

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta
Laboratoř růstových regulátorů

**Syntetické štúdie majúce za úlohu zmapovať cestu
smerom ku príprave prírodných látok s neolignanovou
kostrou**

DIPLOMOVÁ PRÁCA



**Přírodovědecká
fakulta**

Autor:

Študijný program:

Studijný obor:

Forma studia:

Vedúci práce:

Termín odovzdania práce:

Bc. Zuzana Barbuščáková

Experimentální biologie

Experimentální biologie rostlin

Prezenční

RNDr. Jiří Pospíšil, Ph.D.

2018

Bibliografická identifikácia

Méno a priezvisko autora	Bc. Zuzana Barbuščáková
Názov práce	Syntetické štúdie majúce za úlohu zmapovať cestu smerom ku príprave prírodných látok s neolignanovou kostrou
Typ práce	Diplomová práca
Pracovisko	Laboratoň rústových regulátorů
Vedoucí práce	RNDr. Jiří Pospíšil, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2018
Abstrakt	Neolignany sú látky prírodného pôvodu a patria medzi nové potencionálne biologicky aktívne zlúčeniny. V mojej diplomovej práci sa zaoberám substituovanými benzofuranovými neolignanmi a to konkrétne skupinou boehmenanov a dehydrodikoniferyl alkohol-4- β -D-glukosidmi (DCG). Teoretická časť diplomovej práce je zameraná na výskyt, biologickú aktivitu a prípravu boehmenanov a DCG a na teoretický prehľad syntéz benzofuranovej kostry v kontexte syntézy neolignanov. Experimentálna časť je cielená na vývoj a optimalizáciu nových syntetických postupov, konkrétne na prípravu boehmenanu X a DCG-A a B. Prvý navrhnutý postup je založený na „cross-dehydrogenative“ couplingu (CDC), ktorý umožňuje diverzifikovať syntézu na viaceré deriváty boehmenanov. Druhý je založený na esterových couplingoch a poskytuje cielenú prípravu boehmenanu X a DCG-A a B. Navrhnuté postupy by nám mali umožniť rýchlu a variabilnú prípravu cielených zlúčenín s možnosťou prípravy v ich opticky obohacených formách.
Kľúčová slová	neolignany, boehmenany, boehmenan X, dehydrokoniferyl alkohol-4- β -D-glukosidy, syntéza prírodných látok
Počet stran	74
Počet príloh	1 (článok)
Jazyk	slovensky

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Bc. Zuzana Barbuščáková
Title of thesis	Synthetic studies aiming to map the path towards the preparation of natural substances with a neolignan framework
Type of thesis	Diploma thesis
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	RNDr. Jiří Pospíšil, Ph.D.
The year of presentation	2018
Abstract	Neolignans are natural products belonging to novel biologically active compounds. In my diploma Thesis I am working with substituted benzofuran neolignans, specifically focusing on boehmenans and dehydrodiconiferyl alcohol-4-B-D-glucosides (DCGs). Theoretical part of the diploma Thesis is focused on occurrence, biological activity and synthesis of boehmenans and DCGs and also on theoretical overview of benzofuran scaffold syntheses in the context of preparation of neolignans. Experimental part focuses on development and optimization of new synthetic approaches with impact on boehmenan X and DCG-A and B. First suggested approach is based on "cross-dehydrogenative" coupling (CDC), which allows diversification of the synthesis towards more boehmenan derivatives. Second approach deals with ester couplings and provides targeted preparation of boehmenan X and DCG-A and B. The proposed approaches should allow rapid and divergent synthesis of target compounds with the possibility to prepare them in optically enriched forms.
Keywords	neolignans, boehmenans, boehmenan X, dehydrodiconiferyl alcohol-4- β -D-glucosides, synthesis of natural products
Number of pages	74
Number of appendices	1 (publication)
Language	slovak

Prehlasujem, že som predloženú iplomovú prácu vypracovala samostatne za použitia citovanej literatúry.

V Olomouci dňa.....

.....

V prvom rade by som sa chcela poďakovať vedúcemu mojej diplomovej práce RNDr. Jiřímu Pospíšilovi, Ph. D. za to, že ma s otvorenou náručou prijal nie len do jeho výskumnej skupiny, ale zapojil ma do všetkých ostatných aktivít, čím vytvoril vsutku nevídane priateľskú atmosféru. Ďakujem mu za poskytnutie bezchybného odborného vedenia, za všetky neoceniteľné rady ako ku organickej syntéze tak do života! Ďakujem za jeho cenný čas a nekonečnú trpezlivosť. Ešte raz ďakujem, že som mala tú česť Ťa poznať a byť súčasťou Tvojej rozrastajúcej sa chemickej rodinky. Ďalej by som sa chcela poďakovať Mgr. Hanke Kozubíkovej za pomoc a poskytnuté protokoly ako aj skvelému kolektívu oddelenia bioorganickej chémie Laboratória rustových regulátorov. V druhom rade by som sa chcela z celého srdca poďakovať úplne všetkým, ktorí mi priamo alebo nepriamo pomohli. Ďakujem Ing. Ivetke Stanovej, ktorá pri mne na úplnom začiatku stála a aj po tisíce bola ochotná mi čokoľvek vysvetliť. Ďakujem jej za poskytnuté rameno, ktoré som využívala veľmi často a z ktorého ma zakaždým zdvihla a presvedčila ma, že sa to všetko zvládne. Osobne ďakujem aj Stanislavovi Kučerovi, ktorý mi pomohol ako v osobnom živote tak v štúdiu a Janke Jakšovej predovšetkým za nevýslovnú pomoc pri štúdiu. Ďakujem a veľmi si vážim pomoc, ústretivosť a pochopenie od všetkých pracovníkov na oddelení Biofyziky a od Prof. RNDr. Martina Fellnera, Ph.D. V neposlednom rade by som sa chcela poďakovať mojej mamke a dedkovi, ktorí ma celý život vo všetkom podporovali, dodávali mi odvahu a slúžili mi ako vzor toho, že keď človek chce a nevzdá sa, dosiahne všetko. A samozrejme obrovské poďakovanie patrí môjmu trpezlivému, nekonečne ochotnému a odvážnemu priateľovi Mgr. Davidovi Vandovi, ktorý pri mne stál za každých okolností, poskytol mi množstvo odborných rád a keď som náhodou zišla z cesty ochotne ma na ňu zakaždým priviedol a premenil všetky slzy na smiech. Bez teba by som túto prácu nedokončila a možno ani nezačala. Za finančnú podporu ďakujem nie len mamke ale ale aj projektu IGA_PrF_2018_023 IGA_PrF_2018_014. Ďakujem.

“Mám priateľa, ktorý je umelec. Občas s jeho názorom ale nesúhlasím. Pri pohľade na kvetinu mi povedal „Pozri sa, aká je nádherná,“ a ja súhlasím. Ale potom dodal „Já ako umelec vidím ako je krásna, ale ty ako vedec všetku túto krásu dávaš stranou a kvetina je odrazu nudná.“ Ja si myslím že je trochu šialený. Zaprvé, krása, ktorú vidí on, je krásou pre všetkých ostatných, takže aj pre mňa. Aj keď ja túto krásu nemôžem popísať tak vybrane ako on ... dokážem ale oceniť krásu kvetiny. Zároveň vidím v tejto kvetine viac ako on. Môžem si živo predstaviť bunky v nej, zložité procesy vnútri, ktoré majú tiež svoju krásu. Chcem povedať, že nie je krása len v tejto dimenzii, v jednom centimetri. Je tiež krása v menších dimenziách, vo vnútornej štruktúre, v procesoch. Dôvod prečo sa farby kvetiny vyvinuli k prilákaniu opel'ovačov, aby ju rozmnožili, je zaujímavý: znamená to, že hmyz dokáže vnímať farby. Zároveň vyvstáva otázka: existuje tento estetický zmysel tiež u nižších foriem? Prečo je estetický? Všetky sú to zaujímavé otázky, ktorým znalosti vedy pridávajú na úžase, tajomstve a úcte k rastlinám. Pridávajú a nie berú.“

Richard Feynman

Obsah

1. Úvod do problematiky.....	9
1.1 Ciele práce.....	11
2. Teoretická časť	12
2.1 Neolignany – rastlinné sekundárne metabolity fenyylpropanoidového typu	12
2.1.1 Základná charakteristika.....	12
2.1.2 Biosyntéza monolignonov	13
2.2 Teoretický úvod do štúdia boehmenanov	17
2.2.1 Výskyt boehmenanov	17
2.2.2 Základná charakteristika a biologické vlastnosti boehmenanov	20
2.3 Úvod ku dehydrodikoniferyl alkohol-4-β-D-glukosidom	26
2.3.1 Biosyntéza DCG.....	27
2.4 Príprava prírodných látok so zameraním na prípravu benzofuranového jadra.....	28
2.4.1 Od izolácii ku príprave.....	28
2.4.2 Rôzne prístupy prípravy benzofuranovej kostry	29
2.5 Príprava boehmenanu	35
2.6 Príprava DCG	36
3. Experimentálna časť.....	37
3.1 Chemikálie.....	37
3.2 Metody a materiál.....	37
3.2.1 Obecné informácie.....	37
3.3.2 Vizualizačné roztoky pro TLC	38
3.3 Syntéza	38
3.3.1 Príprava prekursorov pre CDC coupling.....	38
3.3.2 Príprava východných látok pre esterový coupling.....	42
3.3.3 Príprava chirálnej pomocnej skupiny pre syntézu opticky čistého produktu	43
3.3.4 Cílená syntéza boehmenanu X pomocou esterového couplingu.....	45
3.3.5 Syntéza DCG.....	48
4. Výsledky.....	52
4.1 Príprava prekursorov pre „cross-dehydrogenačný“ coupling (CDC).....	52
4.2 Esterový coupling.....	54
4.3 Syntéza dehydrodikoniferyl alkohol-4- β-glukosidu.....	55
5. Diskusia.....	58
5.1 Konvergentná retrosyntetická analýza	58

5.2 Prvá navrhnutá syntézna cesta: CDC coupling.....	59
5.3 Druhá navrhnutá syntézna cesta: esterový coupling.....	61
5.4 DCG	65
6. Záver.....	68
7. Zoznam použitých skratiek	69
8. Literatúra	71

1. Úvod do problematiky

Látky prírodného pôvodu využíva ľudstvo vsťuku od nepamäti. Prvé archeologické dôkazy o využití rastlinného materiálu k liečbe siahajú do dôb spred 60 000 rokov, kedy sa v hrobkách paleolitických ľudí našli pozostatky rastlín využívaných dodnes ako liečebné byliny (Solecki, 1975). Z dôb prvých civilizácií (5000 p.n.l.), v oblasti Mezopotámie, sa našli hlinené tabuľky obsahujúce viac ako sto liečebných rastlín (Sumner, 2000). No napriek tomu, že ľudia už v týchto dávnych časoch vedeli, ktoré byliny liečia, a ktoré kôry stromov dokážu zmierniť zápal, nebolo im po ďalšie tisícročia známe, čo za týmito skoro zázračnými účinkami liečivých rastlín stojí. Až v 19. storočí, s nástupom nových vedeckých metód, umožňujúcich vyizolovať a identifikovať jednotlivé zlúčeniny zodpovedné za liečivé účinky rastlín, začala byť moderná medicína založená na farmaceutických liečivách odvodených z liečivých rastlín.

Nie je pochyb o tom, že ľudstvo bolo dobre oboznámené s liečivými schopnosťami rastlín počas celej svojej histórie a že rastliny zastávali a dodnes zastávajú dôležitú pozíciu na poli výskumu a vývoja liečiv.

