

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**  
**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**  
Katedra organické chemie



**Syntéza a biologická aktivita fenypropanoidových  
derivátů: Vývoj syntézy boehmenanu D**

Bakalářská práce

Autor:	Pavol Tuna
Studijní program:	Chemie
Studijní obor:	Bioorganická chemie a chemická biologie
Typ studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	RNDr. Jiří Pospíšil, PhD.

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl 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, 17. 5. 2019

.....

Pavol Tuna

**Poděkování**

Rád bych také poděkoval Interní Grantové Agentuře Univerzity Palackého v Olomouci (grant IGA\_PrF\_2019\_027) za finanční podporu mého výzkumu.

## **Bibliografická identifikace:**

Jméno a příjmení autora:	Pavol Tuna
Název práce:	Syntéza a biologická aktivita fenylypropanoidových derivátů: Vývoj syntézy boehmenanu D
Typ práce:	Bakalářská práce
Pracoviště:	Katedra organické chemie
Školitel:	RNDr. Jiří Pospíšil, PhD.
Rok obhajoby práce:	2019

**Abstrakt:** Cílem mojí bakalářské práce bylo shrnout možnosti a způsoby využití informací z tradičních způsobů léčby, při vývoji nových léčiv. Zároveň jsem se zaměřil na vývoj syntetické metody, pomocí které by bylo možné syntetizovat boehmenan D. V jednotlivých reakčních krocích jsem se snažil nalézt podmínky, za kterých by reakce probíhaly ve vysokých výtěžcích a byly by univerzálně použitelné. Zejména jsem se zaměřil na syntézu benzofuranového skeletu pomocí CDC couplingu a na zjištění podmínek, za kterých reakce probíhá optimálně.

Klíčová slova:	neolignany, sekundární metabolity, radikálový coupling, fenylypropanoidy, přírodní látky, syntéza
Počet stran:	59
Počet stran příloh:	7
Počet příloh:	1
Jazyk:	Český

**Bibliographical identification:**

Author's first name and surname: Pavol Tuna

Title: Synthesis and biological activity of phenylpropanoid derivatives: Towards the boehmenan D synthesis

Type of thesis: Bachelor thesis

Department: Department of Organic Chemistry

Advisor: RNDr. Jiří Pospíšil, PhD.

The year of presentation: 2019

Abstract: Aim of my bachelor thesis is to summarize possibilities and approaches how the traditional herb-based way of healing can impact the drug development processes. At the same time, I have focused on the development of new synthetic approaches that could lead to boehmenan D synthesis. The reaction sequences in the developed methods were optimized in regards of yields and general applicability. Particularly I have focused on the key benzofuran-key building block synthesis. This intermediate should have been accessed with help of CDC-coupling reaction.

Keywords: neolignans, secondary metabolites, radical coupling, phenylpropanoids, natural compounds, synthesis

Number of pages: 59

Number of appendix pages: 7

Number of appendixes: 1

Language: Czech

## Seznam použitých zkratek

AcNa	<i>octan sodný</i>
CDC	<i>cross-dehydrogenativní coupling</i>
CDRI	<i>Central drug research institute</i>
DCC	<i>dicyklohexyl karbodiimid</i>
DCE	<i>1,2-dichlorethan</i>
DCM, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	<i>dichlormethan</i>
DIBAL-H	<i>di-isobutylaluminium hydrid</i>
DMF	<i>dimethyl formamid</i>
DMP	<i>Dess-Martin perjodnan</i>
DTBP	<i>Di-tertbutyl peroxid</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
EtOAc	<i>ethyl acetát</i>
In(OTf) <sub>3</sub>	<i>indium triflát</i>
iPr <sub>2</sub> EtN, DIPEA	<i>di-isopropylethyl amin</i>
LiHMDS	<i>lithium hexamethyldisilazan</i>
MeLi	<i>methyl lithium</i>
MeOH	<i>methanol</i>
MOM	<i>methoxymethyl</i>
MOM-Cl	<i>methoxymethyl chlorid</i>
NAPRALERT	<i>NAtural PProduct alert</i>
NCI	<i>National cancer institute</i>
NHPI	<i>N-hydroxyftalimid</i>
NMR	<i>nukleární magnetická rezonance</i>
NSCLC	<i>non-small cell lung cancer</i>

NuBBE DB	<i>Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais</i>
PCC	<i>pyridinium chlorochromát</i>
PPTS	<i>pyridinium-p-toluensulfonát</i>
PTP1B	<i>tyrosin fosfatasa 1B</i>
RVO	<i>rotační vakuová odparka</i>
TBATB	<i>tetrabutylamonium tribromid</i>
TBDMSCl	<i>tert-butyl dimethylsilyl chlorid</i>
TBDMSOTf	<i>tert-butyl dimethylsilyl triflát</i>
TBS, TBDMS	<i>tert-butyl dimethylsilyl</i>
2-TBSOethyl-SO <sub>2</sub> BT	<i>2-(tert-butyl dimethylsilyl)ethyl sulfobenzthiazol</i>
TFA	<i>kyselina trifluoroctová</i>
THF	<i>tetrahydrofuran</i>
TLC	<i>tenkovrstevná chromatografie</i>

## Obsah

1	Úvod.....	11
1.1	Cíle práce.....	12
2	Teoretická část.....	13
2.1	Tradiční medicína jako zdroj inspirace při vývoji nového léčiva .....	13
2.1.1	Reverzní farmakologie.....	15
2.2	Způsoby výběru rostlin vhodných k biologickému testování .....	16
2.2.1	Náhodný výběr rostlin.....	17
2.2.2	Ethnobotanický výběr rostlin .....	18
2.2.3	Výběr na základě chemotaxonomie .....	19
2.2.4	Výběr na základě ekologických vztahů v přírodě .....	20
2.3	Mezinárodní databáze léčivých přírodních látek.....	23
2.4	Léčiva, k jejichž objevu přispěla ethnomedicína.....	24
2.4.1	Artemisinin.....	24
2.4.2	Metformin.....	25
2.4.3	Khelin.....	26
2.4.4	Pilokarpin .....	27
2.5	Boehmenany–výskyt v přírodě a jejich biologická aktivita .....	28
2.6	Návrh syntézy boehmenanu D.....	30
2.6.1	Syntetický plán .....	31
3	Výsledky a diskuze .....	34
3.1	Příprava chráněného vanilinu pro CDC coupling.....	35
3.1.1	Příprava produktu 17a.....	36
3.1.2	Příprava produktu 17c.....	37
3.1.3	Příprava produktu 17d.....	38
3.2	Příprava $\beta$ -ketoesteru 19 pro CDC coupling .....	40
3.2.1	Příprava produktu 18a.....	40



3.2.2	Příprava produktu 18b.....	41
3.2.3	Příprava produktu 18c.....	41
3.2.4	Příprava $\beta$ -ketoesteru 19 .....	42
3.3	CDC coupling .....	44
4	Experimentální část.....	48
4.1	Obecné informace .....	48
4.2	TLC vizualizační roztoky.....	49
4.3	Reakční cesta k ochráněnému vanilinu 17d .....	49
4.3.1	4-(hydroxymethyl)-2-methoxyfenol (17e) .....	49
4.3.2	4-((tert-butyldimethylsilyl)oxy)-2-methoxyphenol (17d).....	50
4.4	Reakční cesta k $\beta$ -ketoesteru 19 .....	50
4.4.1	MOM chlorid (23) .....	50
4.4.2	3,5-dimethoxy-4-(methoxymethoxy)benzaldehyd (18a) .....	51
4.4.3	1-(3,5-dimethoxy-4-(methoxymethoxy)phenyl)ethan-1-ol (18b) .....	51
4.4.4	1-(3,5-dimethoxy-4-(methoxymethoxy)phenyl)ethan-1-on (18c).....	52
4.4.5	methyl-3-(3,5-dimethoxy-4-(methoxymethoxy)phenyl)-3-oxopropanoát (19a) .....	53
4.5	Syntéza benzo-furanu 31b .....	54
5	Závěr .....	55
6	Seznam použité literatury.....	56
7	Přílohy .....	60
7.1	$^1\text{H}$ NMR a $^{13}\text{C}$ NMR spektra látky 17d.....	60
7.2	$^1\text{H}$ NMR a $^{13}\text{C}$ NMR spektra látky 17e.....	61
7.3	$^1\text{H}$ NMR a $^{13}\text{C}$ NMR spektra látky 18a .....	62
7.4	$^1\text{H}$ NMR a $^{13}\text{C}$ NMR spektra látky 18b.....	63
7.5	$^1\text{H}$ NMR a $^{13}\text{C}$ NMR spektra látky 18c.....	64
7.6	$^1\text{H}$ NMR a $^{13}\text{C}$ NMR spektra látky 19 .....	65

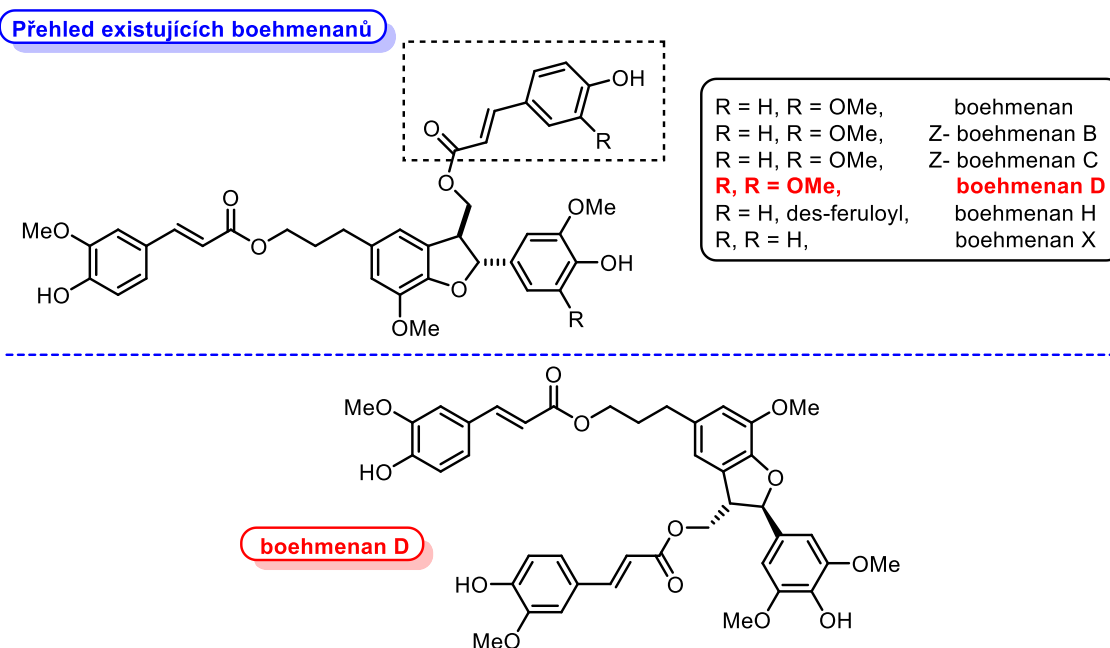
7.7	$^1\text{H}$ NMR a $^{13}\text{C}$ NMR spektra látky 31b.....	66
-----	---	----

## 1 Úvod

Léčivé rostliny jsou pro své účinky využívány již od nepaměti. Mnohá etnika si vytvořila své vlastní, propracované způsoby léčení, které se poté předávali jako dědictví dalším generacím. Lidé se postupně učili, jak která rostlina působí a v jakých situacích může být nápomocna. Tímto způsobem vznikali různé léčivé lektvary, odvary, mastičky, či elixíry. Ty byly často kombinací čerstvých i sušených rostlin s dalšími látkami, které buď zlepšovali výslednou konzistenci, anebo se věřilo, že také napomáhají léčebnému účinku. Připravenými lektvary následně léčili, ať už úspěšně, nebo neúspěšně po mnoho staletí celé generace našich předků. Tato léčba byla z velké míry založena na víře v uzdravení a nikdo příliš nezjišťoval, zda použitý elixír opravdu působí. Postupem času však lidé začali k léčení přistupovat více exaktně. Ukázalo se, že některé původně používané rostliny mají opravdu „léčivou moc“, která není založena pouze „na placebo efektu“. Typickým příkladem může být například extrakt z kůry vrby bílé (*Salix alba*). Ten byl používán již ve starém Egyptě a ve svých spisech jej zmiňuje také Hippokrates ke snižování horečky. Ke konci 19. století, kdy se vědecké kapacity začaly o složení tohoto extraktu více zajímat, vyšlo najevo, že látkou zodpovědnou za daný účinek je kyselina salicylová, která je obsažená v mladých větvičkách a kůře. Od tohoto objevu byl už jen krok k objevu Aspirinu, acetylované formy kyseliny salicylové, který se pro stejný účel (snížení horečky) používá od středověku až dodnes. S tímto objevem, který v podstatě odstartoval novodobý vývoj léčiv, trvá odkaz vlivu této látky na lidskou společnost až do dnešní doby. V naší výzkumné skupině jsme si tohoto odkazu vědomi a dále se zabýváme studiem rostlinných látek s různorodou biologickou aktivitou. Mezi ně patří také boehmenany. Ty byly původně nalezeny v extraktu z ibišku konopovitého (*Hibiscus cannabinus*) a řadí se mezi sekundární metabolity fenylypropanoidového typu. Tento druh ibišku se tradičně používal k hojení ran, proti parazitům a také při nádorovém bujení, které bylo s jeho pomocí potlačováno. Tato skutečnost nás vedla k tomu, že jsme se rozhodli vyvinout jednoduchou a schůdnou syntetickou cestu k těmto druhům látek. Zároveň máme v plánu následně otestovat jejich protirakovinné působení, které nebylo nikdy testováno u takovýchto látek syntetického původu. Rádi bychom tedy připravily boehmenany a jejich deriváty, tedy látky, které by měli lepší, nebo alespoň srovnatelné cytostatické působení jako původní ibiškový extrakt a zároveň by byly lépe tolerovány zdravými buňkami.

## 1.1 Cíle práce

Cílem této bakalářské práce je tedy pomyslně "umést cestičku" k boehmenanu D – vybranému zástupci přírodních látek souhrnně nazvaných boehmenany (Obrázek 1). Tento boehmenan se od ostatních látek tohoto typu liší tetrasubstituovaným, vysoce elektronově bohatým aromatickým kruhem v pozici 2 benzofuranového cyklu. V této práci se tedy budu soustředit na vývoj nového přístupu syntézy k této látce se zaměřením na syntézu jeho centrálního benzofuranového cyklu.



Obrázek 1: Souhrnný přehled boehmenanů s vyznačeným cílovým boehmenanem D.

## 2 Teoretická část

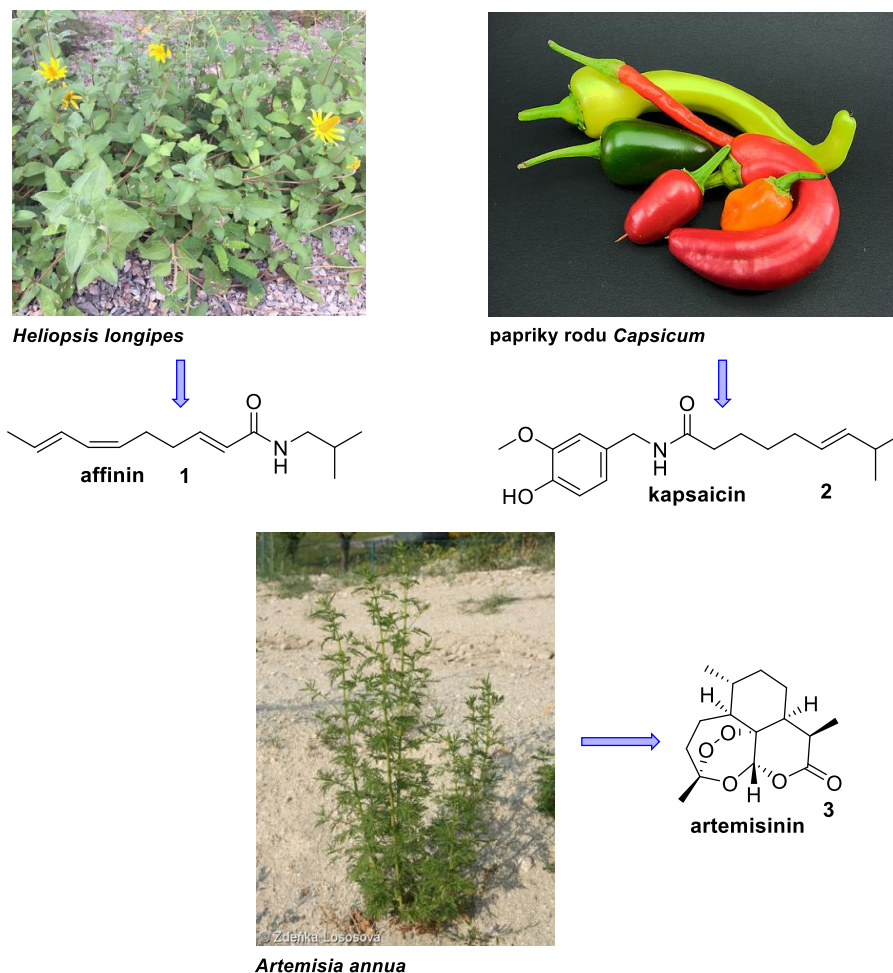
### 2.1 Tradiční medicína jako zdroj inspirace při vývoji nového léčiva

Rostliny, organismy i minerály hrají od pradávna v lidském životě nezastupitelnou roli. Už první lidé se pokoušeli s jejich pomocí léčit, či zmírňovat příznaky nemocí. Získané informace, často metodou pokus-omyl, byly následně předávány z pokolení na pokolení. Tímto dali vzniknout v mnoha kulturách systémům léčení založených na využití extraktů rostlin jako léčiv. První zmínky o takovémto využití rostlin, resp. jejich extraktů, se podle archeologických nálezů datují do doby středního paleolitu (60 000 let př.n.l.).<sup>1</sup>

Z pohledu medicínské vědy je využití rostlin či metod „tradiční medicíny“ značně omezené, protože není obecně podloženo rigorózními klinickými studiemi. Na druhou stranu jsou metody tradičních způsobů léčení ověřené dlouhou historií jejich používání. I přestože nejsou účinky těchto receptur a extraktů vědecky podloženy (metabolom rostlin se samozřejmě mění v závislosti na klimatu či ročním období), jejich benefiční působení však lze využít jako inspiraci pro hledání nových „leading sloučenin“ při vývoji léčiv. A musíme přiznat, že je kde se inspirovat.<sup>2</sup>

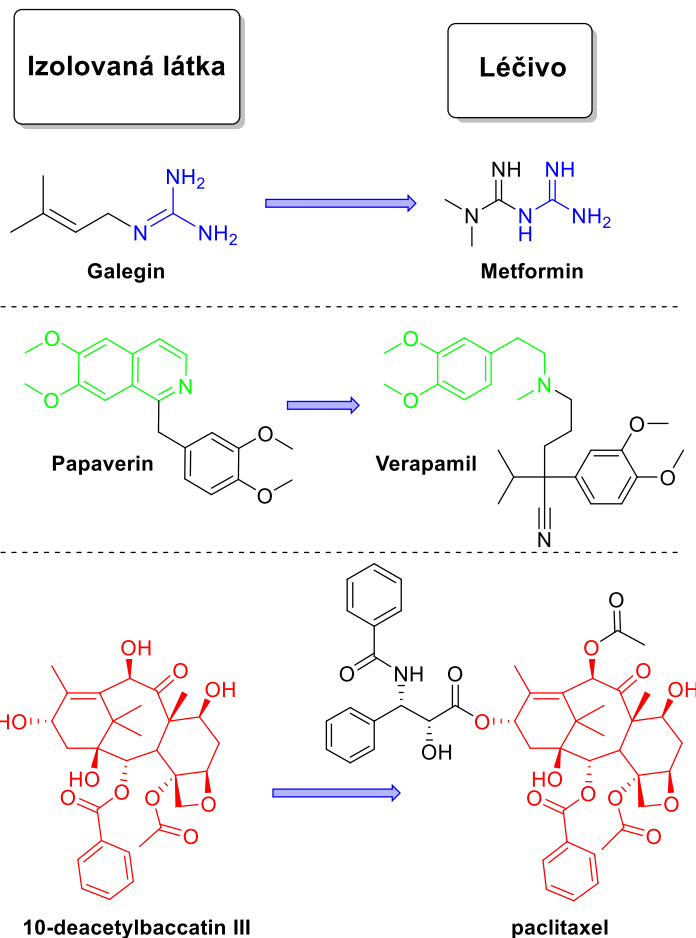
Na Zemi je známo více než 250 000 druhů vyšších rostlin. Z tohoto množství se pro své příznivé účinky na lidský organizmus dostalo do hledáčku vědců a farmaceutických společností okolo 6%. V tradiční lidové medicíně se ale pro svůj pozitivní účinek využívá mnoho dalších zatím neprozkoumaných rostlin. Čerpáním z této studnice možností mohou vědci ověřit, zda tyto látky využívané po dlouhá staletí, mají opravdu nějaké účinky. Výhodou je, že využití rostlin, resp. léčiv z nich připravených, nám již dopředu předurčuje možné cíle využití látek obsažených v těchto rostlinných extraktech. V případě úspěchu tak lze velmi snížit náklady a čas vynaložený na vývoj aktivní substance. Jako typický příklad tohoto postupu se nabízí spilanthol.<sup>1</sup> Tato látka se užívá jako analgetikum, či lokální anestetikum. Nachází se, spolu s dalšími produkovánými *N*-alkylamidy v kořenech *Heliopsis longipes* (Obrázek 2). V Mexiku byla tradičně užívána při léčbě bolesti zubů, ale také jako koření. Pečlivou analýzou extraktů těchto kořenů se ukázalo, že aktivní látkou je affinin (**1**). Látka **1** byla následně připravena a potvrzena pomocí organické syntézy.<sup>1,3</sup> Podobných příkladů samozřejmě existuje mnoho. Připomeneme např. artemisinin (**3**), silné antimalarikum, které bylo původně

získáno extrakcí listů *Artemisia annua* (Obrázek 2) studenou vodou.<sup>4</sup> Dále můžeme vzpomenout kapsaicin (2), vyskytující se jako sekundární metabolit v některých druzích papriček rodu *Capsicum* (Obrázek 2), který nalezl široké využití při léčbě chronických bolestí.<sup>5</sup>



Obrázek 2 Zástupci rostlin a z nich izolované účinné látky<sup>6,7,8</sup>

Obecně lze říci, že účinné látky obsažené v rostlinách se uplatňují spíše v roli „leading sloučenin“. Tyto látky, sice mají požadované vlastnosti, např. afinitu k cílovým receptorům, účinek na požadované molekulární cíle atp., ale zároveň nejsou pro tyto cíle specifické a často působí i na dalších vazebných místech. Z toho důvodu mají mnoho nežádoucích účinků (jsou např. toxické, špatně se vstřebávají do organismu, nemají dostatečnou účinnost). V této chvíli přichází ke slovu medicínští chemici, kteří se snaží upravit strukturu molekuly tak, aby působila bez těchto nežádoucích efektů. V případě úspěchu pak získáme nové léčivo. Léčiva, u nichž bylo využito tohoto přístupu při jejich vývoji, jsou například Metformin, Verapamil, či Paclitaxel (Obrázek 3).<sup>1,9</sup>



Obrázek 3 Strukturální podobnost přírodních látek a léčiv, které z nich byly syntetizovány

Existuje statistika, ve které je zkoumán původ aktivních látek ve schválených léčích. V ní se uvádí, že 54 % aktivních látek v nově certifikovaných léčivech mezi lety 1981-2010 mělo přírodní původ, či bylo inspirováno přírodní látkou. Z toho největší podíl zastupovaly látky (22 %), které byly připraveny semisynteticky ze strukturálního základu, který byl získán z přírodních zdrojů.<sup>10</sup>

### 2.1.1 Reverzní farmakologie

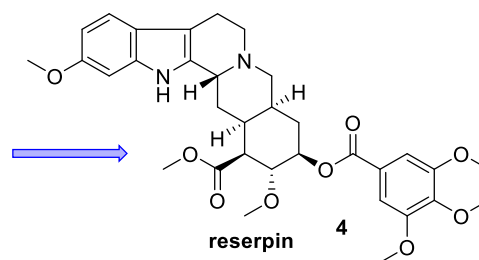
Pojem „reverzní farmakologie“ má v odborné literatuře dva vzájemně odlišné významy. V prvním z nich se používá k označení procesu vývoje léčiva, při kterém se nejdříve zjišťuje molekulární cíl, na který má léčivo působit. Na základě této znalosti se poté hledají ligandy, které by mohli s tímto cílem interagovat. Otestováním velkého počtu ligandů lze takto dojít až k novému léčivu. Postupuje se tedy ve směru od znalosti cíle, na který má léčivo působit, až ke struktuře vlastního léčiva. Oproti standardnímu postupu, při kterém se testují známé struktury na svoji aktivitu vůči nějakému cíli, je tento postup opačný.<sup>11</sup>

V druhém významu označuje pojem „reverzní farmakologie“ postup vývoje léčiva, při kterém se vychází z poznatků tradiční medicíny. Tento koncept byl s oblibou využíván v Indii a Číně k objevům nových aktivních látek, které byly součástí rostlin tradičně používaných v Ayurvedě a tradiční čínské medicíně. Cesta výzkumu však nejde od molekulárního cíle, ale klasicky, od aktivní látky, která je testována vůči určitému cíli. Vychází se však z poznatků, které jsou založeny na po staletí akumulované znalosti aktivity jednotlivých extraktů na jednotlivé cíle. Tím se zvyšuje pravděpodobnost, že izolovaná látka bude efektivní a bezpečná a zároveň se zkrátí čas a finanční náklady na její vývoj. Zároveň tento přístup umožňuje modifikaci izolované struktury s cílem zlepšit její farmakologické vlastnosti. V tomto pojetí lze říci, že oproti „klasickému“ se také jedná o postup „opačný“. Postupuje se totiž z dávné „klinické praxe“ k výzkumu účinku pomocí novodobých laboratorních metod.<sup>12</sup>

Tímto způsobem byly využity například antihypertenzivní a sedativní účinky extraktu z rostliny druhu *Rauwolfia serpentina* (Obrázek 4). Metodami reverzní farmakologie bylo zjištěno, že je za ně zodpovědná v kořenech obsažená látka reserpin (4). Dalším intenzivním testováním tohoto extraktu bylo zjištěno, že jiné látky v něm obsažené jsou po chemické modifikaci schopny pomáhat při depresích, či gynekomastii (benigní zduření mužských prsních žláz). Tento výzkum s úspěchem skončil nalezením nových druhů antidepresiv a prolaktin-redukujících léčiv.<sup>13</sup>



*Rauwolfia serpentina*



Obrázek 4 *Rauwolfia serpentina* a z ní izolovaná látka reserpin<sup>14</sup>

## 2.2 Způsoby výběru rostlin vhodných k biologickému testování

Důkladný výběr rostlin, které budou následně podrobeny testování na biologickou aktivitu, je klíčem k nalezení nových aktivních látek. Existuje mnoho metod, které popisují, jak tento výběr efektivně provádět. V následujících odstavcích bude o těch nejdůležitějších z nich pojednáno detailněji.



