produkt **72c** pouze ve stopovém množství.

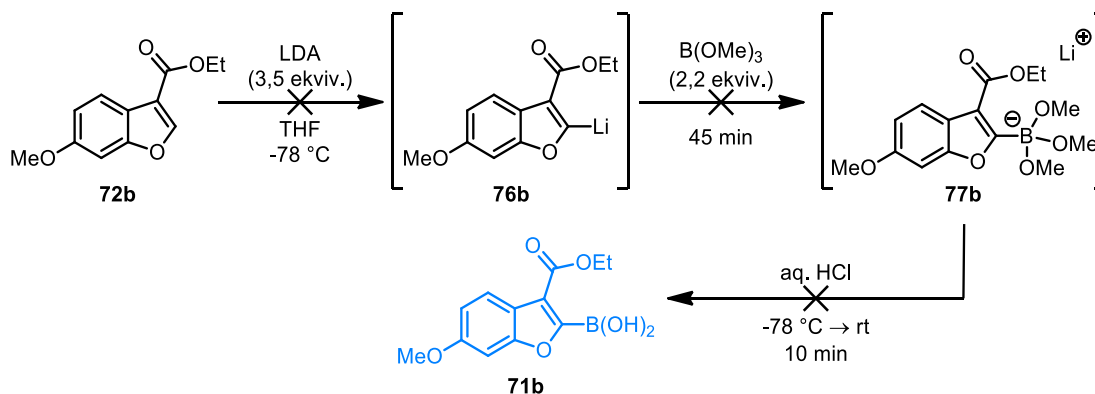


**Schéma 13:** Příprava allyloxy derivátu benzofuranu **72c**

Analýzou  $^1\text{H}$  NMR spekter surových reakčních směsí obou reakcí jsme zjistili, že konverze je úplná, ale vznikají neidentifikovatelné směsi látek. Nízké výtěžky mohou být způsobeny zvýšenou elektronovou hustotou v systému díky elektrondonorním skupinám v substrátech **73b** a **73c** – methoxyskupina, allyloxyskupina a hydroxyskupina.

### 3.1.2.3 Příprava boronové kyseliny **71b**

Za použití výše zmiňovaných reakčních podmínek pro přípravu boronové kyseliny **71**, jenž jsem optimalizovala během bakalářského studia<sup>48</sup>, jsme se snažili připravit (3-(ethoxykarbonyl)-6-methoxybenzofuran-2-yl)boronovou kyselinu **71b** z ethyl 6-methoxybenzofuran-3-karboxylátu **72b** (Schéma 14).

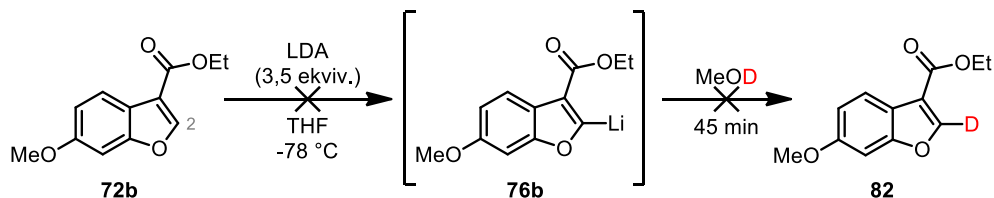


**Schéma 14:** Příprava methoxy derivátu boronové kyseliny **71b**

Zavedení boronové funkční skupiny do skeletu benzofuranu **72b** neproběhlo a chtěný produkt **71b** jsme nezískali. Zajímalo nás, ve kterém kroku reakce je problém, a proto jsme reakci provedli znovu za stejných podmínek, ale místo trimethylboritanu jsme k ukončení reakce použili deuterovaný methanol (Schéma 15). Kdyby došlo k zavedení deuteria do skeletu benzofuranu **72b**, tak bychom prokázali, že došlo k vygenerování vinylithiového intermediátu **76b**. Nicméně produkt **82** jsme podle



$^1\text{H}$  NMR spektra surové reakční směsi nedetekovali. Myslíme si, že vinylithiový intermediát **76b** není generován z důvodu vysoké elektronové hustoty na aromatickém kruhu. LDA tedy není dostatečně silná báze na odtržení kyselého vodíku v benzofuranovém cyklu v poloze 2.

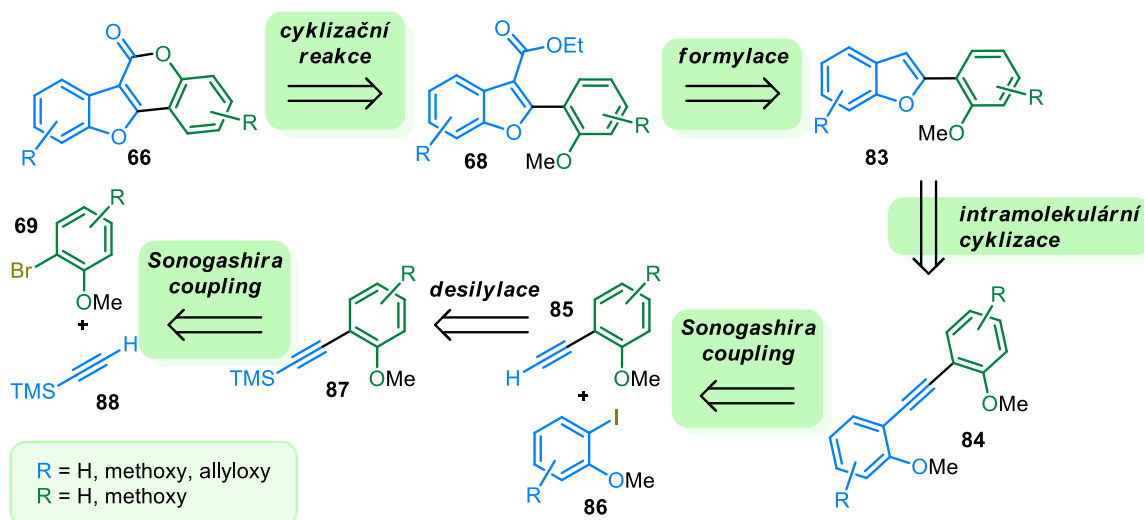


**Schéma 15:** Pokus o zavedení deuteria do skeletu benzofuranu **72b**

Sérií těchto reakcí jsme zjistili, že obrovskou nevýhodou tohoto prvního přístupu je, že trpí sníženým výtěžkem pro salicylaldehydy **73**, které obsahují elektrondonorní funkční skupinu. Proč tedy neimplementujeme elektronakceptorní skupinu? Elektronakceptorní skupiny se v přírodě vyskytují zřídka a u coumestanů nejsou vůbec popsány. V přírodě je totiž tato třída látek generována sérií oxidativních couplingů fenylalaninu – elektronově chudé substituenty tedy nejsou na aromatický skelet zaváděny. Proto jsme navrhli druhý alternativní přístup ke coumestanovému skeletu **66**, který bude popsán a diskutován dále.

## 3.2 2. přístup - retrosyntéza

Po předchozím neúspěchu přípravy derivátů coumestanu **66**, jsme navrhli druhý alternativní přístup ke coumestanovému skeletu **66** (Schéma 16), u kterého klademe důraz na použití pouze jednoho rozpouštědla, protože naše *idea* je připravit coumestany „one-pot“. Je pro nás nadále také důležitý modulární a konvergentní přístup.



**Schéma 16:** Druhá navržená retrosyntéza derivátu coumestanu **66**

Tento přístup je založen na pěti klíčových krocích, přičemž první krok z pohledu retrosyntézy – cyklizační reakce – je stejný, jako u prvního přístupu. Formylací benzofuranu **83**, s následnou oxidací a esterifikací, pak může být připravena látka **68**. Syntéza samotného benzofuranového skeletu **83** by byla založena na intramolekulární cyklizaci interního alkyne **84**, který může být získán Sonogashira couplingem mezi terminálním alkynem **85** a arylhalogenidem **86**. Monosubstituovaný alkyne lze připravit opět zmiňovaným Sonogashira couplingem arylhalogenidu **69** s alkynem **88** s následnou deprotekcí látky **87**.

### 3.2.1 Syntéza coumestanu **3**

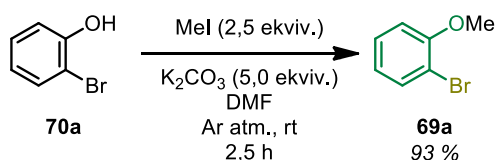
Syntézou coumestanu **3** jsme se pustili otestovat námi navrhnutou syntetickou cestu.

#### 3.2.1.1 Počáteční Sonogashira coupling

Začali jsme Sonogashira couplingem, který je nezbytný pro přípravu látky **87**. Abychom mohli tento krok úspěšně uskutečnit, tak jsme si nejprve museli připravit výchozí substrát – arylhalogenid **69**.

##### 3.2.1.1.1 Příprava arylhalogenidu **69**

Přípravu tohoto substrátu **69a** jsem již popisovala v kapitole 3.1.1.2.2. Tuto reakci jsem použila jak v prvním, tak i ve druhém přístupu syntézy coumestanového skeletu **66**.

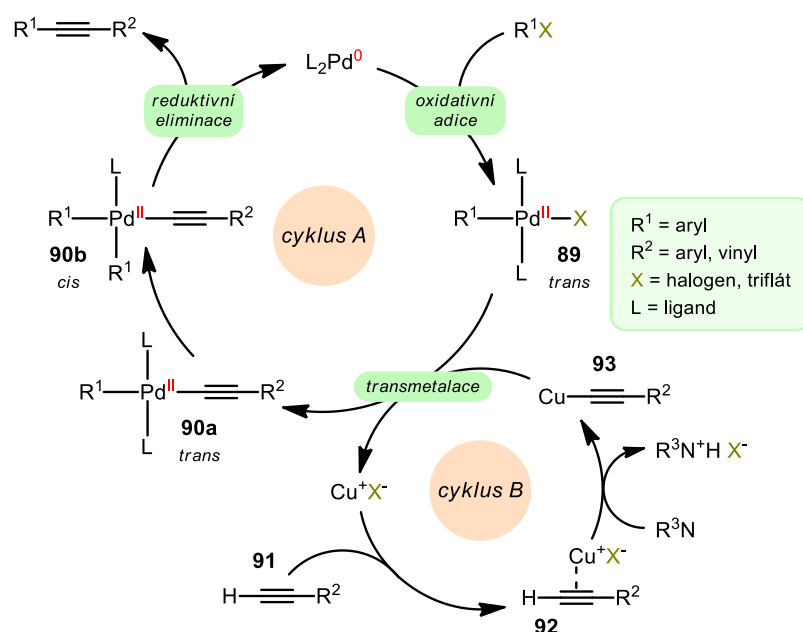


**Schéma 17:** Příprava 2-bromanisolu **69a**

### 3.2.1.1.2 Počáteční Sonogashira coupling – optimalizace couplingového kroku

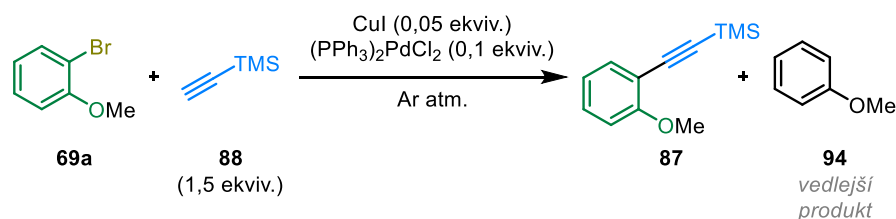
Sonogashira coupling se, obdobně jako Suzuki-Miyaura coupling, řadí mezi cross-kopulační reakce<sup>59</sup>, při kterých se využívá palladiový katalyzátor v oxidačním stupni (0). V případě Sonogashira couplingu se ale do reakční směsi přidává také měděný ko-katalyzátor, který má za úkol transformovat alkyn na organoměďný reagent nezbytný pro následnou transmetalaci reakci (Schéma 18). Přesný mechanismus Sonogashirovi reakce není v tuto chvíli stále dobře pochopen, zejména kvůli obtížím s analýzou kombinovaného působení dvou přítomných kovových katalyzátorů, ačkoli se obecně předpokládá, že probíhá prostřednictvím znázorněných dvou nezávislých katalytických cyklů.<sup>60</sup>

Navržená podoba zahrnuje palladiový cyklus (A), který je v souladu s „klasickým“ mechanismem cross-kopulačního couplingu, který je popsán v kapitole 3.1.1.2.3. Cyklus měďného katalyzátoru (B) je méně známý ale i tak detailně popsán. Předpokládá se, že přítomnost báze vede k tvorbě  $\pi$ -alkynového komplexu **92**. To zvyšuje kyselost terminálního protonu a vede k tvorbě acetylidu mědi, komplexu **93**, po deprotonaci. Acetylid **93** se pak účastní transmetalaci reakce s palladiovým meziproduktem **89**.<sup>61</sup>



**Schéma 18:** Obecný katalytický cyklus palladiového a měďného katalyzátoru při Sonogashirově couplingu (převzaté a upravené z Chinchilla a Nájera 2011 a 2007)

Testování reakčních podmínek Sonogashira couplingu jsme započali screeningem reakčních podmínek (Tab. 3). Nejprve jsme otestovali publikované reakční podmínky (řádek 1)<sup>62</sup>, ve kterých se využívá palladiový pre-katalyzátor  $(PPh_3)_2PdCl_2$ , měďný ko-katalyzátor  $CuI$ , báze  $Et_3N$  a THF jako rozpouštědlo. Reakční teplota činila  $100\text{ }^\circ C$  a reakční doba 2 hodiny. Po dvou hodinách jsme reakci zpracovali a vyhodnotili  $^1H$  NMR spektrum surové reakční směsi. Zastoupení chtěného produktu **87** v reakční směsi ale tvořilo pouze 7 % z celku. Rozhodli jsme se tedy změnit rozpouštědlo z THF na DMF, snížit reakční teplotu na  $60\text{ }^\circ C$  a zvýšit reakční čas na 4 hodiny (řádek 2). Po vyhodnocení  $^1H$  NMR spektra surové reakční směsi jsme zjistili, že produkt **87** je přítomen ve větším množství než výchozí látka **69a**. Detekovali jsme také vznik vedlejšího redukováného produktu **94**. Pro docílení vyšší konverze a menší tvorby vznikajícího vedlejšího produktu **94** jsme pak měnili rozpouštědla, báze, reakční teplotu a také reakční čas v různých kombinacích (řádek 3 až 9).

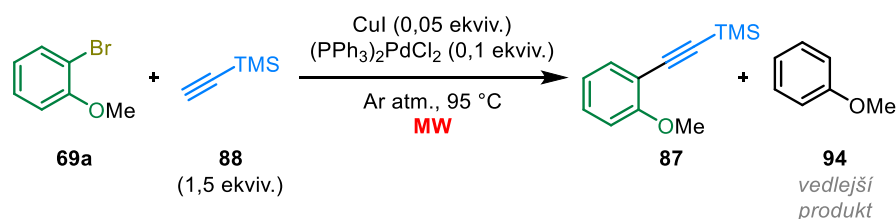
**Tab. 3:** Optimalizace reakčních podmínek Sonogashira couplingu s termickou iniciací<sup>a)</sup>(růžově označené řádky – NMR poměr **87** 0-20 %, šedě označené řádky –NMR poměr **87** 21-50 %, zeleně označené řádky –NMR poměr **87** 51-100 %)

Řádek	Báze/rozpuštědlo 1:3 (V/V)	Teplota [°C]	Čas [hod]	NMR poměr <sup>b)</sup> látek <b>87/94/69a</b> [%]
1	Et <sub>3</sub> N/THF	100	2	7/2/91
2	Et <sub>3</sub> N/DMF	60	4	57/10/33
3	Et <sub>3</sub> N/DMSO	60	4	69/10/21
4	<i>i</i> Pr <sub>2</sub> EtN/DMF	60	4	37/32/31
5	<i>i</i> Pr <sub>2</sub> EtN/DMSO	60	4	35/28/37
6	Et <sub>3</sub> N/DMF	95	4	56/29/15
7	Et <sub>3</sub> N/DMSO	95	4	7/17/76
8	<i>i</i> Pr <sub>2</sub> EtN/DMF	95	4	30/70/-
9	<i>i</i> Pr <sub>2</sub> EtN/DMSO	95	4	-/-/100

a) Koncentrace látky **69a** v rozpuštědle je 0,2M.b) Udává poměr v % mezi detekovaným produktem **87**, vedlejším produktem **94** a výchozí látkou **69a**. Zjištěno na základě analýzy <sup>1</sup>H NMR spekter surové reakční směsi (bez použití vnitřního standardu).

Výše uvedené reakce probíhaly za termické iniciace, proto jsme se rozhodli reakce otestovat i za mikrovlnné iniciace (Tab. 4). Krátkým setem reakcí jsme zjistili, že mikrovlnná iniciace není vhodná pro přípravu požadované látky **87**. Na posledním řádku 4 je <sup>1</sup>H NMR poměr vedlejšího produktu **94** dokonce 100 %.

**Tab. 4:** Optimalizace reakčních podmínek Sonogashira couplingu s mikrovlnnou iniciací<sup>a)</sup> (růžově označené řádky – NMR poměr **87** 0-20 %, šedě označené řádky – NMR poměr **87** 21-50 %, zeleně označené řádky – NMR poměr **87** 51-100 %)



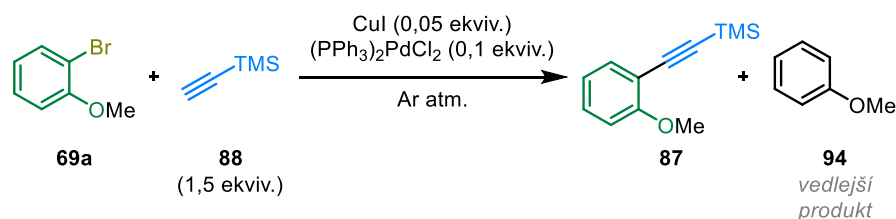
Řádek	Báze/rozpuštědlo 1:3 (V/V)	Čas [hod]	NMR poměr <sup>b)</sup> látek <b>87/94/69a</b> [%]
1	<i>i</i> Pr <sub>2</sub> EtN/DMF	2	17/55/28
2	Et <sub>3</sub> N/DMF	2	33/27/40
3	<i>i</i> Pr <sub>2</sub> EtN /DMF	4	17/64/19
4	<i>i</i> Pr <sub>2</sub> EtN/DMF	6	-/100/-

a) Koncentrace látky **69a** v rozpuštědle je 0,2M.

b) Udává poměr v % mezi detekovaným produktem **87**, vedlejším produktem **94** a výchozí látkou **69a**. Zjištěno na základě analýzy <sup>1</sup>H NMR spekter surové reakční směsi (bez použití vnitřního standardu).

Vyhodnotili jsme tedy termickou iniciaci jako vhodnější než mikrovlnnou, a následně jsme se rozhodli provést další sled optimalizačních reakcí (Tab. 5).

Jako nejvhodnější se ukázala být kombinace báze Et<sub>3</sub>N a rozpuštědla DMSO. Za vysokých teplot dochází k rozkladu výchozí látky **69a** a větší tvorby vedlejšího produktu **94**. Jako neoptimálnější teplota se ukázala být 70 °C. Roli hraje také reakční čas, který nesmí být moc dlouhý (Tab. 5 – řádek 1, 2, 3), protože jinak dochází k degradaci cílového produktu **87**. 4 hodiny se tak ukázaly být ideální. U reakcí, které jsou popsány na řádcích 6, 8, 9, 10 a 11 je koncentrace látky **69a** 0,1M, což mohlo také přispět k vyššímu poměru produktu **87**. Za takto optimalizovaných reakčních podmínek jsme získali interní alkyn **87** v 75% NMR poměru, který mohl být použit v následujícím kroku – desilylaci. Do dalších reakcí pak byla vždy použita směs látek, protože separace produktu **87** od výchozí látky **69a** a vedlejšího produktu **94** se ukázala být komplikovaná.