V dnešnej dobe umožňujú najnovšie bioanalytické metódy cielene izolovať a identifikovať nové chemické individuá z prírodných materiálov s fascinujúcou variabilitou chemických štruktúr (Magoulas a Papaioannou, 2014). Štúdium týchto látok následne dovoľuje nie len pochopiť ich význam pre samotný organizmus, ale umožňuje stanoviť ich biologickú aktivitu a spôsob ako a kde tieto látky pôsobia, a tým ich prípadné využitie vo farmakologickom a kozmetickom priemysle. Do skupín látok s dlhou históriou v oblasti aplikovaného výskumu liečiv patria aj sekundárne metabolity. Tieto látky s extrémne variabilnou štruktúrnou rozmanitosťou nachádzame prevažne v rastlinnej ríši, no len v nepatrných množstvách a v obmedzených časových obdobiach. Preto patrí laboratórna syntéza daných zlúčenín, ku základným oblastiam výskumu nových potencionálnych látok. Môžeme sa tak viac zamerať na štúdium ich účinkov vrátane sekundárnych, resp. nežiadúcich účinkov. Okrem iného, nám laboratórna príprava umožňuje aj ich cieleňú úpravu a tým syntézu ich analógov, ktoré môžu vykazovať ešte lepšie farmako-chemické vlastnosti ruku v ruke s menšími nežiadúcimi vedľajšími účinkami.

Medzi nové biologicky aktívne látky zo skupiny sekundárnych metabolitov, sa zaradzuje aj skupina prírodných látok s názvom neolignany, ktorá je súčasťou rozsiahlej podskupiny sekundárnych metabolitov, a to fenylpropanoidov.

Predmetom nášho záujmu sú konkrétne 8,5'-dimery fenylpropanoidových jednotiek, ktoré vznikajú fenolovým oxidačným couplingom (Shahidi a Chandrasekara, 2010; Fuss, 2003) a obsahujú typický benzofuranový skelet (Schéma 1). Tento štruktúrny motív oplýva širokými biologickými vlastnosťami, preto sa látky s touto kostrou využívajú napríklad ako antimykotika (Masubuchi a spol., 2003), anti-psychootika, ale aj pri liečbe diabetu a rakoviny (Radadiya a Shah, 2012).

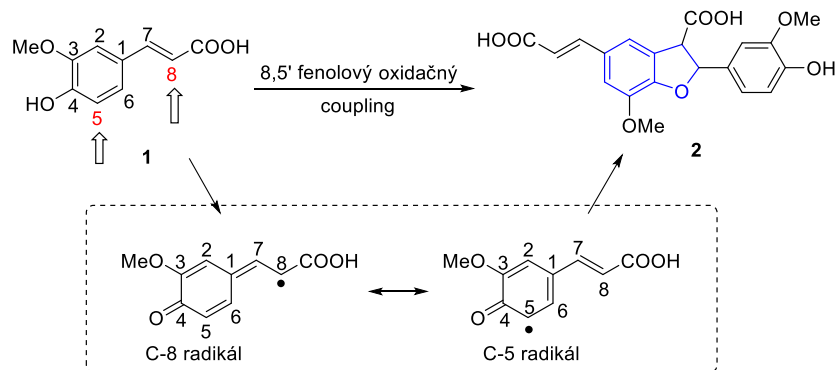
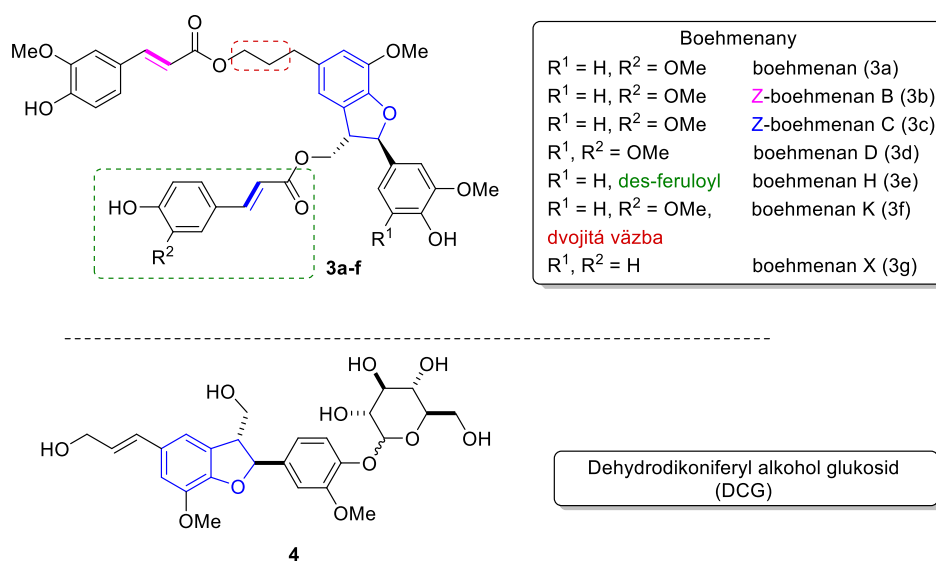


Schéma 1: Vznik základnej kostry podskupiny neolignanov obsahujúcich benzofuranový skelet **2** (vyznačený modrou farbou) pomocou 8,5'-fenolového oxidačného couplingu dvoch fenylpropanoidových jednotiek **1**.

V mojej diplomovej práci sa zaoberám dvoma skupinami substituovaných benzofuranových zlúčenín. Prvá z nich reprezentujú neolignany benzofuranového typu, spadajúce do jednej skupiny látok s názvom boehmenany (Obrázok 1; Xia a spol., 2014). Tieto látky boli identifikované na základe biologických aktivít riadeného skreeningu vybraných rastlín, využívaných v tradičnej čínskej medicíne –ibišek konopovitý (*Hibiscus cannabinus*; Seca a spol., 2001). Druhou skupinou látok sú neolignanové konjugáty s glukózou, tzv. dehydrodikoniferyl alkohol-4-β-D-glukosidy (DCG; Obrázok 1) izolované z tumoru barvíkoveca ružového (*Catharanthus roseus*; Teutonico a spol., 1991)



Obrázok 1: Skupiny substituovaných benzofuranových zlúčenín nášho záujmu (boehmenany **3a-g**, dehydrodikoniferyl alkohol glukosidy (DCG) **4**).

Dôvod hlbšieho štúdia týchto prírodných látok tkvie v ich výraznej biologickej aktivite (Obrázok 6) a ich nožnej funkcii. Boehmenany vykazovali moduláciu Wnt/β-katenin signálnej dráhy, ktorá moduluje mnohé biologické procesy. Jej nadmerná aktivácia, s veľkou pravdepodobnosťou, pôsobí ako spúšťač mechanizmu mnohých patologických pochodov v organizme (Pan a spol., 2016).

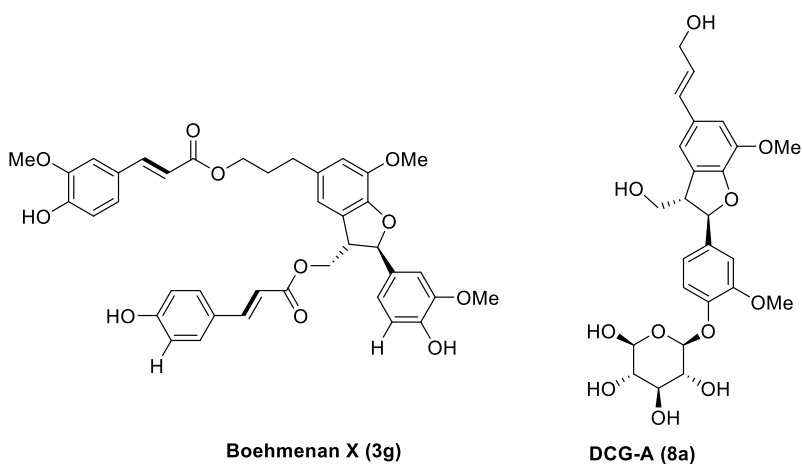
Deriváty DCG vykazovali podobný mechanizmus pôsobenia v rastlinných signálnych dráhach ako fytohormony cytokiníny (Teutonico a spol., 1991).

Z biosyntetického hľadiska pochádzajú prekursori oboch týchto skupín prírodných látok z tzv. šikimátovej dráhy, ktorá pripraví jednotlivé monoméry fenylylpropanoidových jednotiek (Schéma 2; Weng a Chapple, 2010). Následná 8,5'-homodimerizácia monomérov fenylylpropanoidových jednotiek (Schéma 1) vytvorí základnú benzofuranovú kostru oboch typov látok, DCG aj boehmenanov (Obrázok 1; **3a-g**, **4**). Nasledujúce post-dimerizačné sekvencie enzymatických redoxných reakcií dajú za vznik skupine boehmenanov (Magoulas a Papaioannou, 2014)

Cieľom mojej diplomovej práce je využitie cielenej syntézy (Target-Oriented Synthesis – TOS) pri syntéze vybraných neolignanov, menovite boehmenanu X a DCG (Obrázok 1; **3f**, **4**).

1.1 Ciele práce

- 1) Vypracovať teoretickú rešerš na téma "syntéza benzofuranovej kostry v kontexte syntézy neolignanov".
- 2) Vypracovať rešerš na téma "Výskyt, biologická aktivita a príprava boehmenanov a dehydrodikoniferyl alkohol-4- β -glukosidov".
- 3) Vyvinúť nové možnosti prípravy neolignanového skeletu boehmenanu X a dehydrodikoniferyl alkohol-4-beta-glukosidov. Otestovať pripravené látky na ich biologické vlastnosti.
- 4) Charakterizácia pripravených látok pomocou dostupných fyzikálne-chemických metód



Schématické znázornenie štruktúr cieľových zlúčenín (boehmenan X (**3g**) a dehydrodikoniferyl alkohol-4- β -D-glukosid (DCG-A)).

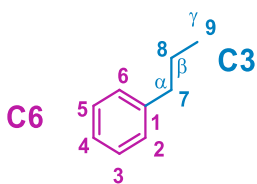
2. Teoretická časť

2.1 Neolignany – rastlinné sekundárne metabolity fenylypropanoidového typu

2.1.1 Základná charakteristika

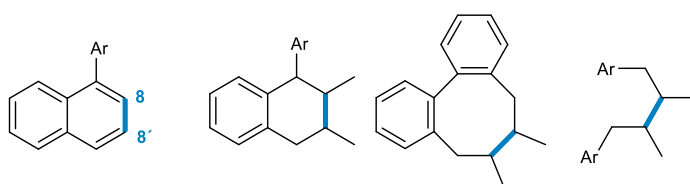
Neolignany (v niektorej literatúre označované aj ako dilignany (Xia a spol., 2014) sú prírodné látky, ktoré patria do rozsiahlej skupiny sekundárnych metabolitov (Teponno a spol., 2016). Tá zahŕňa látky nebielkovinovej povahy, ako sú napríklad hormóny alebo pigmenty, ktoré nie sú priamo zahrnuté v raste a vývoji organizmu, no ich neprítomnosť značne ovplyvňuje kvalitu jeho života. Sekundárne metabolity sú široko zastúpené predovšetkým u rastlín, ktoré ich využívajú napríklad na ochranu proti bylinožravcom a na zvýšenie atraktívnosti pre opel'ovaočov. Tieto dve protichodné funkcie môžu sekundárne metabolity vykonávať hlavne vďaka štruktúrnej rozmanitosti ich jednotlivých podskupín, do ktorých patria napríklad alkaloidy, terpeny, glukosidy alebo fenylypropanoidy (Hartmann, 2007).

Funkcia neolignanov vskutku spočíva v ochrane rastlín proti bylinožravcom a mikroorganizmom a charakterizované sú práve na základe ich kostry. Tá je založená na rôznorodom a nesymetrickom spojení dvoch fenylypropanoidových jednotiek odvodených od aminokyseliny fenylalanínu, čím spadajú do jednej z hlavných podskupín sekundárnych metabolitov, do skupiny fenylypropanoidov (El-Seedi a spol., 2012). V tejto skupine sa neolignany nenachádzajú samotné. Rôzne spojenia fenylypropanoidových jednotiek dávajú za vznik rôznym skupinám zlúčenín, z ktorých najznámejšie sú napríklad lignany a lignin. Pre dané názvoslovne účely sa základný skelet fenylypropanoidov čísluje od 1 do 6 od propylovej jednotky skrz benzénové jadro, samotná propylová skupina je očíslovaná od 7 – 9 (Obrázok 2). V niektorej literatúre sa uhliky na pozíciách 7-9 označujú α , β a γ (Magoulas a Papaioannou, 2014).