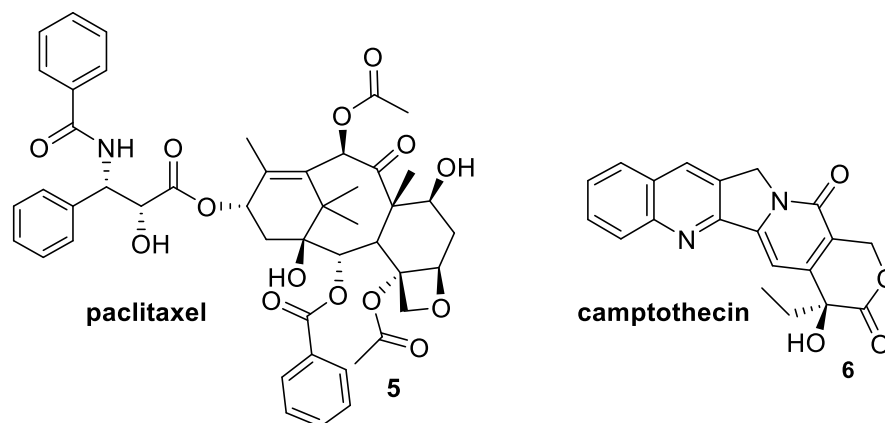
### 2.2.1 Náhodný výběr rostlin

V tomto případě se testují celé skupiny rostlin, jedna po druhé, na jejich potencionální biologickou aktivitu, či obsah účinných látek. Výběr konkrétních zástupců pro testování je tudíž velmi jednoduchý. Bere se celý soubor rostlin určitého druhu (např. rostoucí v konkrétní lokalitě, používané tradičně k léčbě v rámci jednoho etnika).<sup>1</sup>

Takto vedený screening je značně obecný a často se tímto způsobem v rostlinách zjišťují jejich sekundární metabolity (např. alkaloidy, triterpeny, flavinoidy, isothiokyanáty atd.). Pokud však nemáme informace z jiných zdrojů o působení nalezených látek, je skoro nemožné určit jejich konkrétní účinek. Jejich působení je totiž velmi různorodé a pro získání ucelené informace bychom je museli podrobit obrovskému množství biologických testů.<sup>1</sup>

Alternativou může být screening celého souboru rostlin na působení proti konkrétnímu cíli. Nevýhodou však je, že tato metoda neposkytuje informaci o účinku na jiných biologicky relevantních cílech, než pro které je daný test nastaven. Z toho důvodu mohou zůstat některé účinky skryty. I přesto byl tento způsob hojně využíván v minulosti, kdy se biologické testy prováděli velice často na laboratorních zvířatech, zejména myších a potkanech.<sup>15</sup>

Nejvíce výsledků tímto způsobem získali v Central Drug Research Institute v Indii (CDRI) a v National Cancer Institute (NCI) (USA). V CDRI tímto způsobem prozkoumali přes 2000 vzorků rostlin na jejich biologické účinky. Dodnes však neexistuje léčivo s užitím v humánní medicíně, které by vzniklo v rámci tohoto projektu. Přesto tento výzkum nebyl zbytečný. Díky němu bylo objeveno a izolováno velké množství do té doby neznámých bioaktivních látek. Stejným způsobem byl zaměřen výzkum v NCI. V tom bylo od roku 1960 do roku 1981 zkoumáno více než 35 000 druhů rostlin na své protirakovinné působení. Později bylo od testování na zvířatech upouštěno a dále se testovalo na rakovinných buněčných liniích. V rámci tohoto výzkumu byl objeven například paclitaxel (**5**) či camptothecin (**6**).<sup>15,16</sup>



### 2.2.2 Ethnobotanický výběr rostlin

Poznatky o léčivých rostlinách a jejich účincích lidé shromažďují už po dlouhá tisíciletí. Tyto informace se často předávali ústně z generace na generaci mezi šamany, či lidovými léčiteli jednotlivých etnik. Do dnešní doby tak zůstaly pouze informace, které byly zapsány anebo se stále používají.<sup>1</sup> Na druhou stranu například v Číně či Indii vznikli systémy tradičních medicín, jejichž metody jsou velmi propracované a byly dobře zaznamenány. Nejedná se o pouhé používání odvarů či extraktů z bylin. K léčbě se připravují léčivé přípravky, které se často sestávají z mnoha různých rostlin. Díky propracovanému systému archivace je i v dnešní době možné dohledat záznamy, které vznikaly před stovkami let. Tím pádem je tradiční čínská medicína a indický tradiční systém léčení-Ayurveda, velmi hodnotnou pokladnicí medicínských informací.<sup>17</sup>

Tyto záznamy tak dnes mohou sloužit při výběru vhodných rostlinných kandidátů pro testování na přítomnost nových aktivních substancí. Před 20 lety byl proveden zajímavý experiment. Jeho cílem bylo zjistit, zda mají léčiva uvedená v lékopisech rozvojových zemí souvislost s původními léčivými rostlinami využívanými zdejší tradiční medicínou. Celkově byl výzkum zaměřen na 122 léčivých látek. Ukázalo se, že 80 % z těchto látek bylo používáno i v původní tradiční medicíně daného etnika. Další zajímavostí je, že tyto látky pocházely pouze z 94 druhů rostlin. Na zemi se vyskytuje minimálně 250 000 druhů vyšších rostlin. Při letmé úvaze lze předpokládat, že potenciál nalezení nových léčivých látek, rostlinného původu, které dosud nebyly objeveny, je obrovský. A zde může být tradiční medicína velmi nápomocna.<sup>2</sup>

Na druhou stranu má tento způsob výběru i své nevýhody. Poměrně zásadní je například, že neodráží vliv klimatických podmínek. Těmi je v mnoha případech velmi ovlivněn metabolom celé rostliny (zastoupení sekundárních metabolitů). Pokud je

v dané lokalitě tradičně používaná rostlina aktivní, neznamená to, že bude mít stejnou aktivitu i když bude růst v jiném prostředí. To je ovlivněno klimatickými faktory (množství světla, teplota, kvalita půdy, množství vláhy apod.), s jejichž změnou se mění celkový rostlinný metabolom. Nelze tedy tvrdit, že rostlina, která roste na více místech planety a někde se tradičně užívá k léčení, bude stejně účinkovat i jinde.<sup>18</sup>

Příkladem užití ethnobotanického výběru může být přístup společnosti Shaman Pharmaceuticals, Inc, která do roku 1999 fungovala v USA.<sup>1</sup> Tato společnost se zabývala vývojem nových léčiv a potravinových doplňků. Svoji inspiraci čerpala z poznatků domorodých kmenových léčitelů v Amazonském pralese.<sup>19</sup>

Základem jejich výzkumu byl komplexní přístup k problematice výběru rostlin. Cílem nebylo pouze vzít tradičně používané rostliny nalezené v literatuře a identifikovat v nich účinné látky. Velmi důležitou roli zde hrála analýza podmínek, za kterých byly rostliny užívány přímo v původním prostředí. Byly zjišťovány lokality sběru rostlinného zdroje, způsoby jejího zpracování i metody její aplikace původním etnikem. To vše bylo zaznamenáváno v rámci výzkumných expedic k danému etniku. Šance, že výběr i následné testování zvolených kandidátů rostlin bude úspěšné a podaří se najít nová léčiva se tím pádem mnohonásobně zvýšila.<sup>20</sup>

Způsob této selekce rostlin k testování je oproti náhodnému výběru mnohem složitější a zabere více času. V tomto případě se nestačí zabývat pouze vztahem rostliny ke známému léčebnému účinku. Na druhou stranu ale existuje velká šance, že ve výsledném souboru budou zastoupeny rostliny s účinkem, který bude velmi významný.<sup>20</sup> Jako příklad srovnání přístupu „náhodného“ výběru rostlin s výběrem podloženým ethnobotanickým výzkumem může sloužit studie Khafagi a Dewedara<sup>21</sup>. Ti srovnávají účinnosti rostlin z okolí hory Sinai proti bakteriálním a plísňovým onemocněním. Do studie zahrnuli 36 druhů náhodně vybraných rostlin a 24 druhů rostlin využívaných tamními beduíny. Studie ukázala, že vzorek náhodně vybraných rostlin byl aktivní pouze v 41,7 % případů. Oproti tomu, aktivita zástupců rostlin používaných beduíny byla 83,3 %.

### 2.2.3 Výběr na základě chemotaxonomie

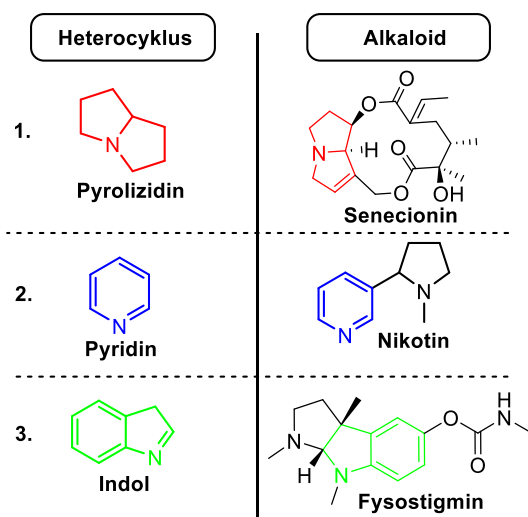
Je známo, že určité rody rostlin obsahují pro ně charakteristické skupiny látek. Například indolové alkaloidy v *Apocynaceae* či kumaríny v *Rutaceae*. Jestliže víme, jak

daný typ sekundárních metabolitů přibližně účinkuje, můžeme selektivně vybrat rostliny, které tyto skupiny látek obsahují. Biologické testování extraktů daných rostlin nám potom může pomoci objevit látky, které působí se zamýšleným účinkem, ale například mají vyšší účinnost. Oproti náhodnému výběru je velkou výhodou, že se soubor rostlin skládá z menšího počtu zástupců.<sup>22</sup> Metoda může mít také další, alternativní, využití. Lze ji například využít při taxonomickém zařazování jednotlivých rostlin. Pokud známe složení metabolomu, máme další zdroj informací pro správné zařazení nově objevené rostliny k určitému druhu.<sup>16</sup>

#### 2.2.4 Výběr na základě ekologických vztahů v přírodě

Z tohoto pohledu se dá provádět cílený výběr rostlin na základě různých ekologických vztahů, které předurčují vybrané kandidáty k dalšímu testování. Lze přihlížet například na vztah mezi biodiverzitou a chemodiverzitou, na obranné strategie rostlin, či fylogenetické trendy. Stejně dobře se dá vycházet také z pozorování chování zvířat.

Ve studii, kterou vydal *Ramesha a kol.*<sup>23</sup> je tento vztah popsán dvěma modely. V prvním je zmíněno, že chemodiverzita roste lineárně s biodiverzitou v rámci taxonomické jednotky. Toto tvrzení by nasvědčovalo tomu, že pro testování bude optimální vybírat rostliny jednoho rodu, který obsahuje co největší počet zástupců, abychom získali co největší množství strukturně odlišných látek. Druhý model však popisuje tuto závislost jako esovitou. Množství produkováných látek prudce vzrůstá s rostoucí biologickou diverzitou. Při dalším růstu počtu zástupců se však diverzita sekundárních metabolitů již tak rychle nezvětšuje. To je ukázáno na příkladu rozmanitosti struktur alkaloidů vyskytujících se celkově v přírodě. Studie udává, že existuje pouze 22 skupin alkaloidů, které se od sebe liší ve své struktuře heterocyklu. Například u *Asteraceae*, které jsou druhově nejrozmanitější a čítají přes 21 000 zástupců, bylo nalezeno pouze 14 z těchto 22 skupin. Stejně je to s *Fabaceae* které mají okolo 16 400 druhů a obsahují 17 skupin strukturně odlišných alkaloidů. Podle druhého modelu se tedy nezvyšuje šance na nalezení strukturně nových látek testováním aktivit mnoha zástupců jednoho rodu. K získání široké škály strukturně různých metabolitů je naopak výhodnější testovat menší počty zástupců z více rodů.<sup>23</sup> Obrázek 5 ukazuje vybrané alkaloidy se strukturně odlišnými základními heterocykly, podle kterých jsou rozřazovány do rozdílných skupin.



Obrázek 5 Příklady alkaloidů a rozdělení do skupin podle jejich stavebních heterocyklů

Existují studie, ve kterých se zabývají zastoupením léčivých rostlin v rámci jejich fylogenetického zařazení. *Zhu a kol.* ukázal, že mnohé z rostlin, které mají podobné léčivé účinky jsou si rodově příbuzné. Díky tomu se dá předpokládat, že jejich metabolom bude podobný. Můžeme tedy vybírat druhy rostlin, které ještě nebyly testovány, ale jsou ve společném rodu se známými léčivými rostlinami a předpokládat u nich podobné biologické vlastnosti.<sup>10,24</sup>

V roce 1976 vznikla hypotéza, která dělila rostliny do dvou skupin, podle jejich strategie obrany proti herbivorům. Do první skupiny jsou zařazeny rostliny, které jsou často dobře dosažitelné, viditelné a v ekosystému dominantní. Jedná se zejména o druhy s dlouhým životním cyklem, například o stromy či jiné dřeviny. Ty si pro svoji ochranu vyvinuli látky, které nejsou tolik jedovaté, ale způsobují, že daná rostlina není pro herbivory tolik atraktivní. Ty jsou produkovány ve velkém množství, aby ochránily celou rostlinu. Ve druhé skupině jsou převážně byliny a rostliny s krátkým životním cyklem, které nejsou dřevnaté. Vizuálně jsou tyto rostliny spíše schované a nedominantní. Nemohou si tedy dovolit investovat příliš mnoho energie do tvorby velkého množství ochranných látek. Z toho důvodu si vytvořili vysoce účinné a často velmi toxické ochranné látky, jako například alkaloidy, které však produkují pouze v malém množství.<sup>25</sup> Pokud bychom se z tohoto pohledu zaměřili na využití rostlin v etnobotanické medicíně a léčitelství, zjistíme zajímavá fakta. Člověka lze z určitého úhlu pohledu brát také jako „herbivora“, či někoho, kdo danou rostlinu otrhává, nebo ojídá. To by naznačovalo tomu, že tyto ochranné látky by měli nepříznivě působit i na něj. U některých to tak doopravdy platí (např. atropin). Jak však řekl Sofokles: „vše je

jed a záleží pouze na dávce,“ tak to platí i v případě těchto látek. Při správném dávkování lze i je využít jako velmi účinná léčiva.<sup>26</sup>

Tato teorie byla následně rozvinuta. Například *Coley a kol.* zjistily, že mladé listy rostlin budou pro herbivory více atraktivní než listy staré. To zdůvodňují tím, že starý list obsahuje velké množství ligninu a celulózy a tím pádem je tvrdý. To je velmi dobrý způsob ochrany, který ale nemá žádný terapeutický potenciál. Na druhou stranu, mladé listy, které ještě nemají tento typ ochrany, se musí chránit jinak. Například pomocí svých metabolitů. Ve studii je ukázáno, že jejich nejvyšší koncentrace je přítomna právě v mladých a rostoucích listech. Ty také vykazovali největší protirakovinnou aktivitu při testech na nádorových buněčných liniích.<sup>27</sup> *Albuquerque a kol.* popisuje strategii rostlin ve vztahu k prostředí jejich růstu. Ukázali, že rostliny, které mají dostatek živin a zdrojů ke svému růstu, nepotřebují investovat tolik energie do chemické ochrany. Je pro ně výhodnější růst rychle, a i v případě kdy jsou napadeny (žrány), toto napadení „přerůst“. Rostliny, které rostou na půdách chudých na živiny, nemohou případný požerek rychle nahrazovat. Je tedy pro ně výhodnější investovat energii do tvorby sekundárních metabolitů, pomocí kterých se chrání. Tyto druhy rostlin jsou poté zajímavé pro terapeutické využití, protože vytváří látky, které jsou účinné proti jiným organismům.<sup>28</sup>

Alternativním přístupem při identifikaci potenciálně účinných rostlin je pozorování zvířat a jejich chování vůči dané rostlině. Tímto způsobem byly například zjištěny účinky látek v rostlině *Khaya anthoteca*, které jsou účinné proti prvokům *Plasmodium falciparum* a *Trypanosoma brucei rhodesiense*. Rod *Khaya* je endemitem, který se vyskytuje v Africe a na Madagaskaru. Jeho účinky byly objeveny na základě pozorování chování babonů a šimpanzů, kteří jedli kůru a semena těchto rostlin. Tyto části přitom nemají žádnou nutriční hodnotu, a jsou navíc hořké.<sup>10</sup>

Vztahů v přírodě, kterými se dá při výběru rostlin pro následné biologické testování řídit, je obrovské množství. Zde jsem shrnul ty nejpoužívanější a nejvíce zmiňované v literatuře, z pohledu využití. Při vlastním výběru by bylo ideální vytvořit jakési propojení, při kterém bychom byly schopni využít informace z více přístupů. Takto provedený výběr by dával šanci, že některá z vybraných rostlin bude mít nakonec hledaný účinek a bude ji možné použít při vývoji nového léčiva.

### 2.3 Mezinárodní databáze léčivých přírodních látek

V minulosti vznikla řada databází, které shromažďují informace o léčivých přírodních látkách. Nejobsáhlejší z nich je NAPRALERT, což je zkratka ze slov NATURAL PRODUCT ALERT. Tato databáze vznikla v roce 1975 pod vedením prof. Normana R. Farnswortha na univerzitě státu Illinois v Chicagu, specificky pro potřeby vývoje nových léčiv z přírodních látek. Uvádí se, že v databázi lze v online podobě nalézt přes 200 000 záznamů k (12/2018), které se datují od roku 1650. (Univerzita státu Illinois v Chicagu, <https://www.napralert.org>) Databáze také obsahuje informace o ethnomedicínském a tradičním použití léčivých rostlin. Zároveň zde můžeme nalézt data o farmakologickém působení a chemickém složení extraktů z rostlin, mikroorganismů a živočichů. Tím pádem lze srovnávat aktivitu a působení jednotlivých extraktů s referencemi o jejich původním užívání. Databáze obsahuje také informace o strukturách a působení sekundárních metabolitů, které byly zjištěny při biologických testech daných extraktů. Celkově je zde zaneseno více než 152 000 známých struktur a záznamy o 52 000 druzích rostlin a živočichů. Všechny informace jsou aktualizovány a doplňovány rychlostí průměrně 600 nových článků za měsíc. Tvůrci databáze uvádějí, že články a informace vydané mezi roky 1975-2004 by měli být kompletní. V období po roce 2004 až dodnes se udává, že databáze obsahuje asi jen 20 % všech publikovaných článků s příslušnou tematikou.<sup>17,29,30</sup>

Další databáze chemických látek získaných z přírodních materiálů jsou například NuBBE DB (Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais), nebo Super Natural II.<sup>31,32</sup>

NuBBE DB je databáze, která byla založena vědci z Brazílie. Jsou v ní obsaženy informace o strukturách přírodních látek a jejich derivátů, které byly izolovány z organismů brazilské fauny a flóry. Zároveň se zde nachází další botanické, farmakologické a toxikologické informace, díky kterým je pohled na danou látku komplexnější a lze jej hodnotit i z medicínského hlediska. Celá databáze je v online verzi přístupná přes internetový odkaz (<http://nubbe.iq.unesp.br/portal/nubbe-search.html>).<sup>17,31</sup>

Super Natural II je pak databází vytvořenou skupinou nadšenců z institutu fyziologie na univerzitě medicíny Charité v Berlíně. Je to další z internetových zdrojů, ve kterém se dá najít obrovské množství informací o přírodních látkách. Uvádí se, že do této databáze je zaneseno 325 811 chemických struktur s příslušnými záznamy o jejich toxikologii,

fyziologickém působení a zástupci látek, které by mohli mít v budoucnosti terapeutické využití. Celá databáze je přístupná v online podobě bez registrace.<sup>17,32</sup> ([http://bioinf-applied.charite.de/supernatural\\_new/index.php?site=home](http://bioinf-applied.charite.de/supernatural_new/index.php?site=home))

## 2.4 Léčiva, k jejichž objevu přispěla ethnomedicína

Jak již bylo zmíněno výše, mnoho z původně tradičně používaných látek je využíváno v dnešní medicíně. Tyto látky se mohou používat jako léčiva v nezměněné podobě, tak jak se nacházejí v rostlině, nebo být synteticky upravené, aby se zlepšili jejich farmakologické vlastnosti. Níže jsou uvedeny některé méně známé příklady takovýchto látek.