**Tab. 5:** Optimalizace reakčních podmínek Sonogashira couplingu s termickou iniciací<sup>a)</sup>(růžově označené řádky – NMR poměr **87** 0-20 %, šedě označené řádky– NMR poměr **87** 21-50 %, zeleně označené řádky– NMR poměr **87** 51-100 %)

Řádek	Báze/rozpuštědlo 1:3 (V/V)	Teplota [°C]	Čas [hod]	NMR poměr <sup>b)</sup> látek <b>87/94/69a</b> [%]
1	Et <sub>3</sub> N/DMF	95	25	15/22/63
2	<i>i</i> Pr <sub>2</sub> EtN /DMF	95	25	-/10/90
3	<i>i</i> Pr <sub>2</sub> EtN /DMF	95	20	4/31/65
4	Et <sub>3</sub> N DMF	60	15	45/4/51
5	Et <sub>3</sub> N /DMF	70	4	38/15/47
6 <sup>c)</sup>	Et <sub>3</sub> N/DMSO	70	4	75/11/14
7	Et <sub>3</sub> N/DMF	80	4	31/19/50
8 <sup>c)</sup>	Et <sub>3</sub> N /DMSO	80	4	78/12/10
9 <sup>c)</sup>	Et <sub>3</sub> N /DMSO	70	4	64/8/28
10 <sup>c)</sup>	Et <sub>3</sub> N /DMF	70	19	60/11/29
11 <sup>c)</sup>	Et <sub>3</sub> N /DMSO	70	19	32/10/58

a) Koncentrace látky **69a** v rozpouštědle je 0,2M.b) Udává poměr v % mezi detekovaným produktem **87**, vedlejším produktem **94** a výchozí látkou **69a**. Zjištěno na základě analýzy <sup>1</sup>H NMR spekter surové reakční směsi (bez použití vnitřního standardu).c) Koncentrace látky **69a** v rozpouštědle je 0,1M.

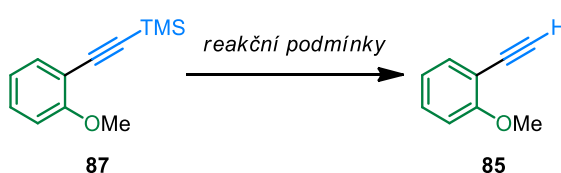
### 3.2.1.2 Druhý Sonogashira coupling

Druhý klíčový krok zahrnuje opět formování vazby uhlík-uhlík, za tvorby interního alkyne **84**. Abychom mohli uskutečnit Sonogashira coupling, je potřeba předem připravit terminální alkyne **85** deprotekcí terminální trimethylsilylové skupiny látky **87**. Jako druhý reakční partner v Sonogashira couplingu vystupuje vhodně substituovaný arylhalogenid **86**.

### 3.2.1.2.1 Příprava terminálního alkynu **85**

Pro přípravu 1-ethynyl-2-methoxybenzenu **85** jsem využila výše připravenou látku **87**, ta ale nebyla, jak již bylo uvedeno, použita v čisté formě. Výchozí směs mimo produktu **87** také obsahovala anisol **94a** 2-methoxybrombenzen **69a** v různých poměrech. Přípravu látky **85** jsem započala využitím s publikovaných podmínek<sup>63</sup>, které jsou uvedeny na řádce 1 v Tab. 6. Po analýze <sup>1</sup>H NMR spektra surové reakční směsi jsme zjistili nulovou konverzi výchozí látky na produkt **85**.

**Tab. 6:** Optimalizace reakčních podmínek deproteční reakce



Řádek	Reakční podmínky	Konverze <sup>a)</sup> látky <b>85</b>
1	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (2,0 ekviv.), MeOH (0,1M), 0 °C, 2 h	0 %
2	TBAF (2,0 ekviv.), THF (0,1M), 0 °C, 30 min	deg. <sup>b)</sup>
3	KF (2,4 ekviv.), MeOH (0,35M), 0 °C → rt, Ar atm., 12 h	0 %
4	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (1,0 ekviv.), MeOH (0,1M), H <sub>2</sub> O (50,0 ekviv.), rt, 2 h	0 %
5	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (1,0 ekviv.), MeOH (0,1M), H <sub>2</sub> O (50,0 ekviv.), rt, 2 h	99 %
6	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (1,0 ekviv.), MeOH (0,1M), H <sub>2</sub> O (50,0 ekviv.), rt, 1 h	99 %

a) Udává poměr mezi detekovaným produktem **85** a výchozí látkou **87** (0 % - přítomna pouze výchozí látka **87**; 99 % - přítomen pouze produkt **85**). Zjištěno na základě analýzy <sup>1</sup>H NMR spekter surové reakční směsi.

b) deg. – degradace, není přítomna výchozí látka **87** a ani produkt **85**.

Rozhodli jsme se tedy změnit reakční protokol a vyzkoušeli jsme reakční podmínky popsané na řádce 2.<sup>64</sup> Po analýze <sup>1</sup>H NMR spektra surové reakční směsi jsme zjistili, že dochází k degradaci výchozí látky **87**. Proto jsme se opět rozhodli pro změnu reakčních podmínek. Tentokrát jsme použili fluorid draselný a methanol jako rozpouštědlo, ale bohužel i touto cestou jsme se nedostali ke kýženému produktu **85** (řádce 3).<sup>65</sup> Nakonec jsme vyzkoušeli i uhličitan draselný v methanolu a ve vodě a terminální alkyn **85** jsme získali (řádce 5 a 6).<sup>66</sup>

Problémem těchto reakcí je opět purifikace surové reakční směsi. Purifikaci jsme prováděli pomocí sloupcové kapalinové chromatografie s různým složením



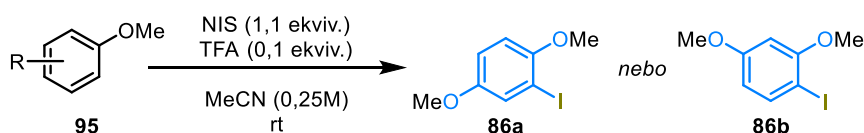
(hexan:EtOAc, DCM:aceton) a s různým poměrem složek mobilní fáze, ale úplně čistý produkt **85** jsme nezískali. V surových reakčních směsích se nacházel jak chtěný produkt **85**, tak i anisol **94** a 2-methoxybrombenzen **69a** z předchozí reakce, které se nám nepodařilo z reakční směsi plně odstranit.

Sérií výše uvedených reakcí jsme chtěli nastínit možnou přípravu derivátů těchto látek **87** a **85** pro plánovanou syntézu derivátů coumestanu **66**.

### 3.2.1.2.2 Příprava arylhalogenidu **86**

Druhým reakčním partnerem Sonogashira couplingu je vhodně substituovaný arylhalogenid **86**. Pomocí publikovaných podmínek<sup>67</sup> jsme se snažili připravit 2-jodo-1,4-dimethoxybenzen **86a** z 1,3-dimethoxybenzenu **95a** a 1-jodo-2,4-dimethoxybenzen **86b** z 1,4-dimethoxybenzenu **95b** (Tab. 7).

**Tab. 7:** Optimalizace reakčních podmínek jodace látky **95**



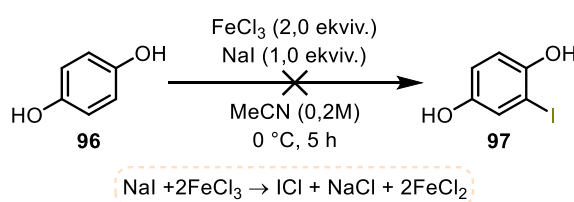
Řádek	Výchozí látka <b>95</b>	Čas	Konverze <sup>a)</sup> látky <b>86</b>
1		22 h	50 % látky <b>86a</b>
2		22 h	50 % látky <b>86b</b>
3		5 h	stopy látky <b>86a</b>
4		16 h	85 % látky <b>86a</b>
5		27 h	70 % látky <b>86a</b>
6 <sup>b)</sup>		27 h	0 % látky <b>86a</b>

a) Udává poměr mezi detekovaným produktem **86** a výchozí látkou **95** (0 % - přítomna pouze výchozí látka **95**; 99 % - přítomen pouze produkt **86**). Zjištěno na základě analýzy <sup>1</sup>H NMR spekter surové reakční směsi.

b) Reakce bez přítomnosti TFA.

Nejprve jsme podle publikovaného protokolu usilovali o přípravu 2-jodo-1,4-dimethoxybenzenu **86a** (řádek 1). Po analýze  $^1\text{H}$  NMR spektra surové reakční směsi jsme zjistili, že dochází k 50% konverzi na chtěný produkt **86a**. Stejně reakční podmínky jsme pak využili pro přípravu 1-jodo-2,4-dimethoxybenzenu **86b** (řádek 2). Konverze látky **86b** činila také 50 %. Reakční čas těchto dvou reakcí byl 22 hodin. Poté jsme vyzkoušeli snížit reakční čas na 5 hodin a zabalit reakční baňku do hliníkové fólie (řádek 3), ale detekovali jsme pouze stopy produktu **86a**. Při reakčním čase 16 hodin byla konverze látky **86a** 85 % (řádek 4). Na řádcích 5 a 6 je uveden reakční čas 27 hodin a byl použit rekrystalizovaný *N*-jodsukcinimid. Při takovémto reakčním čase byla konverze látky **86a** 70 % a při absenci použití TFA jsme detekovali pouze výchozí látku **95a**.

Dále jsme usilovali o přípravu 2-jodobenzen-1,4-diolu **97** z hydrochinonu **96** prostřednictvím *in situ* vygenerovaného chloridu jodného, který byl připraven pomocí oxidace jodidu sodného bezvodým chloridem železitým (Schéma 19).<sup>68</sup> Touto reakcí se nám ale 2-jodobenzen-1,4-diol **97** nepodařil připravit.



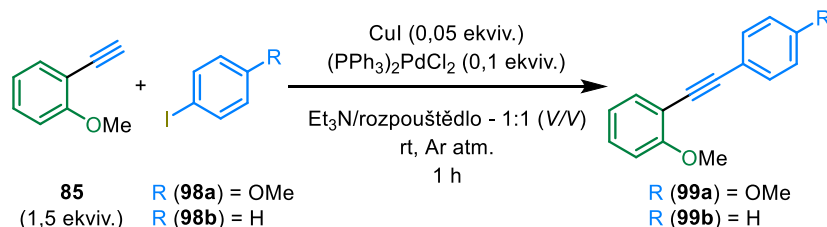
**Schéma 19:** Příprava 2-jodobenzen-1,4-diolu **97**

### 3.2.1.2.3 Druhý Sonogashira coupling – optimalizace couplingového kroku

Z pohledu navrhované syntézy jsme se pustili do druhého Sonogashira couplingu pro přípravu interního alkynu **84**. Použili jsme podobné reakční podmínky jako uvedené v kapitole 3.2.1.1.2 a to ko-katalyzátor jodid měďný, pre-katalyzátor  $(\text{PPh}_3)_2\text{PdCl}_2$ , bázi  $\text{Et}_3\text{N}$  a rozpouštědlo THF nebo DMF.<sup>63</sup> Nejprve jsme vyzkoušeli Sonogashira coupling terminálního alkynu **85** s 1-jodo-4-methoxybenzenem **98a** a s jodobenzenem **98b** (Tab. 8). Při použití výchozí látky **98a** a rozpouštědla DMF jsme nezískali kýžený produkt **99a** (řádek 1), ale při změně rozpouštědla za THF jsme produkt **99a** získali v 84% izolovaném výtěžku (řádek 2). Při zvolení substrátu **98b** a rozpouštědla DMF i THF byla úplná konverze látky **99b**, tudíž jsme výchozí látku **98b** nedetekovali (řádek 3 a 4). Rozhodli jsme se purifikovat pouze produkt **99b** (řádek 4),

abychom mohli určit izolovaný výtěžek reakce. Touto krátkou sérií reakcí, jsme usoudili, že jako vhodnější rozpouštědlo se jeví THF.

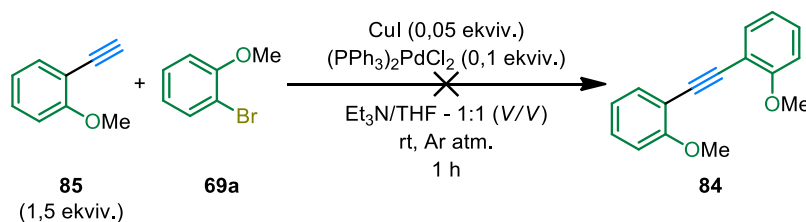
**Tab. 8:** Testování reakčních podmínek Sonogashira couplingu na analogických substrátech **98**



Řádek	Výchozí látka <b>98</b>	Rozpouštědlo	Konverze <sup>a)</sup> (výtěžek <sup>b)</sup> ) látky <b>99</b>
1		DMF	deg. <sup>c)</sup> (n. a. <sup>d)</sup> ) – <b>99a</b>
2		THF	99 % (84 %) – <b>99a</b>
3		DMF	99 % (n. a. <sup>d)</sup> ) – <b>99b</b>
4		THF	99 % (90 %) – <b>99b</b>

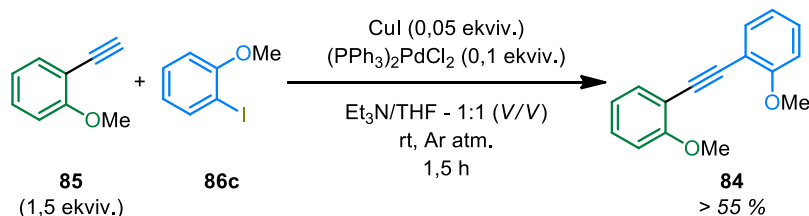
- a) Udává poměr mezi detekovaným produktem **99** a výchozí látkou **98** (0 % - přítomna pouze výchozí látka **98**; 99 % - přítomen pouze produkt **99**). Zjištěno na základě analýzy  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR spekter surové reakční směsi.
- b) Odpovídá izolovanému produktu **99** po purifikaci pomocí sloupcové kapalinové chromatografie s užitím mobilní fáze hexan/EtOAc 2:1 po sorpci surové látky **99** na silikagel.
- c) deg. – degradace, není přítomna výchozí látka **98** a ani produkt **99**.
- d) Izolace produktu **99** nebyla po reakci provedena.

Dále jsme pokračovali v naplánované syntéze coumestanu **3** a zaměřili jsme se na přípravu 2,2'-dimethoxytolanu **84**. Nejprve jsme jako substrát využili 2-bromanisol **69a** (Schéma 20). Po analýze  $^1\text{H}$  NMR spektra surové reakční směsi jsme zjistili, že jsou přítomny pouze výchozí látky **85** a **69a** bez stop chtěného produktu **84**.



**Schéma 20:** Příprava 2,2'-dimethoxytolanu **84** z 2-bromanisolu **69a**

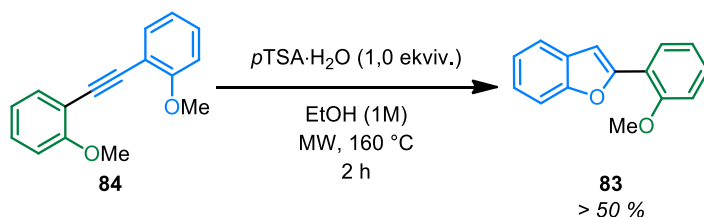
Reakci jsme pak provedli za stejných reakčních podmínek, ale nereaktivní 2-bromanisol **69a** jsme vyměnili za komerčně dostupný 2-jodoanisol **86c** (Schéma 21). Výtěžky izolovaného produktu **84** pak byli u těchto reakcí lepší než 55 %. Reakční podmínky této reakce tak nebylo třeba více optimalizovat.



**Schéma 21:** Příprava 2,2'-dimethoxytolanu **84** z 2-jodoanisolu **86c**

### 3.2.1.3 Intramolekulární cyklizace

Třetím klíčovým krokem syntézy coumestanu **3** je kyselě katalyzovaná intramolekulární cyklizace interního alkynu **84** (Schéma 22). Tato reakce byla v minulosti popsána na stejném substrátu, proto jsme zvolili již publikované podmínky.<sup>69</sup> Reakce je prováděna za mikrovlnné iniciace při 160 °C. Výtěžky izolovaného kýženého produktu **83** jsou vyšší než 50 %.



**Schéma 22:** Příprava benzofuranu **83**

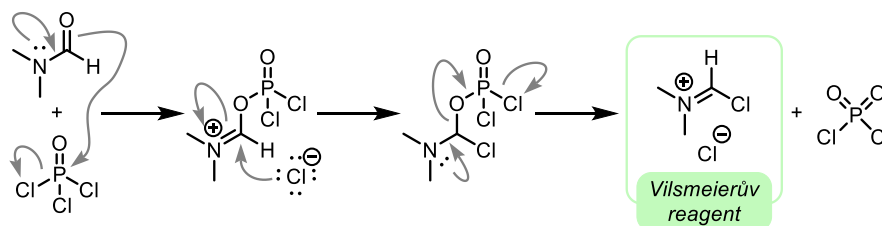
### 3.2.1.4 Tvorba esteru **68**

Čtvrtý klíčový krok je tvorba esterové funkční skupiny na benzofuranovém kruhu v poloze 3. Tento krok zahrnuje formylaci s následnou oxidací vzniklého aldehydu na karboxylovou skupinu, a poté tvorbu samotné esterové funkční skupiny.

#### 3.2.1.4.1 Formylace

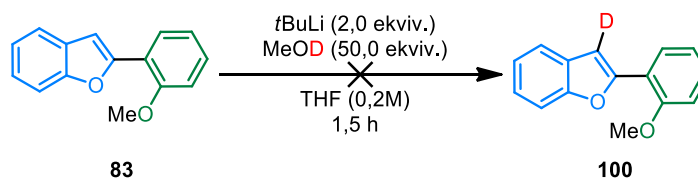
Pro zavedení formylové skupiny do aromatického jádra jsme si vybrali již publikované reakční podmínky, které aplikovali na analoga našeho substrátu **83**.<sup>70</sup> Popsané reakční podmínky využívají trichlorid fosforylu a dimethylformamid, což je typické pro

Vilsmeier-Haack reakci. Při této reakci dochází ke generování Vilsmeierova reagentu (Schéma 23), který následně reaguje s elektronově bohatým aromatickým jádrem.



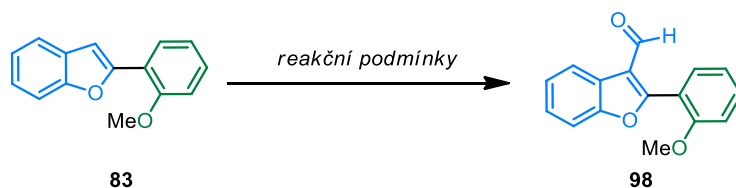
**Schéma 23:** Mechanismus vzniku Vilsmeierova reagentu (převzaté a upravené z Giles a Marson 2001)

Reakční podmínky, které jsme vyzkoušeli, jsou uvedeny v Tab. 9. Jak můžeme vidět na řádku 1, první použité reakční podmínky vhodné pro Vilsmeier-Haack reakci nevedli k přípravě látky **98**. Z reakce jsme získali pouze výchozí látku **83**. Proto jsme se dále rozhodli úplně změnit reakční podmínky a využít *t*BuLi na odštěpení kyselého vodíku z aromatického jádra **83** v poloze 3 a následně zavést formylovou funkční skupinu (řádek 2).<sup>71</sup> Ani při těchto reakčních podmínkách jsme nedetkovali vznik chtěného produktu **98** (řádek 2). Domnívali jsme se, že *t*BuLi není dostatečně silná báze na odtržení vodíku, a proto jsme reakci provedli znovu za stejných podmínek, ale místo DMF jsme k ukončení reakce použili deuterovaný methanol (Schéma 24). Nicméně produkt **100** jsme podle <sup>1</sup>H NMR spektra surové reakční směsi nedetkovali.



**Schéma 24:** Pokus o zavedení deuteria do skeletu benzofuranu **100**

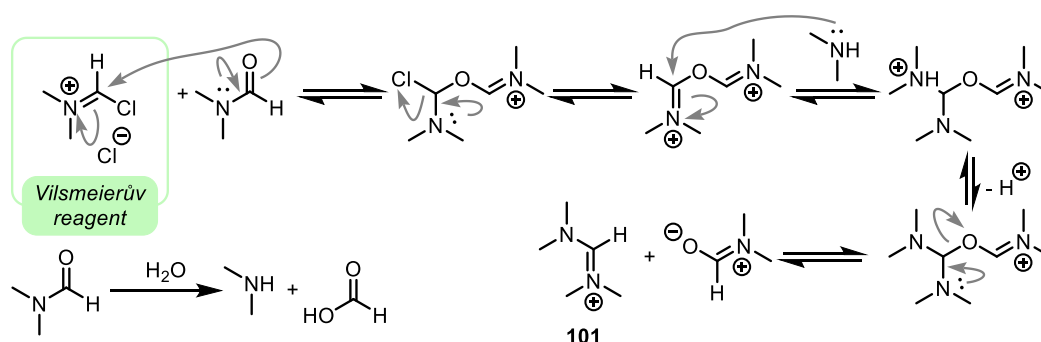
Napadlo nás, vrátit se k Vilsmeier-Haack reakci, a trochu více zoptimalizovat reakční podmínky. Nejprve jsme se zaměřili na rozpouštědla (DMF za 1,2-DCE). Tato změna nás dovedla ke kýženému produktu **98** s uspokojivými výtěžky (řádek 3 a 4).