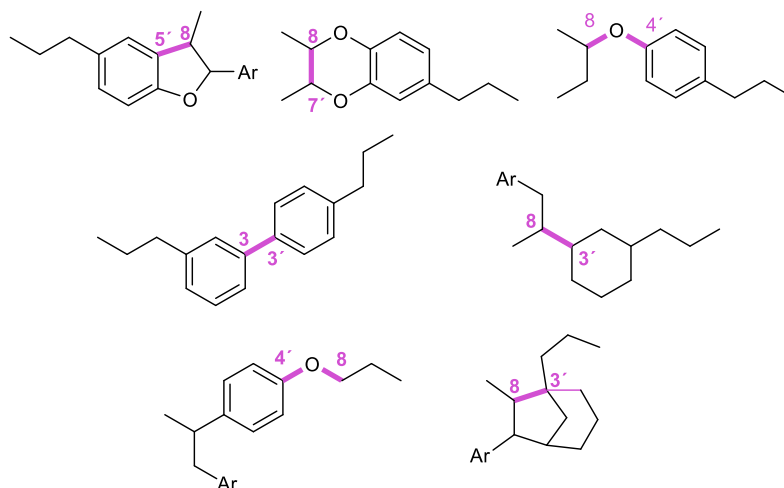
Obrázok 2: Číslovanie základnej fenylypropanoidovej C6-C3 jednotky.

Spojením dvoch fenylypropanoidových jednotiek medzi uhlíkmi C8-C8' vznikajú základné kostry pre lignany (Obrázok 3; Teponno a spol., 2016).



Obrázok 3: Základné kostry lignanov vytvorené dimerizáciou fenylypropanoidových jednotiek medzi uhlíkmi C8-C8' (prevzaté z Teponno a spol. 2016).

Spojenia medzi všetkými inými uhlíkmi ako medzi uhlíkmi C8-C8' poskytujú naozaj rôznorodé možnosti spojenia dvoch fenylypropanoidových jednotiek a dávajú za vznik základným kostrám pre neolignan. Rozličné stupne oxidácie postranného reťazca a substitúcie na aromatických jadrách dávajú za vznik ešte širšiemu rozsahu možných základných kostry neolignanov (Obrázok 4; Teponno a spol., 2016).



Obrázok 4: Vybrané kostry neolignanov vytvorené dimerizáciou fenylypropanoidových jednotiek medzi uhlíkmi inými ako C8-C8' (prevzaté z Teponno a spol. 2016).

Polymerizáciou fenylypropanoidových jednotiek pomocou všetkých väzbových kombinácií vzniká jeden z najvýznamnejších fenylypropanoidov, a to lignin. Je to vysokomolekulárna polyfenolická látka kovalentne viazaná na polysacharidy s nepravidelnou štruktúrou. Táto zlúčenina zabezpečuje nepremokavosť bunecnej steny, čím umožňuje transport vody a rozpustených látok do cievného systému. Poskytuje aj fyzickú ochrannú bariéru pred fytopatogénmi a iným environmentálnym stresom. Taktiež zabezpečuje drevnatenie bunecných stien dreva, čím sa stáva nenahraditeľnou súčasťou všetkých drevín. (Weng a Chapple, 2010).

2.1.2 Biosyntéza monolignanov

Biosyntéza neolignanov, tak ako aj iných sekundárnych metabolitov, zahŕňa len nepatrné množstvo metabolických dráh, ktoré vedú k obmedzenému počtu kľúčových metabolitov, z ktorých následne vzniká ohromné kvantum derivátov špecifickými enzýmovými transformáciami (Harmatha, 2002).

Fenolických látok je vo vyšších rastlinách syntetizovaných niekoľko tisíc (Cai a spol., 2004) no biosyntéza všetkých z nich začína z rovnakej biogennej cesty nazývanej šikimátová dráha (Hermann, 1999; Umezawa a spol., 2009). Táto dráha je pomenovaná podľa šikimovej kyseliny, ktorá je prvý a základný kľúč k biosyntéze nie len všetkých fenolických, ale aj mnohých iných prírodných látok. (Yu

a Jez, 2008). Biosyntéza samotných neolignanov pokračuje syntézou prekursorov fenylypropanoidových jednotiek. Tie sú tvorené amináciou šikimátovej kyseliny za vzniku aminokyseliny fenylalanínu a tyrozinu. Za pomoci fenylalanín amonium lyázy (PAL) je z fenylalanínu v cytoplazme vytvorená kyselina škoricová a z tyrozinu za pomoci tyrozín amonium lyázy (TAL) kyselina *p*-kumarová (El-Seedi a spol., 2012), ktorá môže vzniknúť priamo z kyseliny škoricovej za pomoci 4-hydroxy lyázy (C4H; Shadle a Chen, 2007). Kyselina *p*-kumarová a ostatné metabolity vznikajúce jej biogenetickou premenou, sa nazývajú hydroxyškoricové deriváty (tzv. monolignoly). Sú to napríklad jej metoxy a hydroxy deriváty (kyselina kávová, ferulová a sinapová), prípadne redukciami vznikajú estery, aldehydy (*p*-kumaraldehyd), alkoholy (koniferyl alkohol) a alkény (isoeugenol).

Prvý medziprodukt v príprave monolignolov, tzv. *p*-kumarát koenzym A je vytvorený z kyseliny kumarovej za pomoci 4-kumarát koenzym A ligázy (4CL). Z neho môže v jeho prvej metabolickej ceste vzniknúť *p*-kumaraldehyd za pomoci škoricóat koenzym A reduktázy (CCR) a následne *p*-kumaryl alkohol za pomoci škoricóat alkohol dehydrogenázy (CAD; Van Parijs a spol., 2015, Varbanova a spol., 2011). Z *p*-kumarát koenzymu A môže v jeho druhej metabolickej ceste vzniknúť viackrokovou syntézou cez medziprodukt kyseliny kávovej, kyselina ferulová. Z nej sa za pomoci CAD vytvára buď koniferyl alkohol, alebo za pomoci koniferyl aldehyd 5-hydroxylázy (Cald5H; Osakabe 1999) 5-hydroxy ferulová kyselina. Tá sa za pomoci kávová kyselina 3-O metyl transferázy (COMT) premení na kyselinu sinapovú. Za pomoci CAD sa kyselina sinapová môže premeniť na sinapyl alkohol, ktorý môžeme získať aj úpravou koniferyl alkoholu na 5-hydroxy koniferyl alkohol, za pomoci Cald5H a jeho následnou úpravou za pomoci COMT na spomínaný sinapyl alkohol. Inou viackrokovou úpravou koniferyl alkoholu, získavame isoeugenol (Schéma 2; Magoulas a Papaioannou, 2014).

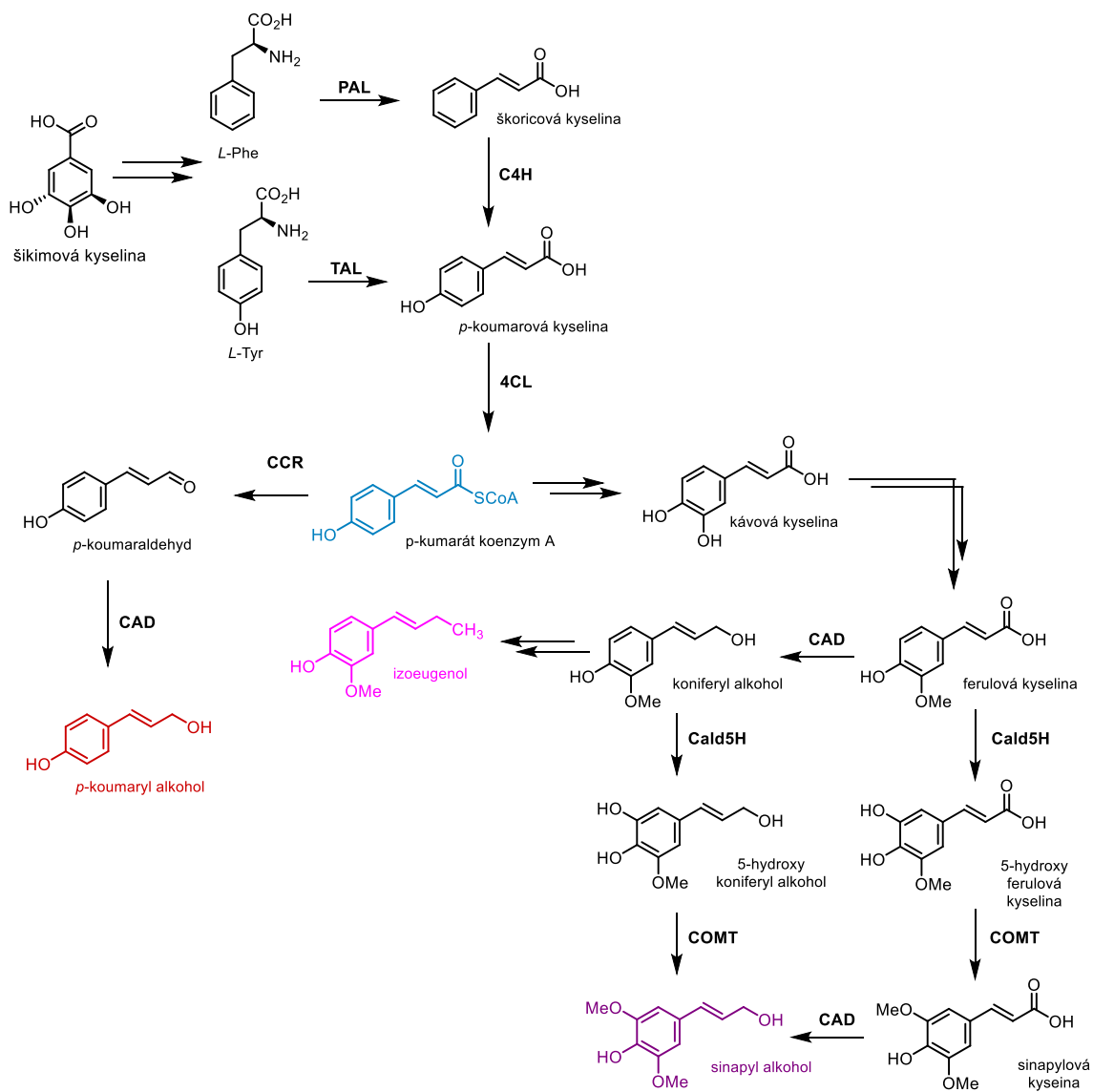


Schéma 2: Biosyntetická dráha monolignonov vychádzajúca zo šikimátovej dráhy (prevzaté z Magoulas a Papaioannou, 2014).

Všetky tieto monolignony sú označované aj ako C6-C3 trieda (Obrázok 2) metabolitov kyseliny škoricovej (Geissman a spol., 1969) a všetky z nich sú silné prírodné antioxidanty (Magoulas a Papaioannou, 2014). Avšak tu ich cesta nekončí, v prírode sú totižto ďalej dimerizované a polymerizované za pomoci fenol oxidačného couplingu (POC; Erdtman, 1933; Lewis, 1998). Ten využíva peroxidázy a lakkázy, ktorými sa v prírode vytvárajú medzi jednotlivými monolignonmi nové C-C prípadne C-O väzby. Peroxidázy a lakkázy sú dve rôzne rodiny enzýmov líšiace sa kovovým kationom nachádzajúcom sa v aktívnom centre enzýmu. Peroxidázy obsahujú Fe^{3+} zatiaľ čo lakkázy Cu^{2+} . Obe sprostredkujú jedoelektrónový POC, ktorý začína tvorbou radikálu 4-hydroxyfenylpropanoidovej jednotky, ktorá po strate elektrónu vytvorí odpovedajúci radikál, ktorý sa môže vystihnúť 5-timi rezonančnými formami (Schéma 3; Magoulas a Papaioannou, 2014).