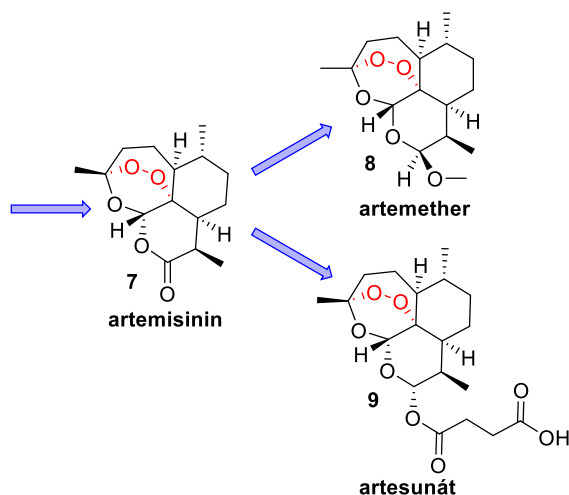
### 2.4.1 Artemisinin

Jedná se o látku, která byla původně izolována z pelyňku ročního (*Artemisia annua*) (Obrázek 6).<sup>4</sup> V dnešní době jsou artemisinin a jeho deriváty doporučovány WHO jako léčiva první volby při léčbě malárie, smrtelné infekce způsobené prvokem *Plasmodium falciparum*. Zároveň tyto látky nahradily dříve používaná chinolinová léčiva, protože vůči nimž vznikala u parazitů rezistence.<sup>4</sup>

Historie objevu artemisininu se datuje do roku 1970, kdy v Číně vznikla tajná výzkumná skupina nazvaná *523 Project*, jehož členem byla profesorka Tu. Ta vyhledávala ve starých čínských recepturách zmínky o rostlinách s antimalarickým působením. Nejčastěji zde byla zmiňována *Artemisia annua L.* Klíčovým pro objev artemisininu bylo, že profesorka Tu, na základě receptů napsaných 1700 let př. n l. Ge Hongem, extrahovala listy pelyňku ve studeném dietyléteru namísto teplého etanolu. Tak získala extrakt s účinností blížící se 100 %.<sup>4</sup>

Později byla objasněna struktura artemisininu a ukázalo se, že se jedná o seskviterpenický lakton s peroxidovým můstkem (vyznačen červeně ve struktuře **7**, Obrázek 6). Tento můstek je nutný pro antimalarický účinek, protože jeho reakcí s Fe<sup>2+</sup> ionty, které jsou v plasmodiu obsaženy z krve, tvoří reaktivní radikály. Ty dále napadají vnitřní struktury plasmodia a ničí jej. Dále se však ukázalo, že i celková struktura molekuly je pro účinek velmi důležitá a jiné struktury s podobně stavěným peroxidovým můstkem účinné nejsou. Struktura artemisininu dala podnět pro syntézu nových derivátů, které by byly ještě účinnější. Tak vznikly látky, které jsou známé pod komerčními názvy artemether (**8**) či artesunát (**9**).<sup>33</sup>



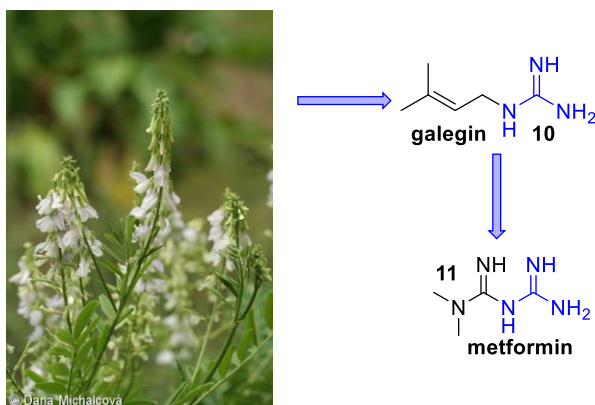


Obrázek 6 *Artemisia annua*<sup>8</sup>, struktura z ní izolovaného artemisininu a od něj odvozená léčiva

## 2.4.2 Metformin

Metformin je v dnešní době užíván jako jedno ze základních léčiv při diabetu 2. typu. Má schopnost snižovat krevní cukr. Při jeho včasné aplikaci je zároveň dokázáno, že brání vzniku kardiovaskulárních poruch a tím prodlužuje délku života pacientů s nadváhou způsobenou diabetem.<sup>34</sup>

Jedná se o léčivo tzv. biguanidinového typu, které je strukturně blízce podobné galeginu, který se nachází v jeřábce lékařského (*Galega officinalis*) (Obrázek 7). Ta se přirozeně vyskytuje v celé Evropě a už od středověku byla v těchto oblastech užívána v tradičním léčitelství, k léčbě diabetu 2. typu.<sup>34</sup> Například ve Francii se extrakt z jeřábkiny pro tento účel předepisoval až do roku 1930. Zároveň se začalo s výzkumem a analýzou aktivních látek, které byly zodpovědné za snižování obsahu cukru v krvi. V extraktu byly nalezeny dvě hlavní složky s tímto účinkem, guanidin a galegin (**10**). Od dalších testů s guanidinem bylo upuštěno kvůli jeho přílišné toxicitě pro klinické použití. Naopak galegin se nějakou dobu ve 20. století skutečně užíval jako antidiabetikum. Zejména však jeho struktura sloužila jako základní motiv při vývoji dalších antidiabetik, hojně používaných v dnešní době. Jedním z nich je například metformin (**11**), jehož strukturní podobnost s galeginem zachycuje Obrázek 7.<sup>1,34</sup>



Obrázek 7 *Galega officinalis*<sup>35</sup> z ní izolovaný galegin a jeho strukturní podobnost s metforminem

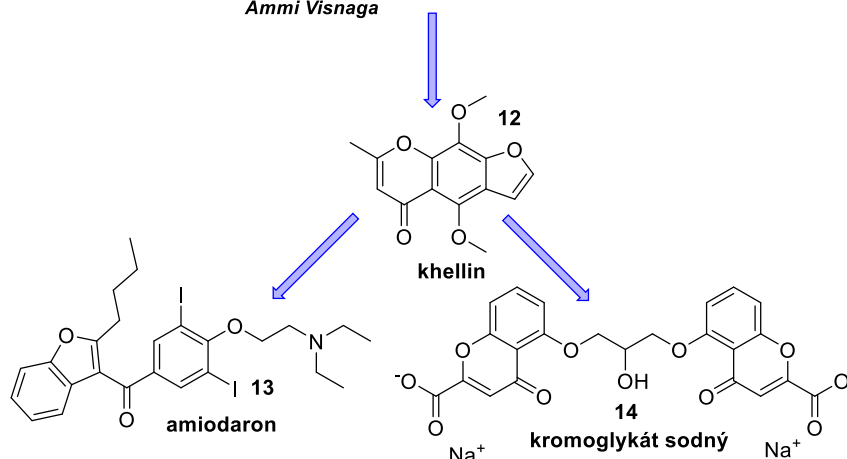
### 2.4.3 Khelin

Khellin je příkladem látky využívané v ethnomedicíně, která se kvůli svým vedlejším účinkům v klinické praxi neprosadila. Posloužila však jako strukturní základ léčiv, které byly následně hojně využívány (např. amiodaron, chromoglykát sodný) a tak výrazně dopomohla jejich vzniku.<sup>1</sup>

Strukturně podobné látky, khelin a visnagin, se společně nacházejí v moráči zákrovnatém. (*Ammi Visnaga*) (Obrázek 8). Tato rostlina se vyskytuje ve středomoří, západní asii a severní Africe. Jedná se o rostlinu čeledi miříkovité (*Apiaceae*) dorůstající výšky až 1 metru. V ethnomedicíně se *A. Visnaga* užívala při trávicích obtížích a kolice. Dále našla využití při léčbě srdečních poruch a vysokého tlaku. Nelze opomenout ani její pozitivní účinky při léčbě dýchacích obtíží, astmatu a také angíny.<sup>36</sup> Později se zjistilo, že za zmíněné účinky je zodpovědný khelin (**12**), látka, která se poté v Americe užívala jako bronchodilatátor. Od toho se však upustilo, protože se ukázalo, že po delším užívání způsobuje pocity dávení a zvracení. V roce 1955 započal v Anglii výzkum, který měl za cíl vytvořit analogy khelinu s lepšími farmakologickými vlastnostmi. To vedlo k objevu kromoglykátu sodného (**14**), který stabilizuje buněčné membrány v plicích. Tím pádem blokuje uvolnění aktivátorů astmatického záchvatu. Dále se výzkumné týmy zabývali také účinky khelinu na srdce. Částečnou změnou jeho struktury vznikla účinná léčiva proti srdeční arytmii. V dnešní době se používá například amiodaron (**13**).<sup>37</sup> Strukturní podobnost khelinu s kromoglykátem a amiodaronem ukazuje Obrázek 8.



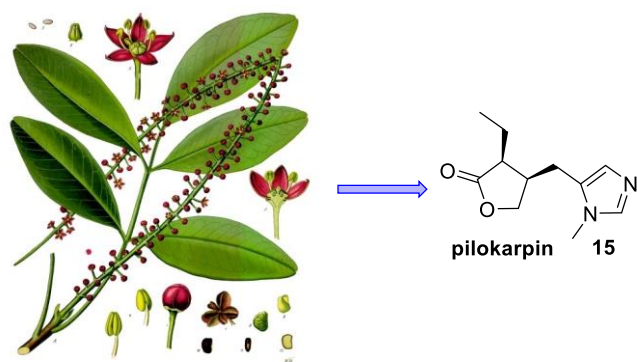
*Ammi Visnaga*



Obrázek 8 *Ammi Visnaga*<sup>38</sup>, struktura khellinu a s ním strukturně podobná léčiva<sup>1</sup>

## 2.4.4 Pilokarpin

Pilokarpin je alkaloid, který lze získat z jihoamerické rostliny *Pilocarpus jaborandi* (Obrázek 9). Tu objevil v roce 1873 brazilský fyzik Symphronio Coutinho. Ten upozoroval, že když domorodí obyvatelé žvýkali listy této rostliny, výrazně se u nich zvýšila produkce slin. Na základě tohoto pozorování přinesl vzorky rostliny do Evropy, aby ji podrobil dalšímu zkoumání. O rok později byla z této rostliny izolována látka pilokarpin (15). Ta se začala nejprve používat jako prostředek při léčení otoků (odvodňuje), než byla vynalezena účinnější diuretika.<sup>39</sup> Zároveň byla zjištěna její schopnost působit na muskarinové acetylcholinové receptory ( $M_3$ ), a tím ovládat svaly stahující duhovku a způsobující akomodaci čočky v oku<sup>39</sup>. Díky tomu také účinně snižovat nitrooční tlak při zeleném zákalu. Dnes je skoro výhradně využívána pro tento účel a patří na seznam základních léčiv světové zdravotnické organizace<sup>40</sup>. Původně pozorované zvýšení produkce slin se dnes také využívá při xerostomii (suchosti v ústech) a při diagnóze cystické fibrózy. Zajímavé je, že pilokarpin je jednou z mála přírodních látek, které nebyly synteticky upraveny a jsou v medicíně používány ve své původní podobě.<sup>39,41</sup>

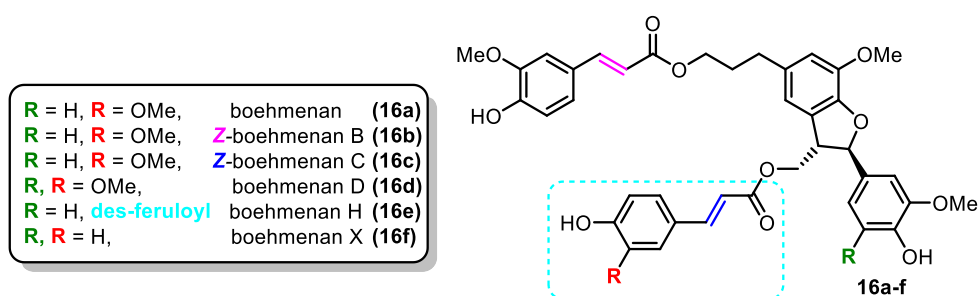


*Pilocarpus jaborandi*

Obrázek 9 *Pilocarpus jaborandi*<sup>42</sup> a struktura pilokarpinu, který byl z něj poprvé izolován

## 2.5 Boehmenany–výskyt v přírodě a jejich biologická aktivita

Boehmenany (Obrázek 10) poprvé izoloval *Seca et al* v roce 2001 z kůry ibišku konopovitého (*Hibiscus cannabinus*, *Kenaf*) (Obrázek 11).<sup>43</sup> Později se zjistilo, že jsou přítomny i v dalších rostlinných extraktech, například z *Durio zibethinus*, *Helicteres hirsuta*, *Sambucus adnata*, nebo *Hibiscus taiwanensis*. Jedná se o strukturně novou skupinu neolignanů, se zajímavými vlastnostmi. Neolignany jsou sekundární metabolity rostlin strukturně odvozené od fenylypropanoidu, které jsou biosyntetizovány v šikimátové biosyntetické dráze. V rostlinných buňkách jsou dále derivatizovány pomocí dalšího enzymatického aparátu, což vede k široké strukturní diverzitě a mnoha zajímavým biologickým účinkům. Lze zmínit například jejich antioxidační působení, nebo inhibici růstu jiných dvouděložných rostlin.<sup>43,44</sup>



Obrázek 10 Struktury boehmenanů<sup>44</sup>

Díky již zmiňovanému biologickému působení je ibišek konopovitý (Obrázek 11) už po dlouhá staletí využíván v ethnomedicíně. Původně se vyskytoval v oblastech subsaharské Afriky, kde je jeho výskyt datován už od roku 4000 př. Kr. Zde využívali extrakt z listů k pomoci při žlučnických potížích, teplotě, nebo jako celkově pročišťující prostředek. Postupem času se ibišek rozšířil i do dalších tropických oblastí světa a je užíván jako léčivý prostředek v indické Ayurvedě, nebo tradiční čínské

medicině. Udává se, že účinkuje protizánětlivě, kardioprotektivně a proti vysokému krevnímu tlaku. Zároveň má antioxidační účinky a olej ze semen působí kancerostaticky.<sup>45</sup>



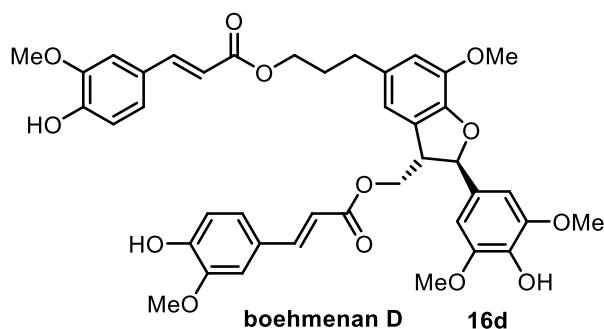
Obrázek 11 *Hibiscus cannabinus*, Kenaf<sup>46</sup>

V dnešní době se zájem o biologické účinky boehmenanů neustále zvyšuje. Ukazuje se totiž, že jsou schopny působit jako účinné inhibitory Wnt/ $\beta$ -catenin signální dráhy.<sup>47</sup> Ta má u obratlovců úlohu regulace buněčného růstu a diferenciaci nově vznikajících buněk, kde její poruchy vedou k mnoha onemocněním. Příliš vysoká aktivita má často za následek růst nádorů a kancerogenezi. To bylo popsáno například u rakoviny prsu, jater, nebo u kožních melanomů. Zároveň je známo, že v tomto případě často vzniká diabetes 2. typu a narůstá hustota kostí. Naopak vymizení její aktivity může podpořit rozvoj Alzheimerovy nemoci a osteoporózy. Boehmenany, se dají využít jako inhibitory této dráhy při její přílišné aktivitě. Tím pádem jsou potenciálně využitelné jako cytostatika<sup>48</sup> Pan *et al.* zkoumají účinek boehmenanů na kmen lidských rakovinných buněk A 549 NSCLC (non-small cell lung cancer). Uvádějí, že boehmenany fungují jako účinné inhibitory růstu těchto nádorových buněk. Působí mechanismem inhibice EGFR (epidermal growth factor receptor) signální dráhy a zastavují buněčný cyklus v G<sub>1</sub> fázi. Zároveň indukují signální kaskádu vedoucí k apoptóze buňky. Tím pádem účinně působí proti proliferaci, růstu nádoru a tvorbě metastáz.<sup>49</sup>

Vedle cytostatického působení boehmenanů je známá i jejich schopnost kompetitivně inhibovat enzym tyrosin fosfatasu 1B (PTP1B) v nízkých účinných koncentracích (IC<sub>50</sub> = 43,5  $\mu$ mol). PTP1B funguje v organizmu jako negativní regulátor signální dráhy inzulinu a jeho inhibitory se využívají jako léčiva diabetu 2. typu. Proto se nabízí možnost využít boehmenany jako leading sloučeniny při vývoji nových typů antidiabetik.<sup>50</sup>

## 2.6 Návrh syntézy boehmenanu D

Syntéza boehmenanu D, jehož strukturu ukazuje Obrázek 12, je v našem případě založena na CDC couplingu, (cross dehydrogenative coupling). Předpokládáme, že pomocí něj je možné připravit benzofuranový skelet v jeho nenasycené podobě. Tento klíčový skelet je základní strukturální jednotkou všech boehmenanů.<sup>51</sup>



Obrázek 12 Struktura boehmenanu D

Výchozími látkami jsou vhodně substituovaný fenol a β-ketoester, které společnou reakcí dávají výsledný benzofuran (Schéma 1a). Reakce probíhá za přítomnosti železitých solí, které interagují přes kyslíkové atomy (karbonylové kyslíky na β-ketoesteru a fenolickou -OH skupinu) s reakčními meziprodukty. Takto dojde ke snížení energie hraničních orbitalů vzniklého komplexu. Železité ionty jsou v reakčním prostředí vázány v komplexu s NHPI (*N*-hydroxyftalimid), který tak dodatečně stabilizuje vznikající reakční intermediáty železitých iontů v různém oxidačním stavu. Iniciátorem celého procesu je DTBP (di-*tert* butylperoxid), který se při zahřátí na vyšší teplotu homolyticky štěpí a radikálově zahajuje průběh reakce.<sup>51</sup> Reakční mechanismus však nebyl do doposud důkladně ověřen a proto existují pouze návrhy, které předpokládají existenci radikálového intermediátu, při kterém vzniká nová C-C vazba (Schéma 1b).<sup>52</sup>

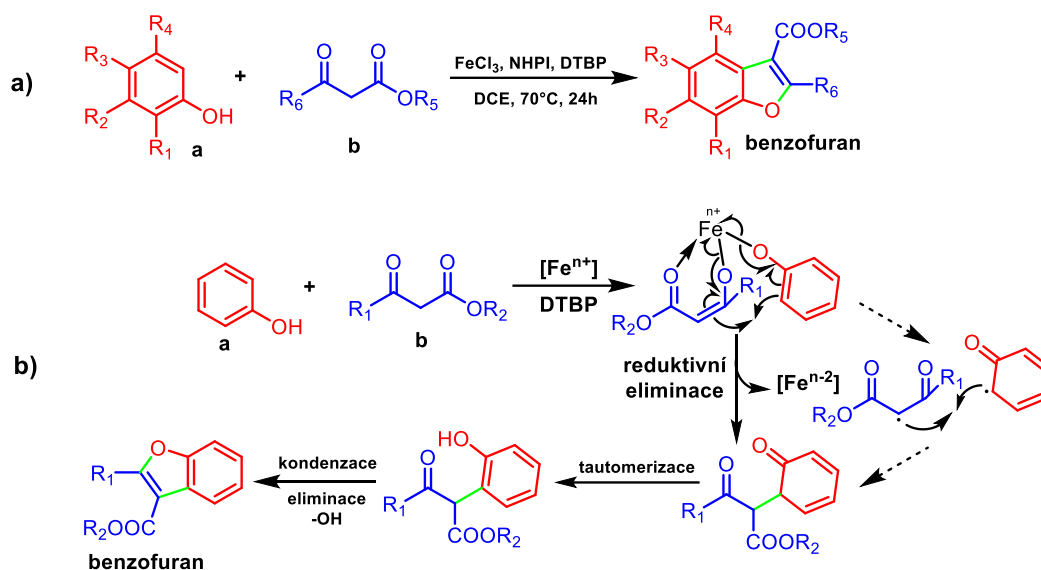


Schéma 1 a) Průběh CDC couplingu a reakční podmínky, b) Návrh reakčního mechanismu vzniku benzofuranu pomocí CDC couplingu probíhajícího přes radikálový meziprodukt

### 2.6.1 Syntetický plán

Výchozími látkami pro syntézu boehmenanu D jsou vanilin (Schéma 2, **17**) a syringaldehyd **18**. Z těchto látek jsou v dalších krocích připraveny prekurzory pro CDC coupling **17a** a **19**. Vanilin je vhodně ochráněn na karbonylové skupině a do couplingové reakce poskytuje svoji fenolickou -OH skupinu. Fenolická skupina syringaldehydu je chráněna jako MOM-ether pomocí MOM-Cl, a takto chráněný meziprodukt **18a** je pomocí Reformatsky reakce s pomocí  $\alpha$ -bromoalkyl acetátu převeden na příslušný  $\beta$ -hydroxyester **25**.  $\beta$ -hydroxy skupina je následně oxidována pomocí PCC za vzniku  $\beta$ -ketoesteru **19**, který je druhou výchozí látkou pro CDC coupling.



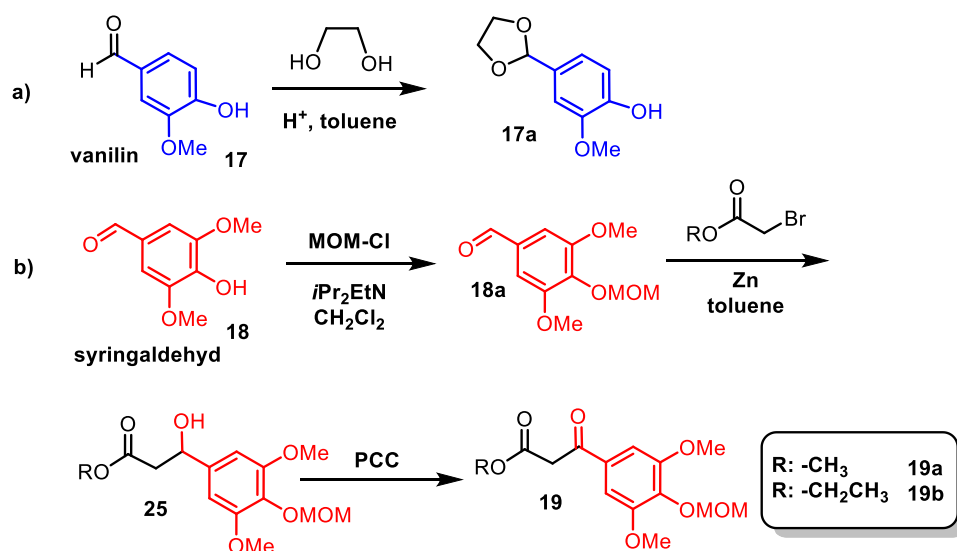


Schéma 2 Příprava prekurzorů pro CDC coupling z (a) vanilinu a (b) syringaldehydu

Jakmile připravíme prekurzory **17a** a **19** pro CDC coupling, CDC coupling vedoucí ke vzniku benzofuranového skeletu **20** bude vyzkoušen (Schéma 3). Reakce by měla proběhnout v suchém DCE za přítomnosti bezvodého FeCl<sub>3</sub> a NHPI. Zdrojem radikálů pro nastartování této reakce je DTBP, který se při zvýšené teplotě homolyticky štěpí a slouží jako zdroj radikálů.<sup>44</sup> Výsledný adukt **20** pak bude podroben selektivní redukci  $\Delta^{2,3}$  dvojně vazby za vzniku *trans*-2,3-dihydrobenzofuranu **20-1**. Této přeměny lze selektivně docílit pomocí Mg aktivovaného pomocí NH<sub>4</sub>Cl v prostředí MeOH a THF.<sup>53</sup> Redukcí esteru v poloze C-3 na benzofuranovém cyklu pak cílovou získáme volnou hydroxy skupinu (produkt **20-2**).