**Tab. 9:** Optimalizace reakčních podmínek formylace na substrátu **83**

Řádek	Reakční podmínky	Konverze <sup>a)</sup> (výtěžek <sup>b)</sup> ) látky <b>98</b>
1	POCl <sub>3</sub> (1,25 ekviv.), DMF (0,18M), reflux, 12 h	0 % (n. a. <sup>c)</sup> )
2	<i>t</i> BuLi (1,1 ekviv.), DMF (1,5 ekviv.), THF (0,2M), -78 °C, 1,5 h	0 % (n. a. <sup>c)</sup> )
3	POCl <sub>3</sub> (5,0 ekviv.), DMF (5,0 ekviv.), 1,2-DCE (0,2M), reflux, 12 h	99 % (89 %)
4	POCl <sub>3</sub> (5,0 ekviv.), DMF (5,0 ekviv.), 1,2-DCE (0,2M), reflux, 12 h	99 % (75 %)

- a) Udává poměr mezi detekovaným produktem **98** a výchozí látkou **83** (0 % - přítomna pouze výchozí látka **83**; 99 % - přítomen pouze produkt **98**). Zjištěno na základě analýzy <sup>1</sup>H NMR spekter surové reakční směsi.
- b) Odpovídá izolovanému produktu **98** po purifikaci pomocí sloupcové kapalinové chromatografie s užitím mobilní fáze hexan/EtOAc 2:1 po sorpci surové látky **98** na silikagel.
- c) Izolace produktu **98** nebyla po reakci provedena.

Domníváme se, že při použití DMF jako rozpouštědla, došlo k rozkladu Vilsmeierova reagentu na formamidinový kation **101**, ještě před samotnou formylací benzofuranového skeletu **83** (Schéma 25).<sup>72</sup>

**Schéma 25:** Navržený mechanismus rozkladu Vilsmeierova reagentu

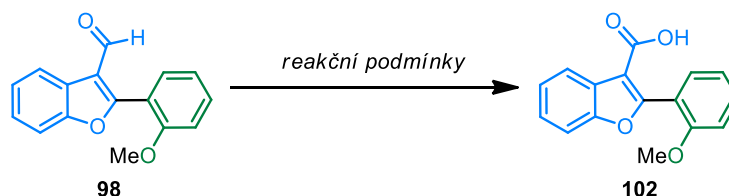
### 3.2.1.4.2 Oxidace na karboxylovou kyselinu

Metod oxidace aldehydů na karboxylové kyseliny je nespočet. My jsme nejprve zvolili použití běžného oxidačního činidla, a to manganistanu draselného (Tab. 10 – řádek 1).

Inspirovali jsme se publikovanými reakčními podmínkami, při kterých se výchozí látka **98** rozpustí v acetonu a následně se přikapává vodný roztok manganistanu draselného za laboratorní teploty.<sup>73</sup> Produkt **102** jsme podle <sup>1</sup>H NMR spektra surové reakční směsi nedetekovali.

Další metoda, která se nabízela, byla Pinnickova oxidace. Ta využívá chloritan sodný a mírně protické reakční podmínky pro generaci kyseliny chlorité, jako aktivního oxidantu.<sup>74</sup> Po analýzách <sup>1</sup>H NMR spekter surových reakčních směsí jsme zjistili, že ve všech případech je konverze výchozího aldehydu **98** na cílový produkt **102** kvantitativní (řádek 2 až 4). Karboxylová kyselina **102** byla získána ve velmi uspokojivé čistotě, proto byla použita v dalším kroku bez purifikace.

**Tab. 10:** Příprava karboxylové kyseliny **102**

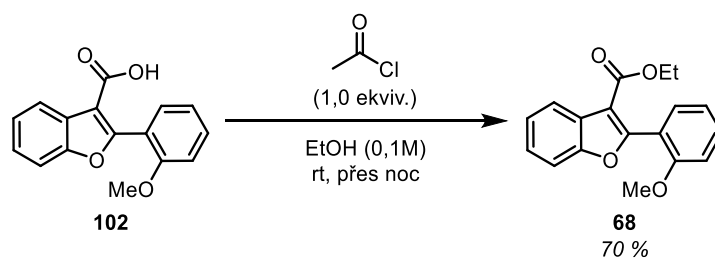


Řádek	Reakční podmínky	Konverze <sup>a)</sup> látky <b>102</b>
1	KMnO <sub>4</sub> (2,5 ekviv.), aceton (0,4M), rt, 6 h	0 %
2	NaClO <sub>2</sub> (19 ekviv.), NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (19 ekviv.), <i>t</i> BuOH (0,05M), 2-methyl-2-buten (0,05M), H <sub>2</sub> O (0,1M), rt, 24 h	99 %
3	NaClO <sub>2</sub> (19 ekviv.), NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (19 ekviv.), <i>t</i> BuOH (0,05M), 2-methyl-2-buten (0,05M), H <sub>2</sub> O (0,1M), rt, 19 h	99 %
4	NaClO <sub>2</sub> (19 ekviv.), NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (19 ekviv.), <i>t</i> BuOH (0,05M), 2-methyl-2-buten (0,05M), H <sub>2</sub> O (0,1M), rt, 25 h	99 %

a) Udává poměr mezi detekovaným produktem **102** a výchozí látkou **98** (0 % - přítomna pouze výchozí látka **98**; 99 % - přítomen pouze produkt **102**). Zjištěno na základě analýzy <sup>1</sup>H NMR spekter surové reakční směsi.

### 3.2.1.4.3 Esterifikace

Pro získání ethylesteru karboxylové kyseliny **68** jsme zvolili běžný protokol pro přípravu esterů z karboxylových kyselin a alkoholů, Fischerovu esterifikaci. V našem případě dochází ke generaci kyseliny chlorovodíkové *in situ* z acetyl chloridu a ethanolu (Schéma 26). Požadovaný produkt **68** jsme získali ve velmi ucházející čistotě bez nutnosti další purifikace.



**Schéma 26:** Příprava ethylesteru karboxylové kyseliny **68**

Cílový coumestan **3** pak může být získán z látky **68** pomocí „one-pot“ protokolu popsaném v přístupu 1 (viz. kapitola 3.1.1.3).



---

## 4 Závěr

V průběhu své diplomové práce jsem vyvinula dva nezávislé postupy směřující k syntéze látek patřících do rodiny coumestanů. První z nich, založený na postupné stavbě benzofuranového kruhu vycházel ze sekvence tří kroků (přesmyk/Suzukiho coupling/intramolekulární laktonizace). Jeho limitací byla využitelnost v kontextu arylických jader s elektrondonorními funkčními skupinami. Z tohoto důvodu mohl být připraven tímto postupem pouze jeden zástupce z rodiny coumestanů – její „základní“ člen (nemá na aromatických jádrech žádné substituenty) nazvaný coumestan.

Limitace této metody je samozřejmě velmi podstatná, neboť valná většina látek z rodiny coumestanů obsahuje alespoň jednu methoxy skupinu na aromatickém jádře. Z tohoto důvodu, jsme ihned začali pracovat na novém přístupu, jež by nám umožnil překonat tuto limitaci. Náš druhý přístup byl založen na konsektivních Sonogashira couplingích kombinovaných s dvěma intramolekulárními cyklizacemi, do nichž se vmezeřila karbonylační metoda. Tento postup, i když je delší a trpěl v počátku problematickými optimalizacemi zejména prvního Sonogashira couplingu, se nakonec ukázal jako velmi úspěšný a vedl v konečném důsledku také k přípravě coumestanu.

U tohoto přístupu prozatím nebyla ověřena z časových důvodů jeho obecná aplikovatelnost, ale z limitací jednotlivých reakčních kroků (Sonogashira coupling, Vilsmeierova-Haack reakce) je patrné, že elektrondonorní substituenty na aromatickém jádře tyto kroky budou spíše podporovat.

Vyvinuli jsme dva přístupy k tetracycklickému skeletu přírodních látek patřících do rodiny coumestanů, kdy ten druhý se jeví být velmi obecným a je značným příslibem do budoucna. Předpokládáme tedy, že již nic nebrání tomu, aby byli připraveni další členové této rodiny přírodních látek a ohodnocena jejich biologická aktivita.

---

## 5 Experimentální část

### 5.1 Obecné informace

Veškeré reakce byly prováděny, pakliže není uvedeno jinak, v bezvodém prostředí. Aparatury byly žíhány plamenem pod pozitivním tlakem inertního plynu (argon).

K měření NMR spekter byl použit spektrometr JEOL ECA400II pracující při frekvenci 400 MHz ( $^1\text{H}$ ) a 101 MHz ( $^{13}\text{C}$ ) a nebo JEOL 500 ECA pracující při frekvenci 500 MHz ( $^1\text{H}$ ) a 126 MHz ( $^{13}\text{C}$ ). Měření byla prováděna za laboratorní teploty, přičemž vzorky byly rozpuštěny a následně měřeny v jednom z následujících deuterovaných rozpouštědel:  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{DMSO-}d_6$ . Chemické posuny zbytkových nedeuterovaných resp. částečně nedeuterovaných rozpouštědel v daném rozpouštědle jsou následující: pro  $\text{CDCl}_3$  7.27 ppm ( $^1\text{H}$ ) a 77.16 ppm ( $^{13}\text{C}$ ) a pro  $\text{DMSO-}d_6$  2.50 ppm ( $^1\text{H}$ ) a 39.52 ppm ( $^{13}\text{C}$ ). Protonové vazebné vzory jsou reprezentovány jako singlet (s), dublet (d), dublet dubletů (dd), triplet (t), triplet tripletů (tt), quartet (q) a multiplet (m).

Měření hmotnostních spekter se vykonávalo na spektrometru TSQ Quantum ACCES (Thermo Scientific, USA) a ionizačním zdrojem APCI.

Hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením (HRMS) se měřila na hmotnostním spektrometru Agilent 6230 s vysokým rozlišením s ionizací elektrosprejem (ESI) a analyzátozem doby letu pracujícím v pozitivním nebo negativním režimu plného skenování v rozsahu 100 – 1700 m/z.

Všechny experimenty s mikrovlnným ozařováním byly prováděny ve specializovaném mikrovlnném přístroji CEM-discover v monomódu. Reaktor byl použit ve standardní konfiguraci při dodání, včetně proprietárního softwaru. Reakce byly prováděny ve skleněných lahvičkách o objemu 10 nebo 35 ml, které byly utěsněny silikonovými/PTFE uzávěry. Teplota byla měřena IR senzorem na vnějším povrchu procesní nádoby. Po periodě ozařování byly reakční nádoby ochlazeny na okolní teplotu chlazením proudem plynu.

Pro sloupcovou chromatografii (CC) bylo využito silikagelu (60 Å, 230 – 400 mesh) jako stacionární fáze a směsi hexan:EtOAc (V/V), pokud není uvedeno jinak, jako mobilní fáze. Při dělení sloupcovou kapalinovou chromatografií bylo použito

postupného gradientu, kdy polárnější frakce mobilní fáze byla skokově přidávána do mobilní fáze (například dle následujícího postupu: hexan:EtOAc = 20:1→10:1→4:1→2:1). Eluované frakce byly jímány po 5-30 ml frakcích a jejich obsah byl monitorován pomocí TLC. Frakce obsahující stejný produkt byly spojeny a následně odpařeny na rotační vakuové odparce (RVO).

Průběh reakcí byl monitorován pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC) na silikagelu. Pro tento typ operace byly použity aluminiové desky pokryté silikagelem 60 F<sub>254</sub> s fluorescentním indikátorem. Jednotlivé sloučeniny přítomné v reakční směsi byly detekovány pomocí UV záření ( $\lambda = 256 \text{ nm}$ ) a dále byly vizualizovány pomocí vizualizačních roztoků.

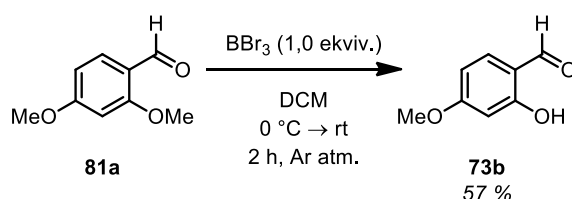
### 5.1.1 Vizualizační roztoky pro TLC

Metody přípravy:

- Zásaditý roztok KMnO<sub>4</sub> byl připraven rozpuštěním 1,5 g KMnO<sub>4</sub> a 10 g K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> v 200 ml vody s 1,25 ml 10% NaOH.
- Vanilinový roztok byl připraven rozpuštěním 12 g vanilinu v 200 ml ethanolu obsahující 2 ml koncentrované H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

## 5.2 Syntéza derivátů salicylaldehydu (73)

### 5.2.1 Syntéza 2-hydroxy-4-methoxybenzaldehydu (73b)



Do ochlazeného roztoku 2,4-dimethoxybenzaldehydu **81a** (1,0 g; 5,9 mmol; 1,0 ekviv.) v dichlormethanu (29,5 ml) se přidá BBr<sub>3</sub> (1 ml; 5,9 mmol; 1,0 ekviv.), který se následně nechá míchat za laboratorní teploty v atmosféře argonu po dobu 2 hodin. Poté se do směsi přidá nasycený vodný roztok NaHCO<sub>3</sub> (3 ml). Výsledné vrstvy se oddělí a vodná vrstva je extrahována pomocí EtOAc (3x30 ml). Spojené organické fáze jsou promyty nasyceným vodným roztokem NaCl (30 ml), vysušeny pomocí bezvodého MgSO<sub>4</sub>, zfiltrány a organické rozpouštědlo je odpařeno na RVO. Odparek je následně

purifikován pomocí sloupcové kapalinové chromatografie (SiO<sub>2</sub>; hexan:EtOAc = 2:1). Získané frakce s požadovanou látkou **73b** jsou odpařeny na RVO. Výsledný produkt **73b** (0,51 g; 57 %) je získán ve formě bílé krystalické látky.

$R_f = 0,69$  (hexan:EtOAc = 2:1)

m. p. = 37 – 38 °C

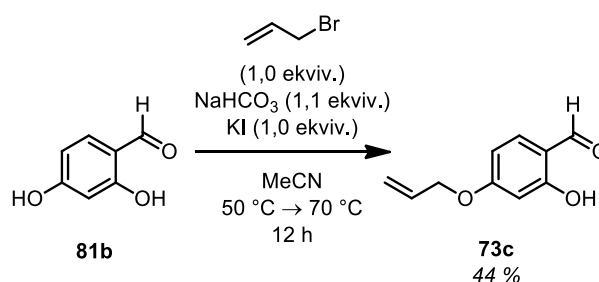
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  (ppm) 11.48 (s, 1H), 9.72 (d,  $J = 0.6$  Hz, 1H), 7.43 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H), 6.54 (dd,  $J = 8.6, 2.4$  Hz, 1H), 6.44 (d,  $J = 2.3$  Hz, 1H), 3.86 (s, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  (ppm) 194.5, 166.9, 164.6, 135.4, 115.3, 108.5, 100.7, 55.8.

MS (APCI),  $m/z$  (%):  $[M+H]^+$  153.1

HRMS *vypočteno* pro C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>O<sub>3</sub><sup>-</sup>  $[M-H]^-$ : 151.0390, nalezeno 151.0387

## 5.2.2 Syntéza 4-(allyloxy)-2-hydroxybenzaldehydu (**73c**)



Do roztoku 4-hydroxysalicylaldehydu **81b** (1,0 g; 7,1 mmol; 1,0 ekvív.) v acetonitrilu (10,1 ml) se přidá NaHCO<sub>3</sub> (0,66 g; 7,8 mmol; 1,1 ekvív.) a KI (1180 mg; 7,1 mmol; 1,0 ekvív.). Dále se tato reakční směs míchá při 50 °C po dobu 30 minut. Poté se k této reakční směsi přidá během 5 minut roztok allylbromidu (0,6 ml; 7,1 mmol; 1,0 ekvív.) v acetonitrilu (5 ml) a vzniklá směs se dále míchá při 70 °C po dobu 12 hodin. Organické rozpouštědlo je odstraněno na RVO a odparek je rozpuštěn ve směsi diethyl etheru (10 ml) a vody (10 ml). Výsledné vrstvy se oddělí a vodná vrstva je extrahována diethyl etherem (3x10 ml). Spojené organické fáze jsou promyty nasyceným vodným roztokem NaCl (20 ml), vysušeny pomocí bezvodého MgSO<sub>4</sub>, zfiltrány a organické rozpouštědlo je odpařeno na RVO. Odparek je následně purifikován pomocí sloupcové kapalinové chromatografie (SiO<sub>2</sub>; hexan:EtOAc = 2:1). Získané frakce s požadovanou látkou **73c** jsou odpařeny na RVO. Výsledný produkt **73c** (0,63 g; 44 %) je nažloutlá olejovitá kapalina.

$R_f = 0,33$  (hexan:EtOAc = 2:1)

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  (ppm) 11.46 (s, 1H), 9.71 (s, 2H), 7.42 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H), 6.55 (dd,  $J = 8.7, 2.3$  Hz, 2H), 6.43 (d,  $J = 2.3$  Hz, 2H), 6.02 (ddt,  $J = 17.4, 10.6, 5.3$  Hz, 2H), 5.42 (dq,  $J = 17.2, 1.6$  Hz, 2H), 5.33 (dq,  $J = 10.6, 1.4$  Hz, 2H), 4.58 (dt,  $J = 5.3, 1.6$  Hz, 4H).

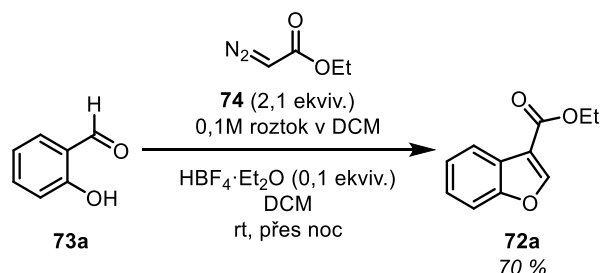
$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  (ppm) 194.5, 165.9, 164.5, 135.4, 132.1, 118.7, 115.3, 108.9, 101.5, 69.2.

MS (APCI),  $m/z$  (%):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  179.2

HRMS vypočteno pro  $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{O}_3^-$   $[\text{M}-\text{H}]^-$ : 177.0546, nalezeno 177.0540

## 5.3 Syntéza derivátů benzofuranu (72)

### 5.3.1 Syntéza ethyl benzofuran-3-karboxylátu (72a)



Do roztoku salicylaldehydu **73a** (3,0 g; 24,56 mmol; 1,0 ekviv.) v dichlormethanu (20,9 ml) se přidá  $\text{HBF}_4 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  (0,39 g; 2,46 mmol; 0,1 ekviv.) za laboratorní teploty za stálého míchání. Dochází ke vzniku červeného roztoku. Ethyl diazoacetát **74** (5,89 g; 51,59 mmol; 2,1 ekviv.) v dichlormethanu (5,5 ml) se přikapává do reakční směsi pomocí syringe pump rychlostí 0,06 ml/min. Během přidávání roztoku ethyl diazoacetátu **74** se uvolňuje dusík a reakční směs se zahřívá. Dále je směs míchána přes noc za laboratorní teploty a poté je rozpouštědlo odstraněno na RVO. Před neutralizací nasyceným vodným roztokem  $\text{NaHCO}_3$  (34 ml) se do směsi přidá koncentrovaná kyselina sírová (1,2 ml). Výsledné vrstvy se oddělí a vodná vrstva je extrahována EtOAc (3x30 ml). Spojené organické fáze jsou promyty nasyceným vodným roztokem NaCl (30 ml). Organické rozpouštědlo je vysušeno pomocí bezvodého  $\text{MgSO}_4$ , zfiltrováno a organické rozpouštědlo je odpařeno na RVO. Odparek je následně purifikován pomocí sloupcové kapalinové chromatografie ( $\text{SiO}_2$ ; hexan:EtOAc = 10:1).

Získané frakce s požadovanou látkou **72a** jsou odpařeny na RVO. Výsledná látka **72a** (3,29 g; 70 %) je nažloutlá olejovitá kapalina.

$R_f = 0,87$  (hexan:EtOAc = 10:1)

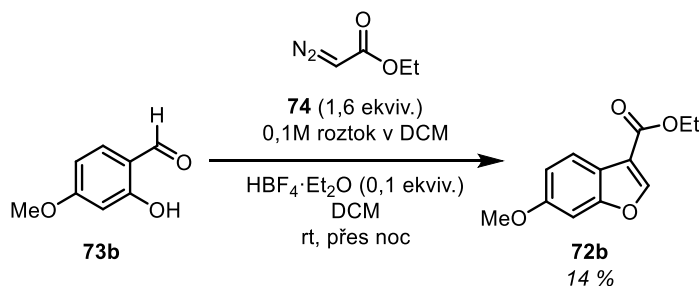
$^1\text{H NMR}$  (400 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  (ppm) 8.26 (s, 1H), 8.09 – 8.05 (m, 1H), 7.55 – 7.52 (m, 1H), 7.38 – 7.35 (m, 2H), 4.42 (q,  $J = 7.20$  Hz, 2H), 1.43 (t,  $J = 7.10$  Hz, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$  (101 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  (ppm) 163.6, 155.8, 151.1, 125.4, 124.8, 124.3, 122.2, 114.9, 111.8, 60.7, 14.5.