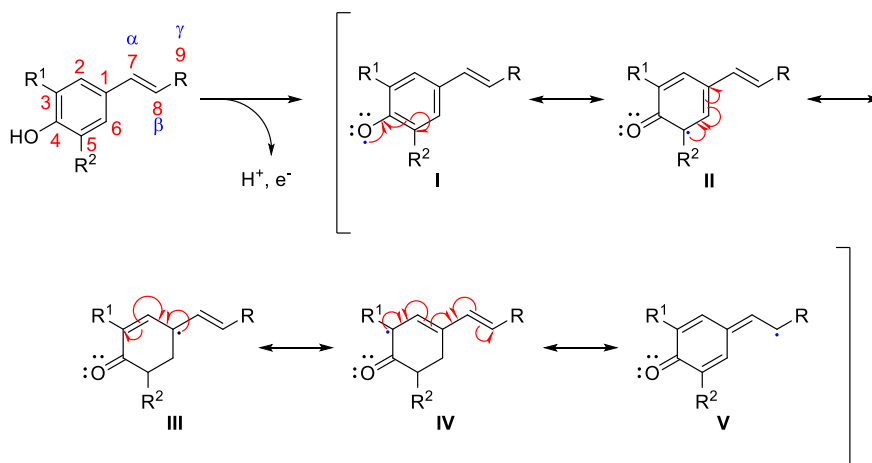


Schéma 3: Jednoelektrónová oxidácia 4-hydroxyfenylpropanoidovej jednotky tvoriaca 5 mezomerných foriem (I-V) fenoxidového radikálu (prevzaté z Magoulas a Papaioannou, 2014).

Nasleduje homodimerizácia medzi rôznymi uhlíkmi a kyslíkmi na daných C6-C3 fenylpropanoidových jednotkách, čím sa vytvára vskutku ohromné množstvo rozličných biologicky aktívnych regioizomerných dimérov (vyžitie lakkáz; Wang a spol., 2013), ako napríklad už spomínané lignany, neolignany a polymérov ako napríklad ligniny (vyžitie peroxidáz; Wang a spol., 2013). Pomer možných regioizomérov tvorených pri POC závisí na stereoelektrónových efektoch vyskytujúcich sa na fenoxidovom radikále, oxidačnom činidle a podmienkach reakcie. Čo sa týka biosyntézy neolignanov, najpočetnejšie štruktúry sú medzi uhlíkmi C8-C5' a C8-O-C4'. Dimerizácia medzi C8 a C5' je možná jedine, ak je táto pozícia nesubstituovaná. Na druhú stranu, väzby medzi kyslíkmi, prípadne uhlíkmi na prvej pozícii na oboch monolignonoch neboli nikdy pozorované. Súvisí to s vytvorením vysoko nestabilných peroxy dimerov v prvom prípade a stérickým bránením v prípade druhom (Setälä a spol., 2008).

Nasledujúcim coupligom a post-dimerizačnými sekvenciami enzymatických redoxných reakcií vznikajú celkové kostry neolignanov (Obrázok 4; Teponno a spol., 2016).

V prírode je väčšina neolignanov syntetizovaná ako zmes stereoizomerov a to v závislosti na podmienkach buď ako čisté enantioméry alebo ako racemáty. Stereoselektivita syntézy v rastline nezáleží len na druhu zlúčeniny, ale aj na konkrétnej rastline, v ktorej je syntetizovaná. Jeden neolignan môže byť syntetizovaný v rôznych izomerných formách, v rôznych rastlinách rovnakého druhu. (Umewaza, 1997).

V mojej diplomovej práci sa okrem základnej charakteristiky a biosyntézy neolignanov, zameriavam konkrétnejšie na dve skupiny látok (boehmenany a DCG; Obrázok 1) benzofuranového typu. Obecné známe postupy syntézy budú ďalej detailnejšie pokryté.

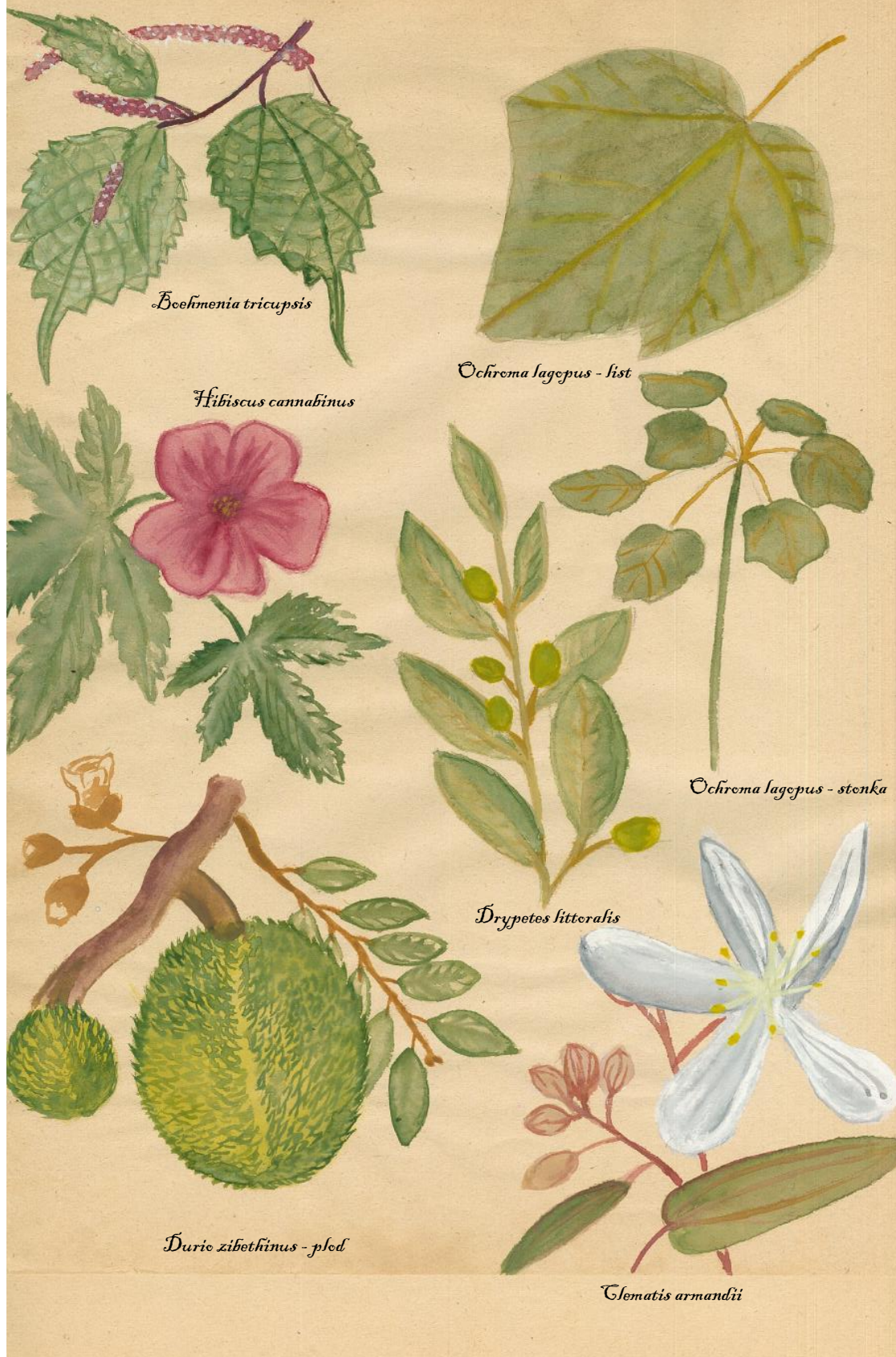
2.2 Teoretický úvod do štúdia boehmenanov

2.2.1 Výskyt boehmenanov

Čínska medicína je známa po celom svete. Je to druh alternatívnej medicíny, pri ktorej sa okrem iného využívajú aj rastliny dobre známe pre svoje hojivé a liečebné účinky. Čo sa za týmito, na prvý pohľad, zázračnými vlastnosťami skrýva, nám možno bylinkárky nepovedia, no bioanalytické metódy áno. Pozoruhodný vývoj v spriahnutých analytických technikách v posledných rokoch výrazne rozšíril hranice a aplikácie týchto techník v analýze prírodných produktov (Teponno a spol., 2016). Tieto metódy sú založené na spojení separačných techník s on-line spektroskopickými metódami, ako napríklad GC-MS, LC-MS, LC-FTIR, LC-NMR, CE-MS atď. Využívajú sa hlavne v kontexte preizolačných analýz surových extraktov alebo frakcií z rozličných prírodných zdrojov, izolácii, on-line detekcii prírodných látok, hemotaxonomických štúdií, chemických „fingerprintintov“, kontroly kvality rastlinných produktov, de-replikácie prírodných produktov a metabolomických štúdií. (Patel a spol., 2010). V našom špecifikom príklade prispelo ku kvantitatívnemu aj kvalitatívnemu vyhodnoteniu extraktov a určení štruktúry a účinku nových neolignanov hlavne vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC) s detektorom fotodiodového poľa (PDA) v spojení s tandemovou hmotnostnou spektrometriou (MS^n) a plynová chromatografia (GC) v spojení s detektorom elektrónového záchytu (ECD). Tieto vysoko senzitivne metódy dokážu zachytiť špecifické molekuly v komplexných matriaciach v pikogramových a femtogramových množstvách (Teponno a spol., 2016).

Rastliny používané v tradičnej čínskej medicíne podstúpili pomocou spomenutých moderných izolačných a identifikačných metód menší „výsluch“ a poskytli okrem iných látok aj látky nové, a to konkrétne boehmenany. Tým sa podarilo odhaliť, aspoň do určitej miery, rúško tajomstva nielen rastlín používaných v tradičnej čínskej medicíne ale aj ďalších iných (Obrázok 5).