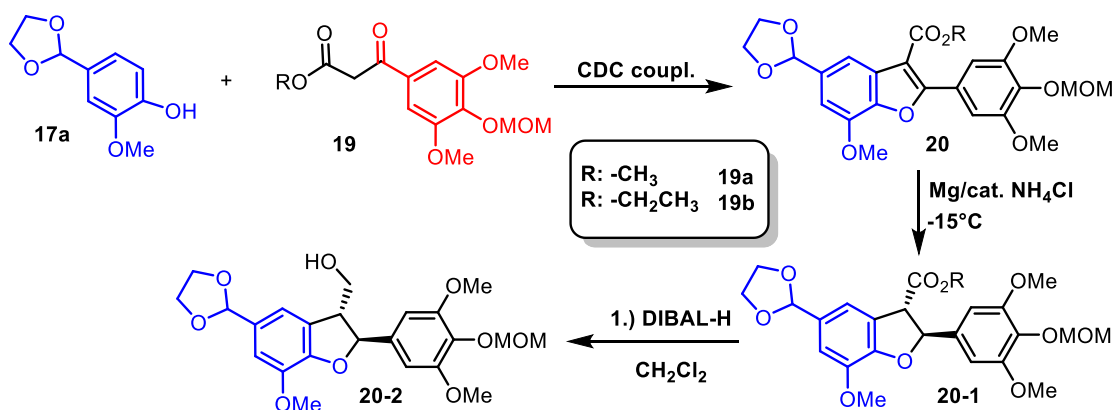


Schéma 3 Reakční cesta od výchozích látek **17a** a **19** po meziprodukt **20-2**

Následně by mělo následovat odstranění acetalové chránicí skupiny pomocí PPTS (Schéma 4, látka **20-3**), a uvolněný aldehyd by pak byl transformován za využití námi vyvinutého reagentu 2-TBSO-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-SO<sub>2</sub>BT na allylický alkohol **20-4**. Selektivní



redukce allylického olefinu pomocí  $\text{LiAlH}_4$  by následně mělo vést k syntéze cílového intermediátu **20-5**, klíčového meziprojektu při přípravě boehmenanu D.

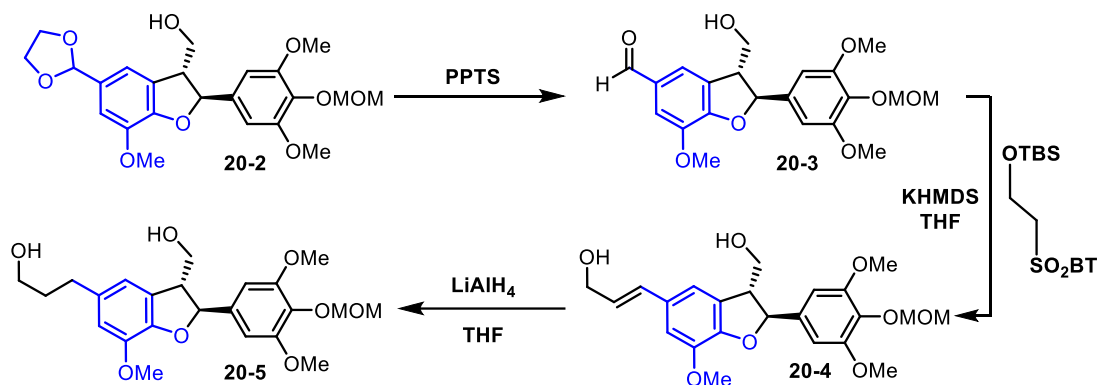


Schéma 4 Reakční cesta od meziprojektu **20-2** po meziprojekt **20-5**

Abychom následně zakončili syntézu boehmenanu D, tak musíme připravit MOM-chráněný intermediát odvozený od kyseliny ferulové **21** (Schéma 5, **21**).

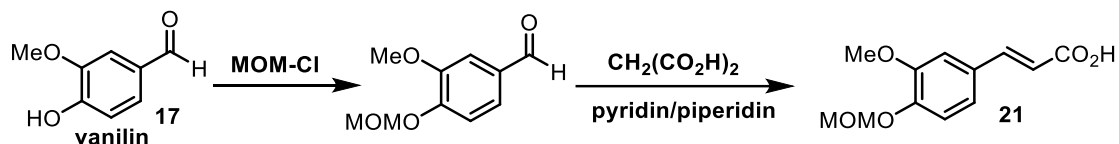


Schéma 5 Příprava MOM chráněné kyseliny ferulové (**21**)

Konečným krokem syntézy pak bude dvojitá esterifikace volných hydroxylových skupin na **20-5** pomocí derivátu ferulové kyseliny **21** (Schéma 6.). Tato reakce bude provedena DCC couplingem a následný produkt bude podroben TFA-mediované deMOMaci. Tato konečná „kosmetická“ reakce by měla poskytnout boehmenan D (**16d**).

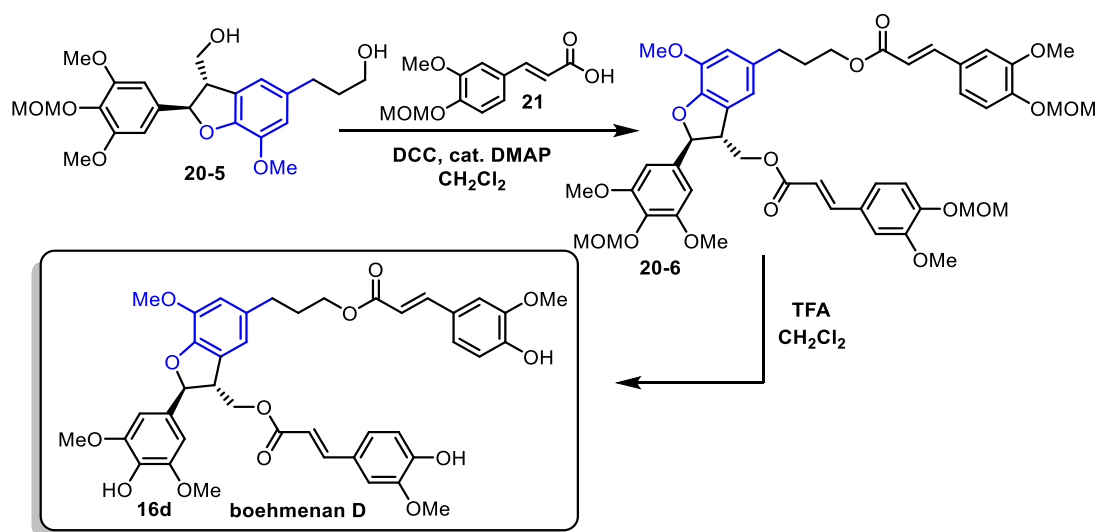


Schéma 6 Reakční cesta od meziprojektu **20-5** po boehmenan D (**16d**)

### 3 Výsledky a diskuze

V praktické části méj bakalářské práce jsem měl za cíl „vykolíkovat“ syntetickou cestu umožňující přípravu boehmenanu D (**16d**). Retrosyntetická analýza této látky (viz Schéma 7) nám ukázala, že celková molekula může být připravena ze dvou základních strukturních jednotek, vanilinu (**17**) a syringaldehydu (**18**). V prvních krocích bylo nejdříve potřeba připravit vanilin **17b** s vhodně ochráněnou aldehydickou skupinou (R) a  $\beta$ -ketoester **19**. Z těch měl být pomocí CDC couplingu následně vytvořen benzofuranový skelet (**20**). Tato struktura je základní stavební jednotkou boehmenanu D, který je z ní získán následnou substitucí postranních funkčních skupin. Z toho důvodu měl CDC coupling zásadní vliv na úspěšný průběh celé syntézy a byl kladen velký důraz na jeho prozkoumání. Po zvládnutí tohoto kroku, měla být struktura **20** v sérii dalších reakcí (viz kapitola 2.6) převedena až na boehmenan D. Následně se však ukázalo, že s připravenými prekurzory **17b** a **19** CDC coupling buď vůbec neprobíhá anebo proběhne pouze v zanedbatelných výtěžcích. Na druhou stranu, pokud se použijí jinak (stereoelektronický vliv) substituované výchozí látky, benzofuran vzniká jako majoritní produkt reakce (bude diskutováno). To nasvědčuje tomu, že reakce je citlivá na substituční polohy na aromatickém jádru reaktantů. A jak se zdá, naše výchozí látky (a tím pádem i tento přístup k boehmenanu D) není příliš vhodný. Ale začněme diskutovat celou syntézu popořádku.

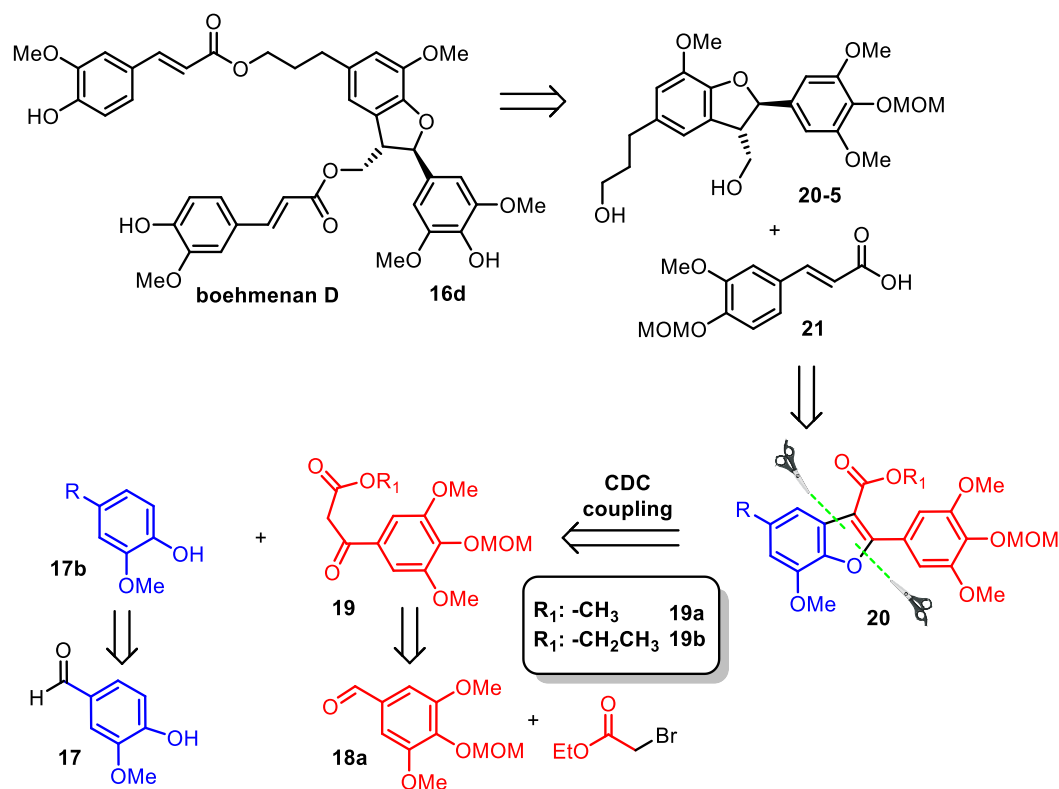


Schéma 7 Retrosyntéza boehmenanu D z vanilinu a syringaldehydu

### 3.1 Příprava chráněného vanilinu pro CDC coupling

První výchozí látkou pro CDC coupling byl vanilin, který do reakce poskytl fenolickou -OH skupinu, přes kterou se uzavíral cílový benzofuranový kruh. Na základě návrhu reakčního mechanismu (Schéma 1b) jsme předpokládali, že by volná aldehydická skupina mohla snižovat elektronovou hustotu na aromatickém jádře a tím pádem vadit při vzniku radikálu (anebo vzniklý radikál příliš stabilizovat a učinit jej nereaktivním). To by zabránilo průběhu celého couplingu. Z toho důvodu jí bylo potřeba vhodně ochránit. První volbou bylo chránění ethylen glykolem v podobě acetalu **17a**. Ukázalo se však, že tato reakce na vanilnu neprobíhá. Překvapivě veškeré publikované reakce tohoto typu v mém provedení neprodukovali kýžený produkt. V dalším postupu bylo cílem najít způsob chránění, který by na vanilnu probíhal ve velkém výtěžku a byl by operačně co nejjednodušeji proveditelný. Testované podmínky a typy chránících skupin lze nalézt ve Schéma 8. Diskuze jednotlivých přístupů pak následuje ve zbytku této podkapitoly.

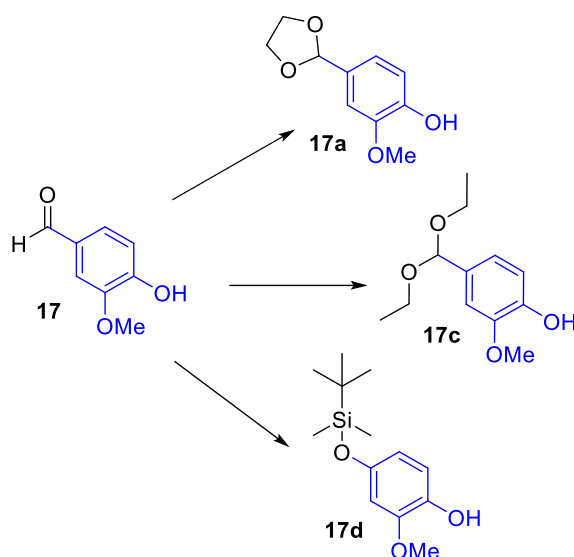


Schéma 8 Chráncí skupiny použité pro chránění vanilinu

### 3.1.1 Příprava produktu 17a

Rozhodli jsme se postupovat podle článku který publikoval *Palaniappan et al.*<sup>54</sup> ve kterém je přímo popsána reakce chránění vanilinu pomocí ethylenglykolu. Je zde uvedeno, že reakce probíhá s 90% výtěžností. Jediným problémem je, že ke kyselé katalýze zde používají polyanilin sulfát, který jsme neměli dostupný. Není jej však složité připravit přímo v laboratoři. Jedná se o polymeraci anilinu za přítomnosti peroxodisíranu amonného, který ji radikálově zahajuje. Je však potřeba mít čerstvý peroxodisíran, aby reakce probíhala. Reakci jsme opakovali 2krát a stále nebylo možné získat žádný produkt. Až po koupi čerstvého peroxodisíranu reakce proběhla s výtěžkem blížícím se kvantitativnímu za vzniku zelenočerně zbarvené práškové látky (Schéma 9, 22).

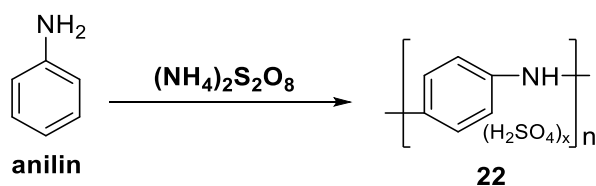


Schéma 9 Příprava polyanilin sulfátu

V následujícím kroku jsme provedli chránění vanilinu ethylenglykolem podle postupu z článku (Schéma 10). Po zpracování reakční směsi se však ukázalo, že tvorba acetalu neprobíhá. Od tohoto postupu jsme nakonec upustili. Jedním z hlavních důvodů bylo, že při přípravě polyanilin sulfátu v laboratoři nejsme schopni zajistit shodnou strukturu a vlastnosti produktu s komerčně prodávaným polyanilinem. To byl také pravděpodobně důvod proč reakce s námi připraveným polyanilinem neprobíhala.

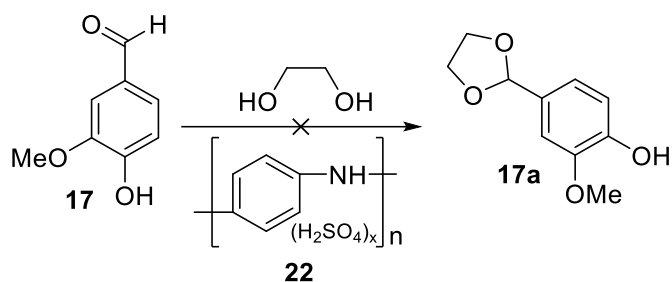


Schéma 10 Chránění vanilinu ethylenglykolem pomocí polyanilin sulfátu

Další možností k ochránění vanilinu ethylenglykolem bylo použití tetrabutylamonium tribromidu (TBATB) (Schéma 11), což ve svém článku publikoval *Gopinath et al.*<sup>55</sup> Ten slouží v reakční směsi jako *in situ* generátor bromovodíku, který kyselce katalyzuje tvorbu acetalu. Reakci jsme prováděli za laboratorní teploty a při 100°C, v obou případech za použití ethylenglykolu jako reaktantu a zároveň jako rozpouštědla. Po zpracování reakční směsi se však nepodařilo izolovat čistý produkt. Změřením <sup>1</sup>HNMR spektra surové reakční směsi se podařilo srovnáním intenzit píků výchozí látky a produktu určit stupeň konverze, která byla v obou případech 40 %. Z toho lze usuzovat, že teplota neovlivňuje výtěžnost reakce. Jediný rozdíl byl v zabarvení, kdy při reakci za laboratorní teploty zůstala reakční téměř bezbarvá. Naopak při zvýšené teplotě se TBATB ihned rozpustil a po pár minutách reakční směs zhnědla. To si lze vysvětlovat tím, že se při vysoké teplotě rozložila část TBATB a vznikl elementární brom. Ve výsledku však nebyla ani tato reakce vhodná pro ochránění vanilinu z důvodu nízkého výtěžku a obtížné izolace produktu. A nemožnosti získat cílový produkt v dostatečné čistotě.

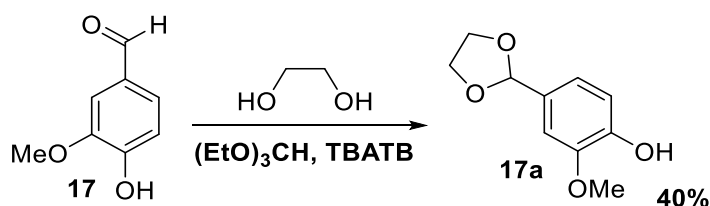


Schéma 11 Chránění vanilinu ethylenglykolem pomocí TBATB

### 3.1.2 Příprava produktu 17c

Tento způsob jsme zkoušeli jako alternativu k chránění ethylenglykolem, které nebylo v případě vanilinu příliš úspěšné. Inspirací nám byl článek, který publikoval *Smith et al.*<sup>56</sup> v němž chrání aromatické aldehydy pomocí ethylorthoformiátu za přítomnosti indium triflátu [ $\text{In}(\text{OTf})_3$ ] s velmi dobrými výtěžky (Schéma 12). Chtěli jsme vyzkoušet, zda bude možné stejným způsobem ochránit i vanilin, který nebyl v článku zmíněn.

V případě, že by reakce probíhala alespoň v malém výtěžku, stálo by za to se jí více zabývat a pokusit se nalézt vhodné reakční podmínky. V našem případě k tomu ale nedocházelo (konverze >5%) za jakýchkoliv testovaných podmínek.

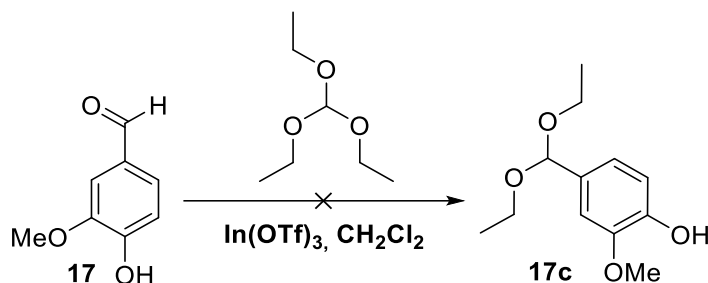


Schéma 12 Chránění vanilinu ethylorthoformátem za přítomnosti indium triflátu

### 3.1.3 Příprava produktu 17d

Ani v jednom z předchozích experimentů se nám nepodařilo ochránit vanilin v dostatečném výtěžku. Předpokládali jsme, že pokud bychom aldehyd zredukovali na alkohol, mohlo by chránění probíhat lépe. Rozhodli jsme se postupovat touto cestou i za cenu zvětšení počtu reakčních kroků. Nejprve bylo potřeba ochránit fenolickou -OH skupinu vanilinu pomocí methoxymethyl chloridu (MOM-Cl), aby na ní následně nedocházelo ke konkurenční reakci při chránění TBDMSOTf. MOM-Cl (**23**) jsme si připravovali čerstvý v laboratoři reakcí dimethoxymethanu s acetylchloridem v toluenu (Schéma 13). Reakční směs se při smíchání výchozích látek zahřála na 60°C. Po ochlazení na laboratorní teplotu se takto připravený MOM-Cl používal bez dalšího zpracování.



Schéma 13 Příprava MOM-Cl z dimethoxymethanu

V této fázi následovalo ochránění hydroxyly v poloze 4 na benzenovém jádře vanilinu pomocí MOM-Cl (Schéma 14) a redukce aldehydu. Chránění probíhalo za snížené teploty postupným přidáváním MOM-Cl do bazického roztoku vanilinu a výtěžek izolovaného produktu **24** se blížil 100 %. V následující reakci byla redukována aldehydická skupina pomocí  $\text{NaBH}_4$  v prostředí bezvodého ethanolu. Po izolaci a přečištění produktu **24a** byl výtěžek 78 %. Takto připravený alkohol jsme použili k ochránění pomocí TBDMSOTf. Reakce probíhala také bez problémů již za laboratorní teploty a výtěžek čisté látky **24b** byl 80%.

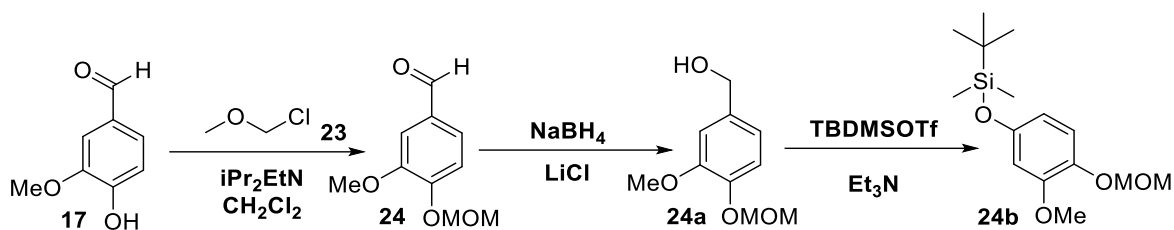


Schéma 14 Chránění vanilinu MOM-Cl, redukce aldehydu a chránění vzniklého alkoholu pomocí TBDMSOTf

Tímto postupem se nám podařilo ochránit vanilin a izolovat jej ve vysokém výtěžku a dobré čistotě.

Jedinou nevýhodou tohoto postupu bylo, že při něm nezůstávala zachována volná fenolická -OH skupina. Ta je nutná pro průběh CDC couplingu a proto ji bylo potřeba zpětně selektivně ochránit. Původně jsme předpokládali, že by to neměl být problém kvůli vyšší stabilitě TBDMS oproti MOM v kyselém prostředí. Nakonec se ukázalo, že v našem případě tomu takto není. V prostředí HCl jsme po zpracování vzorku zjistily, že odpadají obě chránicí skupiny současně. Poté jsme zkoušeli odstranit MOM pomocí  $\text{FeCl}_3$ . V tomto případě k selektivnímu ochránění MOM skupiny došlo, ale naměřená spektra neodpovídala struktuře vanilinu, který se pravděpodobně při reakci rozložil. Z toho důvodu jsme byly nuceni upustit i od tohoto postupu chránění.

Naskytla se však možnost, jak tento problém obejít. Podařilo se nám najít postup, při kterém byl TBDMS selektivně ochráněn pouze alifatický hydroxyl (Schéma 15). Tím pádem bylo možné úplně vynechat reakci s MOM-Cl. Redukovaný vanilin **17e** jsme nechali v tomto případě reagovat ihned s TBDMSCl (*tert*-butyldimethylsilyl chlorid) v přítomnosti imidazolu za vzniku produktu **17d**, který byl vhodný pro použití v CDC couplingu. I za cenu většího množství reakčních kroků jsme našli způsob, jak selektivně ochránit vanilin, aby jej bylo možné použít pro CDC coupling.