MS (APCI),  $m/z$  (%):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  191.0

HRMS vypočteno pro  $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_4\text{K}^+$   $[\text{M}+\text{K}]^+$ : 247.0367, nalezeno 247.0370

### 5.3.2 Syntéza ethyl 6-methoxybenzofuran-3-karboxylátu (**72b**)



Ethyl 6-methoxybenzofuran-3-karboxylát **73b** (70 mg; 0,46 mmol; 1,0 ekvív.) se rozpustí v dichlormethanu (0,4 ml) a dále se přidá HBF<sub>4</sub>·Et<sub>2</sub>O (6,0  $\mu\text{l}$ ; 0,05 mmol; 0,1 ekvív.) za laboratorní teploty za stálého míchání. Následně se přikapává roztok ethyl diazoacetátu **74** (9,7  $\mu\text{l}$ ; 0,74 mmol; 1,6 ekvív.) v dichlormethanu (0,31 ml). Během přidávání roztoku ethyl diazoacetátu **74** se uvolňuje dusík a reakční směs se zahřívá. Dále je směs míchána přes noc za laboratorní teploty a poté je rozpouštědlo odstraněno na RVO. Před neutralizací nasyceným vodným roztokem NaHCO<sub>3</sub> (1,3 ml) se do směsi přidá koncentrovaná kyselina sírová (0,32 ml). Výsledné vrstvy se oddělí a vodná vrstva je extrahována EtOAc (3x5 ml). Spojené organické fáze jsou promyty nasyceným vodným roztokem NaCl (10 ml), vysušeny pomocí bezvodého MgSO<sub>4</sub>, zfiltrány a organické rozpouštědlo je odpařeno na RVO. Odparek je následně purifikován pomocí sloupcové kapalinové chromatografie (SiO<sub>2</sub>; hexan:EtOAc = 2:1). Získané frakce s požadovanou látkou **72b** jsou odpařeny na RVO. Výsledná látka **72b** (13,5 mg; 14 %) je nažloutlá olejovitá kapalina.

$R_f = 0,69$  (hexan:EtOAc = 2:1)

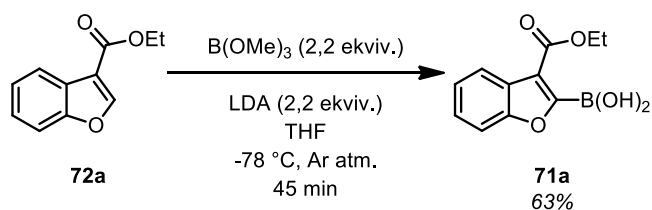
$^1\text{H NMR}$  (500 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  (ppm) 8.16 (s, 1H), 7.90 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 7.04 (d,  $J = 2.2$  Hz, 1H), 6.98 (dd,  $J = 8.6, 2.2$  Hz, 1H), 4.39 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 1.42 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$  (126 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  (ppm) 163.7, 158.7, 156.7, 150.1, 122.2, 118.0, 114.8, 113.4, 96.0, 60.6, 55.8, 14.5.

MS (APCI),  $m/z$  (%):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  221.3

HRMS vypočteno pro  $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{O}_4^+$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 221.0808, nalezeno 221.0808

## 5.4 Syntéza (3-(ethoxykarbonyl)benzofuran-2-yl)boronové kyseliny (71a)



Směs ethyl benzofuran-3-karboxylátu **72a** (250 mg; 1,31 mmol; 1,0 ekviv.) a trimethyl borátu (300 mg; 2,89 mmol; 2,2 ekviv.) se rozpustí v bezvodém tetrahydrofuranu (4 ml) pod atmosférou argonu a vše je chlazeno na  $-78\text{ }^\circ\text{C}$  pomocí lázně s pevným oxidem uhličitým a acetonem za stálého míchání. Dále se přidá pomocí injekční stříkačky diisopropylamid lithný (310 mg; 2M THF/heptan/ethylbenzen; 2,89 mmol; 2,2 ekviv.) a výsledná reakční směs se míchá po dobu 45 minut za stejných podmínek. Poté se přidá roztok kyseliny chlorovodíkové (4,8 ml; 4 M v  $\text{H}_2\text{O}$ ). Směs se míchá 10 minut za laboratorních podmínek před extrakcí s EtOAc (3x20 ml). Sloučené organické fáze jsou promyty nasyceným vodným roztokem NaCl (10 ml). Organické rozpouštědlo je odstraněno na RVO a odparek je následně purifikován pomocí sloupcové kapalinové chromatografie ( $\text{SiO}_2$ ; hexan:EtOAc = 2:1). Získané frakce s požadovanou látkou **71a** jsou odpařeny na RVO. Výsledná látka **71a** (194 mg; 63 %) je získána ve formě béžových krystalků.

$R_f = 0,38$  (hexan:EtOAc = 2:1)

m. p. =  $119 - 120\text{ }^\circ\text{C}$

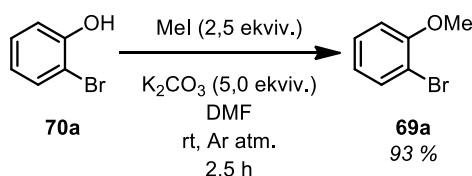
$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  (ppm) 8.04 (ddd,  $J = 7.9, 1.3, 0.7$  Hz, 1H), 7.62 (dt,  $J = 8.3, 0.8$  Hz, 1H), 7.53 (s, 1H), 7.45 (ddd,  $J = 8.4, 7.2, 1.4$  Hz, 1H), 7.38 (td,  $J = 7.6, 1.0$  Hz, 1H), 4.55 (q,  $J = 7.1$  Hz, 1H), 1.53 (t,  $J = 7.1$  Hz, 2H).

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  (ppm) 167.9, 156.8, 127.0, 124.9, 124.5, 123.6, 123.2, 112.3, 62.4, 14.3.

MS (APCI),  $m/z$  (%):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  217.1

HRMS vypočteno pro  $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{BO}_5^-$   $[\text{M}-\text{H}]^-$ : 247.0783, nalezeno 247.0779

## 5.5 Syntéza 2-bromanisolu (69a)



Do vyžíhané baňky s argonovou atmosférou se vloží  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (3,9 g; 28,3 mmol; 5,0 ekviv.) a rozpustí se v bezvodém DMF (28,3 ml). Dále se přidá 2-bromfenol **70a** (0,67 ml; 5,66 mmol; 1,0 ekviv.) a poté se pomalu přikapává methyljodid (0,88 ml; 14,2 mmol; 2,5 ekviv.). Vzniklá bílá, zakalená reakční směs se nechá míchat 2,5 hodiny za laboratorní teploty v argonové atmosféře. Před extrakcí s EtOAc (3x30 ml) se přidá nasycený vodný roztok  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (6,65 ml). Sloučené organické fáze jsou promyty nasyceným vodným roztokem NaCl (30 ml), vysušeny pomocí bezvodého  $\text{MgSO}_4$ , zfiltrvány a organické rozpouštědlo je odpařeno na RVO. Surový produkt **69a** (983 mg; 93 %) je získán ve formě žluté olejovité látky a dále je použit do dalšího reakčního kroku bez purifikace.

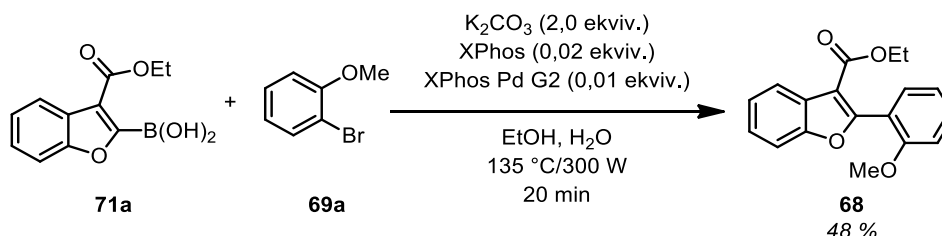
$R_f = 0,86$  (hexan:EtOAc = 2:1)

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  (ppm) 7.54 (dd,  $J = 7.8, 1.7$  Hz, 1H), 7.30 – 7.25 (m, 1H), 6.91 (dd,  $J = 8.3, 1.4$  Hz, 1H), 6.84 (td,  $J = 7.6, 1.5$  Hz, 1H), 3.90 (s, 3H).

$^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  (ppm) 155.9, 133.5, 128.6, 121.9, 112.1, 111.8, 56.3.



## 5.6 Syntéza ethyl 2-(2-methoxyfenyl)benzofuran-3-karboxylátu (68)



Do zkumavky určené do mikrovlnného reaktoru se vloží boronová kyselina **71a** (250 mg; 1,07 mmol; 1,0 ekviv.) a nechá se rozpustit v ethanolu (0,79 ml) a v deionizované vodě (1,0 ml). Do vzniklé reakční směsi se dále přidá XPhos (10,5 mg; 0,02 mmol; 0,02 ekviv.), XPhos Pd G2 (8,4 mg; 0,01 mmol; 0,01 ekviv.),  $K_2CO_3$  (295 mg; 2,14 mmol, 2,0 ekviv.) a nakonec 2-bromanisol **69a** (200 mg; 1,07 mmol; 1,0 ekviv.). Vzniklá reakční směs se zahřeje za mikrovlnné iniciace (300 W; 135 °C) po dobu 20 minut a poté se přefiltruje přes Celite<sup>®</sup> a promyje EtOAc (0,5 ml). Organické rozpouštědlo je odstraněno na RVO a odparek je následně purifikován pomocí sloupcové kapalinové chromatografie (SiO<sub>2</sub>; hexan:EtOAc = 6:1). Získané frakce s požadovanou látkou **68** jsou odpařeny na RVO. Výsledný produkt **68** (150 mg; 48 %) je získán ve formě žluté olejovité látky.

$R_f = 0,27$  (hexan:EtOAc = 6:1)

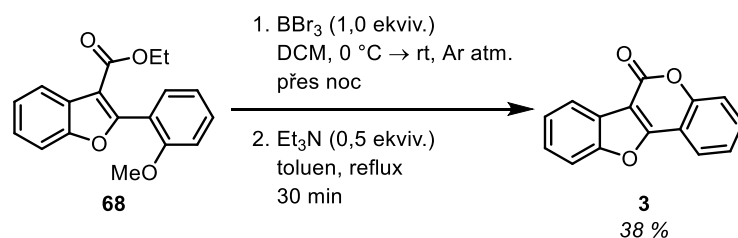
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  (ppm) 8.10 – 8.02 (m, 1H), 7.59 – 7.50 (m, 2H), 7.50 – 7.43 (m, 1H), 7.40 – 7.31 (m, 2H), 7.08 (td,  $J = 7.5, 1.0$  Hz, 1H), 7.01 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 4.30 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 3.82 (s, 3H), 1.27 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  (ppm) 164.0, 158.4, 157.9, 154.4, 131.7, 131.5, 126.8, 125.0, 123.9, 122.2, 120.3, 119.7, 111.4, 111.2, 60.4, 55.8, 14.3.

MS (APCI),  $m/z$  (%):  $[M+H]^+$  297.2

HRMS vypočteno pro  $C_{18}H_{17}O_4^+$   $[M+H]^+$ : 297.1121, nalezeno 297.1118

## 5.7 Syntéza coumestanu (3)



Do vyžíhané baňky opatřené balónkem s argonovou atmosférou se vloží látka **68** (300 mg; 1,01 mmol; 1,0 ekviv.) a rozpustí se v dichlormethanu (1 ml). Dále se přikapává BBr<sub>3</sub> (4,04 ml; 4,04 mmol; 4,0 ekviv.) při 0 °C a vzniklá reakční směs se nechá míchat přes noc za laboratorní teploty. Před extrakcí s EtOAc (3x5 ml) se přidá nasycený vodný roztok NaHCO<sub>3</sub> (2 ml). Sloučené organické fáze jsou promyty nasyceným vodným roztokem NaCl (5 ml), vysušeny pomocí bezvodého MgSO<sub>4</sub>, zfiltrány a organické rozpouštědlo je odpařeno na RVO. Před přidání Et<sub>3</sub>N (0,08 ml; 0,506 mmol; 0,5 ekviv.) je vytvořený odparek rozpuštěn v toluenu (10 ml). Vzniklá reakční směs se dále 30 minut refluxuje (110 °C). Organické rozpouštědlo je odstraněno na RVO a odparek je následně purifikován pomocí sloupcové kapalinové chromatografie (SiO<sub>2</sub>; hexan:EtOAc = 6:1). Získané frakce s požadovanou látkou **3** jsou odpařeny na RVO. Výsledný produkt **3** (30 mg; 38 %) je získán ve formě bílé krystalické látky.

$R_f = 0,39$  (hexan:EtOAc = 6:1)

m. p. = 183 – 184 °C

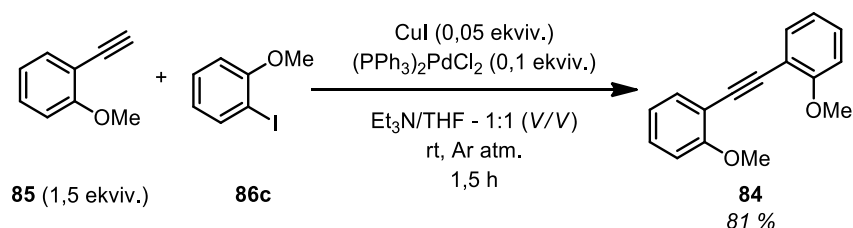
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm) 8.20 – 8.12 (m, 1H), 8.06 (dd,  $J = 7.9, 1.6$  Hz, 1H), 7.72 – 7.58 (m, 2H), 7.56 – 7.37 (m, 4H).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm) 160.2, 158.2, 155.7, 153.9, 132.1, 126.9, 125.4, 124.8, 123.6, 122.1, 122.1, 117.7, 112.9, 111.9, 106.1.

MS (APCI),  $m/z$  (%): [M+H]<sup>+</sup> 237.1

HRMS vypočteno pro C<sub>15</sub>H<sub>9</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>: 237.0546, nalezeno 237.0549

## 5.8 Syntéza 1,2-bis(2-methoxyfenyl)ethynu (84)



Do vyžíhané baňky opatřené balónkem s argonovou atmosférou se vloží látka **85** (212 mg; 1,6 mmol; 1,5 ekviv.) a rozpustí se v  $\text{Et}_3\text{N}/\text{THF}$  – 1:1 (V/V; 5,4 ml). Dále se vloží 2-jodanisol **86c** (250 mg; 1,07 mmol; 1,0 ekviv.), jodid měďný (10,4 mg; 0,05 mmol; 0,05 ekviv.) a nakonec  $(\text{PPh}_3)_2\text{PdCl}_2$  (75 mg; 0,11 mmol; 0,1 ekviv.). Vzniklá směs se nechá míchat za laboratorní teploty po dobu 1,5 hodiny. Před extrakcí s  $\text{EtOAc}$  (3x5 ml) se přidá voda (6 ml). Sloučené organické fáze jsou promyty nasyceným vodným roztokem  $\text{NaCl}$  (10 ml), vysušeny pomocí bezvodého  $\text{MgSO}_4$ , zfiltrvány a organické rozpouštědlo je odpařeno na RVO. Odparek je následně purifikován pomocí sloupcové kapalinové chromatografie ( $\text{SiO}_2$ ; hexan: $\text{EtOAc}$  = 5:1). Získané frakce s požadovanou látkou **84** jsou odpařeny na RVO. Výsledný produkt **84** (205 mg; 81 %) je získán ve formě bílé krystalické látky.

$R_f$  = 0,45 (hexan: $\text{EtOAc}$  = 5:1)

m. p. = 121 °C

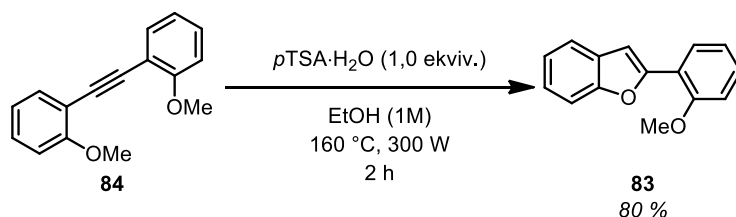
$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  (ppm) 7.53 (dd,  $J$  = 7.5, 1.7 Hz, 1H), 7.29 (ddd,  $J$  = 8.3, 7.4, 1.7 Hz, 1H), 6.93 (td,  $J$  = 7.6, 1.1 Hz, 1H), 6.90 (dd,  $J$  = 8.3, 1.0 Hz, 1H), 3.93 (s, 3H).

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  (ppm) 160.1, 133.7, 129.7, 120.6, 113.0, 110.9, 90.0, 56.1.

MS (APCI),  $m/z$  (%):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  239.2

HRMS vypočteno pro  $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{O}_2^+$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 239.1067, nalezeno 239.1068

## 5.9 Syntéza 2-(2-methoxyfenyl)benzofuranu (83)



Do zkumavky určené do mikrovlnného reaktoru se vloží alkyň **84** (608 mg; 2,55 mmol; 1,0 ekviv.) a nechá se rozpustit v ethanolu (10,2 ml). Do vzniklé reakční směsi se dále přidá  $pTSA \cdot H_2O$  (495 mg; 2,55 mmol; 1,0 ekviv.). Vzniklá reakční směs se zahřeje za mikrovlnné iniciace (300 W; 160 °C) po dobu 2 hodin. Před extrakcí s EtOAc (3x15 ml) se přidá voda (6 ml). Sloučené organické fáze jsou promyty nasyceným vodným roztokem NaCl (15 ml), vysušeny pomocí bezvodého  $MgSO_4$ , zfiltrvány a organické rozpouštědlo je odpařeno na RVO. Odparek je následně purifikován pomocí sloupcové kapalinové chromatografie ( $SiO_2$ ; hexan:EtOAc = 10:1). Získané frakce s požadovanou látkou **83** jsou odpařeny na RVO. Výsledný produkt **83** (460 mg; 80 %) je získán ve formě bílé krystalické látky.

$R_f = 0,58$  (hexan:EtOAc = 10:1)

m. p. = 76 °C

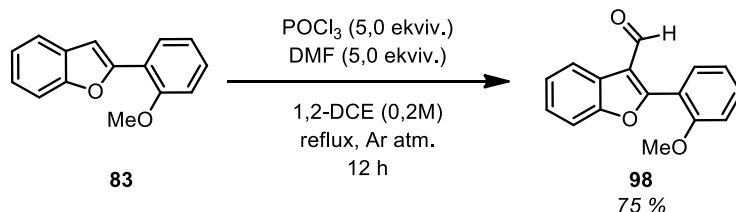
$^1H$  NMR (400 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  (ppm) 8.09 (dt,  $J = 7.8, 1.5$  Hz, 1H), 7.64 – 7.49 (m, 2H), 7.39 – 7.26 (m, 3H), 7.22 (td,  $J = 7.4, 1.1$  Hz, 1H), 7.09 (tt,  $J = 7.5, 1.0$  Hz, 1H), 7.02 (dd,  $J = 8.3, 1.1$  Hz, 1H), 4.02 (s, 3H).

$^{13}C$  NMR (101 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  (ppm) 156.7, 154.1, 152.3, 130.0, 129.4, 127.2, 124.2, 122.8, 121.2, 120.9, 119.6, 111.2, 111.0, 106.5, 55.6.