Vybraný zástupci prírodnej čínskej medicíny

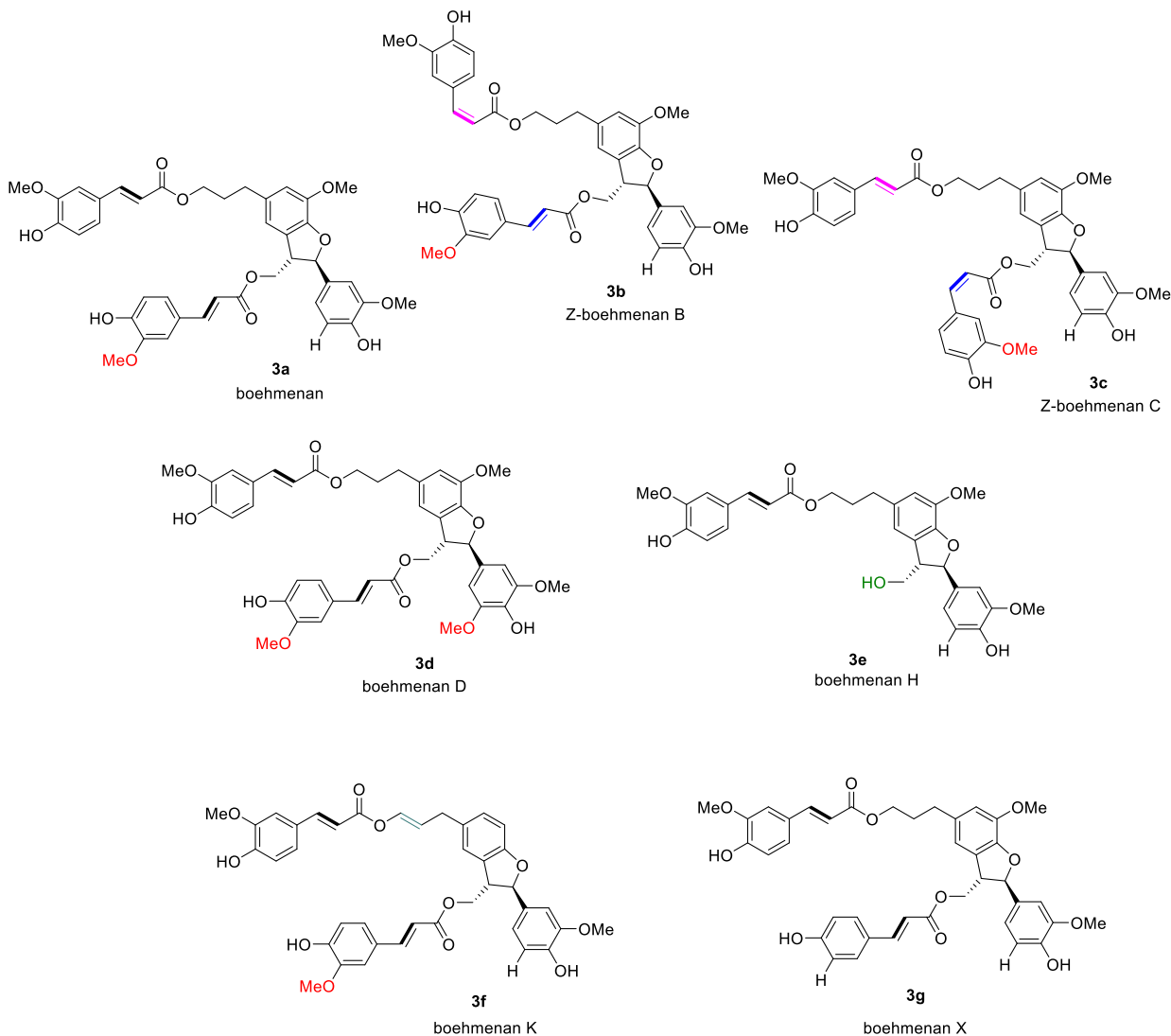


Obrázok 5: Nákresy jednotlivých vybraných prírodných zdrojov boehmenanov.

Prvá zmienka o vyizolovaní nového neolignanu pochádza z roku 1975 z rastliny *Boehmeria tricuspis* (Takemoto a spol., 1975). Z jej metanolickeho extraktu koreňa bol po chromatografickom prečistení získaný boehmenan a boehmenan D (Obrázok 1; **3a**, **3d**). Až o celých tridsať rokov neskôr je o tejto látke ďalšia zmienka. Roku 1995 Paula a spol. vyizolovali boehmenan B, C a D (**3b**, **3c**, **3d**) z etanolickeho extraktu jadrového dreva *Ochroma lagopus*. Táto rastlina vykazovala zaujímavé biologické vlastnosti a pochádza z južného Mexika, čím ako jediná nezapadá do našej zbierky ázijských rastlín. Následne bol boehmenan H a boehmenan K (**3e**, **3f**) vyizolovaný z extraktu dužiny dvojklíčnolistovej byliny, známej ako kenaf (ibišek konopovitý; *Hibiscus cannabinus*; Seca a spol., 2001). V Ázii je táto rastlina známa predovšetkým ako protilátka pri otrave jedovatými hubami, je taktiež rezistentná proti hubovým patogénom a jej olej vykazuje antimikotickú aktivitu (Moujir a spol., 2007). Výskumy chemického zloženia metanolickeých roztokov ázijských rastlín *Drypetes littoralis* a *Alchornea davidii franch* poskytli u oboch boehmenan (**3a**; Cui a Tan, 2004), u *Drypetes l.* aj boehmenan D (**3d**; Lin a spol., 2001). U ďalšej rastliny patriacej do rodu ibiškov, *Hibiscus taiwanensis*, v Ázii známej predovšetkým ako protizápalový, antifungálny, antipyretický a protihlistový agent, bol vyizolovaný mimo iných aj boehmenan (**3a**; Wu a spol., 2004). Rovnako bol boehmenan po fytochemickom prieskume vyizolovaný aj zo stromu *Durio zibethinus*, ktorý produkuje jedno z najobľúbenejších sezónnych ovocí v južnej Ázii – durian. Tento strom bol v Ázii využívaný aj pre svoje liečebné účinky. Verilo sa napríklad, že džús z listov a koreňa pôsobí antipyreticky (Rudiyansyah a Garson, 2006). V rovnakom roku došlo ku izolácii a identifikácii boehmenanu a boehmenanu H (**3a**, **3e**) z *Helicteres hirsuta*, za pomoci metódy delenia buniek podľa cytotoxicity (Chin a spol., 2006). Táto rastlina bola používaná v tradičnej medicíne proti malárii a v liečbe diabetes. Boehmenan a boehmenan X (**3a**, **3g**) boli získané z kôry stromu *Durio carinatus*. Tento strom má široké využitie v potravinárskom priemysle aj stavebníctve. Jeho ovocie je v južnej Ázii označované aj ako „kráľ ovocia“ (Rudiyansyah a spol., 2010). Ďalšia známa rastlina obsahujúca boehmenan (**3a**), *Sambucus andata* (Sasaki a spol., 2011), je v tradičnej čínskej medicíne využívaná na liečbu rubeoly a zápalu obličiek (Jiangsu a spol., 1977). Roku 2014 Xiong a spol. vyizolovali boehmenan (**3a**) z etanolickeho extraktu *Clematis armandii* využívanej hlavne ako protizápalová agent. V rovnakom roku vyizoloval Ying a spol. boehmenan X (**3g**) z Okry (*Abelmoschus esculentus L.*) a Rudiyansyah a spol. (+)-boehmenan a boehmenan X (**3a**, **3g**) z etanolickeho extraktu kôry stromu *Durio affinis Becc.* O rok neskôr bol delením na základe aktivity z metanolickeho extraktu *Hibiscus ficulneus* vyizolovaný boehmenan aj boehmenan D (**3a**, **3d**; Shono a spol., 2015). Ako posledná známa rastlina obsahujúca boehmenan (**3a**), vystupuje *Macaranga denticulata*, ktorej korene boli využívané v tradičnej čínskej medicíne na liečbu hepatitídy (Yang a spol., 2015). Vybrané rastliny sú schématicky namalované na Obrázku 5.

Fytochemický prieskum všetkých spomínaných rastlín nasledovaný identifikáciou a izoláciou nových prírodných látok, mimo iných aj boehmenanov (Obrázok 6; **3a-3g**), tak poskytol nové potenciálne biologicky aktívne látky a tým vodítko ku vyriešeniu pôvodu liečivých účinkov skúmaných rastlín. Izolácia boehmenanov z liečivých rastlín síce indikuje ich možnú biologickú aktivitu, no

jednoznačne ju nepotvrďuje, preto je ich hlbšie štúdium o ich štruktúre a vlastnostiach veľmi významné a perspektívne. Naviac sa nepodarila určiť absolútna stereochemia chirálnych centier boehmenanov a už teraz je isté, že niektoré rastliny produkujú opačné antipody daných látok (napr. *Durio affinis* Becc = boehmenan (**3a**); *Helicteres hirsuta* = boehmenan (**3a**)).



Obrázok 6: Názorné vyobrazenie všetkých doposiaľ vyizolovaných zástupcov skupiny boehmenanov (**3a-3g**).

2.2.2 Základná charakteristika a biologické vlastnosti boehmenanov

Všetky boehmenany (**3a-3f**) získané izoláciou z extraktov rôznych častí rastlín, boli charakterizované pomocou $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C NMR}$ a HRESIMS (Rudiyansyah a spol., 2014), IČ spektroskopie, kvapalinovej chromatografie a hmotnostného spektrometru. Po vyriešení štruktúry boehmenanov obsahujúcej benzofuranovú kostru, ktorá vznikla dimerizáciou a fenol oxidačným couplingom dvoch fenylypropanoidových jednotiek (Schéma 4), boli tieto látky zaradené do rozsiahlej skupiny sekundárnych metabolitov a to ku fenylypropanoidom. Konkrétnejšie boli zaradené ku substituovaným benzofuranovým neolignanom. Post-dimerizačné redoxné enzymatické reakcie pomohli pripojiť ku základnej benzofuranovej kostre ďalšie dve fenylypropanoidové jednotky, čím

vznikla celková kostra boehmenanov, ktorá je v konečnom dôsledku tvorená polymerizáciou štyroch fenylypropanoidových jednotiek. Substitúciou postranných reťazcov sa vytvára paleta rôznych boehmenanov, ktoré sa na základe toho ďalej delia na boehmenan a boehmenan B-X (Obrázok 6; **3a-g**).