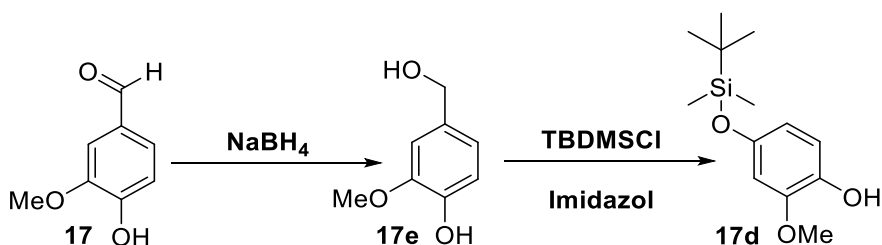


Schéma 15 Selektivní ochránění alifatického hydroxyly bez nutnosti použít MOM-Cl

## 3.2 Příprava $\beta$ -ketoesteru **19** pro CDC coupling

Druhou, pro CDC coupling nepostradatelnou látkou byl  $\beta$ -ketoester **19** (Schéma 16). Jeho příprava vycházela ze syringaldehydu **18** a vedla přes větší počet reakčních kroků. Nejprve bylo potřeba ochránit fenolický hydroxyl aldehydu **18** ve formě MOM chránicí skupiny. Následovalo zavedení methylové skupiny na karbonyl (adice methylolithia, MeLi) na produkt **18b** a oxidace vzniklého benzylického sekundárního alkoholu **18b** na  $\beta$ -ketoester **19**. Bylo potřeba otestovat více reakčních cest, protože tato reakce není triviální a potřebovala více pozornosti, než jsme byly schopni získat produkt **19** v dobrém výtěžku a čistotě. Jednotlivé reakční kroky budou více rozvedeny v dalších kapitolách.

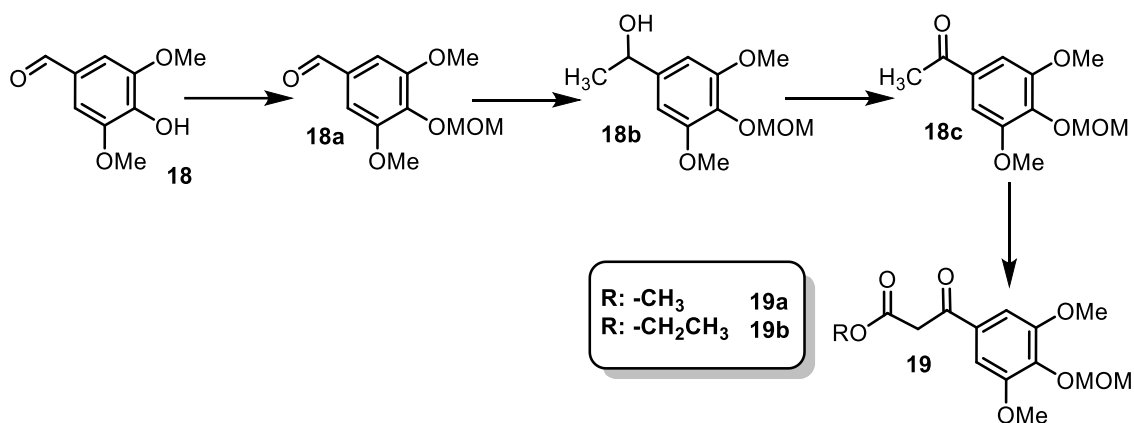


Schéma 16 Návrh syntézy  $\beta$ -ketoesteru **19**

### 3.2.1 Příprava produktu **18a**

Vycházeli jsme z čistého syringaldehydu **18**, na kterém bylo potřeba před dalšími reakčními kroky ochránit fenolický hydroxyl (Schéma 17). Pro chránění jsme zvolili MOM-Cl, který byl připraven podle postupu v kapitole 3.1.3 Schéma 13. Chránění probíhalo stejným způsobem jako v případě vanilinu v předchozí kapitole a výtěžek se blížil kvantitativnímu. Při delším skladování (5 měsíců, laboratorní teplota) MOM chráněného syringaldehydu **18a** jsme zjistily, že tato látka není zcela stabilní a MOM postupně ztrácí. To jsme vyřešili zopakováním MOM chránění. Částečně rozložený produkt jsme znovu rozpustili a do roztoku přidali čerstvou dávku MOM-Cl, který znovu ochránil volné -OH skupiny.



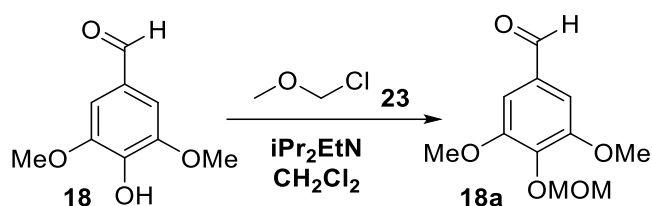


Schéma 17 Chránění syringaldehydu pomocí MOM-Cl

### 3.2.2 Příprava produktu 18b

V tomto reakčním kroku se jednalo o alkylační reakci na karbonylu pomocí MeLi (Schéma 18). Produkt **18a** jsme rozpustili v bezvodém diethyletheru. Po přidání methyllithia došlo v reakční směsi k vysrážení žluté sraženiny. Jak jsme zjistili, k zajištění reprodukovatelnosti reakce je vhodné použít čerstvé methyllithium. Při použití starého, které bylo pravděpodobně částečně hydrolyzováno, už reakce neprobíhala dobře a muselo být použito více ekvivalentů reagentu. Reakci jsme opakovali 5 krát a pokusili jsme se optimalizovat reakční podmínky. V prvních experimentech jsme reakci prováděli za laboratorní teploty a ukončovali ji po 15 minutách. V tomto případě se výtěžky produktu **18b** pohybovali okolo 50-60 %. V posledních dvou experimentech jsme ve fázi přidávání methyllithia vyzkoušeli ochladit reakční směs na 0°C a následně ji nechali ohřívat samovolně na laboratorní teplotu. Reakce probíhaly vždy 18 hodin. V obou těchto případech byl výtěžek produktu blízký 90 %.

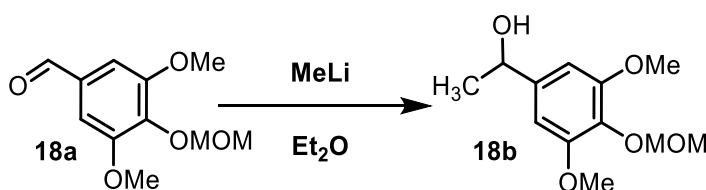


Schéma 18 Příprava meziprojektu 18b

### 3.2.3 Příprava produktu 18c

Přípravou meziprojektu **18b** jsme se v syntéze posunuli zas o krok dále. Následovala oxidace -OH skupiny na keton (Schéma 19). První oxidační činidlo, které jsme zkoušeli byl pyridinium chlorochromát (PCC). S ním jsme provedli 2 reakce. První sloužila k potvrzení, že vzniká produkt. Další jsme už vyzkoušeli ve větší navážce výchozích látek tak abychom mohli uvést výtěžek reakce. Po přidání PCC se změnilo zabarvení z bezbarvé až téměř na černou a po celý průběh reakce (24h) zůstalo konstantní. Izolovaný produkt **18c** byl znečištěn vedlejšími produkty oxidace a bylo třeba jej přecistit na koloně. Výtěžek po izolaci byl 54 %. Z toho důvodu byla nutností další

optimalizace. Následně jsme k oxidaci použili Dess–Martin perjodnan (DMP). Po zpracování reakční směsi a izolaci byl produkt opět silně znečištěn a byla z něj cítit kyselina octová. Výtěžek produktu po čištění byl 37 %. Rozhodli, jsme se otestovat, zdali se produkt v reakční směsi nerozkládá vlivem přítomného kyselého prostředí. K následující reakci jsme opět použili PCC, protože s ním byl původně výtěžek produktu vyšší. Navíc jsme do reakční směsi přidali octan sodný (AcONa), který sloužil v reakci jako pufr. Reakce probíhala přes noc za laboratorní teploty. Produkt **18c** se nám podařilo izolovat ve vysoké čistotě a výěžku 97 % bez nutnosti čištění na koloně. To potvrdilo předpoklad, že reakce je v tomto případě citlivá na příliš nízké hodnoty pH při kterých s velkou pravděpodobností dochází z důvodu aktivace aromatického jádra k deMOMaci či demethylaci(im).

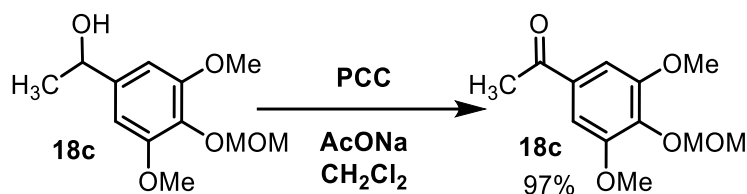


Schéma 19 Příprava meziproduktu **18c**

### 3.2.4 Příprava $\beta$ -ketoesteru **19**

Po zvládnutí přípravy meziproduktu **18c** nám už nic nebránilo přistoupit k syntéze  $\beta$ -ketoesteru **19**. Rozhodli jsme se vyzkoušet reakci s dimethylkarbonátem, která měla s látkou **18c** poskytovat podle návrhu produkt **19a** (Schéma 20).

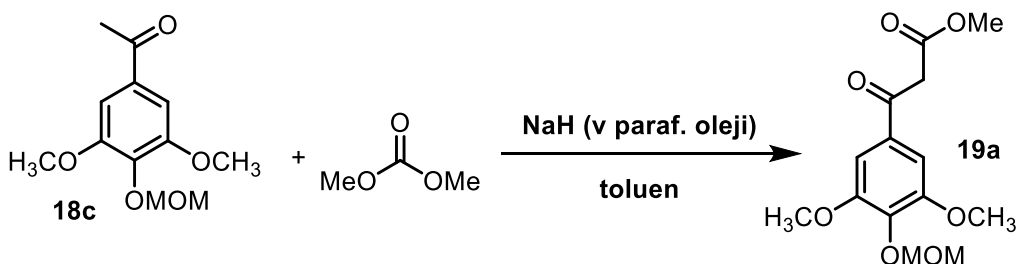


Schéma 20 Příprava  $\beta$ -ketoesteru **19a**

Reakci jsme provedli nejprve jako testovací, abychom potvrdili, že probíhá. V dalších opakováních jsme navážky výchozích látek postupně zvyšovali. Testovali jsme závislost reakční teploty na výtěžku reakce. Při 95°C se podle TLC analýzy neprojevovali žádné změny. Při zvýšení teploty na 120°C začala reakce probíhat. Ukončili jsme ji po 1 hodině a izolovali produkt. Ten nebyl po izolaci čistý a bylo jej třeba chromatograficky rozdělit od nečistot. Po odpaření rozpouštědel byl však výtěžek

pod 30%. Reakci jsme opakovali ve větším množství a nechali ji probíhat přes noc. Doufali jsme, že by to mohlo mít kladný vliv na výtěžnost. Ta však zůstala po izolaci na koloně úplně stejná.

To bylo impulzem k hledání nových postupů, které by poskytovali  $\beta$ -ketoester ve větších výtěžcích. Rozhodli jsme se vyzkoušet reakci produktu **18c** s ethyl chloroformátem (Schéma 21). Předpokladem bylo, že ethyl chloroformát bude mnohem reaktivnější než předtím použitý dimethylkarbonát. Tím pádem dostaneme vyšší výtěžek produktu **19b**. Při reakci se ukázalo, že reaktivita ethyl chloroformátu byla pro naše účely možná až příliš vysoká. Po zpracování jsme analyzovali pestrou škálu reakčních produktů, mezi kterými byla obsažena i látka **19b**. V tomto případě ji ale nemělo smysl izolovat, protože její obsah ve směsi byl spíše minoritní. Z toho důvodu nebylo vhodné používat tuto reakci k její přípravě.

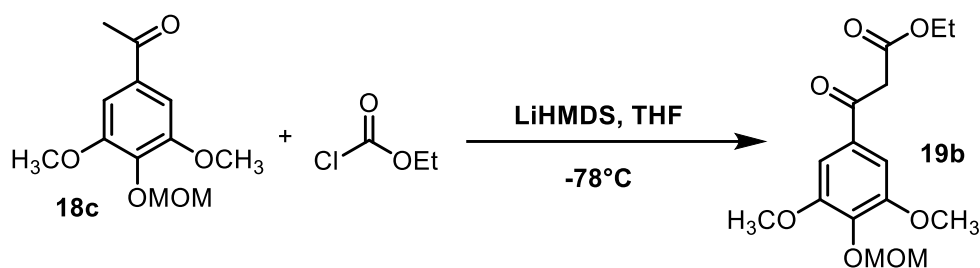


Schéma 21 Příprava  $\beta$ -ketoesteru **19b** reakcí s ethyl chloroformátem

Po tomto neúspěchu jsme se rozhodli vyzkoušet úplně nový přístup s využitím Claisenovy kondenzace. Vycházeli jsme z chráněného syringaldehydu, který reagoval s bezvodým ethylacetátem v bazickém prostředí. Produktem byl  $\beta$ -hydroxyester, jehož -OH skupina byla následně oxidována na keton za vzniku  $\beta$ -ketoesteru **19** (Schéma 22).

Reakci jsme provedli se dvěma rozdílně chráněnými substráty (Schéma 22, reakce (a) a (b)). Výchozími látkami byl MOM chráněný syringaldehyd **18a**, který jsme měli připravený předem (kapitola 3.2.1). Zbývalo ochránit syringaldehyd pomocí TBDMSOTf. Tato reakce probíhala s téměř 100 % výtěžkem a získaný produkt **18e** jsme po izolaci použili rovnou do další reakce. Kritickým krokem obou reakcí byla kondenzace s ethyl acetátem. Reakce jsme prováděli v bezvodém prostředí při -78°C po dobu 4 hodin. Ani v jednom případě však nedošlo ke tvorbě produktu  $\beta$ -hydroxyesteru. Reakce (a) neprobíhala vůbec. V případě reakce (b) došlo k úbytku výchozí látky **18e** ale vznikala pestrá směs produktů. Cílový produkt **19c** bohužel mezi nimi přítomen nebyl. Z toho důvodu jsme se touto reakční cestou dále nezabývali.

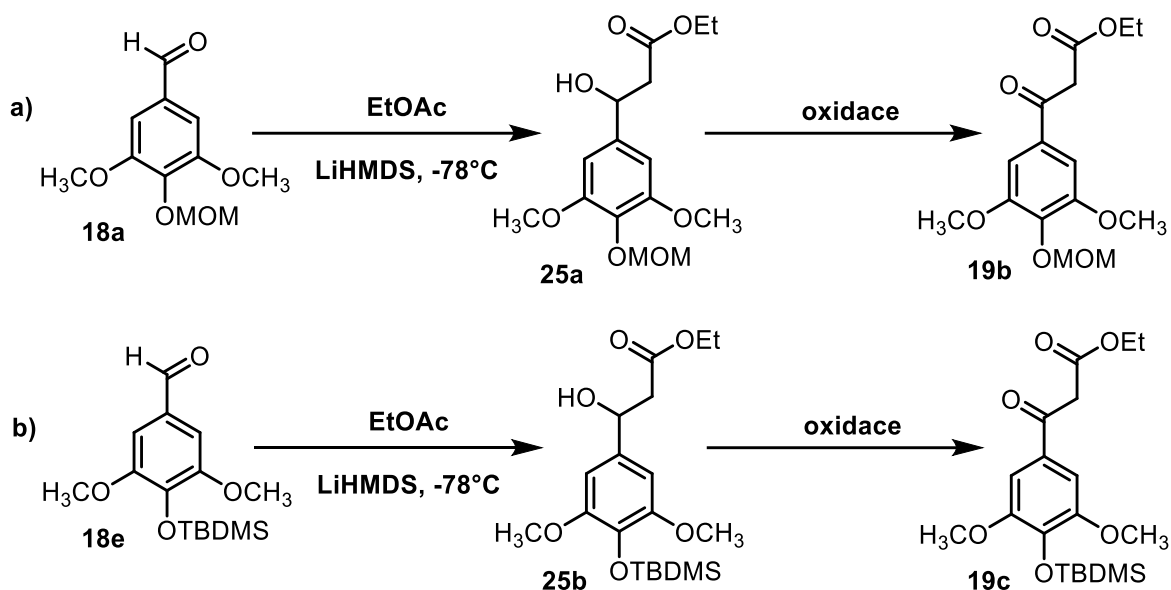


Schéma 22 Příprava  $\beta$ -ketoesteru **19b** a **19c** Claisenovou kondenzací

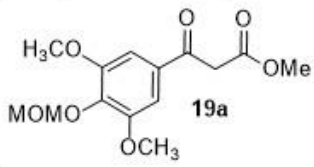
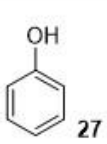
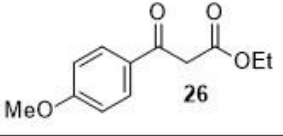
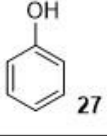
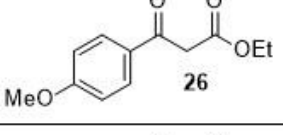
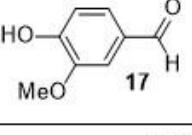
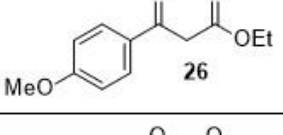
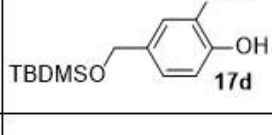
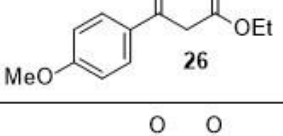
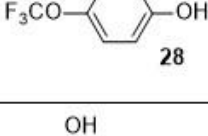
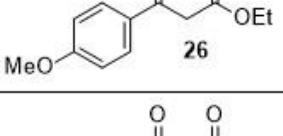
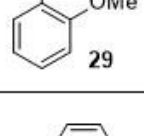
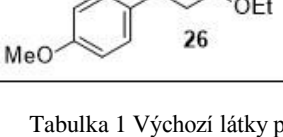
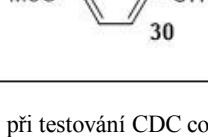
$\beta$ -ketoester **19** se nám podařilo připravit pouze v reakci s dimethylkarbonátem, i když ne ve vysokém výtěžku. Výtěžky surového produktu však byly dobré a látka se ztrácela při čištění na koloně. Předpokládáme, že toto je způsobeno velikou citlivostí poměrně značně elektronově bohatého  $\beta$ -keto esteru **19** na kyselé podmínky (silika gel). Předpokládáme, že pakliže bychom použili fluorosil na úkor silika gelu ( $F^-$  dotovaný silikagel) tak by se měli izolované výtěžky zvýšit. Jedinou věcí, která mluvila proti použití této stacionární fáze pro sloupcovou chromatografii byla její cena.

Uvažovali jsme tedy, jak tuto fázi (čištění na sloupcové chromatografii) obejít. Analýzou produktu jsme zjistili, že největší podíl nečistot připadá na parafinový olej, který je přidáván do reakce ve směsi s NaH. Zopakovali jsme reakci s dimethylkarbonátem, ale přidávaný NaH jsme nejprve promyli hexanem a tím ho oleje zbavili. Reakce proběhla bez problémů a další separace na koloně nebyla nutná, protože produkt byl dostatečně čistý pro následující reakce.

### 3.3 CDC coupling

Úspěšným ochráněním vanilinu a zvládnutím přípravy  $\beta$ -ketoesteru jsme se posunuli k CDC couplingu, ústřední reakci celé syntézy boehmenanu D. Bylo potřeba najít reakční podmínky, které by poskytovali vysoký výtěžek produktu a zároveň nezabraňovali jeho izolaci z reakční směsi. Zároveň jsme chtěli, aby při reakci vznikl

benzofuran i v případě, že použijeme výchozí látky s různou substitucí. Souhrnný přehled všech kombinací výchozích látek, které jsme testovali, ukazuje Tabulka 1.

	$\beta$ -ketoester	fenol	výtěžek
a)	 <b>19a</b>	 <b>27</b>	nereaguje
b)	 <b>26</b>	 <b>27</b>	96 %
c)	 <b>26</b>	 <b>17</b>	nereaguje
d)	 <b>26</b>	 <b>17d</b>	nereaguje
e)	 <b>26</b>	 <b>28</b>	30 %
f)	 <b>26</b>	 <b>29</b>	nereaguje
g)	 <b>26</b>	 <b>30</b>	40 %

Tabulka 1 Výchozí látky použité při testování CDC couplingu

Nejprve jsme vyzkoušeli coupling výchozích látek **19a** a **27**. Chtěli jsme otestovat, zda bude reakce s námi připraveným  $\beta$ -ketoesterem **19a** probíhat. Jelikož jsme měli v zásobě pouze malé množství TBDMS chráněného vanilinu **17d**, rozhodli jsme se nejprve použít fenol **27**, kterého jsme měli dostatečné množství, a nemohl svojí substitucí ovlivňovat průběh reakce. Reakce probíhala v bezvodém DCE za katalýzy železitými ionty v komplexu s NHPI a byla zahájena homolytickým štěpením DTBP při vysoké teplotě (Schéma 23).

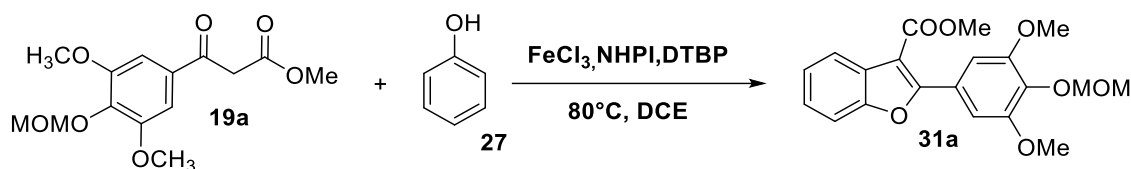


Schéma 23 Tvorba benzofuranu **31a** CDC couplingem látek **19a** a **27**

Reakci jsme opakovali 2krát, ale ani v jednom případě nebyl produkt **31a** získán, ani nebyla detekována jeho přítomnost v surové reakční směsi. To naznačovalo, že reakce neprobíhá buď z důvodu špatně nastavených reakčních podmínek, nebo použití nevhodných výchozích látek. V zásobě jsme měli komerčně dostupný *para* substituovaný  $\beta$ -ketoester **26** neobsahující žádné *ortho* substituenty. Rozhodli jsme se nechat reagovat tento substrát s fenolem **27**. Reakce, která probíhala za shodných reakčních podmínek jako předcházející reakce měla ovšem zcela nečekaný průběh. Již v průběhu reakce bylo podle TLC analýzy reakční směsi možné pozorovat vznik produktu **31b** (Schéma 24), který pod UV zářením na rozdíl od ostatních látek intenzivně tyrkysově fluoreskoval. Následnou NMR analýzou jsme potvrdili jeho strukturu. Výtěžek této reakce byl 96 %.

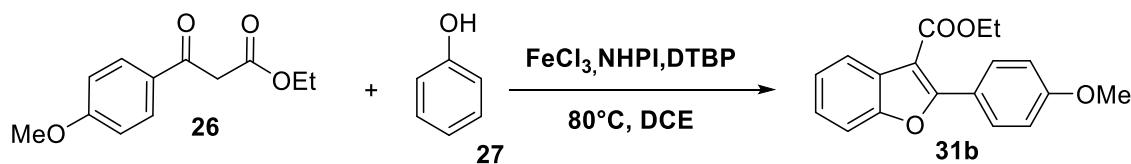


Schéma 24 Tvorba benzofuranu **31b**

Tímto se nám podařilo dokázat, že za použitých reakčních podmínek je možné připravit benzofuran a to ve vysokém výtěžku. Zároveň jsme zjistili, že reakce je citlivá na polohy substituentů na benzenovém jádře  $\beta$ -ketoesteru. Pokud je jádro substituované pouze v *para*- poloze, reakce probíhá. Substituce polohy *-meta* však couplingu brání.