MS (APCI),  $m/z$  (%):  $[M+H]^+$  225.4

HRMS vypočteno pro  $C_{15}H_{13}O_2^+$   $[M+H]^+$ : 225.0910, nalezeno 225.0912

## 5.10 Syntéza 2-(2-methoxyfenyl)benzofuran-3-karbaldehydu (**98**)



Do vyžíhané baňky opatřené balónkem s argonovou atmosférou se vloží nejprve rozpouštědlo 1,2-DCE (7,8 ml) a poté DMF (0,6 ml; 7,8 mmol; 5,0 ekviv.). Vzniklá reakční směs se ochladí na 0 °C pomocí ledové lázně a následně se přidá POCl<sub>3</sub> (1,2 g; 7,8 mmol; 5,0 ekviv.). Vytvořený roztok se nechá míchat za laboratorní teploty po dobu 1 hodinu v argonové atmosféře. Po uplynutí 1 hodiny se přidá substrát **83** (0,35 g; 1,56 mmol; 1,0 ekviv.) a reakční směs se refluxuje (84 °C) 12 hodin. Po vychladnutí reakční baňky se vzniklý roztok nalije na drcený led (228 g) a nechá se míchat 1 hodinu. Dále se vytvořená reakční směs zalkalizuje vodným roztokem NaOH (1M) na pH 9. Výsledné vrstvy se oddělí a vodná vrstva je extrahována DCM (3x15 ml). Spojené organické fáze jsou promyty nasyceným vodným roztokem NaCl (15 ml), vysušeny pomocí bezvodého MgSO<sub>4</sub>, zfiltrovány a organické rozpouštědlo je odpařeno na RVO. Odparek je následně purifikován pomocí sloupcové kapalinové chromatografie (SiO<sub>2</sub>; hexan:EtOAc = 2:1). Získané frakce s požadovanou látkou **98** jsou odpařeny na RVO. Výsledný produkt **98** (297 mg; 75 %) je nažloutlá krystalická látka.

$R_f = 0,58$  (hexan:EtOAc = 2:1)

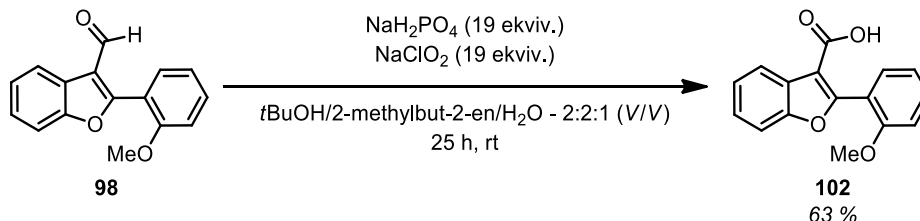
m. p. = 129 °C

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  (ppm) 10.11 (s, 1H), 8.30 – 8.24 (m, 1H), 7.64 (dd,  $J = 7.6, 1.8$  Hz, 1H), 7.54 (ddd,  $J = 9.9, 7.3, 2.5$  Hz, 2H), 7.43 – 7.33 (m, 2H), 7.17 – 7.12 (m, 1H), 7.09 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H), 3.87 (s, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*)  $\delta$  (ppm) 187.9, 162.8, 157.5, 154.7, 132.7, 131.9, 125.7, 125.3, 124.7, 122.7, 121.1, 118.4, 117.9, 111.8, 111.3, 55.9.

MS (APCI),  $m/z$  (%): [M+H]<sup>+</sup> 253.5

## 5.11 Syntéza 2-(2-methoxyfenyl)benzofuran-3-karboxylové kyseliny (102)



2-(2-methoxyfenyl)benzofuran-3-karbaldehyd **98** (100 mg; 0,396 mmol; 1 ekv.) se rozpustí ve směsi  $t\text{BuOH}/2\text{-methylbut-2-en}/\text{H}_2\text{O}$  – 2:2:1 (V/V; 5,5 ml). Dále se vloží  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (1175 mg; 7,530 mmol; 19 ekv.) a  $\text{NaClO}_2$  (681 mg; 7,530 mmol; 19 ekv.) a vzniklá reakční směs se nechá míchat po dobu 25 hodin za laboratorní teploty. Poté se směs zředí připraveným roztokem DCM/MeOH – 95:5 (V/V; 25 ml). Dále je vzniklá reakční směs promyta nasyceným vodným roztokem NaCl (25 ml) a organická fáze je následně zakoncentrována na RVO. Před extrakcí s DCM (3x25 ml) je vzniklý odparek rozpuštěn ve vodném roztoku  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (0,5M). Spojené vodné fáze jsou okyseleny pomocí koncentrované HCl (4 ml) za vzniku bílého zákalu. Takto vzniklá směs se dále extrahuje do DCM (3x25 ml). Spojené organické fáze jsou vysušeny pomocí bezvodého  $\text{MgSO}_4$ , zfiltrovány a organické rozpouštědlo je odpařeno na RVO. Surový produkt **102** (67 mg; 63 %) je získá ve formě bílé krystalické látky a dále je použit do dalšího reakčního kroku bez purifikace.

$R_f = 0,29$  (hexan:EtOAc = 2:1)

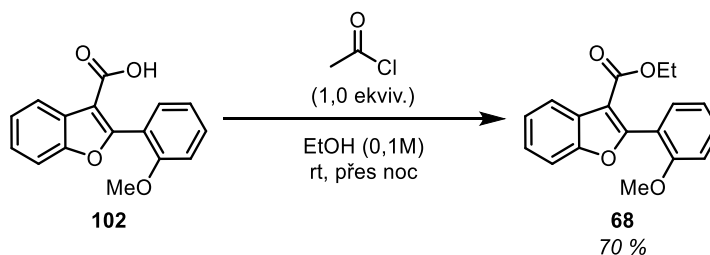
m. p. = 218 – 219 °C

$^1\text{H NMR}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  (ppm) 12.73 (s, 1H), 8.02 – 7.91 (m, 1H), 7.70 – 7.60 (m, 1H), 7.52 (td,  $J = 7.4, 1.8$  Hz, 2H), 7.44 – 7.35 (m, 2H), 7.17 (dd,  $J = 8.9, 1.0$  Hz, 1H), 7.08 (td,  $J = 7.5, 1.0$  Hz, 1H), 3.77 (s, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$  (126 MHz  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  (ppm) 164.4, 157.6, 157.5, 153.5, 131.9, 131.3, 126.5, 125.1, 124.0, 121.7, 120.1, 118.8, 111.7, 111.4, 111.3, 55.6.

MS (APCI),  $m/z$  (%):  $[\text{M-H}]^-$  223.5

## 5.12 Syntéza ethyl 2-(2-methoxyfenyl)benzofuran-3-karboxylátu (68)



2-(2-methoxyfenyl)benzofuran-3-karboxylovou kyselinu **102** (55 mg; 0,205 mmol; 1 ekviv.) rozpustím v ethanolu (2,0 ml) a následně se přidá acetyl chlorid (16 mg; 0,205 mmol; 1 ekviv.). Vzniklá reakční směs se nechá míchat za laboratorní teploty přes noc. Před extrakcí s Et<sub>2</sub>O (3x5 ml) se přidá voda (5 ml). Sloučené organické fáze jsou promyty nasyceným vodným roztokem NaHCO<sub>3</sub> (5 ml), vysušeny pomocí bezvodého MgSO<sub>4</sub>, zfiltrovány a organické rozpouštědlo je odpařeno na RVO. Surový produkt **68** (43 mg; 70 %) je získán ve formě žluté olejovité látky a dále je použit do dalšího reakčního kroku bez purifikace. Analytická data připraveného produktu **68** korespondují s analytickými daty produktu **68** připraveného v kapitole 5.6.

---

## 6 Použitá literatura

- (1) Nicolaou K., Vourloumis D., Winssinger N., B. P. *The Art and Science of Total Synthesis*; **2000**; Vol. 39.
- (2) Wöhler, F. *Annalen Der Pharmacie*; **1838**.
- (3) Kolbe, H. *Annalen Der Chemie Und Pharmacie*; **1845**.
- (4) Endemann, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1880**, 2 (8), 366–371.
- (5) Baeyer, A.; Drewsen, V. *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft* **1882**, 15, 2856–2864.
- (6) Fischer, E. *Synthese Des Traubenzuckers*; **1890**.
- (7) Markó, I. E. *Science (80-. )*. **2001**, 294 (5548), 1843–1844.
- (8) Erb, M.; Kliebenstein, D. J. *Plant Physiol.* **2020**, 184 (1), 39–52.
- (9) Pagare, S.; Bhatia, M.; Tripathi, N.; Pagare, S.; Bansal, Y. K. *Secondary Metabolites of Plants and Their Role*; **2015**; Vol. 9.
- (10) Crozier, A.; Clifford, M. N.; Ashihara, H. *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*; **2006**.
- (11) Zálešák, F.; Bon, D. J. Y. D.; Pospíšil, J. *Pharmacol. Res.* **2019**, 146 (May), 104284.
- (12) Juraj Harmatha. *Fenylpropanoidy, Lignany a Jejich Biologické Účinky*; **2002**.
- (13) Pan, J. Y.; Chen, S. L.; Yang, M. H.; Wu, J.; Sinkkonen, J.; Zou, K. *Nat. Prod. Rep.* **2009**, 26 (10), 1251–1292.
- (14) Nehybova, T.; Smarda, J.; Benes, P. *Anticancer. Agents Med. Chem.* **2014**, 14 (10), 1351–1362.
- (15) Bickof, E. M.; Boot, A. N. *Science (80-. )*. **1957**, 126 (3280), 969.
- (16) Horn-Ross, P. L.; Barnes, S.; Lee, M.; Coward, L.; Mandel, J. E.; Koo, J.; John, E. M.; Smith, M. *Cancer Causes Control* **2000**, 11 (4), 289–298.
- (17) Kurzer, M. S.; Xu, X. *Annu. Rev. Nutr.* **1997**, 17, 353–381.
- (18) Torrens-Mas, M.; Roca, P. *Biology (Basel)*. **2020**, 9 (12), 1–19.
- (19) Cvejić, J.; Bursać, M.; Atanacković, M. *Phytoestrogens: “Estrogene-like” Phytochemicals*; **2012**; Vol. 38.
- (20) Lock, M. Contested Meanings of the Menopause. *Lancet* **1995**, 67 (8), 458–459.



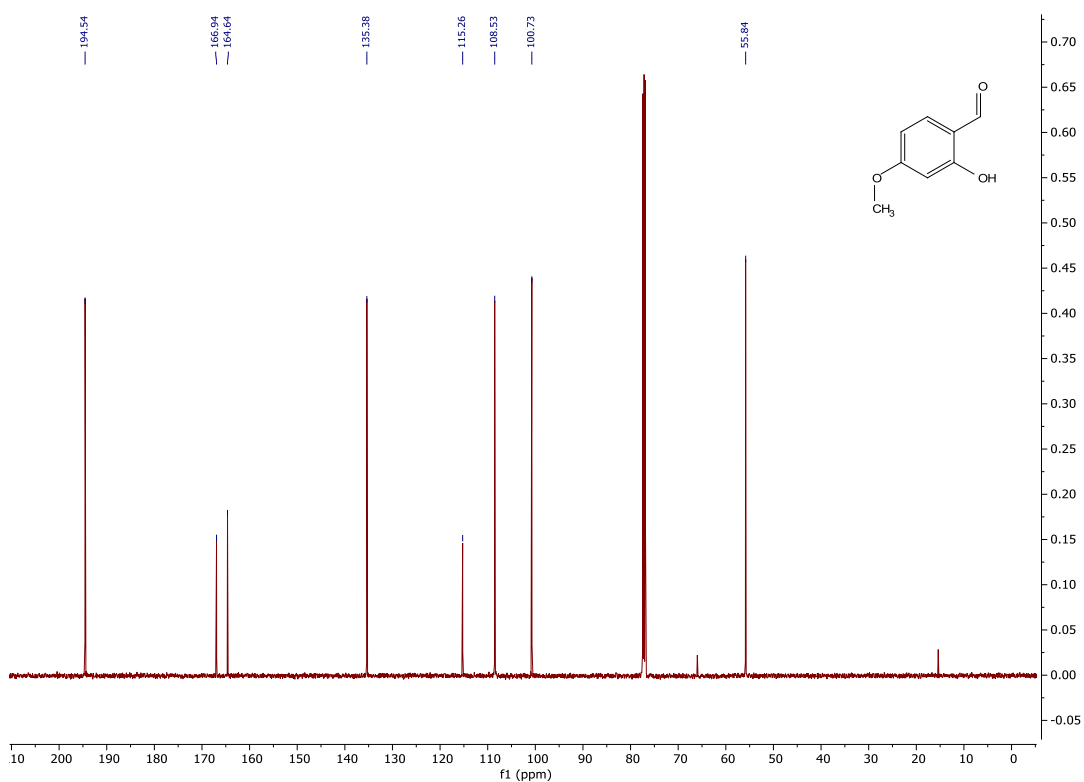
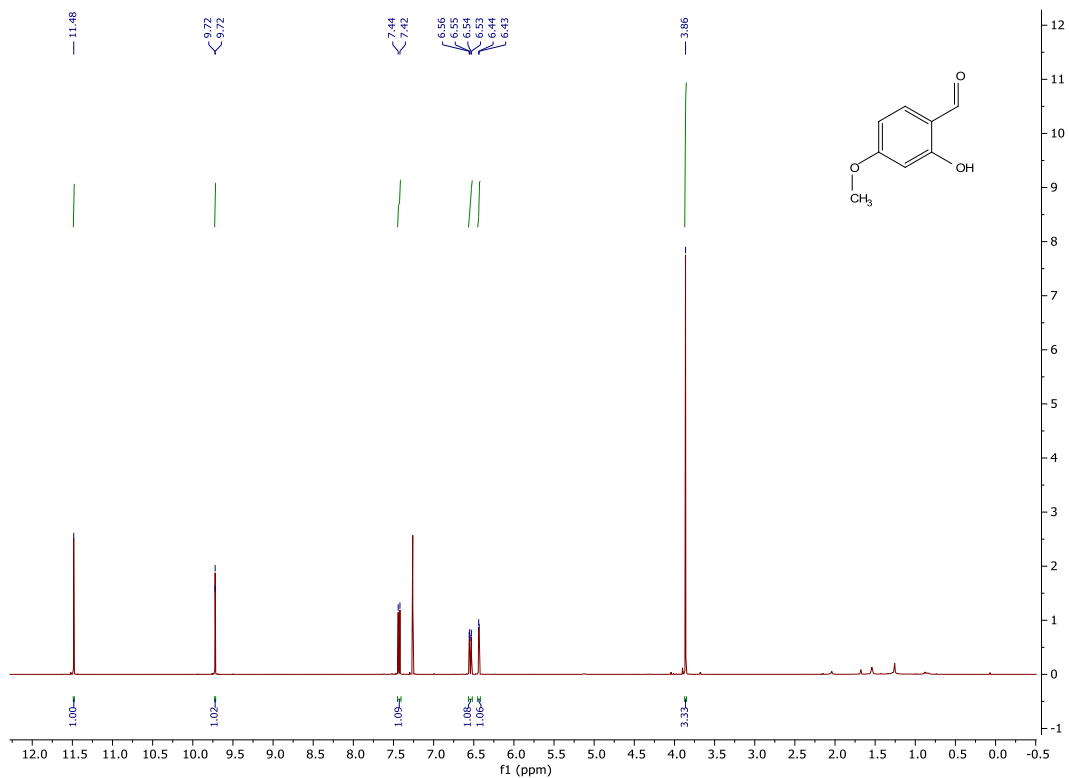
- (21) Hartmann, T. *Phytochemistry* **2007**, *68* (22–24), 2831–2846.
- (22) Yadav, V.; Wang, Z.; Wei, C.; Amo, A.; Ahmed, B.; Yang, X.; Zhang, X. *Pathogens* **2020**, *9* (4), 1–25.
- (23) Herrmann, K. M.; Weaver, L. M. *Annu. Rev. Plant Biol.* **1999**, *50*, 473–503.
- (24) Tohge, T.; Watanabe, M.; Hoefgen, R.; Fernie, A. R. *Front. Plant Sci.* **2013**, *4* (MAR), 1–13.
- (25) Knaggs, A. R. *Nat. Prod. Rep.* **2003**, *20* (1), 119–136.
- (26) Latif, S.; Weston, P. A.; Barrow, R. A.; Gurusinghe, S.; Piltz, J. W.; Weston, L. *A. Metabolites* **2020**, *10* (7), 1–20.
- (27) Basu, P.; Maier, C. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *107* (August), 1648–1666.
- (28) Lopes, A. A.; Souza, G. R. S.; de Castro França, S.; Lourenço, M. V. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* **2022**, *151* (1), 215–219.
- (29) Barz, W. *Phytochemistry* **1972**, *11* (1971), 1689–1693.
- (30) Sheng, J.; Xu, T.; Zhang, E.; Zhang, X.; Wei, W.; Zou, Y. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79* (10), 2749–2753.
- (31) Liu, X.; Nam, J. W.; Song, Y. S.; Viswanath, A. N. I.; Pae, A. N.; Kil, Y. S.; Kim, H. D.; Park, J. H.; Seo, E. K.; Chang, M. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2014**, *24* (5), 1403–1406.
- (32) Kuiper, G. G. J. M.; Lemmen, J. G.; Carlsson, B. O.; Corton, J. C.; Safe, S. H. *Endocrinology* **1998**, *139* (10), 10–16.
- (33) Tuskaev, V. A. *Pharm. Chem. J.* **2013**, *47* (1), 1–11.
- (34) Power, F. B.; Rogerson, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1910**, *32* (1), 80–113.
- (35) Ha, N. M.; Hop, N. Q.; Son, N. T. *Fitoterapia* **2023**, *164* (September 2022), 105355.
- (36) Syed, S. D.; Deepak, M.; Yogisha, S.; Chandrashekar, A. P.; Muddarachappa, K. A.; D'Souza, P.; Agarwal, A.; Venkataraman, B. V. *Phyther. Res.* **2003**, *17* (4), 420–421.
- (37) Pahari, P.; Rohr, J. *J. Org. Chem.* **2009**, *74* (7), 2750–2754.
- (38) Tu, Y.; Wang, K.; Jia, X.; Tan, L.; Han, B.; Zhang, Q.; Li, Y.; He, C. *J. Agric. Food Chem.* **2020**, *68* (39), 10664–10677.
- (39) Tu, Y.; Tan, L.; Lu, T.; Wang, K.; Wang, H.; Han, B.; Zhao, Y.; Chen, H.; Li, Y.; Chen, H.; Chen, M.; He, C. *Biochem. Pharmacol.* **2022**, *197* (November 2021), 114912.
- (40) Kshirsagar, U. A.; Parnes, R.; Goldshtein, H.; Ofir, R.; Zarivach, R.; Pappo, D.

- Chem. - A Eur. J.* **2013**, *19* (40), 13575–13583.
- (41) Yao, T.; Yue, D.; Larock, R. C. *J. Org. Chem.* **2005**, *70* (24), 9985–9989.
- (42) Jiménez-González, L.; Hernández-Cervantes, C.; Álvarez-Corral, M.; Muñoz-Dorado, M.; Rodríguez-García, I. *Nat. Prod. Commun.* **2011**, *6* (4), 537–554.
- (43) Barbušćáková, Z.; Kozubíková, H.; Zálešák, F.; Doležal, K.; Pospíšil, J. *Monatshefte für Chemie* **2018**, *149* (4), 737–748.
- (44) Konrádová, M. D. Biological Applications of Secondary Plant Metabolites of Phenyl Propanoid Origins. Ph.D. Thesis, Univerzita Palackého v Olomouci, **2019**.
- (45) Barbušćáková, B. Z. Syntetické Štúdie Majúce Za Úlohu Zmapovať Cestu Smerom Ku Príprave Prírodných Látok s Neolignanovou Kostrou. Ph.D. Thesis, Univerzita Palackého v Olomouci, **2018**.
- (46) Tuna, P. Syntéza a Biologická Aktivita Fenylypropanoidových Derivátů: Vývoj Syntézy Boehmenanu D. Mgr. Thesis, Univerzita Palackého v Olomouci, **2019**.
- (47) Lachetová, E. Syntéza Neolignanů s Benzofuranovým Skeletem. Mgr. Thesis, Univerzita Palackého v Olomouci, **2019**.
- (48) Vysloužilová, D. Modulární Syntéza a Biologická Aktivita Fenylypropanoidových Dimerů: Syntéza Benzofuranového Skeletu. Bc. Thesis, Univerzita Palackého v Olomouci, **2021**.
- (49) Tolkien, J. R. R. *The Return of the King*; **1955**.
- (50) Jedinák, L.; Zátoková, R.; Zemánková, H.; Šustková, A.; Cankař, P. *J. Org. Chem.* **2017**, *82* (1), 157–169.
- (51) Qin, L.; Vo, D. D.; Nakhai, A.; Andersson, C. D.; Elofsson, M. *ACS Comb. Sci.* **2017**, *19* (6), 370–376.
- (52) Costa, A. M. S. R. C. S.; Dean, F. M.; Jones, M. A.; Varma, R. S. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1985**, No. 9, 799–808.
- (53) Ohmura, T.; Kusaka, S.; Torigoe, T.; Sugimoto, M. *Adv. Synth. Catal.* **2019**, *361* (19), 4448–4453.
- (54) Miyaura, N.; Yamada, K.; Suzuki, A. *Tetrahedron Lett.* **1979**, *20* (36), 3437–3440.
- (55) Nicolaou, K. C.; Bulger, P. G.; Sarlah, D. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2005**, *44* (29), 4442–4489.
- (56) Miyaura, N.; Suzuki, A. *ACS Publ.* **1995**, *7* (95), 2457–2483.
- (57) Pospíšil, J.; Potáček, M. *Tetrahedron* **2007**, *63* (2), 337–346.