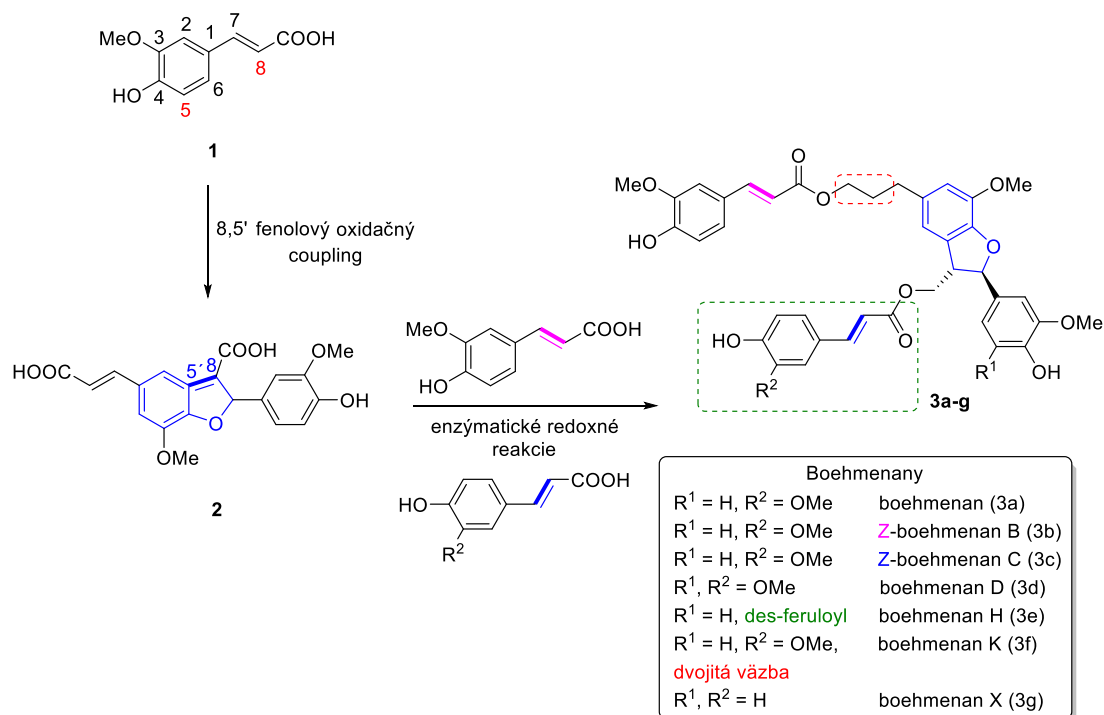


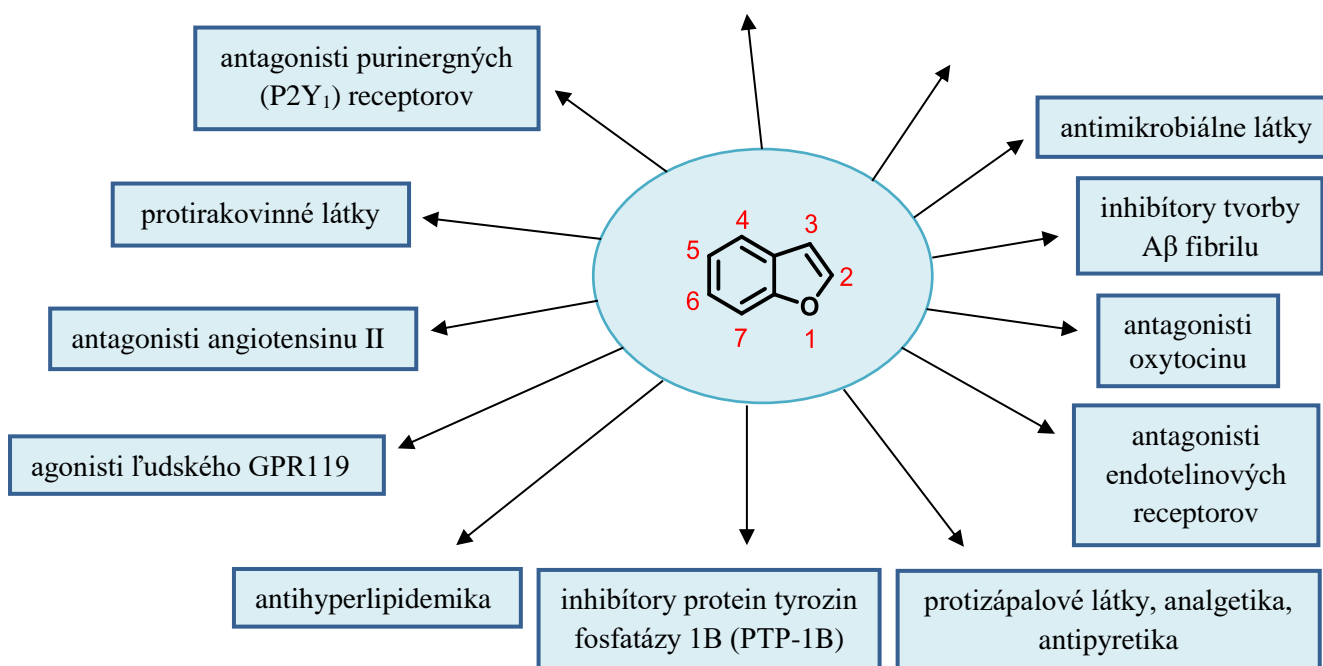
Schéma 4: Biosyntéza boehmenanov počínajúca dimerizáciou a fenol oxidačným couplingom dvoch fenylypropanoidových jednotiek, nasledovanou pripojením ďalších dvoch fenylypropanoidových jednotiek pomocou enzymatických redoxných reakcií.

Prečo sa ale práve táto skupina látok stala predmetom záujmu mnohých vedeckých skupín? Jeden z faktorov je ich už spomínaný výskyt v liečivých rastlinách, ďalší je ich samotná kostra. Benzofuranový motív totiž vykazuje širokú škálu biologických aktivít (Shono a spol., 2015), pre ktorý sa aj táto skupina látok, jednoznačne zaradila ku novým kandidátom potenciálne biologicky aktívnych látok. (Obrázok 7).

Keďže sa ale boehmenany, tak ako väčšina sekundárnych metabolitov, vyskytujú v rastlinách vo veľmi nízkych koncentráciách, je potrebné pri izolácii zamedziť stratovosť izolovanej látky. Preto sa na izoláciu látok, ktoré sú následne testované na biologickú aktivitu, využíva vysoko rýchlostná protiprúdová chromatografia (HSCCC) s kontinuálnou metódou delenia medzi dvoma kvapalnými fázami a s veľmi nízkou stratovosť vzorky. Pomocou tejto metódy boli vyzisované aj niektoré boehmenany (Ying a spol. 2014). Napriek všetkým snahám nebolo získané dostatočné množstvo k určeniu absolútnej konfigurácie týchto látok.

agonisti sfingosin-1 fosfát
(SIP₁) receptorov

antivirotika



Obrázok 7: Vybrané biologické vlastnosti benzofuranovej kostry (prevzaté z Khanam a Shamsuzzaman; 2015).

Boehmenany podstúpili, v prvom rade biologické testy ich cytotoxických aktivít voči vybraným druhom ľudských karcinómov. Vzhľadom na vysoký výskyt nádorových chorôb u ľudí, patria tieto testy ku výrazne najbežnejším štúdiám potenciálne biologicky aktívnych látok. Namerané hodnoty ED₅₀ a IC₅₀ jednotlivých testov sú zhrnuté v Tabuľke 1. Boehmenan (**3a**) a boehmenan H (**3e**) boli testované proti ľudským nádorovým líniam karcinómu pľúc (Lu1), karcinómu prostaty (LNCaP) a líniam nádoru prsníku (MCF-7), voči ktorým vykazoval boehmenan H (**3e**) vyššiu aktivitu. Lúnia HUVEC vystupovala ako kontrolná lúnia zdravých buniek (Chin a spol., 2006). Boehmenan (**3a**) bol testovaný aj proti ľudským pľúcnyim nádorovým líniam (A549; Wu a spol., 2004) a ľudským nádorovým líniam krčku maternice (HeLa), voči ktorým vykazoval nízku biologickú aktivitu (Rudiyansyah a spol., 2014). Voči lúni ľudského nádoru prsníku (T47D) vykazoval boehmenan vyššiu aktivitu a voči kontrolnej lúni vero, bol netoxický (Rudiyansyah a spol., 2014). Boehmenan H (**3e**) a boehmenan K boli testované voči nádorovým líniam v dvoch štádiách. V log štádiu prebiehalo buncené delenie, zatiaľ čo v lag štádiu ku deleniu buniek nedochádzalo. Boehmenan H (**3e**) vykazoval vysokú aktivitu voči HeLa lúni v oboch fázach. Voči A549 lúniám a nádorovým líniam larynxu (Hep-2) len v log fáze, čo znamená, že sa u týchto lúni zvyšuje aktivita boehmenanu H pri exponenciálnom raste buniek. Boehmenan K (**3f**) vykazoval nízku aktivitu voči HeLa, A549 aj Hep-2 nádorovým lúniám. (Moujir a spol., 2007). Boehmenan X (**3g**) bol testovaný na jeho antiproliferačnú aktivitu voči ľudským bunkovým lúniám rakoviny vaječníku (HO8910), nádoru prsníku (MCF-7), myeloidnej leukémii (HL-60) a epitelovým bunkovým lúniám ľudského pľúcneho adenokarcinómu (A590; Ying a spol. 2014), voči ktorým vykazoval veľmi nízku biologickú aktivitu.

Mechanizmus antiproliferačného a cytotoxického pôsobenia bol bližšie študovaný u boehmenanu voči líniam nemalobunkového pľúcneho karcinómu (A549 NSCLC; Pan a spol., 2016) a voči líniam ľudského epidermálneho karcinómu (A431; Pan a spol., 2017). U týchto bunkových línii totiž boehmenan vykazoval vyššiu cytotoxickú aktivitu (Tabuľka 1).

Prietoková cytometria preukázala, že mechanizmus anti-proliferačného účinku boehmenanu (**3f**) na A549 NSCL súvisí s uväznením buniek v G1 bunkovej fáze. Uväznenie bolo sprevádzané redukciou migrácie a zvýšením apoptózy, ktorá bola spustená po modulácii proteínov s ňou spojených (ako napríklad p53 a p21). Indukcia apoptózy, čiže programovanej bunkovej smrti, je jedna zo základných cieľov terapie nádorových chorôb. Môže byť vyvolaná skrz tzv. mitochondriálnu dráhu (Liu a spol., 2010), ktorej hlavný mechanizmus tkvie v disipácii mitochondriálneho membránového potenciálu $\Delta\Psi_m$. Po jeho kolapse dochádza ku rozvoľneniu membrány, z ktorej sa do cytozolu uvoľňuje cytochróm C a iné pro-apoptické molekuly. Nakoniec sú aktivované DNA reparačné enzýmy ako kaspáza 3 a poly (ADP-ribozyl) polymeráza (PARP), čo vyúsťuje v apoptózu bunky (Pan a spol., 2013). Bolo dokázané, že boehmenan (**3f**) indukuje kolaps $\Delta\Psi_m$, čo spúšťa kaskádu reakcií a vyúsťuje v apoptózu A549 bunecných línii.

Ďalším dôležitým cieľom liečby rakoviny je deaktivácia receptora epidermálneho rastového faktoru (EGFR). Tento transmembránový tyrozin-kinázový receptor aktivuje mnohé kinázy ako je napríklad MAP kináza, čo vyúsťuje v stimuláciu rastu tumoru (Freudlsperger a spol., 2011). Tretí preukázaný mechanizmus antitumorových vlastností boehmenanu (**3f**) voči A549 NSCL línii súvisel práve s deaktiváciou EGFR, spolu s jeho „downstream“ signálnou dráhou (Pan a spol., 2016).

Inhibícia rastu A431 bunkovej línii bola sprostredkovaná boehmenanom (**3f**), v závislosti na jeho koncentrácii a čase pôsobenia. Boehmenan (**3f**) blokoval bunkový cyklus v G2/M fáze a tak, ako u A549 NSCL bunkových línii, boehmenan indukoval apoptózou ako skrz moduláciu proteínov s ňou súvisiacich (p21, štiepiaca kaspáza-3, štiepiaca poly (ADP-riboza) polymeráza atď.), tak skrz zmenu mitochondriálneho membránového potenciálu $\Delta\Psi_m$. Táto zmena bola v prípade A431 bunkovej línii vyvolaná indukciou reaktívnych foriem kyslíka (ROS). Boehmenan ďalej vykazoval aj deaktiváciu EGFR s jeho „downstream“ signálnou dráhou, ktorá výrazne prispela k jeho cytotoxickým vlastnostiam (Pan a spol., 2017).

Mimo cytotoxických vlastností vykazovali boehmenany (**3a-g**) aj iné biologické aktivity. Jedna z nich súvisí s moduláciou Wnt/ β -katenin signálnej dráhy. Tá vystupuje v mnohých biologických procesoch a jej aktivácia pôsobí ako spúšťač mechanizmus viacerých patologických pochodov v organizme. Spúšťačom Wnt signálnej dráhy je Wnt proteín, v prítomnosti ktorého dochádza ku rozpadnutiu deštruktívneho komplexu β -kateninu. To vedie ku jeho stabilizácii, následnej akumulácii a presunu do jadra, kde vytvára komplexy s koaktivátormi. Tým v konečnom dôsledku spúšťa expresiu génov spojených s Wnt signálnou dráhou. Pri absencii Wnt proteínu sú hladiny β -kateninu regulované deštruktívnym komplexom. Ten obsahuje kinázové domény fosforylujúce β -katenin, čím sa spúšťa jeho

následná degradácia sprostredkovaná ubiquitin proteazomovým komplexom. Regulácia Wnt signálnej dráhy je veľmi prísna. Jej nadmerná aktivácia je totiž spojená s množstvom ľudských chorôb vrátane rakoviny. Preto jedna z možných stratégií pri prevencii chorôb spojených s Wnt signálnou dráhou je jej inhibícia sprostredkovaná zamedzením akumulácie β -kateninu, prípadne vzniku komplexu β -kateninu s kotranskripčnými faktormi v jadre.

Boehmenan (**3a**) a boehmenan D (**3f**) vykazovali inhibičnú aktivitu voči Wnt signálnej dráhe s IC_{50} hodnotami 1,0 a 1,9 μ M. Boehmenan vykazoval cytotoxickú aktivitu voči rakovinovým bunecným líniam závislých na Wnt signálnej dráhe, rovnako ako voči líniam nezávislých na tejto dráhe. Bolo dokázané, že boehmenan indukuje zníženie hladín cytozolického aj nukleárneho β -kateninu, podľa čoho sa dá usudzovať na fakt, že inhibícia Wnt signálnej dráhy sprostredkovaná boehmenanom súvisí so znižovaním koncentrácie β -kateninu. Presný mechanizmus pôsobenia boehmenanu zatiaľ ale čaká na odhalenie (Shono a spol., 2015).