Dále jsme se rozhodli používat  $\beta$ -ketoester **26** se kterým CDC coupling probíhal a vyzkoumat vliv substituce fenolu. Při použití nechráněného i chráněného vanilinu (řádek **c** a **d** Tabulka 1) se reakce vůbec nerozběhla a v reakční směsi jsme analyzovali pouze výchozí látky. Toto jsme očekávali u nechráněného vanilinu **17**, jehož volný aldehyd snižuje elektronovou hustotu na benzenovém jádře a tím pádem na něm příliš stabilizuje vzniklý radikál nebo naopak znesnadňuje jeho vznik. Zaujalo nás však, že reakce neprobíhala ani v případě, že byl tento efekt eliminován chráněním pomocí TBDMS (**17d**). To naznačovalo, že na reaktivitu mají vliv nejenom elektronické

vlastnosti substrátů ale také sterické vlastnosti a poloha. Provedli jsme sérii reakcí s různě substituovanými fenoly (řádky **e,f,g**, Tabulka 1) a sledovali, zdali bude vznikat benzofuran. V případě *para*- substituovaných fenolů **28** a **30** benzofuran vznikal, i když pouze s 30-40 % výtěžky. Pokud však byla methoxy skupina vázána v *ortho*- poloze oproti reagujícímu fenolu (**29**), cílový produkt nebyl pozorován.

Pomocí těchto experimentů jsme ukázali, že použití CDC couplingu pro tvorbu benzofuranů je možné a v určitých případech i výhodné. Na druhou stranu velmi závisí na substituci výchozích látek, které hodláme CDC couplingu podrobit. V případě  $\beta$ -ketoesteru je reakce zpomalena elektrondonorními substituenty v poloze *meta*. Poloha *para*- naopak na reaktivitu vliv nemá.

V případě fenolů se je potřeba se vyvarovat použití derivátů, které jsou substituovány elektrondonorní skupinou v poloze *ortho*. Opět nevedí substituce do polohy *para*.

Pro syntézu boehmenanu D je to však velmi zásadní poznatek. Znamená to totiž, že pro CDC coupling nelze použít vanilin jako výchozí látku. Tento fenol má totiž *ortho* methoxy skupinu. Abychom však připravili boehmenan D, na benzofuranu je methoxy skupina v této poloze nezbytná. S touto znalostí by bylo vhodné nalézt jiný postup tvorby benzofuranu, který by vůbec CDC coupling nepoužíval.

## 4 Experimentální část

### 4.1 Obecné informace

Pokud není uvedeno jinak, všechny experimenty byly prováděny v bezvodém prostředí pod argonovou atmosférou, která byla udržována v reakční nádobě v mírném přetlaku. Použitá rozpouštědla byla zbavená zbytkové vlhkosti pomocí standardních sušících protokolů.

K čištění látek pomocí sloupcové chromatografie jsme použili silikagelu jako stacionární fáze. Velikost kolony byla vybrána na základě množství vzorku, které jsme čistili. Frakce byly jímány po 5-20 ml a obsah každé z nich byl monitorován pomocí TLC chromatografie. Frakce obsahující stejný produkt jsme spojili a odpařili na rotační vakuové odparce (RVO).

Na měření NMR spekter jsme použili spektrometr značky JEOL ECA400II.  $^1\text{H}$  spektra jsme měřili při frekvenci 399,78 MHz a  $^{13}\text{C}$  spektra při 100,53 MHz za laboratorní teploty v deuterovaném chloroformu  $\text{CDCl}_3$  nebo dimethylsulfoxidu  $\text{DMSO-d}_6$ . Ke kalibraci naměřených  $^1\text{H}$  NMR spekter jsme použili posuny zbytkového nedeuterovaného  $\text{CHCl}_3$  a  $\text{DMSO-d}_5$ :  $\text{CDCl}_3$  (7,27ppm),  $\text{DMSO-d}_6$  (2,52ppm). Uhlíková spektra byla kalibrována pomocí charakteristického signálu uhlíku rozpouštědla  $^{13}\text{C}$  substituovaného atomy deuteria. Tyto posuny byly následující:  $\text{CDCl}_3$  (77,16 ppm prostřední signál),  $\text{DMSO-d}_6$  (39,52 ppm prostřední signál).

Průběh reakcí byl sledován pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC) na silikagelových deskách. TLC desky byly aluminiové, pokryté silikagelem 60 SIL G/UV<sup>254</sup> s fluorescentním indikátorem. Jednotlivé analyzované látky byly dále vizualizovány pomocí TLC vizualizačních roztoků

Pro LC–MS analýzu posloužil hmotnostní spektrometr TSQ Quantum ACCES (Thermo Scientific, USA) a ACQUITY UPLC, PDA/QDA (Waters, USA). HRMS data byla získána pomocí quadrupol/iontové pasti hmotnostního spektrometru.

Teploty tání byly proměřeny na Boetiově bloku a nebyly korigovány.

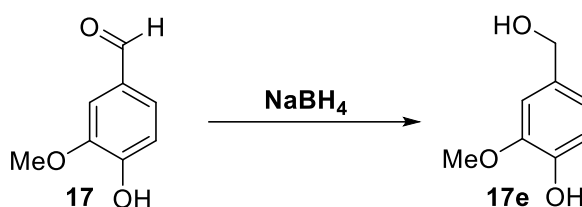


## 4.2 TLC vizualizační roztoky

- a) Zásaditý roztok KMnO<sub>4</sub> jsme připravili rozpuštěním 9 g KMnO<sub>4</sub> a 20 g K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ve 150 ml 10% NaOH
- b) Vanilinový roztok jsme připravili rozpuštěním 15g vanilinu v 250 ml bezvodého ethanolu a přidali 2,5 ml koncentrované H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.
- c) Roztok *p*-anisaldehydu jsme připravili smísením 135 ml absolutního ethanolu s 5 ml koncentrované H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1,5 ml ledové kys. octové a 3,7 ml *p*-anisaldehydu.

## 4.3 Reakční cesta k ochráněnému vanilinu 17d

### 4.3.1 4-(hydroxymethyl)-2-methoxyfenol (17e)



Roztok vanilinu (13,1 mmol, 1 equiv.) v bezvodém methanolu byl ochlazen na 0°C. Následně byl do reakční směsi po částech přidán NaBH<sub>4</sub> (26,3 mmol, 2 equiv.). Chlazení bylo ponecháno po dobu dalších 10 minut a poté bylo odstraněno. Při laboratorní teplotě se směs míchala ještě 1 hodinu. Následně byl přidán ethyl acetát (63 ml) a nasycený roztok NH<sub>4</sub>Cl (35 ml). Směs se rozdělila na dvě vrstvy a horní, organická vrstva byla odebrána a promyta solankou (10 mL). Poté byla vysušena bezvodým MgSO<sub>4</sub> a odpařena na RVO. Produktem po odpaření byl nažloutlý olejíček. Přidáním malého množství ethyl acetátu došlo k vykrytalizování bílých krystalů, které byly odsáty a vysušeny. Výtěžek produktu byl 99 %.

B.t. = 114 – 115 °C

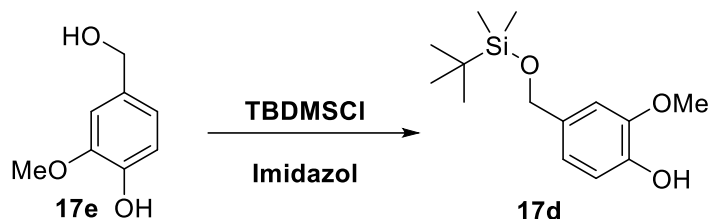
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 8.77 (s, 1H), 6.87 (s, 1H), 6.71 (s, 2H), 4.98 (s, 1H), 4.37 (s, 2H), 3.74 (s, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm) 147.4, 145.3, 133.5, 119.1, 115.1, 111.1, 62.9, 55.5.

MS (ESI): *m/z* (%) 155 [M+H]<sup>+</sup>, 193 [M+K]<sup>+</sup>

HRMS (ESI) vypočítaná pro C<sub>8</sub>H<sub>11</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 155.0703; změřená 155.0708.

### 4.3.2 4-((tert-butyldimethylsilyloxy)-2-methoxyphenol (17d)



V bezvodém DMF byl rozpuštěn imidazol (13,2 mmol, 2,2 ekviv.) a do roztoku byl přidán TBDMSCl (6,6 mmol, 1,1 ekviv.) Roztok byl za laboratorní teploty míchán 10 minut. Poté byla do reakční směsi v jedné porci přidána látka **17e** (6 mmol, 1,0 ekviv). Roztok změnil barvu na žlutou a zahřál se. Reakce poté probíhala ještě 2,5 hodiny. Následně byla reakční směs naředěna solankou (20 ml) a extrahována 3 × 20 ml EtOAc. Organická vrstva byla oddělena, vysušena nad bezv. MgSO<sub>4</sub>, filtrována a odpařena na RVO. Odparek byl čištěn pomocí sloupcové chromatografie (SiO<sub>2</sub>, Hexan:EtOAc = 2:1). Výtěžek po čištění 60 %.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ (ppm): 6.93 – 6.84 (m, 2H), 6.82 – 6.74 (m, 1H), 5.52 (s, 1H), 4.66 (s, 2H), 3.89 (s, 3H), 0.94 (s, 9H), 0.09 (s, 6H).

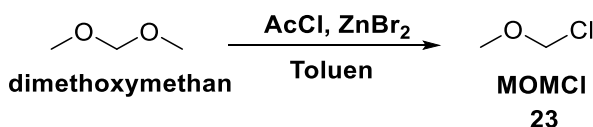
<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, Chloroform-d) δ (ppm): 146.6, 144.7, 133.6, 119.2, 114.2, 109.3, 65.1, 56.0, 26.1, 25.8, 18.6, -3.5, -5.0.

MS (ESI): m/z (%) 269 [M+H]<sup>+</sup>, 308 [M+K]<sup>+</sup>

HRMS (ESI) vypočítaná pro C<sub>14</sub>H<sub>25</sub>O<sub>3</sub>Si [M+H]<sup>+</sup>: 269,1567; změřená 269,1568.

## 4.4 Reakční cesta k β-ketoesteru 19

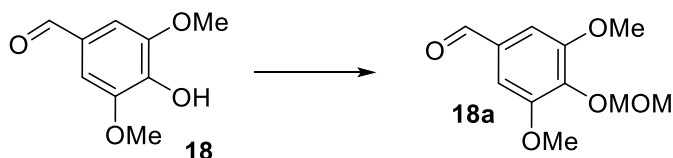
### 4.4.1 MOM chlorid (23)



MOM chlorid byl připraven reakcí dimethoxymethanu s acetylchloridem za katalýzy bromidem zinečnatým. Do bezvodého toluenu byl přidán dimethoxymethan (250 mmol, 1 ekviv.) a bromid zinečnatý (25 mmol, 0,1 ekviv.). Po rozpuštění všech složek se do směsi začal po kapkách přidávat acetylchlorid (250 mmol, 1 ekviv.) Reakční teplota

v průběhu přidávání stoupla na 60 °C a poté postupně klesala. Reakce probíhala 2-3 hodiny a po zchlazení reakční směsi na laboratorní teplotu byla ukončena. Produkt, 2,1M roztok MOM chloridu v toluenu nebyl dále čištěn a byl použit pro všechny ostatní reakce. Molarita roztoku byla určena na základě poměru intenzity toluenové CH<sub>3</sub> skupiny a MOMové CH<sub>3</sub> skupiny v roztoku.

#### 4.4.2 3,5-dimethoxy-4-(methoxymethoxy)benzaldehyd (18a)



V tomto reakčním kroku se jednalo o ochranění fenolické skupiny syringaldehydu pomocí MOM chloridu. Ve 30 ml dichlormethanu byl rozpuštěn syringaldehyd (**18**, 27,5 mmol, 1 equiv.) a do roztoku byl přidán diisopropylethyl amin (DIPEA) (52,5 mmol, 1,9 equiv.). Následně byla teplota směsi snížena na 0°C. Po ochlazení byl přidán MOM-Cl v roztoku toluenu (42,7 mmol, 1,5 equiv.), rozdělený do tří dávek. Následně bylo odebráno chlazení a směs se ohřála na laboratorní teplotu. Takto reagovala ještě 1 hodinu. Následně bylo do reakční směsi nalito 50 ml nasyc. roztoku NH<sub>4</sub>Cl a organická vrstva byla oddělena. Vodní vrstva byla extrahována 3× 50 ml EtOAc, organické vrstvy byly spojeny, vysušeny nad bezv. MgSO<sub>4</sub>, filtrovány a odpařeny na RVO. Výtěžek 90 %.

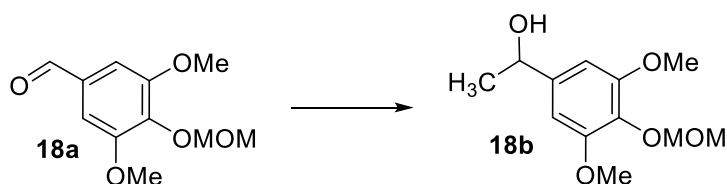
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm): 9.87 (s, 1H), 7.13 (s, 2H), 5.22 (s, 2H), 3.92 (s, 6H), 3.59 (s, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ (ppm): 191.2, 153.9, 140.2, 132.3, 106.7, 98.3, 57.4, 56.4.

MS (ESI): *m/z* (%) 227 [M+H]<sup>+</sup>, 265 [M+K]<sup>+</sup>

HRMS (ESI) vypočítaná pro C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>O<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 227,0914; změřená 227,0913.

#### 4.4.3 1-(3,5-dimethoxy-4-(methoxymethoxy)phenyl)ethan-1-ol (18b)



V bezvodém diethyletheru byl rozpuštěn produkt **18a** (4,42 mmol, 1 equiv.). Za stálého míchání byla reakční směs ochlazená na 0°C a následně byla po kapkách přidávána 1,6 M suspenze methyl lithia v diethyletheru (13,3 mmol, 3 equiv.) Po přidání bylo odstaveno chlazení a reakce byla ponechána za laboratorní teploty přes noc. Poté bylo do reakční směsi opatrně nalito 25 ml vody, což způsobilo rozklad přebytků MeLi a vývoj methanu. Zároveň reakční směs zežloutla. Po odeznění reakce byla oddělena organická vrstva. Vodní vrstva byla extrahována 3× 25 ml DCM. Extrakty byly spojeny, vysušeny nad bezv. MgSO<sub>4</sub>, filtrovány a odpařeny na RVO. Výtěžek produktu byl 87 %.

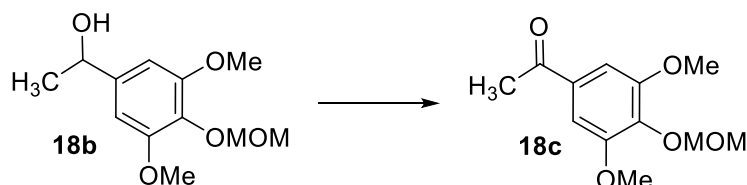
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, Chloroform-d) δ (ppm): 6.61 (s, 2H), 5.11 (s, 2H), 3.86 (s, 6H), 3.60 (s, 3H), 1.48 (d, J = 6.4 Hz, 3H).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, Chloroform-d) δ (ppm): 153.5, 142.2, 102.3, 98.2, 70.8, 57.2, 56.1, 25.3.

MS (ESI): m/z (%) 243 [M+H]<sup>+</sup>, 281 [M+K]<sup>+</sup>

HRMS (ESI) vypočítaná pro C<sub>12</sub>H<sub>19</sub>O<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 243,1227; změřená 243,1227.

#### 4.4.4 1-(3,5-dimethoxy-4-(methoxymethoxy)phenyl)ethan-1-on (**18c**)



V 10 ml DCM byla rozpuštěna látka **18c** (3,8 mmol, 1 equiv.) a zároveň byl do roztoku přidán octan sodný (1,9 mmol, 0,5 equiv.). Do dalších 10 ml DCM bylo přidáno PCC (7,7 mmol, 2 equiv.), za tvorby suspenze. Tato suspenze byla následně přidána do reakční směsi. Reakce probíhala 24 hodin za laboratorní teploty a zbarvení reakční směsi se změnilo ze žluté na tmavě hnědou. Následně bylo do reakce přidáno 2 g křemeliny a reakční směs byla zfiltrována na fritě přes 1cm hrubou křemelinovou vrstvu. K filtrátu bylo přidáno 20 ml solanky a organická vrstva byla oddělena. Vodní vrstva se extrahovala 2× 30 ml DCM, org. fáze byly spojeny, vysušeny nad bezv. MgSO<sub>4</sub>, filtrovány a odpařeny na RVO. Výtěžek byl 97 %.

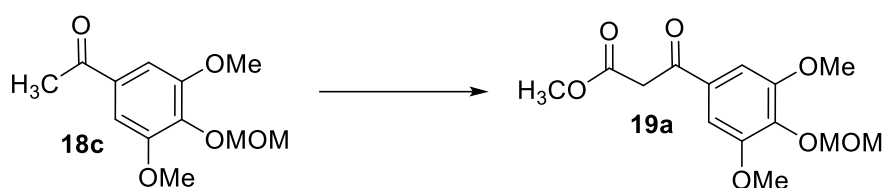
$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Chloroform-d)  $\delta$  (ppm) 7.22 (s, 2H), 5.20 (s, 2H), 3.91 (s, 6H), 3.59 (s, 3H), 2.59 (s, 3H).

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, Chloroform-d)  $\delta$  (ppm) 197.01, 191.18, 153.93, 153.30, 140.22, 139.19, 133.00, 132.28, 106.71, 105.82, 98.28, 98.24, 57.41, 56.34, 29.80, 26.55.

MS (ESI):  $m/z$  (%) 241  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 279  $[\text{M}+\text{K}]^+$

HRMS (ESI) vypočítaná pro  $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{O}_5$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 241,1071; změřená 241,1070.

#### 4.4.5 methyl-3-(3,5-dimethoxy-4-(methoxymethoxy)phenyl)-3-oxopropanoát (19a)



Výchozí látka **18c** (3,8 mmol, 1 equiv.) byla rozpuštěna v bezvodém toluenu (20 mL) pomocí ultrazvuku. V jiné nádobě byl navážen NaH (60 % suspenze v parafinovém oleji, 22,6 mmol, 6 equiv.), ke kterému bylo přidáno 30 ml n-hexanu. Vzniklá suspenze byla odsáta na fritě a promyta dalším čistým hexanem, aby byly odstraněny i zbytky parafinového oleje. Takto vyčištěný NaH byl přidán k roztoku výchozí látky. Následovalo přidávání dimethylkarbonátu (18,9 mmol, 5 equiv.) po kapkách do reakční směsi. Ta byla následně pod zpětným chladičem refluxována po dobu 16 hodin. Po zchladnutí bylo přidáno 30 ml vody okyselené kys. octovou na pH = 5 a reakční směs byla zfiltrována přes 2 cm křemeliny. Filtrát se rozdělil na 2 vrstvy a organická byla odebrána. Vodní extrahována pomocí DCM (30 mL). Organické vrstvy byly spojeny, sušeny nad bezv.  $\text{MgSO}_4$ , filtrovány a odpařeny na RVO. Výtěžek produktu 73 %.

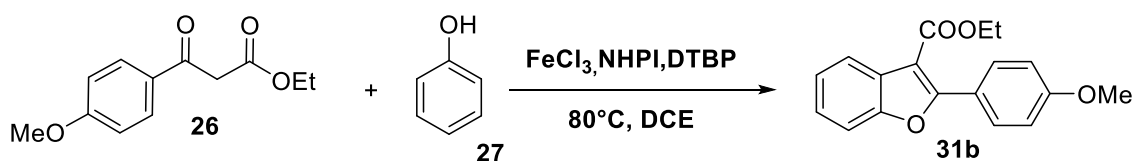
$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Chloroform-d)  $\delta$  (ppm) 7.21 (s, 2H), 5.20 (s, 2H), 3.97 (s, 2H), 3.89 (s, 6H), 3.75 (s, 3H), 3.58 (s, 3H).

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, Chloroform-d)  $\delta$  (ppm) 191.15, 168.05, 153.45, 139.80, 131.64, 106.06, 103.42, 98.23, 77.48, 57.39, 56.36, 52.69, 45.95.

MS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  (%) 299  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 337  $[\text{M}+\text{K}]^+$

HRMS (ESI<sup>+</sup>) vypočítaná pro  $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{O}_7$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 299,1125; změřená 299,1125.

## 4.5 Syntéza benzofuranu 31b



V bezvodém DCE (40 mL) byl rozpuštěn  $\beta$ -ketoester **26** (4,5 mmol, 1 equiv.) a fenol (**27**, 4,9 mmol, 1,1 equiv.). Následně byl přidán NHPI (0,225 mmol, 0,05 equiv.) a  $\text{FeCl}_3$  (0,45 mmol, 0,1 equiv.). V jiné baňce byl připraven roztok DTBP (11,24 mmol, 2,5 equiv.) v 5 ml DCE, který byl následně přidán po kapkách do reakční směsi. Reakce byla následně zahřívána na  $80^\circ\text{C}$  a ponechána takto po dobu 20 hodin. Po skončení reakce a zchlazení na laboratorní teplotu byla reakční směs zfiltrována přes 1 cm vrstvu Celitu<sup>®</sup> a následně promyta pomocí nasyceného roztoku  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (10 mL). Organická vrstva byla oddělena a vodní extrahována  $2 \times 15$  ml DCM. Organické vrstvy byly spojeny, sušeny nad bezv.  $\text{MgSO}_4$ , filtrovány a odpařeny na RVO. Výtěžek produktu byl 95 %.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, Chloroform- $d$ )  $\delta$  (ppm): 8.07 – 8.02 (m, 3H), 7.54 – 7.48 (m, 1H), 7.36 – 7.30 (m, 2H), 7.05 – 6.98 (m, 2H), 4.42 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 3.89 (s, 3H), 1.43 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H).

$^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, Chloroform- $d$ )  $\delta$  (ppm) 164.4, 161.4, 161.2, 153.7, 131.3, 127.5, 125.0, 124.0, 122.7, 122.2, 113.7, 111.1, 107.9, 60.7, 55.5, 14.5.

MS ( $\text{ES}^+$ ),  $m/z$  (%): 297 [ $\text{M}+\text{H}$ ]<sup>+</sup>, 335 [ $\text{M}+\text{K}$ ]<sup>+</sup>.

HRMS ( $\text{ESI}^+$ ) vypočítaná pro  $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{O}_4$  [ $\text{M}+\text{H}$ ]<sup>+</sup>: 297.1121, nalezeno 297.1124.

## 5 Závěr

Ve svojí práci jsem zkoumal způsoby, pomocí kterých by bylo možné interpretovat poznatky tradiční medicíny, při vývoji nových léčiv. Jednou z rostlin, která se takto tradičně využívá, je ibišek konopovitý. V nedávné době v něm byla objevena nová skupina látek (boehmenany), které mají cytostatické působení. Toto působení však nebylo nikdy testováno u synteticky připravených derivátů. Z toho důvodu je zajímavé se pokusit boehmenany připravit synteticky v opticky čisté formě a otestovat, zda působí stejně, jako ty, co byly extrahovány z rostlinného materiálu.

V experimentální části této práce jsme se o tuto syntézu pokusili. Zvolili jsme přístup, který využívá CDC couplingu při tvorbě základní benzo-furanové struktury. Radikálový průběh této reakce je podobný tomu, který se uskutečňuje při enzymatické biosyntéze boehmenanů v rostlině. V případě rostlinných enzymů tato reakce probíhá bezproblémově. V našem případě jsme však zjistili, že CDC coupling je citlivý na polohy, ve kterých jsou výchozí látky substituovány. Při vhodném uspořádání substituentů vznikají radikály velmi ochotně. Na druhou stranu, při použití nevhodně substituovaného substrátu se reakce vůbec nerozběhne. Abychom však připravili, konkrétní boehmenan, bylo potřeba vycházet z konkrétních výchozích látek, u kterých však CDC coupling neprobíhal.