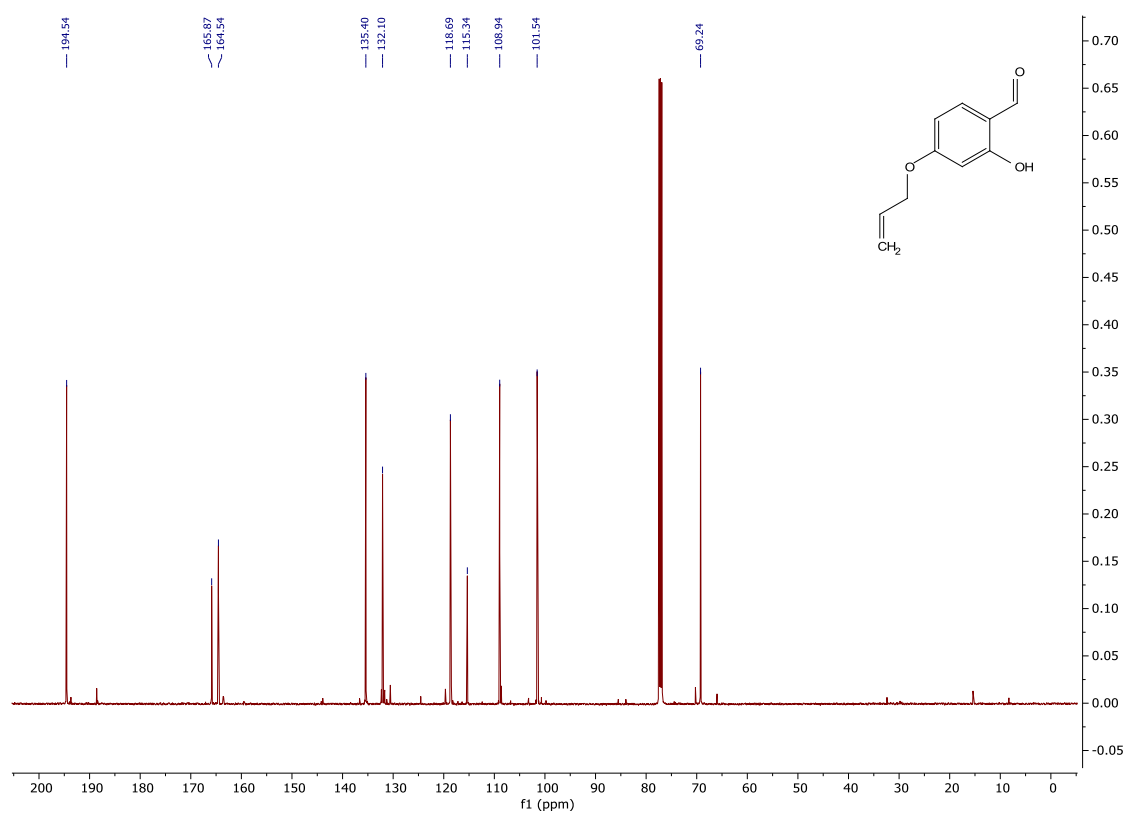
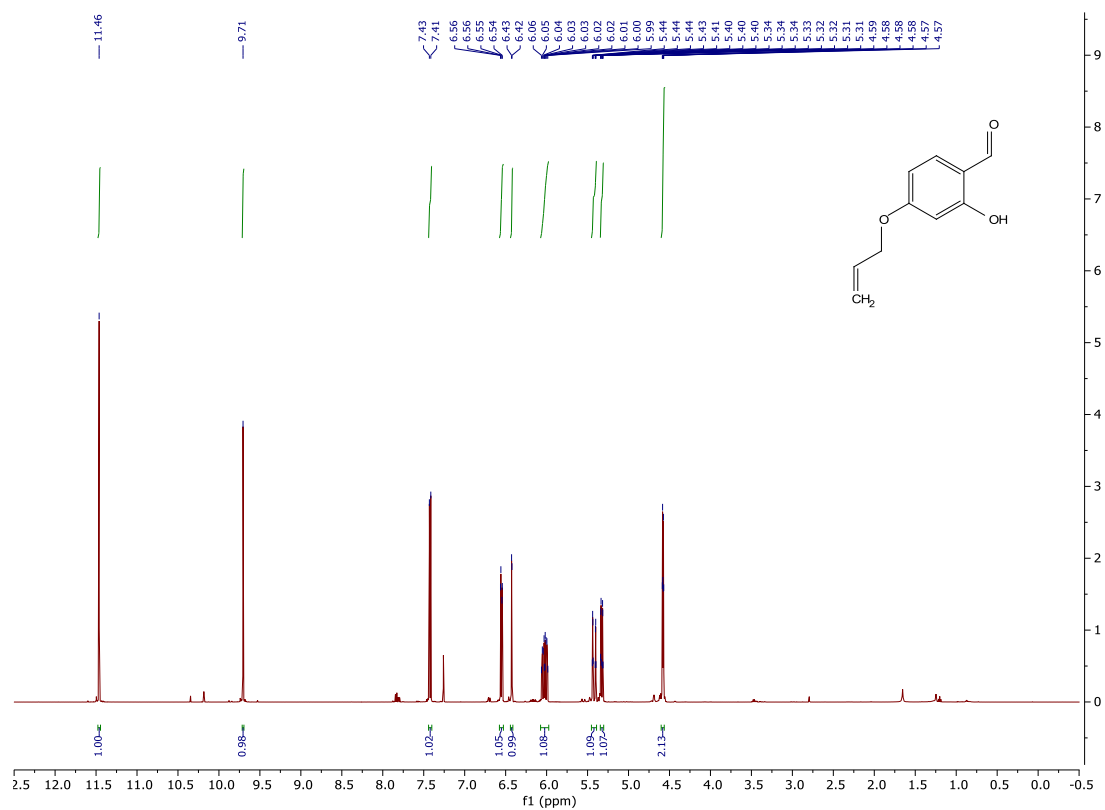
- (58) Sairam, M.; Saidachary, G.; Raju, B. C. *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56* (11), 1338–1343.
- (59) Sonogashira, K. *J. Organomet. Chem.* **2002**, *653* (1–2), 46–49.
- (60) Chinchilla, R.; Nájera, C. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40* (10), 5084–5121.
- (61) Chinchilla, R.; Najera, C. *Chem. Rev.* **2007**, *107* (3), 874–922.
- (62) Kiss, E.; Vracken, R.; Goris, N. Pyrroloryridine and Imidazopyridine Antiviral Compounds, **2021**.
- (63) Torigoe, T.; Ohmura, T.; Suginome, M. *Chem. - A Eur. J.* **2016**, *22* (30), 10415–10419.
- (64) Chen, C. C.; Wu, M. Y.; Chen, H. Y.; Wu, M. J. *J. Org. Chem.* **2017**, *82* (12), 6071–6081.
- (65) Aurelio, L.; Volpe, R.; Halim, R.; Scammells, P. J.; Flynn, B. L. *Adv. Synth. Catal.* **2014**, *356* (9), 1974–1978.
- (66) Ikeda, A.; Omote, M.; Kusumoto, K.; Tarui, A.; Sato, K.; Ando, A. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13* (33), 8886–8892.
- (67) Carreño, M. C.; García Ruano, J. L.; Sanz, G.; Toledo, M. A.; Urbano, A. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37* (23), 4081–4084.
- (68) Mohanakrishnan, A. K.; Prakash, C.; Ramesh, N. *Tetrahedron* **2006**, *62* (14), 3242–3247.
- (69) Jacubert, M.; Provot, O.; Peyrat, J. F.; Hamze, A.; Brion, J. D.; Alami, M. *Tetrahedron* **2010**, *66* (21), 3775–3787.
- (70) Zhang, L.; Cao, T.; Jiang, H.; Zhu, S. *Angew. Chemie* **2020**, *132* (12), 4700–4707.
- (71) Brennman, J. B.; Ginn, J. D.; Sarko, C. R.; Westbrook, J.; Zhang, Z.; Yu, M.; Hopkins, T. D.; Lowe, M. D. Heterocyclic Carboxylic Acids as Activators of Soluble Guanylate Cyclase, **2016**.
- (72) Meth-Cohn, O.; Stanforth, A. P. *Compr. Org. Synth.* **1991**, *50* (1), 1.
- (73) Sreenivasulu, R.; Tej, M. B.; Jadav, S. S.; Sujitha, P.; Kumar, C. G.; Raju, R. R. *J. Mol. Struct.* **2020**, *1208*, 127875.
- (74) Auzzas, L.; Larsson, A.; Matera, R.; Baraldi, A.; Deschênes-Simard, B.; Giannini, G.; Cabri, W.; Battistuzzi, G.; Gallo, G.; Ciacci, A.; Vesce, L.; Pisano, C.; Hanessian, S. *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (23), 8387–8399.

# 7 Příloha

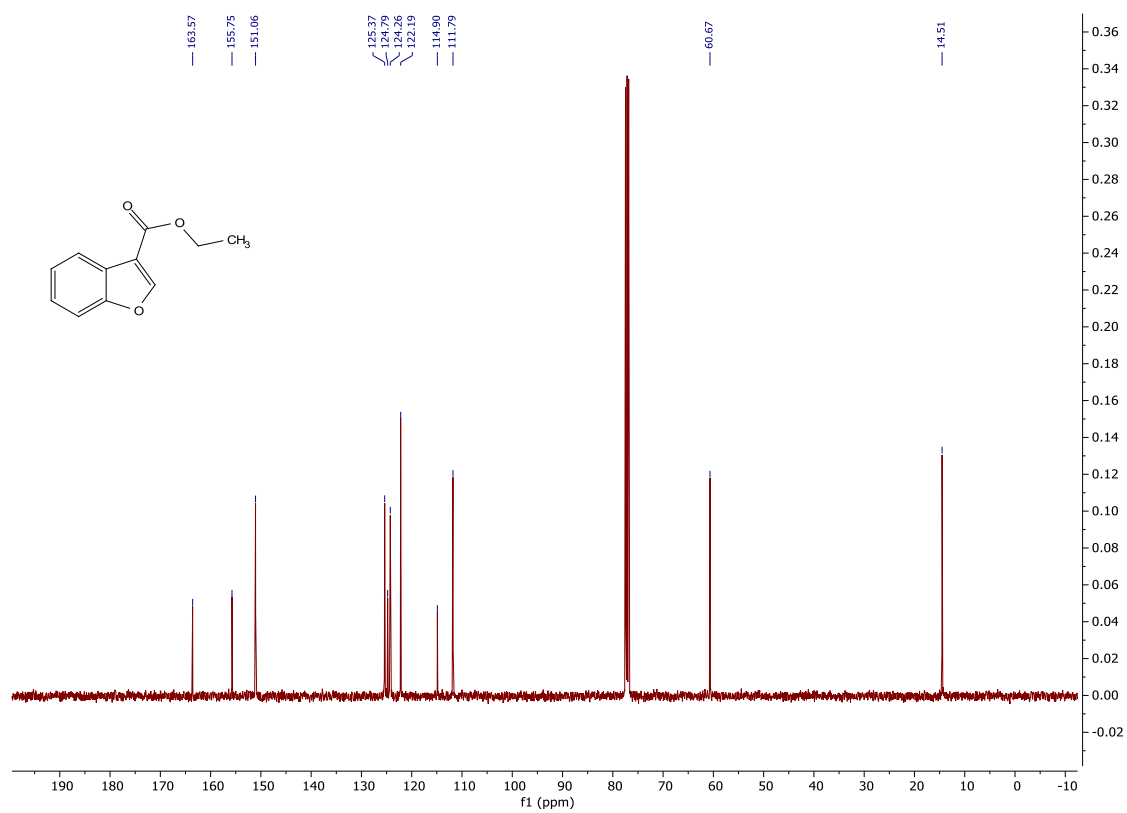
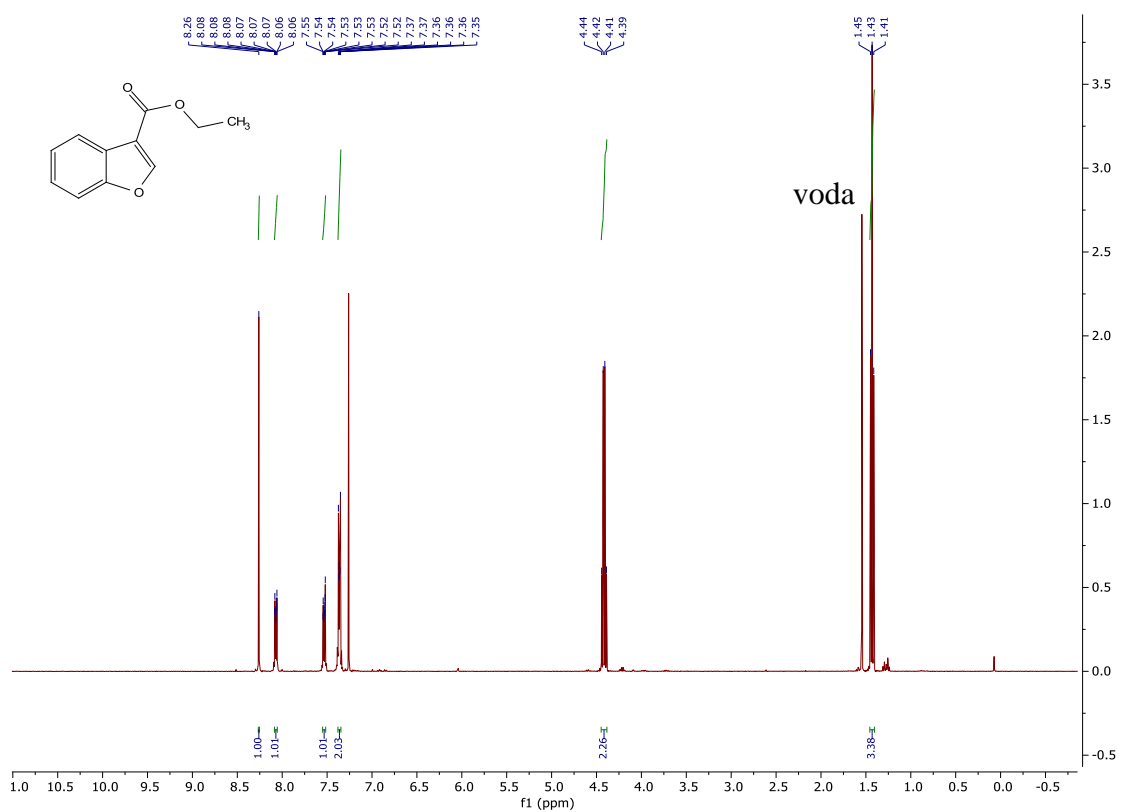
$^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR spektra 2-hydroxy-4-methoxybenzaldehydu (73b)



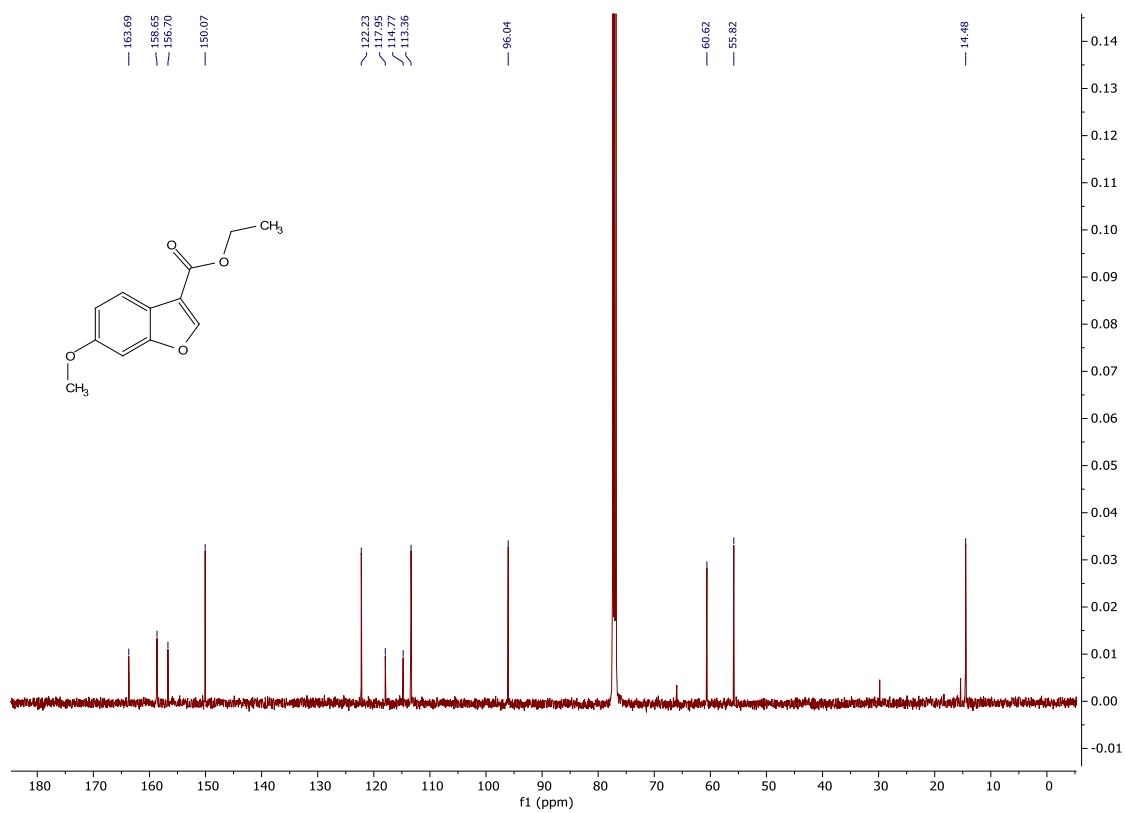
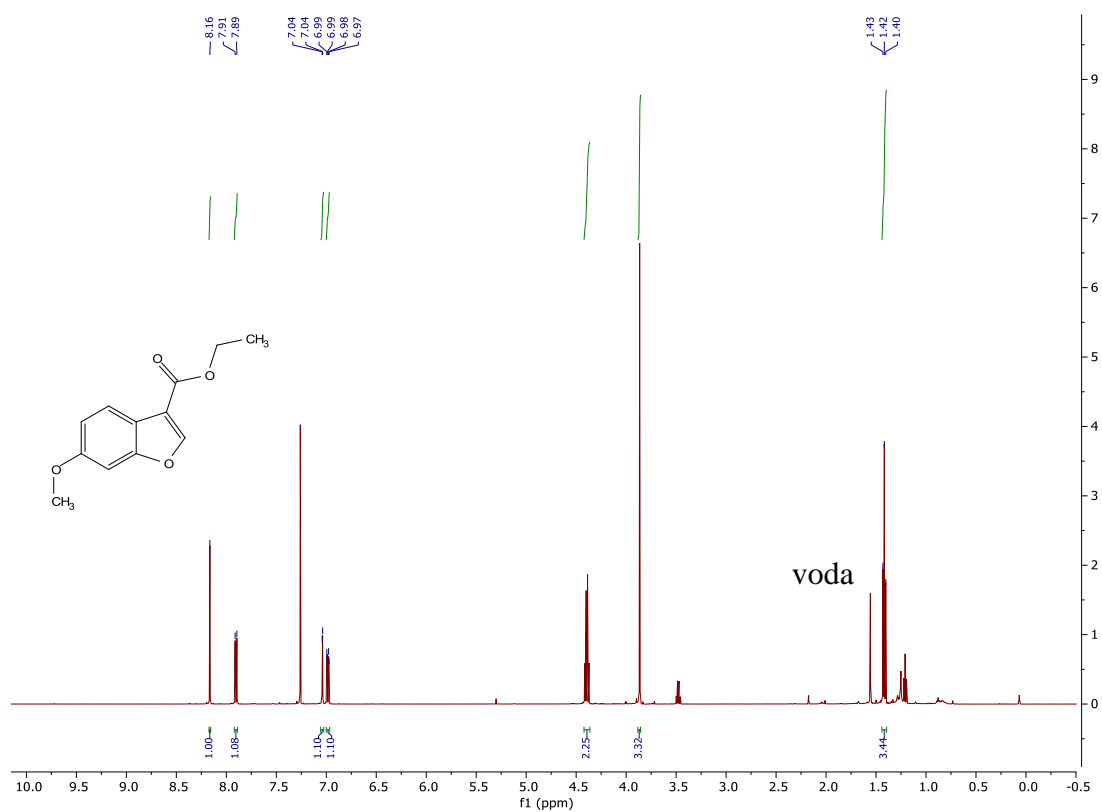
$^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR spektra 4-(allyloxy)-2-hydroxybenzaldehydu (73c)