Poslednou zistenou biologickou aktivitou boehmenanov je inhibičná aktivita protein-tyrosin fosfatázy 1B (PTP1B), vystupujúcej ako základný člen rodiny protein tyrozinových fosfatáz (PTP). PTP1B pôsobí ako negatívny regulátor signálnej dráhy inzulínu, čím sa z nej stáva potenciálny terapeutický cieľ pri liečbe diabetes 2 typu. Okrem toho vystupuje táto kináza aj pri vývoji rakoviny prsníku, čím sa z nej stáva potenciálny terapeutický cieľ aj tohto ochorenia. Sasaki a spol. zistili, že (\pm)-boehmenan vykazoval voči PTP1B inhibičnú aktivitu s IC_{50} hodnotami 43,5 μ M (Sasaki a spol., 2011).

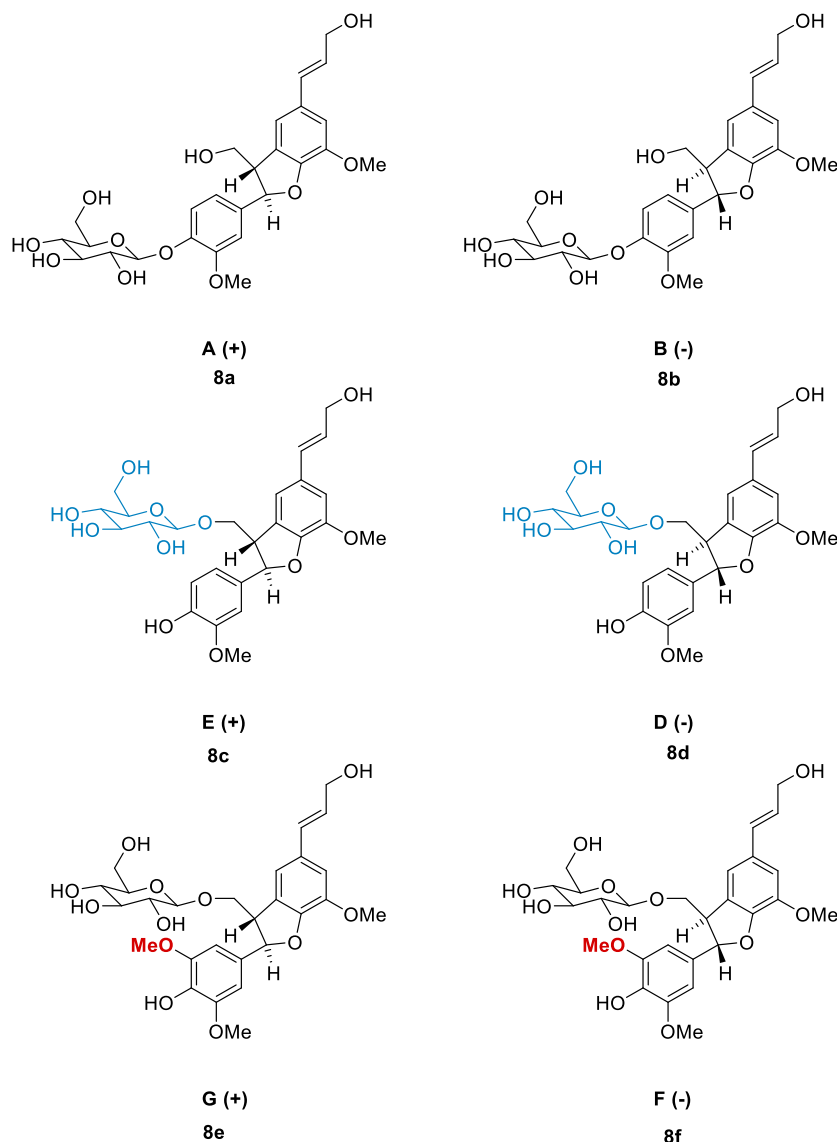
Napriek faktu, že boehmenany nájdené v prírode majú potenciálne uplatnenie vo farmaceutickom priemysle, ich absolútna konfigurácia a štruktúra ešte neboli na počiatku tohto projektu potvrdené syntetickou cestou. A práve kvôli tejto skutočnosti sme sa začali o boehmenany bližšie zaujímať.

	Lu1	LNCaP	MCF-7	HUVEC	A549 (lag) (log)	HeLa (lag) (log)	Hep-2 (lag) (log)	T47D	vero	A549 NSCLC	HO8910	HL-60	A431
(-)-boehmenan Doxorubicin	10,4	9,5	10,0	9,0	18,4	93,5		13,4	790	6.48*			1.6*
(-)-boehmenan H Paclitaxel	5,3	7,7	10,2	6,2			9,4						
	0,002	0,001	0,006	0,008									
boehmenan K					>20	>20	>20	>20	>20	>20			
boehmenan H					14,5	4,2	2,6	1,7	>20	10,7			
Actinomycin D					NA	NA	0,01 4	0,00 2	0,24	0,008			
boehmenan X Adriamycin			32,5		36,5						25,7	28,1	
			0,55		0,82						0,66	0,39	

Tabuľka 1: Výsledné hodnoty cytotoxickej aktivity vybraných boehmenanov a kontrolných látok (doxorubicin, paclitaxel, Actinomycin D a Adriamycin) voči vybraným nádorovým líniam (Lu1, LNCaP, MCF-7, A549, HeLa, Hep-2, T47D, HO8910, HL-60 a A431) a vybraným kontrolným líniam HUVEC a vero) v hodnotách ED₅₀ (µg/ml); *IC₅₀ (µg/ml)

2.3 Úvod ku dehydrodikoniferyl alkohol-4-β-D-glukosidom

Do druhej skupiny látok, o ktoré som sa zaujímala patria cukerné konjugáty neolignanov, konkrétne alkohol-4-β-D-glukosidy (DCG; Obrázok 1). Táto látka bola izolovaná z rastlinného tumoru barvínkovca ružového (*Catharanthus roseus*) spolu s ďalšími 5-timi štruktúrnymi derivátmi. (Obrázok 8, **8a-8f**)



Obrázok 8: Štruktúry charakterizovaných DCG izomérov (**8a-f**; prevzaté z Binns 1987).

Rovnako ako boehmenany, aj DCG spadajú do skupiny substituovaných benzofuranových neolignanov. Identický je pravdepodobne aj ich význam pre rastlinu, ktorý spočíva v obrannom mechanizme (Teutonico a spol., 1991).

Dôvodom nášho záujmu o DCG deriváty sú výsledky biologických testov pri ktorých bol skúmaný vplyv týchto látok na rast rastlín. Zistilo sa, že niektoré izoméry sú schopné „nahradzovať“ fytohormóny

cytokiníny. Konkrétne sa jednalo o tabakový (*Nicotiana tabacum*) kalus, ktorý v prítomnosti DCG rástol aj bez dodania exogénnych cytokinínov.

Najsignifikantnejší vplyv na delenie buniek kalusu mali izoméry DCG-A a B (**8a, 8b**). Zdá sa preto, že tieto látky majú pri vývoji kalusu podobný vplyv ako cytokiníny. Látky DCG-E,D,G a F (**8c-8f**) neboli účinné čo nasvedčuje na fakt, že poloha naviazanej glukózy ma zrejmy vplyv na aktivitu DCG na bunkové delenie. Naopak, enantioména forma látky na ňu vplyv nemá. Samotný priebeh posobenia DCG-A a B (**8a, 8b**) na delenie buniek tabakového kalusu bol prekvapujúci a nekoreloval s priebehom bunkového delenia cytokinínov. Na počiatku experimentu bol totiž pozorovaný jav „auxinoveho zvačšovaia“, pri ktorom sa bunky nedelia ale zvačšujú. Tento typ chovania je známy pri pôsobení auxinu na buncné kultúry, z čoho vyplýva aj jeho názov. Po 4-8 dňoch sa začali bunky deliť a dali za vznik kalusu, morfologicky nerozoznatel'nému od vzorku kalusu, ktorý bol ošetrovaný cytokinínmi. (Binns a spol., 1987).

Tento experiment viedol ku záveru, že deriváty DCG-A a B (**8a, 8b**) pôsobia v rastlinných signálnych dráhach cytokinínov. Presnejší mechanizmus spočíva v cytokínmi stimulovanej akumulácii DCG (**8a, 8b**) a následnej iniciácii bunkového delenia. Z čoho vyplýva, že cytokiníny sprostredkujú buncné delenie skrz reguláciu a akumuláciu skupiny molekúl, medzi ktoré patria aj DCG (**8a, 8b**). Do týchto komponentov regulácie bunkového delenia sprostredkovanej cytokínmi (Binns a spol., 1987; Attoumbrea a spol. 2006) najčastejšie patria molekuly prítomné v buncnej stene (Binns a spol., 1987). Tie následne priamo pôsobia na buncné delenie.

U ďalších experimentov DCG-A a B (**8a, 8b**) nevykazovali totožné vlastnosti s cytokinínmi. Neposobili napríklad na rast koreňa a indukciu syntézy betakyaninu v klíčkoch laskovca (*Amaranthus*), z čoho vyplýva, že DCG nie sú schopné nahradiť cytokiníny v plnej škále (Teutonico a spol., 1991).

2.3.1 Biosyntéza DCG

Prvý predpoklad vzniku DCG (**8a-8f**) v rastlinách, nezahŕňal priamu syntézu ale fragmentáciu buncnej steny. Experimenty tento predpoklad zavrhlí a bolo dokázané, že tak, ako je to v prípade ostatných neolignanov, sú aj oni priame produkty šikimátovej dráhy (Orr a Lynn, 1991). Konkrétne sú to produkty koniferyl alkoholu, ktorý po polymerizácii za účasti peroxidáz a oxidačného couplingu, dáva za vznik základnej kostre pozostávajúcej z boehmenanového jadra (Schéma 1). Následne prebieha glykozylácia DCG na fenolovom kyslíku (Schéma 5; Orr a Lynn, 1991).

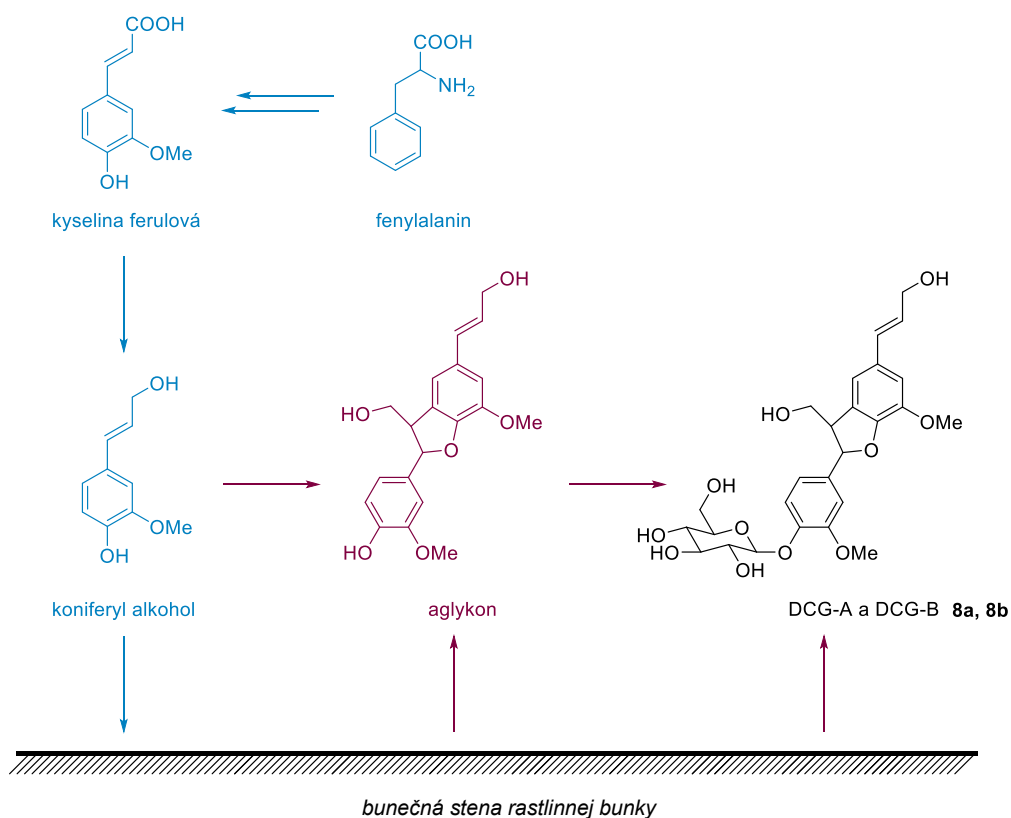


Schéma 5: Biosyntéza DCG vychádzajúca zo šikimátovej dráhy (modrou), fragmentáciou bunečnej steny (ružovou), prípadne cez medziprodukt aglykon (ružovou; prevzaté z Orr a Lynn, 1992)

Rozklad DCG (**8a-8f**) je u rastlín veľmi pomalý a ich koncentrácia je prísne kontrolovaná skrz dostupnosť koniferyl alkoholu (Teutonico a spol., 1991).