Tento fakt nám zabránil připravit boehmenan D touto reakční cestou, na druhou stranu je to důležitý poznatek pro všechny, kteří se budou dále o syntézu boehmenanů pokoušet. Existuje mnoho dalších možností, jak benzo-furanový skelet připravit. V této práci sice nebyly testovány, ale otevírají novou cestu, která končí úspěšně připraveným opticky čistým boehmenanem. To je směr, kterým lze v tomto projektu pokračovat. Na základě veškerých předcházejících negativních výsledků, tedy všeho, co již bylo v této oblasti vyzkoumáno a nefungovalo přesně podle původního návrhu, budeme moci navrhnout nové a fungující přístupy.

## 6 Seznam použité literatury

- (1) Fabricant, D. S.; Farnsworth, N. R. The Value of Plants Used in Traditional Medicine for Drug Discovery. *Environ. Health Perspect.* **2001**, *109* (SUPPL. 1), 69–75. <https://doi.org/10.1289/ehp.01109s169>.
- (2) Yuan, H.; Ma, Q.; Ye, L.; et al. The Traditional Medicine and Modern Medicine from Natural Products. *Molecules* **2016**, *21* (5), 559. <https://doi.org/10.3390/molecules21050559>.
- (3) Ibarra-Alvarado, C.; Rojas-Molina, A.; García-Gasca, T.; et al. Affinin (Spilanthol), Isolated from *Heliopsis Longipes*, Induces Vasodilation via Activation of Gasotransmitters and Prostacyclin Signaling Pathways. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18* (1), 218. <https://doi.org/10.3390/ijms18010218>.
- (4) Su, X.-Z.; Miller, L. H. The Discovery of Artemisinin and the Nobel Prize in Physiology or Medicine. *Sci. China Life Sci.* **2015**, *58* (11), 1175–1179. <https://doi.org/10.1007/s11427-015-4948-7>.
- (5) Corson, T. W.; Crews, C. M. Molecular Understanding and Modern Application of Traditional Medicines: Triumphs and Trials. *Cell*. September **2007**, pp 769–774. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.08.021>.
- (6) de Nova, A. Photo 5147507 *Heliopsis Longipes* <https://www.inaturalist.org/photos/5147507> (accessed Mar 3, 2019).
- (7) Bushby, R. An arrangement of jalapeño, banana, cayenne pepper, chili, and habanero peppers. [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Arrangement\\_of\\_jalapeño,\\_banana,\\_cayenne,\\_chili,\\_and\\_habanero\\_peppers.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Arrangement_of_jalapeño,_banana,_cayenne,_chili,_and_habanero_peppers.jpg) (accessed Mar 5, 2019).
- (8) Lososová, Z. *Artemisia annua*, Pelyněk roční [http://www.botanickafotogalerie.cz/highslide/images/large/141/Artemisia\\_annua1.jpg](http://www.botanickafotogalerie.cz/highslide/images/large/141/Artemisia_annua1.jpg) (accessed Mar 4, 2019).
- (9) Raviña Rubira, E. *The Evolution of Drug Discovery: From Traditional Medicines to Modern Drugs*; Wiley-VCH, **2011**.
- (10) Schwikkard, S. L.; Mulholland, D. A. Useful Methods for Targeted Plant Selection in the Discovery of Potential New Drug Candidates. *Planta Medica*. June 12, **2014**, pp 1154–1160. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1368549>.
- (11) Takenaka, T. Classical vs Reverse Pharmacology in Drug Discovery. *BJU Int.* **2001**, *88 Suppl 2*, 7-10; discussion 49-50.
- (12) Willcox, M. L.; Graz, B.; Falquet, J.; et al. A “Reverse Pharmacology” Approach for Developing an Anti-Malarial Phytomedicine. *Malar. J.* **2011**, *10* (S1), S8. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-10-S1-S8>.
- (13) Patwardhan, B.; Mashelkar, R. A. Traditional Medicine-Inspired Approaches to Drug Discovery: Can Ayurveda Show the Way Forward? *Drug Discovery Today*. August **2009**, pp 804–811. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2009.05.009>.
- (14) Valke, D. File:Rauvolfia serpentina (505526733).jpg [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Rauvolfia\\_serpentina\\_\(505526733\).jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Rauvolfia_serpentina_(505526733).jpg) (accessed Mar 12, 2019).



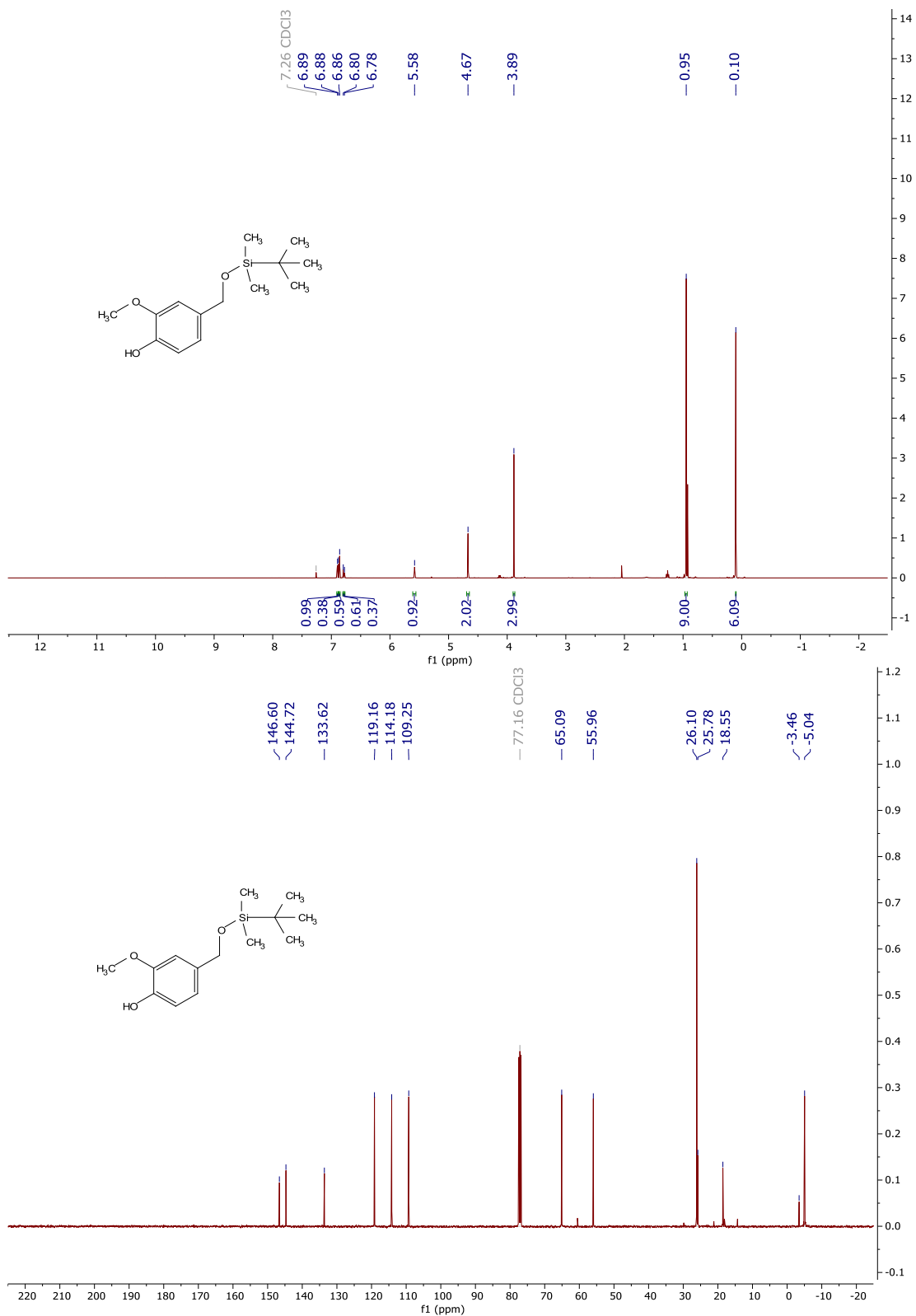
- (15) Katiyar, C.; Kanjilal, S.; Gupta, A.; et al. Drug Discovery from Plant Sources: An Integrated Approach. *AYU (An Int. Q. J. Res. Ayurveda)* **2012**, *33* (1), 10. <https://doi.org/10.4103/0974-8520.100295>.
- (16) Mahendra, J. *ETHNOMEDICAL HERBS AND VARIOUS APPROACHES IN DEVELOPMENT OF NEW DRUGS*; **2015**; Vol. 5.
- (17) Vlachogianni, T.; Loridas, S.; Fiotakis, K.; et al. *From Traditional Medicine to the Modern Era of Synthetic Pharmaceuticals. Natural Products and Reverse Pharmacology Approaches Have Expedited New Drug Discovery*; **2014**; Vol. 26.
- (18) Inbathamizh, L.; Padmini, D. E. Effect of Geographical Properties on the Phytochemical Composition and Antioxidant Potential of Moringa Oleifera Flowers. *BioMedRx* **2013**, *1* (3), 239–247.
- (19) King, S. R.; Carlson, T. J.; Moran, K. Biological Diversity, Indigenous Knowledge, Drug Discovery and Intellectual Property Rights: Creating Reciprocity and Maintaining Relationships. In *Journal of Ethnopharmacology*; **1996**; Vol. 51, pp 45–57. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(95\)01349-0](https://doi.org/10.1016/0378-8741(95)01349-0).
- (20) Bierer, D.; Carlson, T.; King, S. Shaman Pharmaceuticals: Integrating Indigenous Knowledge, Tropical Medicinal Plants, Medicine, Modern Science and Reciprocity into a Novel Drug Discovery Approach. *Netw. Sci.* **1996**, *2* (5).
- (21) Khafagi, I. K.; Dewedar, A. The Efficiency of Random versus Ethno-Directed Research in the Evaluation of Sinai Medicinal Plants for Bioactive Compounds. *J. Ethnopharmacol.* **2000**, *71* (3), 365–376. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(00\)00164-1](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(00)00164-1).
- (22) Prance, G.; Chadwick, D.; Marsh, J.; et al. *Ethnobotany and the Search for New Drugs.*; J. Wiley, **1994**.
- (23) Uma Shaanker, R.; N. Ganeshaiah, K.; T. Ramesha, B.; et al. Biodiversity and Chemodiversity: Future Perspectives in Bioprospecting. *Curr. Drug Targets* **2011**, *12* (11), 1515–1530. <https://doi.org/10.2174/138945011798109473>.
- (24) Zhu, F.; Ma, X. H.; Qin, C.; et al. Drug Discovery Prospect from Untapped Species: Indications from Approved Natural Product Drugs. *PLoS One* **2012**, *7* (7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039782>.
- (25) De Almeida, C.; Cavalcanti De Amorim, E.; De Albuquerque, U. P. Insights into the Search for New Drugs from Traditional Knowledge: An Ethnobotanical and Chemical-Ecological Perspective. *Pharm. Biol.* **2011**, *49* (8), 864–873. <https://doi.org/10.3109/13880209.2010.551777>.
- (26) Albuquerque, U. P. de; Lucena, R. F. P. Can Apparency Affect the Use of Plants by Local People in Tropical Forests? *Interciencia.* **2005**, pp 506–511.
- (27) Coley, P. D.; Heller, M. V.; Aizprua, R.; et al. Using Ecological Criteria to Design Plant Collection Strategies for Drug Discovery. *Front. Ecol. Environ.* **2003**, *1* (8), 421–428. [https://doi.org/10.1890/1540-9295\(2003\)001\[0421:UECTDP\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/1540-9295(2003)001[0421:UECTDP]2.0.CO;2).
- (28) Albuquerque, U. P.; Ramos, M. A.; Melo, J. G. New Strategies for Drug Discovery in Tropical Forests Based on Ethnobotanical and Chemical Ecological Studies. *J. Ethnopharmacol.* **2012**, *140* (1), 197–201. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.12.042>.

- (29) WELCOME TO NAPRALERT <https://www.napralert.org/> (accessed Sep 1, 2018).
- (30) NORMAN R. FARNSWORTH 1930-2011 <https://www.napralert.org/nrf/> (accessed Sep 1, 2019).
- (31) Bolzani, V. S.; Andricopulo, A. D. NuBBE - Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais <https://nubbe.iq.unesp.br/portal/nubbe-search.html> (accessed Mar 18, 2019).
- (32) Preissner, R.; Mathias, D.; Banerjee, P. SuperNatural Database V2 [http://bioinf-applied.charite.de/supernatural\\_new/index.php?site=contact](http://bioinf-applied.charite.de/supernatural_new/index.php?site=contact) (accessed Mar 18, 2019).
- (33) Li, Y. Qinghaosu (Artemisinin): Chemistry and Pharmacology. *Acta Pharmacologica Sinica*. September 27, **2012**, pp 1141–1146. <https://doi.org/10.1038/aps.2012.104>.
- (34) Bailey, C. J.; Day, C. Metformin: Its Botanical Background. *Pract. Diabetes Int.* **2004**, *21* (3), 115–117. <https://doi.org/10.1002/pdi.606>.
- (35) Michalcová, D. Galega officinalis - jestřabina lékařská [http://www.botanickafotogalerie.cz/highslide/images/large/82/Galega\\_officinalis4.jpg](http://www.botanickafotogalerie.cz/highslide/images/large/82/Galega_officinalis4.jpg) (accessed Mar 19, 2019).
- (36) Hashim, S.; Jan, A.; Marwat, K.; et al. *Phytochemistry and Medicinal Properties of Ammi Visnaga (Apiaceae)*; **2014**; Vol. 46.
- (37) Hollman, A. Amiodarone, Nifedipine, Sodium Cromoglycate. *Heart* **2007**, *65* (1), 57–57. <https://doi.org/10.1136/hrt.65.1.57>.
- (38) Obstová, B. Ammi visnaga, morač zákrovnatý [http://www.botanickafotogalerie.cz/highslide/images/large/104/Ammi\\_visnaga1.jpg](http://www.botanickafotogalerie.cz/highslide/images/large/104/Ammi_visnaga1.jpg) (accessed Mar 19, 2019).
- (39) Sneader, W. *Drug Discovery: A History*; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, **2006**. <https://doi.org/10.1002/0470015535>.
- (40) Organization, W. H. WHO Model List of Essential Medicines. (19th Edition). *World Heal. Organ.* **2015**.
- (41) Prasad, R. K. *Chemistry and Synthesis of Medicinal Agents (Expanding Knowledge of Drug Chemistry)*, 1st ed.; BookRix GmbH & Co. KG, **2017**.
- (42) Köhler, F. E. Pilocarpus pennatifolius - Köhler-s Medizinal-Pflanzen-238.jpg [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pilocarpus\\_pennatifolius\\_-\\_Köhler-s\\_Medizinal-Pflanzen-238.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pilocarpus_pennatifolius_-_Köhler-s_Medizinal-Pflanzen-238.jpg) (accessed Mar 20, 2019).
- (43) Xia, Y.; Dai, X.; Liu, H.; et al. *First Total Synthesis of Boehmenan*; **2014**; Vol. 126.
- (44) Barbušćáková, Z.; Kozubíková, H.; Zálešák, F.; et al. General Approach to Neolignan-Core of the Boehmenan Natural Product Family. *Monatshfte fur Chemie* **2018**, *149* (4), 737–748. <https://doi.org/10.1007/s00706-017-2132-4>.

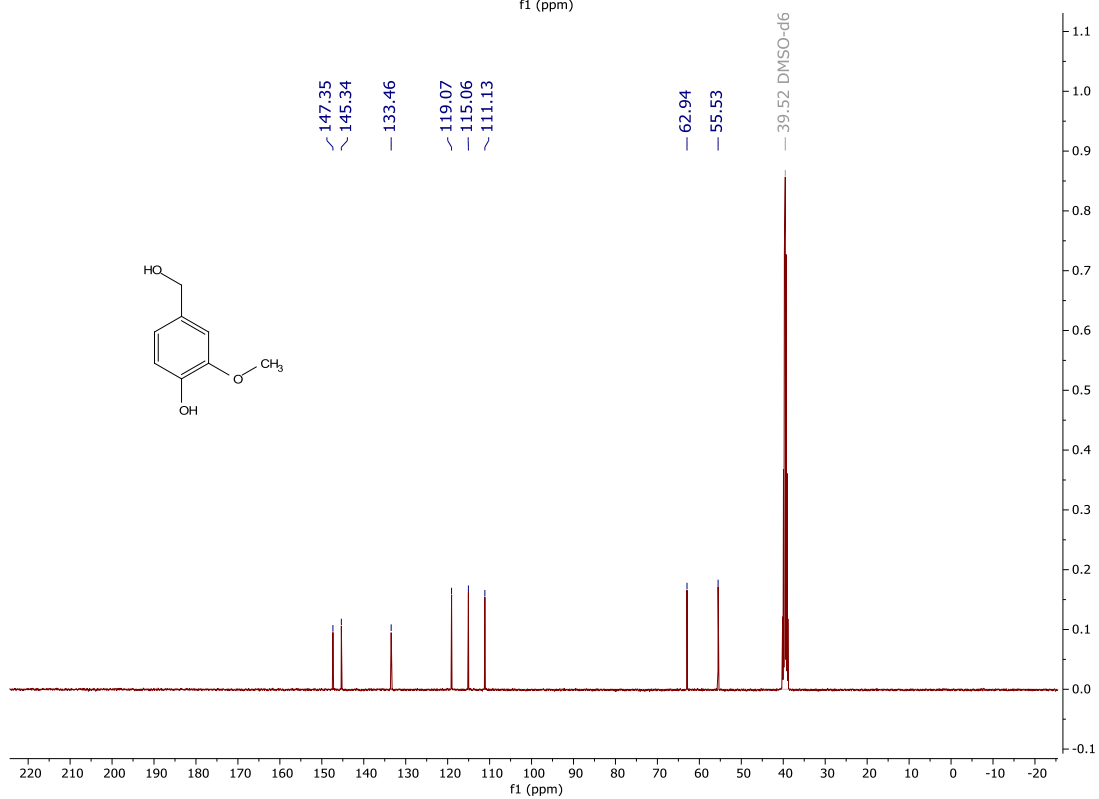
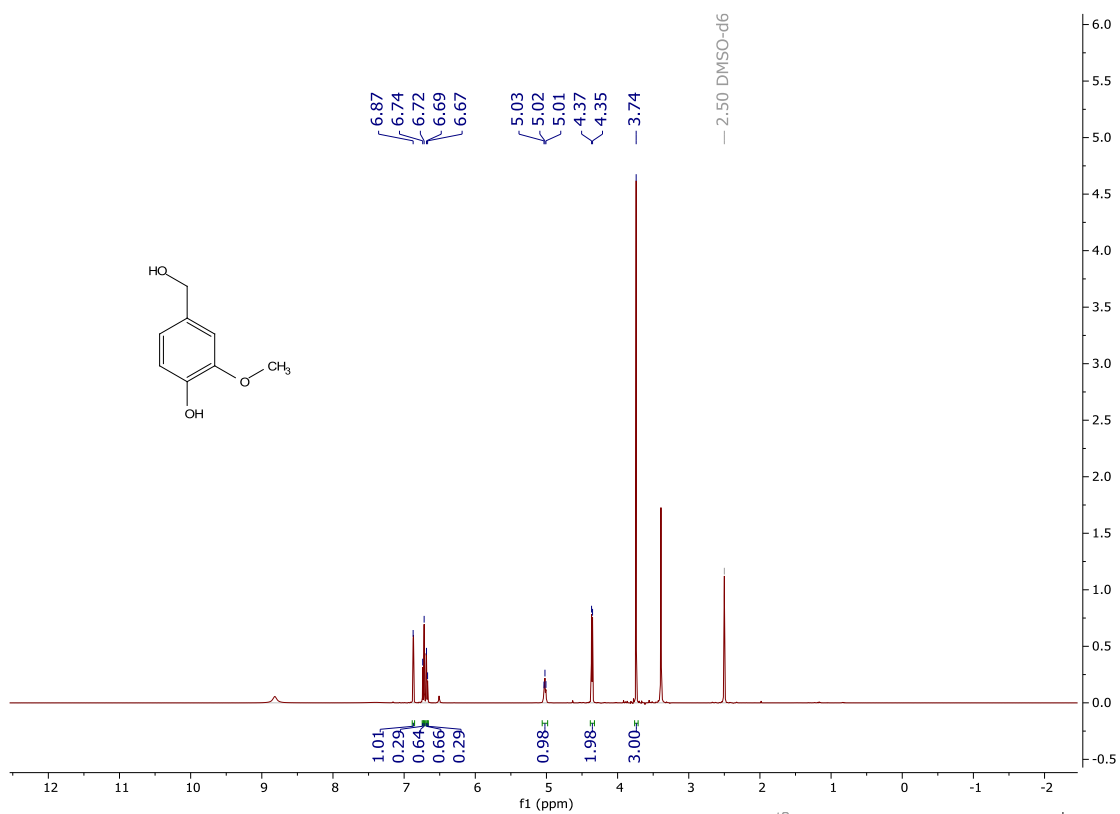
- (45) Ayadi, R.; Hanana, M.; Mzid, R.; et al. Hibiscus Cannabinus L. – Kenaf: A Review Paper. *J. Nat. Fibers* **2016**, *14* (4), 466–484. <https://doi.org/10.1080/15440478.2016.1240639>.
- (46) Darendrojit. Housoubri-2.jpg - Wikimedia Commons <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Housoubri-2.jpg> (accessed Mar 27, 2019).
- (47) Shono, T.; Ishikawa, N.; Toume, K.; et al. Boehmenan, a Lignan from Hibiscus Ficulneus, Showed Wnt Signal Inhibitory Activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25* (14), 2735–2738. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.05.037>.
- (48) Fuentes, R. G.; Arai, M. A.; Ishibashi, M. Natural Compounds with Wnt Signal Modulating Activity. *Nat. Prod. Rep.* **2015**, *32* (12), 1622–1628. <https://doi.org/10.1039/C5NP00074B>.
- (49) Pan, L.-L.; Wang, X.-L.; Zhang, Q.-Y.; et al. Boehmenan, a Lignan from the Chinese Medicinal Plant Clematis Armandii, Induces Apoptosis in Lung Cancer Cells through Modulation of EGF-Dependent Pathways. *Phytomedicine* **2016**, *23* (5), 468–476. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2016.02.006>.
- (50) Sasaki, T.; Li, W.; Morimura, H.; et al. Chemical Constituents from Sambucus Adnata and Their Protein–Tyrosine Phosphatase 1B Inhibitory Activities. *Chem. Pharm. Bull.* **2011**, *59* (11), 1396–1399. <https://doi.org/10.1248/cpb.59.1396>.
- (51) Kshirsagar, U. A.; Parnes, R.; Goldshtein, H.; et al. Aerobic Iron-Based Cross-Dehydrogenative Coupling Enables Efficient Diversity-Oriented Synthesis of Coumestrol-Based Selective Estrogen Receptor Modulators. *Chem. - A Eur. J.* **2013**, *19* (40), 13575–13583. <https://doi.org/10.1002/chem.201300389>.
- (52) Guo, X.; Yu, R.; Li, H.; et al. Iron-Catalyzed Tandem Oxidative Coupling and Annulation: An Efficient Approach to Construct Polysubstituted Benzofurans. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (47), 17387–17393. <https://doi.org/10.1021/ja907568j>.
- (53) Fischer, J.; Paul Savage, G.; Coster, M. J. A Concise Route to Dihydrobenzo[b]Furans: Formal Total Synthesis of (b)-Lithospermic Acid. *Org. Lett.* **2011**, *13* (13), 929–934. <https://doi.org/10.1021/ol201130h>.
- (54) Palaniappan, S.; Narender, P.; Saravanan, C.; et al. Polyaniline-Supported Sulfuric Acid Salt as a Powerful Catalyst for the Protection and Deprotection of Carbonyl Compounds. *Synlett* **2003**, No. 12, 1793–1796. <https://doi.org/10.1055/s-2003-41412>.
- (55) Gopinath, R.; Haque, S. J.; Patel, B. K. Tetrabutylammonium Tribromide (TBATB) as an Efficient Generator of HBr for an Efficient Chemoselective Reagent for Acetalization of Carbonyl Compounds. *J. Org. Chem.* **2002**, *67* (16), 5842–5845. <https://doi.org/10.1021/jo025701o>.
- (56) Smith, B. M.; Graham, A. E. Indium Triflate Mediated Acetalization of Aldehydes and Ketones. **2006**. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2006.10.111>.