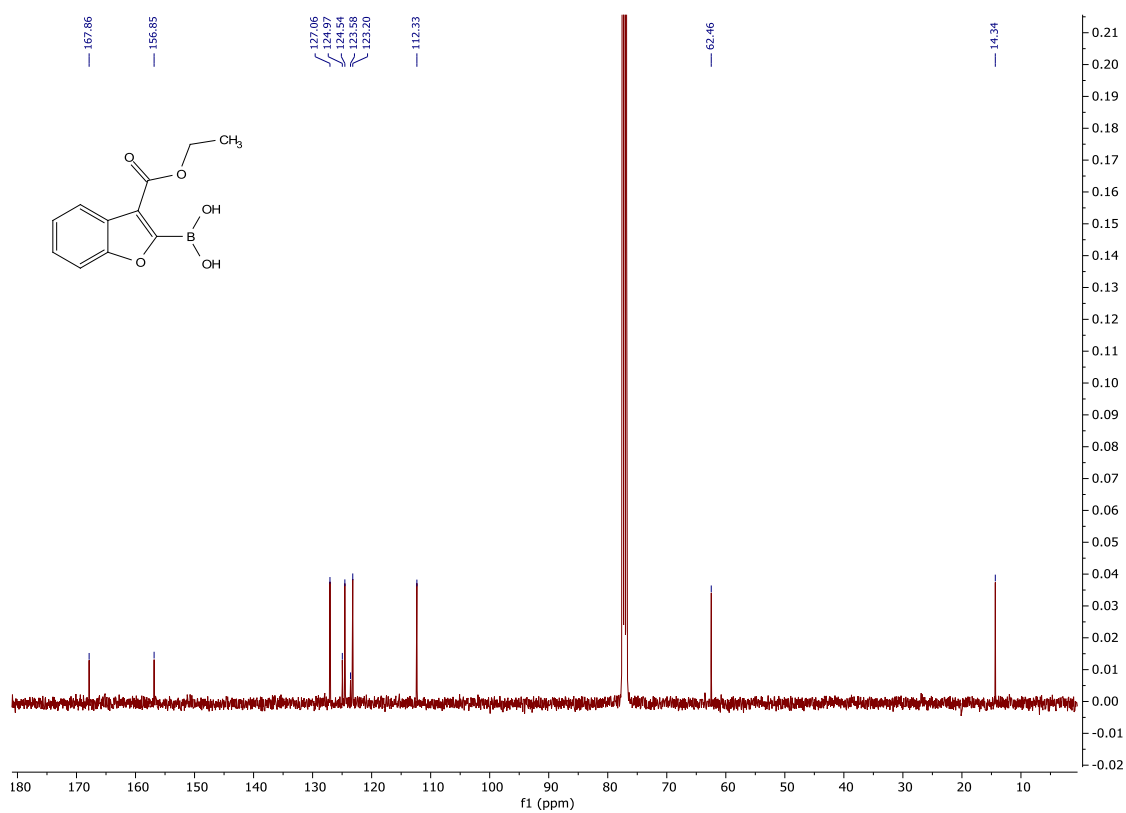
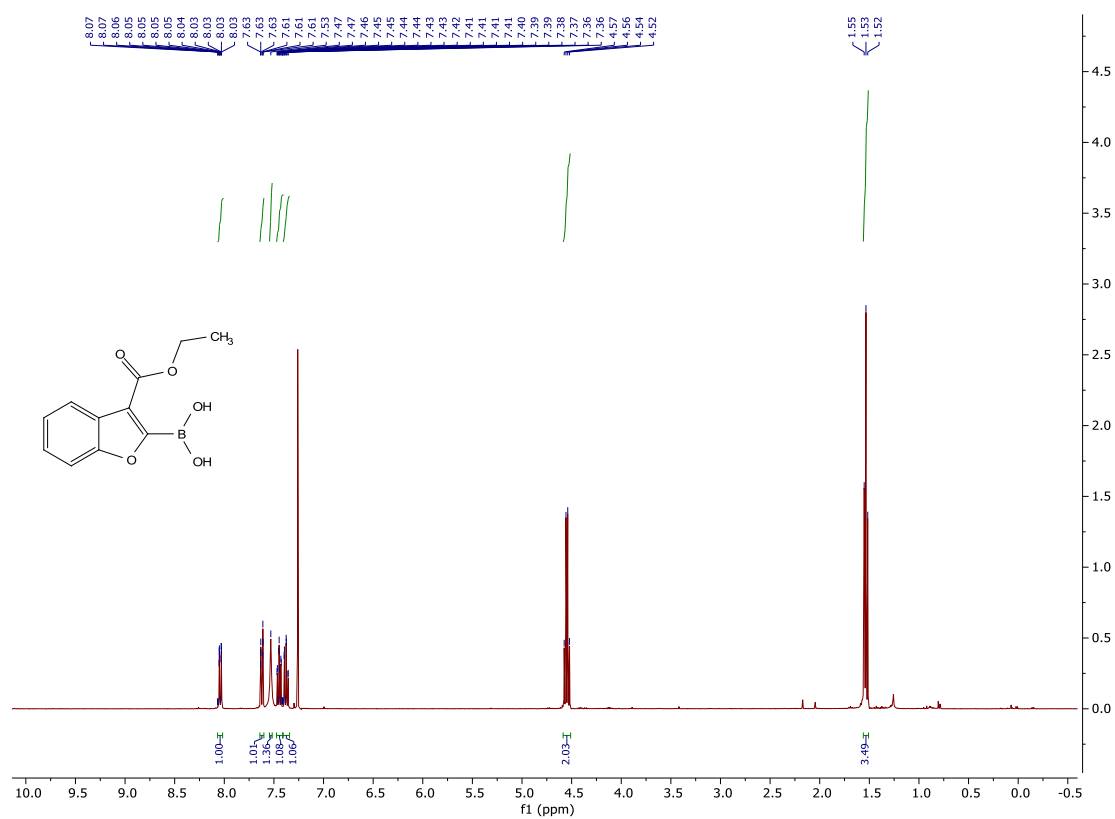
$^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR spektra ethyl benzofuran-3-karboxylátu (72a)



$^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR spektra ethyl 6-methoxybenzofuran-3-karboxylátu (72b)

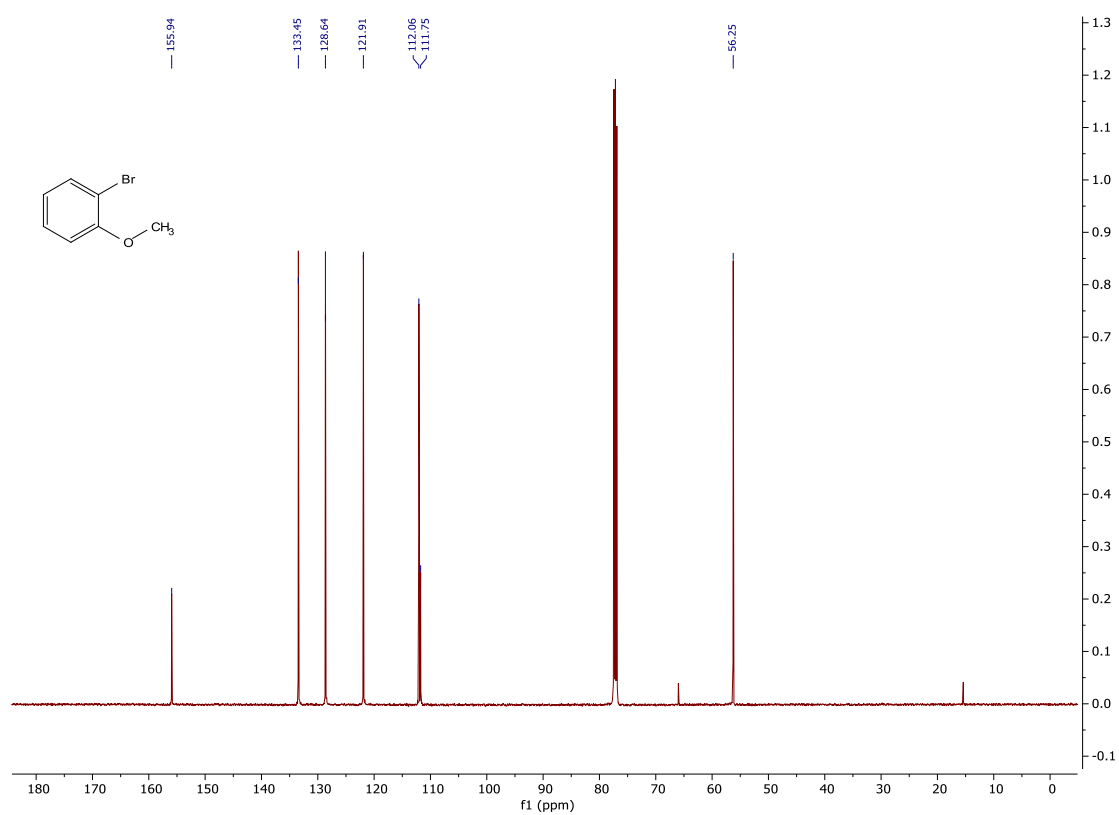
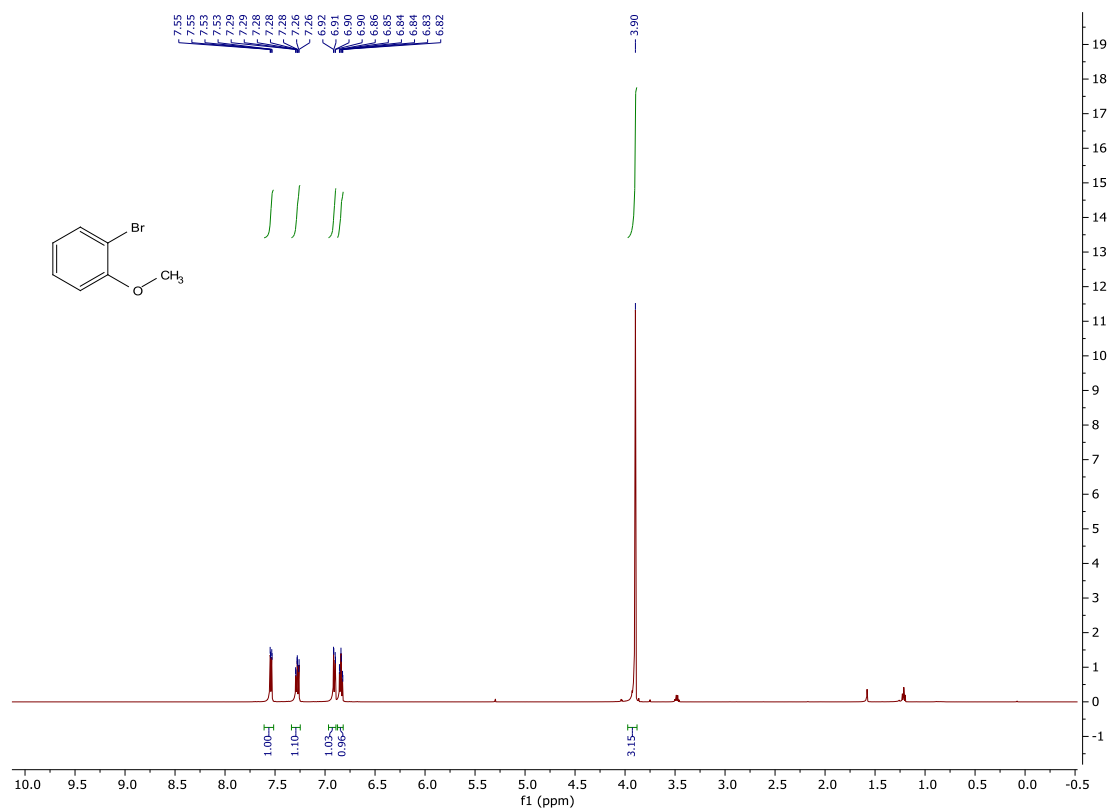


$^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR spektra (3-(ethoxykarbonyl)benzofuran-2-yl)boronové kyseliny (71a)

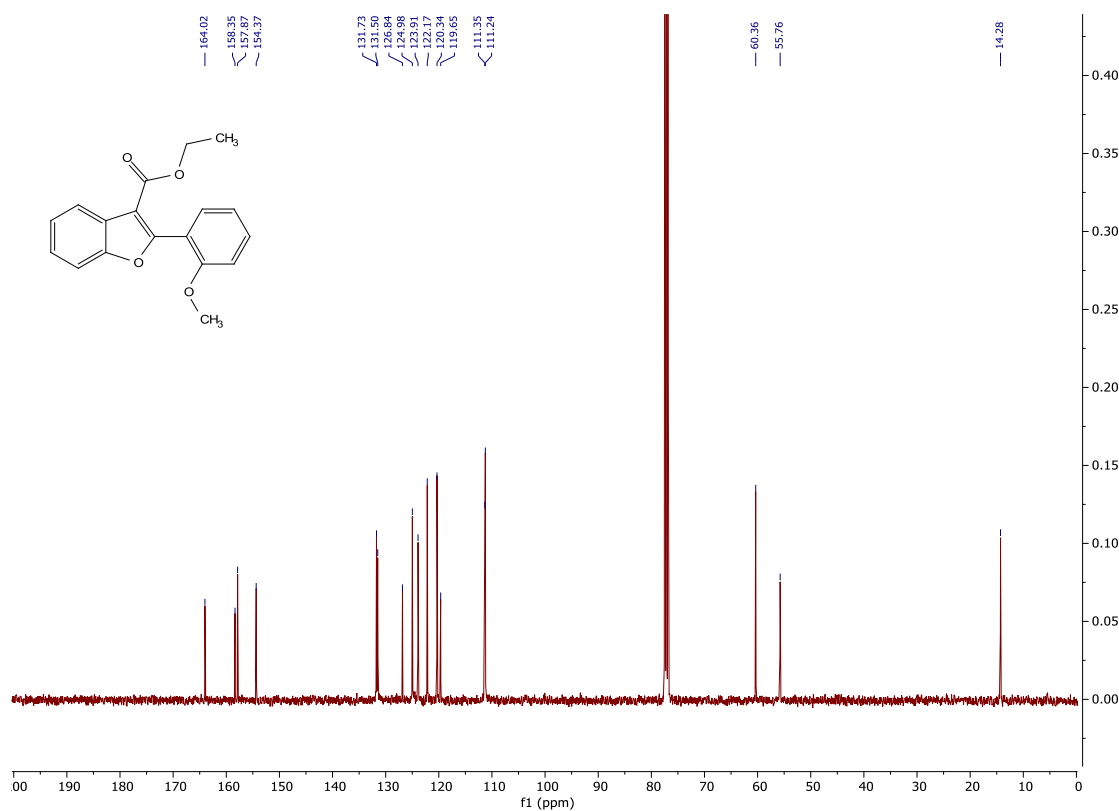
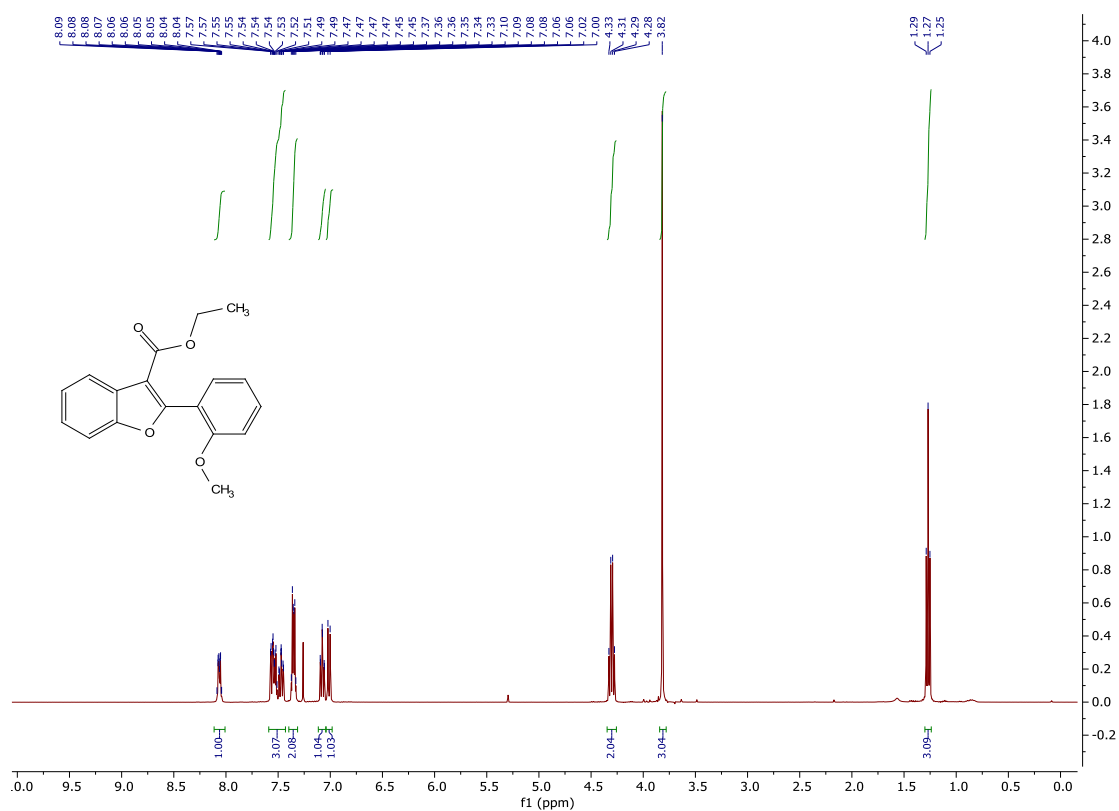




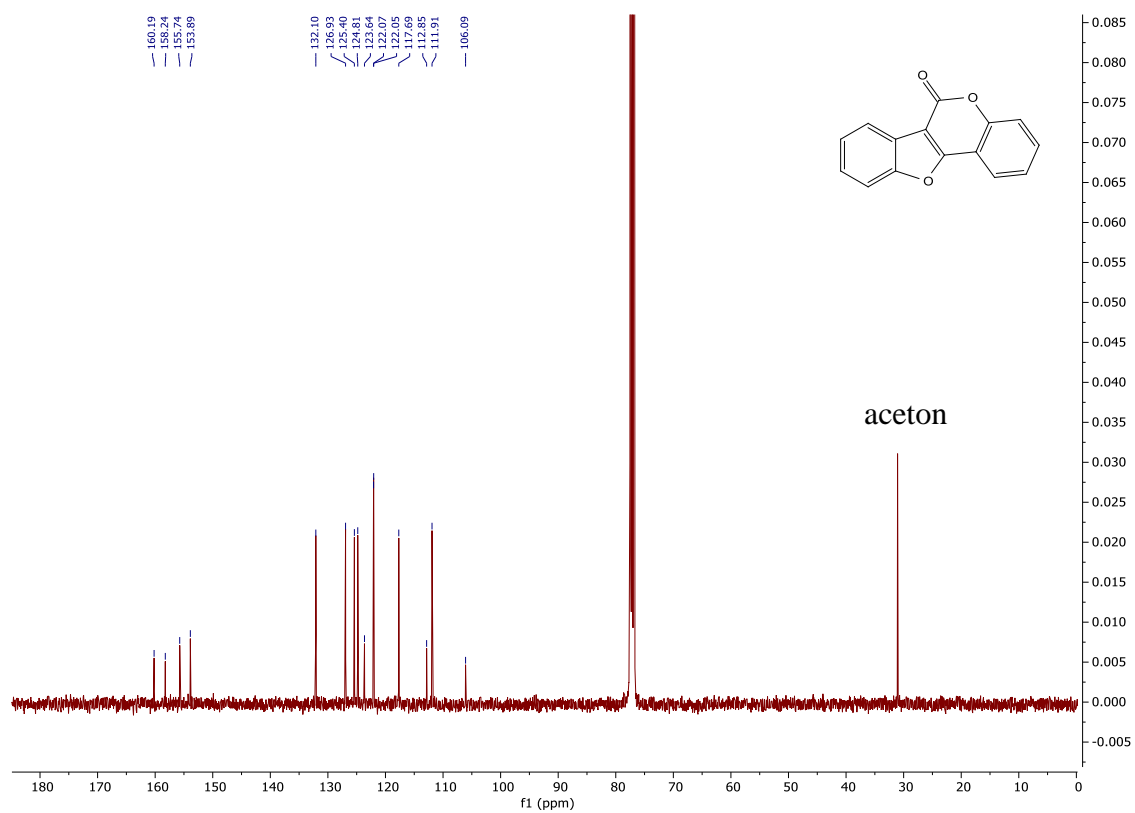
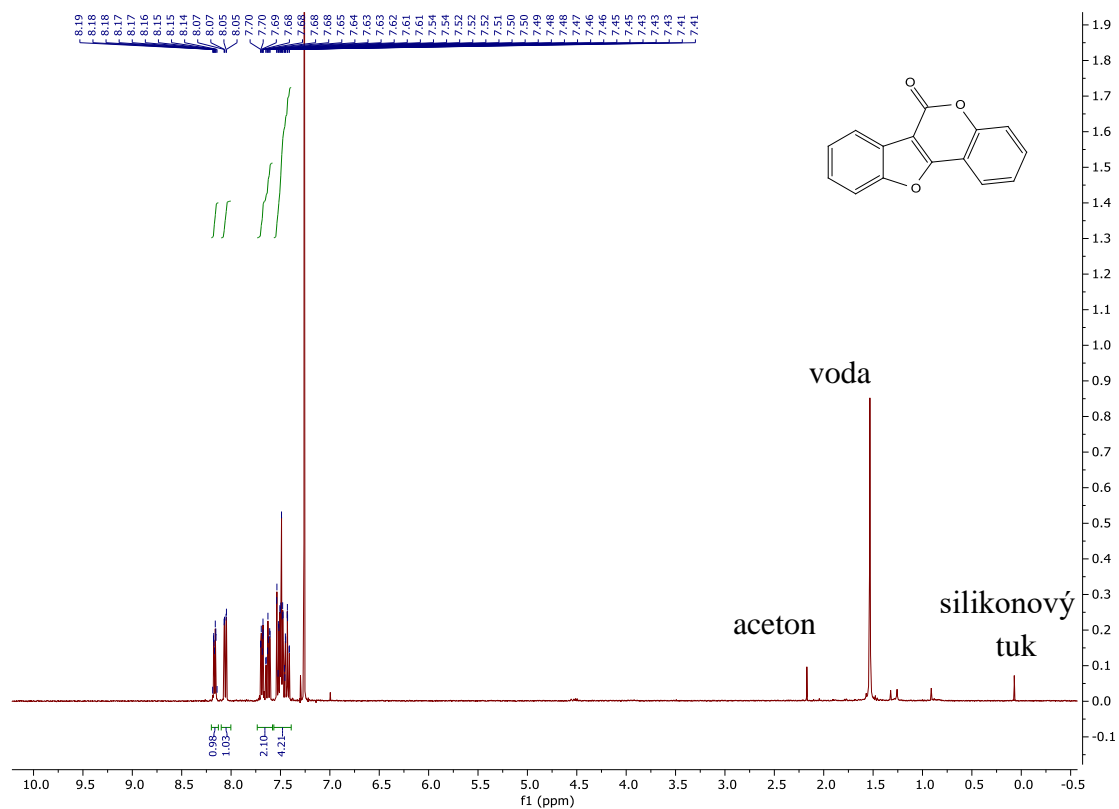
$^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR spektra 2-bromanisolu (69a)



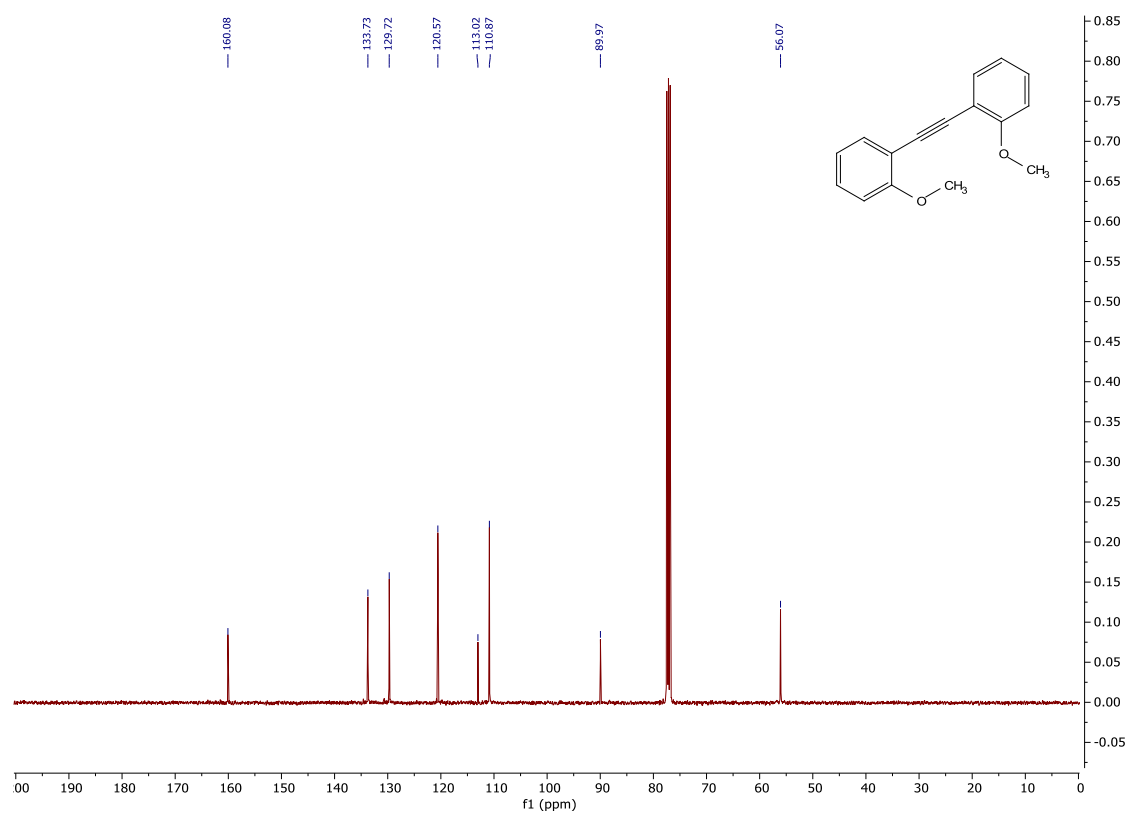
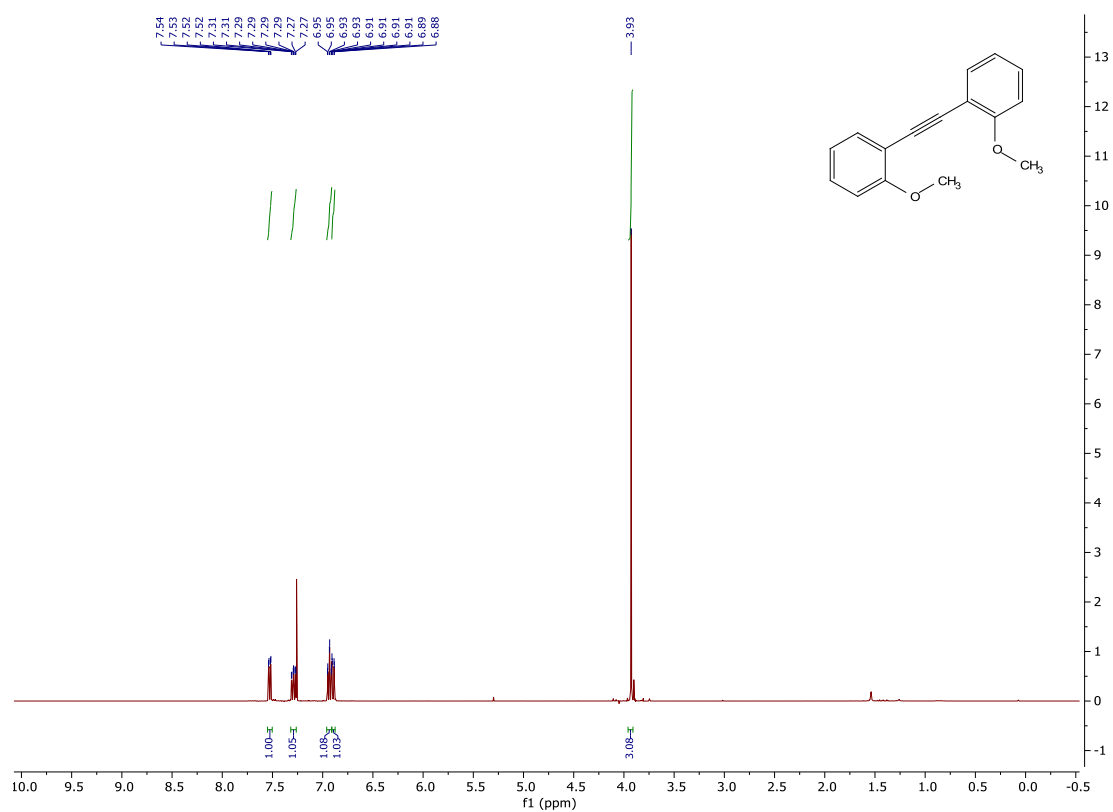
$^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR spektra ethyl 2-(2-methoxyfenyl)benzofuran-3-karboxylátu (68)



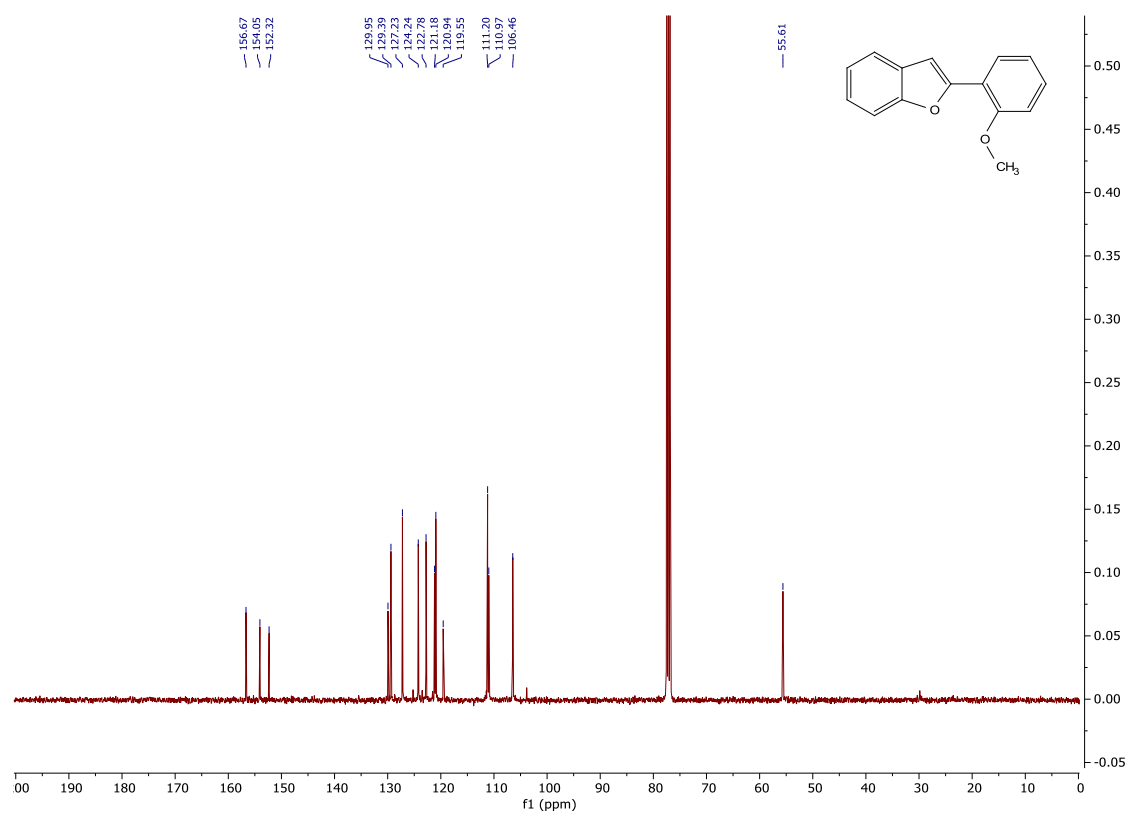
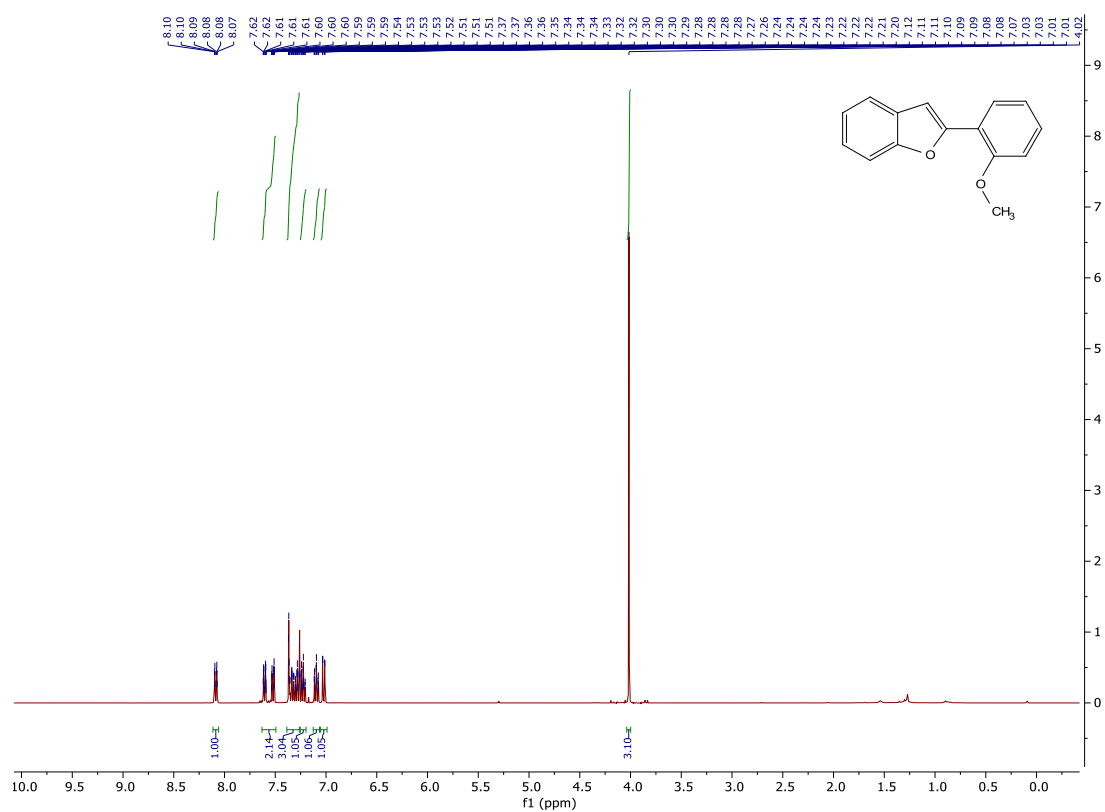
$^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR spektra coumestanu (3)



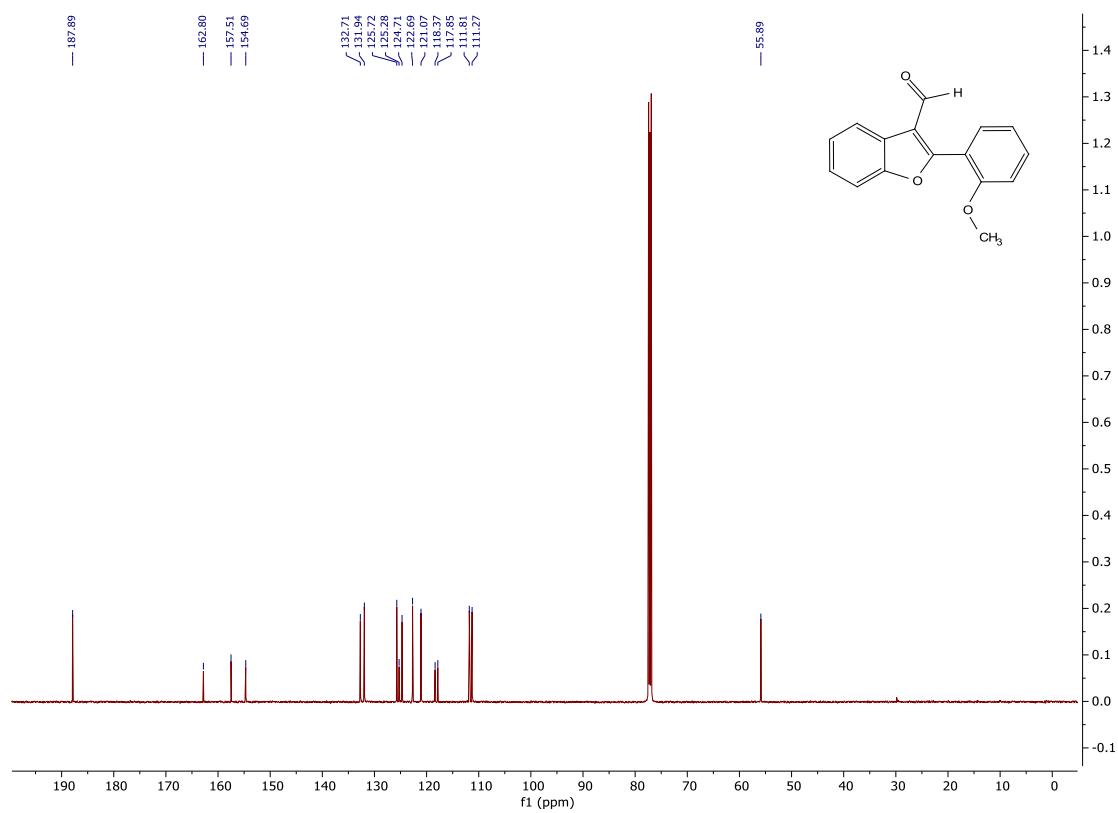
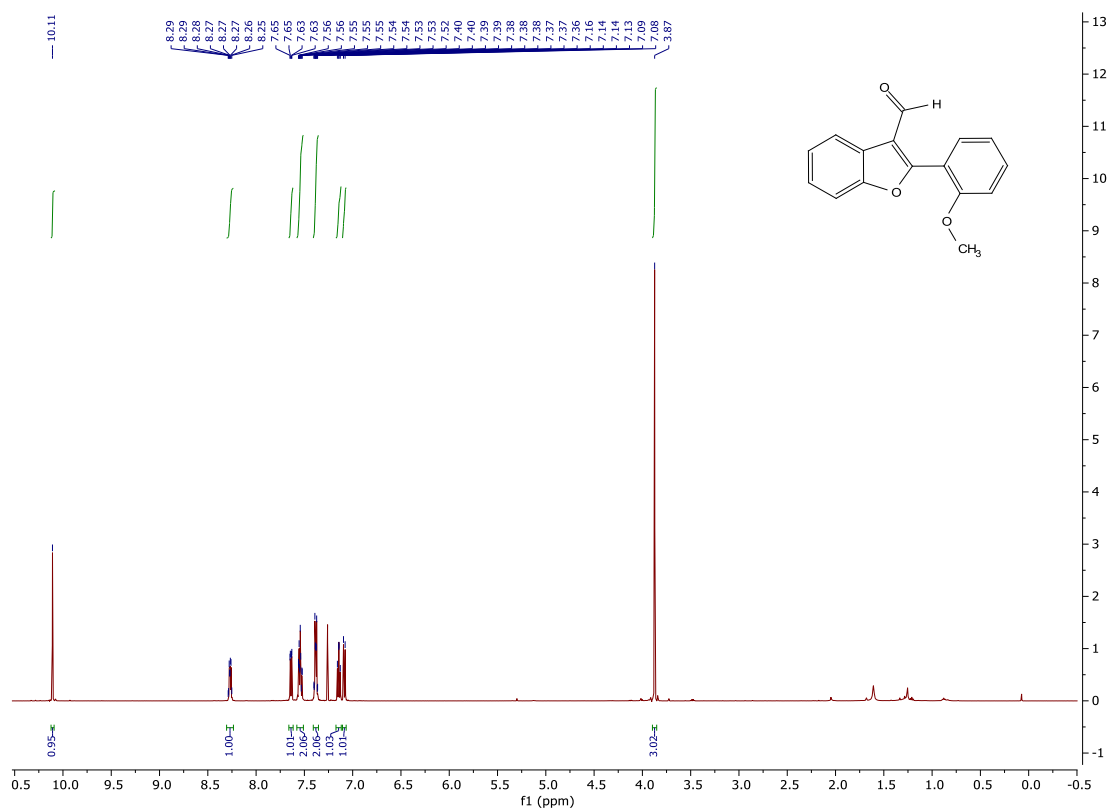
$^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR spektra 1,2-bis(2-metoksyfenyl)ethynu (84)



$^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR spektra 2-(2-metoksyfenyl)benzofuranu (83)



$^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR spektra 2-(2-metoksyfenyl)benzofuran-3-karbaldehydu (**98**)



$^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR spektra 2-(2-methoxyfenyl)benzofuran-3-karboxylové kyseliny (**102**)