## 7 Přílohy

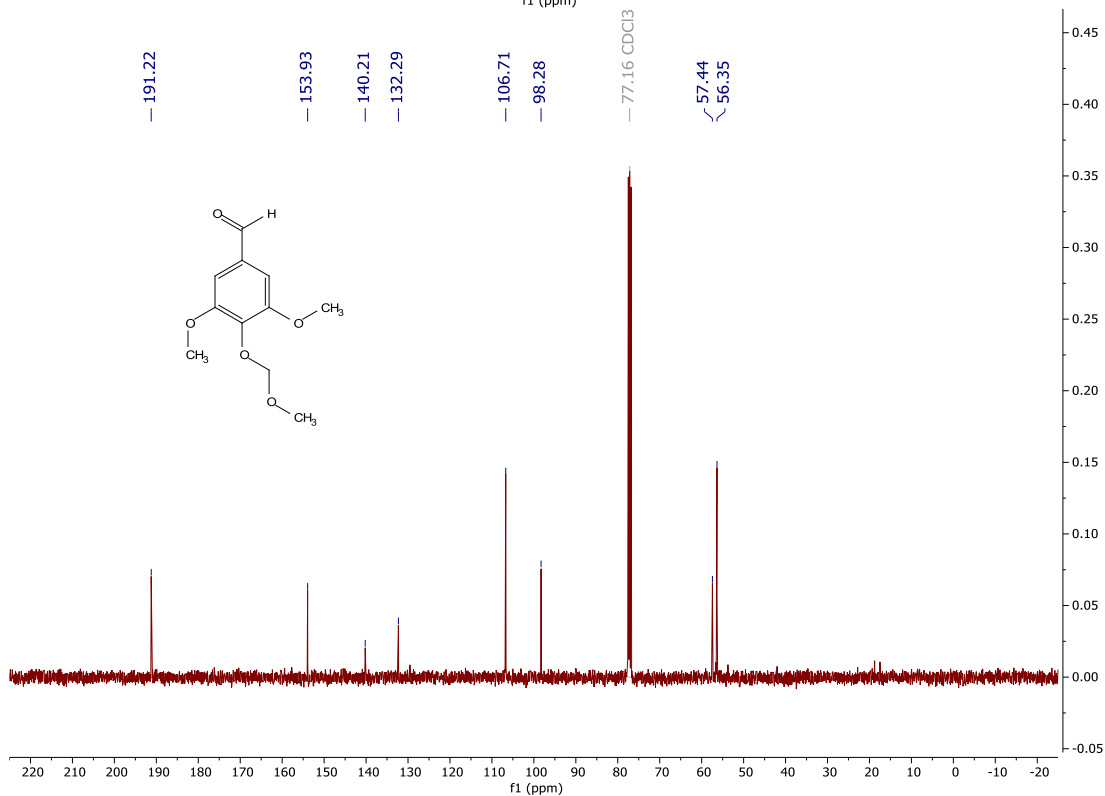
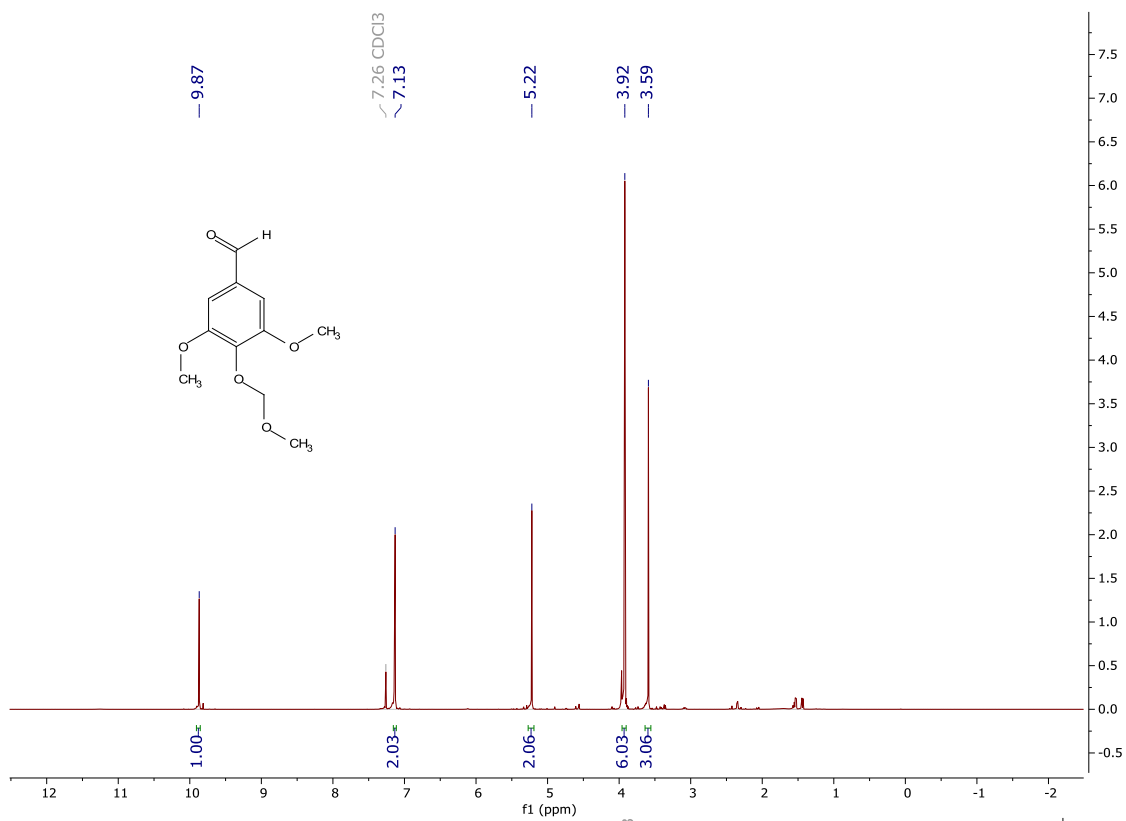
### 7.1 $^1\text{H}$ NMR a $^{13}\text{C}$ NMR spektra látky 17d



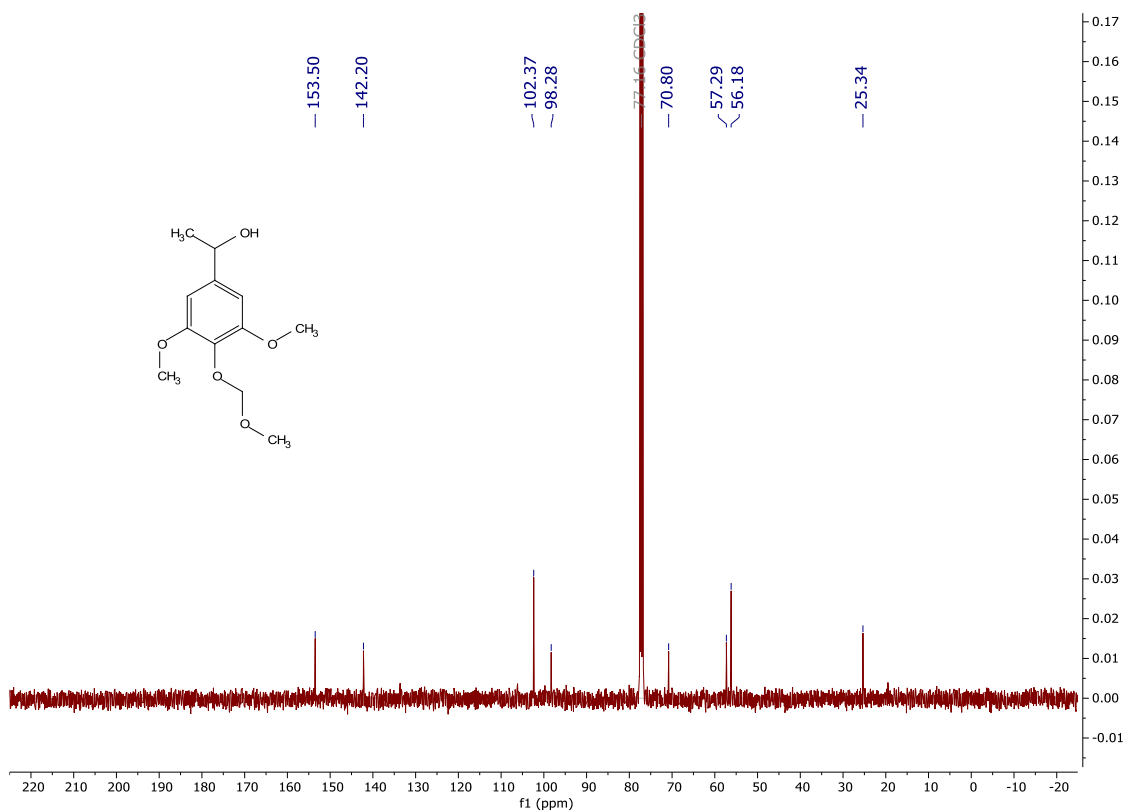
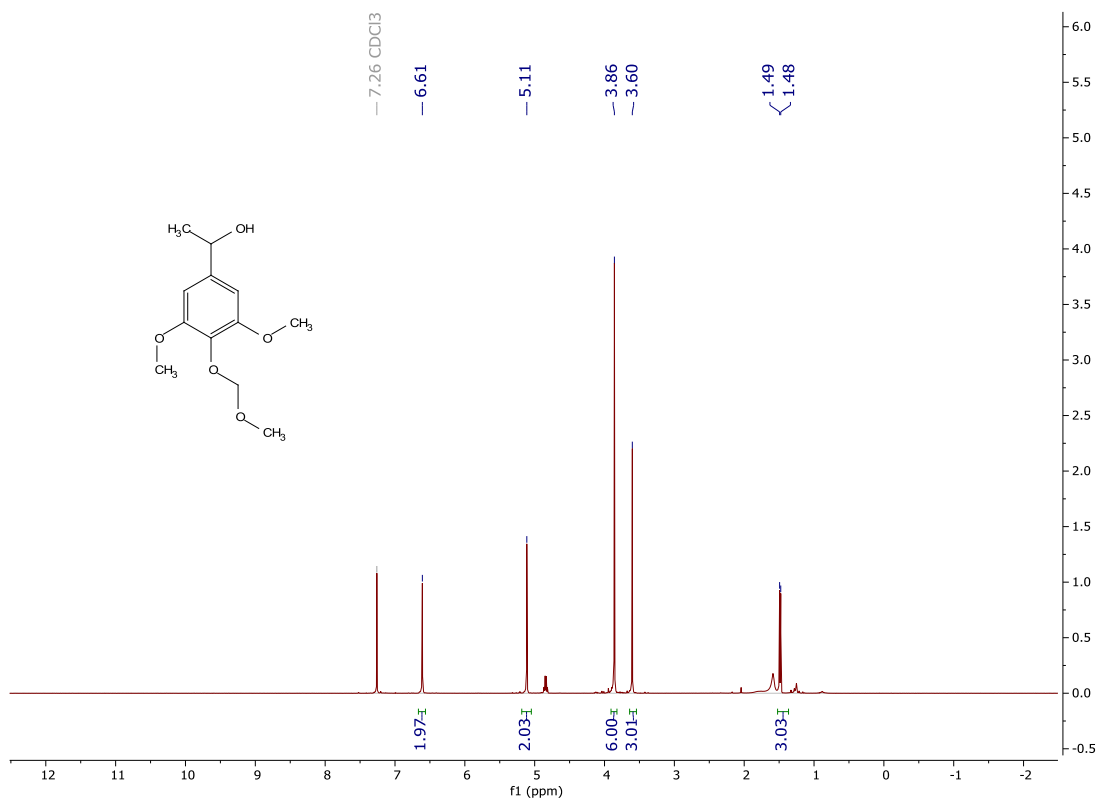
## 7.2 $^1\text{H}$ NMR a $^{13}\text{C}$ NMR spektra látky 17e



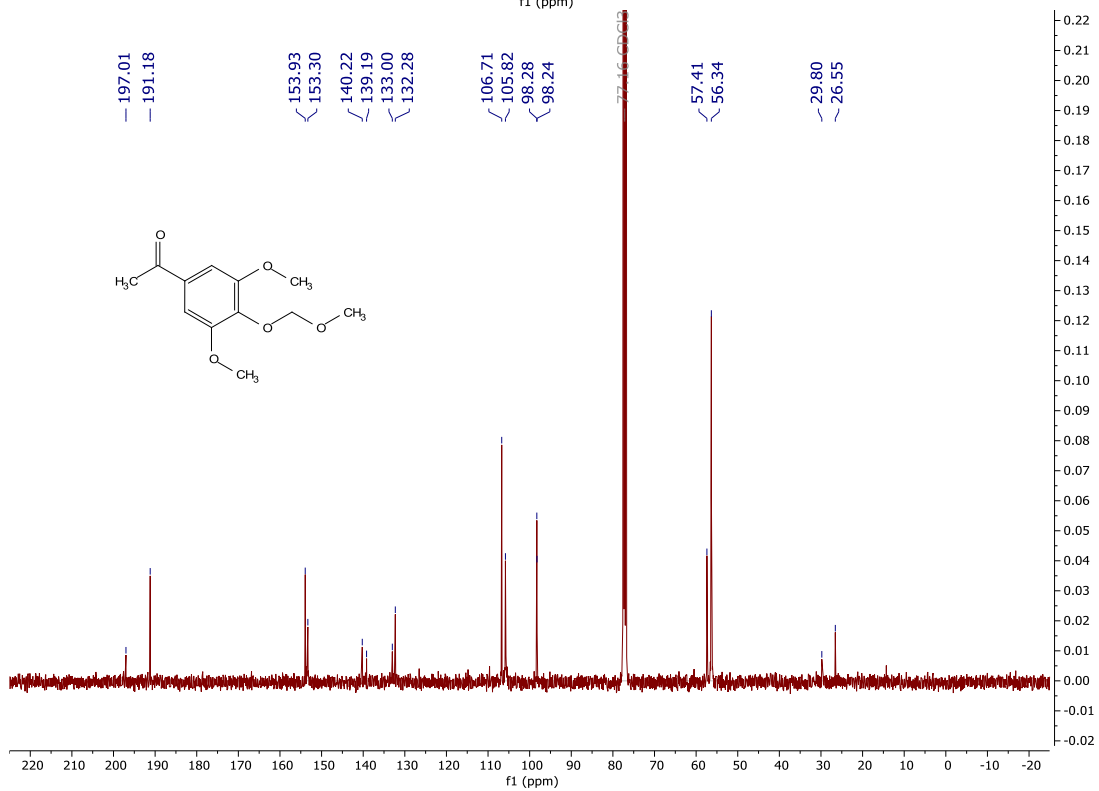
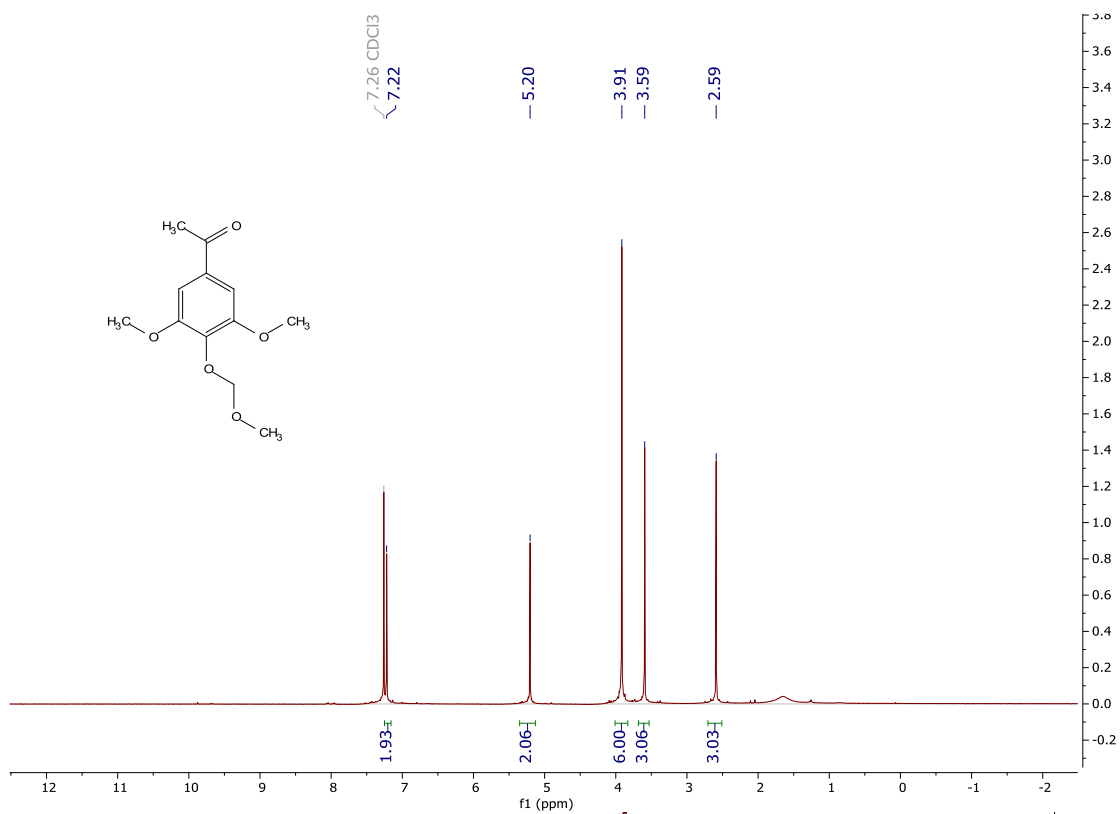
### 7.3 $^1\text{H}$ NMR a $^{13}\text{C}$ NMR spektra látky 18a



## 7.4 $^1\text{H}$ NMR a $^{13}\text{C}$ NMR spektra látky 18b

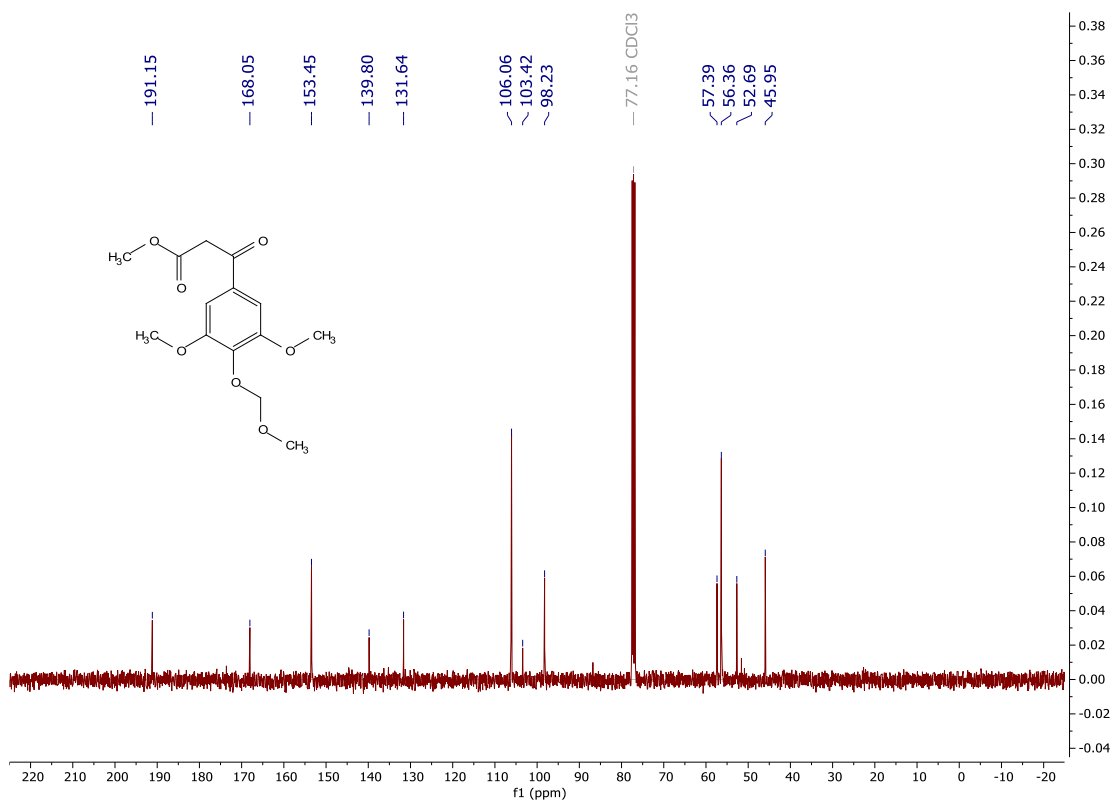
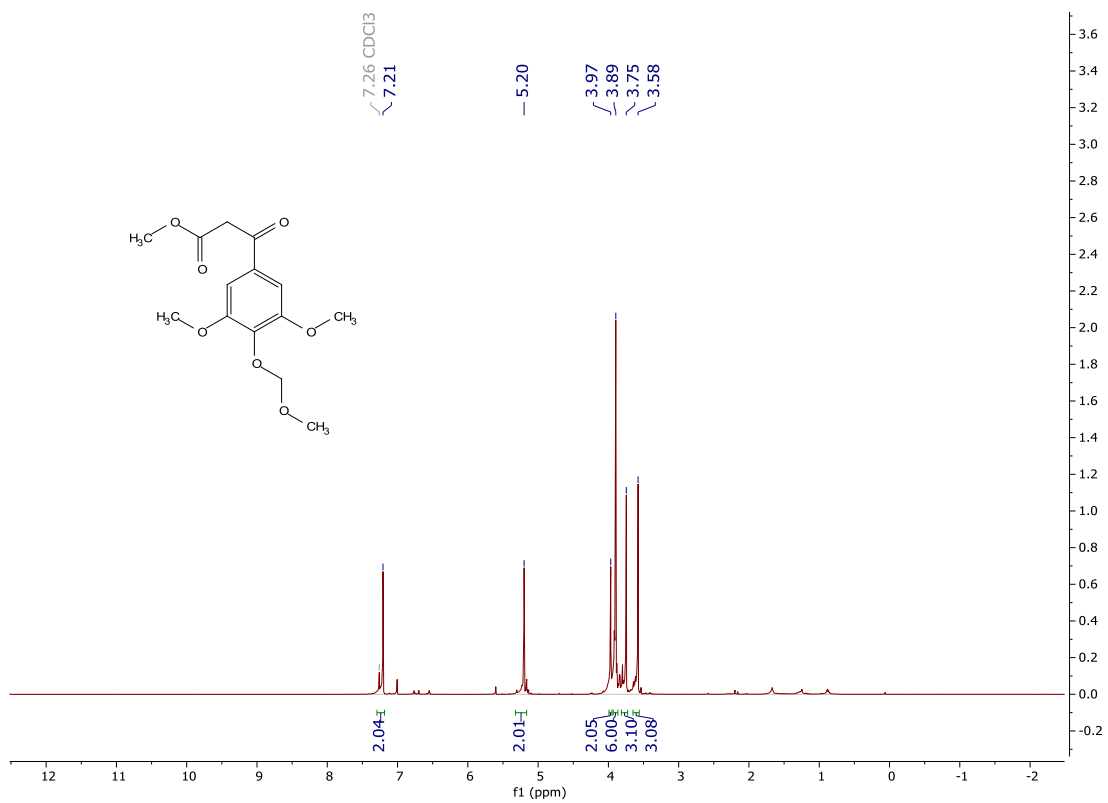


## 7.5 $^1\text{H}$ NMR a $^{13}\text{C}$ NMR spektra látky 18c





## 7.6 $^1\text{H}$ NMR a $^{13}\text{C}$ NMR spektra látky 19



## 7.7 $^1\text{H}$ NMR a $^{13}\text{C}$ NMR spektra látky 31b