Bohužiaľ všetky ďalšie informácie o DCG konjugátoch nie sú známe, čo nás viedlo ku rozhodnutiu zahrnúť syntézu DCG-A a B (**8a, 8b**) do nášho projektu.

2.4 Príprava prírodných látok so zameraním na prípravu benzofuranového jadra

2.4.1 Od izolácii ku príprave

Ako bolo na začiatku práce spomenuté, je izolácia, syntéza a štúdium biologickej aktivity prírodných látok dôležité z viacerých dôvodov. Z farmaceutického pohľadu je honba za novými prírodnými látkami výhodná z hľadiska možnosti nájdenia novej biologicky aktívnej zlúčeniny a v konečnom dôsledku nového terapeutika. Z chemického hľadiska ide hlavne o nájdenie cesty prípravy daných látok.

Aktívne študovanou oblasťou pre nachádzanie nových prírodných látok je skupina sekundárnych metabolitov rastlín. Tá poskytuje širokú škálu zlúčenín s ešte širšou variabilitou v ich štruktúrach a funkciách. Preto už samotné extrakty z rastlín poskytujú dôležité informácie o prítomnosti alebo

neprítomnosti zlúčenín s potenciálnou biologickou aktivitou. Po nasledovanej a hlavne úspešnej izolácii sa jednotlivé látky testujú na biologickú aktivitu. Tie s najvyššou aktivitou, čaká ich laboratórna príprava, ktorá je pri hlbších štúdiách často nevyhnutná. Dôvodom je hlavne skutočnosť, že mnohé sekundárne metabolity sa v rastlinách vyskytujú v príliš nízkych koncentráciách. Preto by bola potenciálna izolácia konkrétnej látky v potrebných množstvách príliš neefektívna. Z hľadiska aplikovaného výskumu a priemyslu by bolo získavanie zlúčenín s potvrdenou a charakterizovanou biologickou aktivitou, vzhľadom na spomínané nízke koncentrácie a celkovú náročnosť, nerealizovateľné. Cieľom totálnej syntézy je preto získanie požadovanej látky čo najrýchlejšou, a tiež cestou, ktorá by umožnila syntézu prírodných syntetických homológov. Tým máme možnosť zvýšiť aktivitu, prípadne zlepšiť chemicko-fyzikálne vlastnosti zlúčenín. A tak, ako v živote, aj v organickej syntéze niekedy platí, že cesta je dôležitejšia ako cieľ. V neposlednom rade totiž navrhovanie a samotná realizácia syntéz prírodných látok prináša okrem mnohých úskalí, aj nové možnosti syntézy a poznatky. Predsa len, pripraviť prírodnú látku podobnú, prípadne, lepšou cestou ako ju vytvorila príroda, je dostatočne veľkou výzvou pre každého chemika či experimentálneho biológa. Preto štúdium prírodných látok nie je perspektívne len z farmaceutického ale aj chemického pohľadu.

Pri samotnej príprave prírodných látok sa využívajú poznatky z biosyntézy daných zlúčenín, ktorú sa pomocou organickej chémie snažíme imitovať. V prvom kroku navrhovania syntézy zložitejších prírodných látok sa využíva retrosyntéza. Tento teoretický prístup je založený na pomyselnom rozdelení molekuly na menšie, jednoduchšie celky, ktorých príprava je realizovateľná. V druhom kroku sa navrhujú vhodné prepojenia jednotlivých celkov či prípadne ďalšie úpravy molekúl. Pritom sa využívajú overené alebo novo navrhnuté postupy, ktoré zväčša napodobňujú biosyntézu daných látok. To dá v konečnom dôsledku za vznik celkovej kostre prírodnej látky. Následne neostáva nič, len teoretickú syntézu overiť.

2.4.2 Rôzne prístupy prípravy benzofuranovej kostry

Kľúčový krok v syntéze neolignanov benzofuranového typu je samotná príprava benzofuranovej kostry. Tento typ štruktúrneho motívu má obecnú známu biologickú aktivitu a preto je jeho syntéza v literatúre široko obsiahnutá (Khanam a Shamsuzzaman; 2015; Abu-Hashem a spol., 2014) a zahŕňa rôzne prístupy. Veľa z nich je tzv. biomimetických, čo znamená že sú založené na napodobňovaní prírodnej cesty. Zahŕňajú preto 8-5'homodimerizáciu dvoch fenylpropanoidových jednotiek nasledovanú fenolovým oxidačným couplingom.

Mechanizmus dimerizácie fenylpropanoidových jednotiek s nasledovaným fenolovým oxidačným couplingom tkvie v prvom rade v reakcii dvoch rôznych radikálových mezomérov 4-hydroxyfenylpropanoidovej jednotky (Obrázok 3). Jeden s voľným elektrónom na benzénovom jadre v polohe 5', druhý na alifatickom reťazci v polohe 8. Ich dimerizáciou tak vzniká medziprodukt s novou

8-5' väzbou. V kyslom prostredí sa okamžite spúšťa kaskáda stabilizačných reakcií a medziprodukt podlieha intramolekulárnej cyklizácii, za vzniku benzofuranového cyklického produktu (Schéma 6).

Jednoelektronový POC je najčastejšie sprostredkovaný pomocou enzýmov, biomimetického radikálového homocouplingu alebo couplingových reakcií za použitia tranzitných kovov. Prehľad jednotlivých reakcií s podmienkami je zhrnutý v Tabuľke 2.

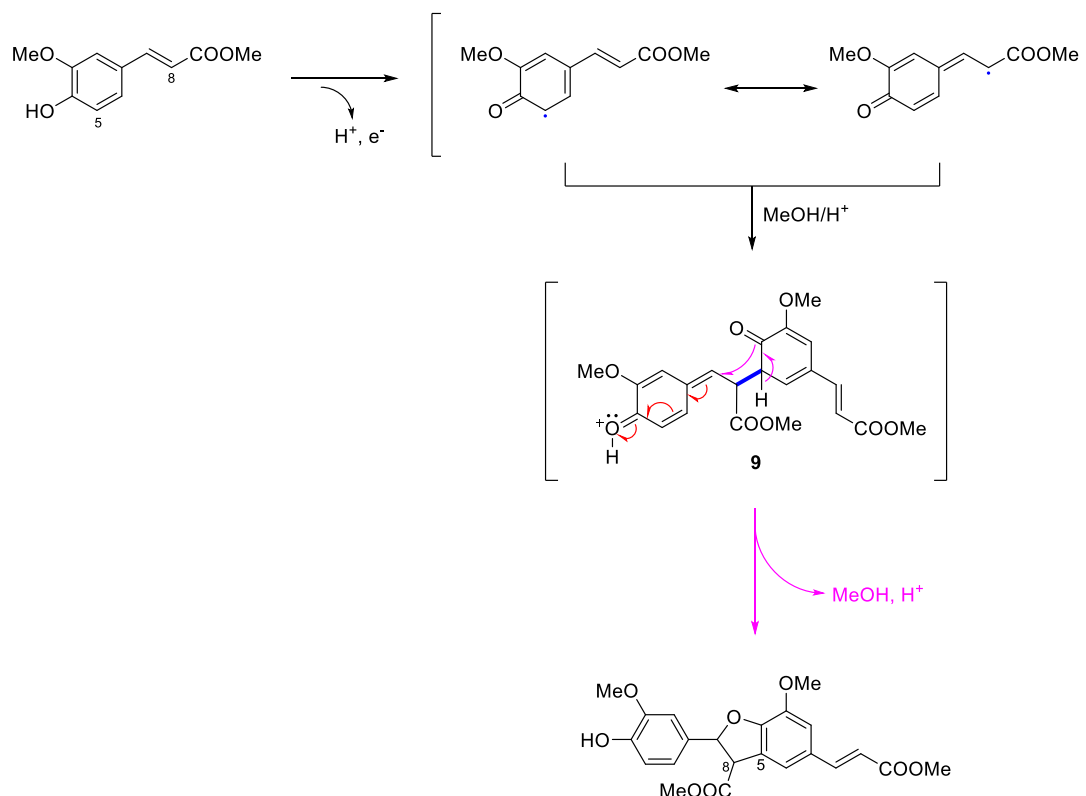


Schéma 6: Mechanizmus priebehu jednoelektronového POC prebiehajúceho cez radikálové mezoméry, ktoré po vzájomnej dimerizácii (9) podliehajú intramolekulárnej cyklizácii za vzniku benzofuranovej kostry (prevzaté z Magoulas a Papaioannou, 2014).

Príprava benzofuranovej kostry za použitia enzýmov

Prvá využívaná cesta za pomoci enzýmov sa týka hlavne peroxidáz a lakkáz. Peroxidázy a lakkázy sú dve rôzne rodiny redoxných enzýmov (Witayakran a spol., 2007) sprostredkujúcich jednoelektronový oxidačný coupling. Líšia sa v type kovu nachádzajúcom sa v aktívnom centre a v donore elektrónu a tým pádom vo svojej reaktivite (Wang a spol., 2013). Peroxidázy obsahujú v aktívnom centre železitý zati aľ čo lakkázy meďnatý komplex. Ako donor elektrónu využívajú peroxidázy jeho produkciu pri redukcii peroxidu vodíku na vodu. Samotný peroxid vodíku je produkovaný buď z molekuly kyslíku pomocou NADPH oxidázy, pričom vzniká najprv superoxidový radikál, ktorý prechádza na produkt za katalýzy superoxid dizmutázy (SOD).

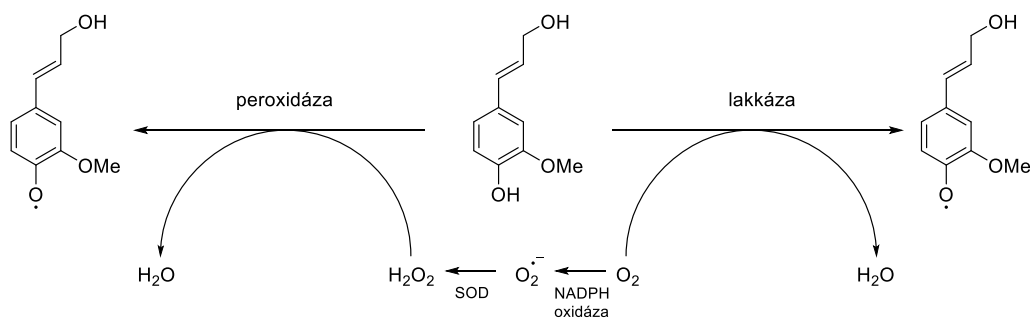


Schéma 7: Mechanizmus jednoelektrónovej oxidácie peroxidázou využívajúcej peroxid vodíku a lakkázou využívajúcej molekulárny kyslík (prevzaté z Wang a spol., 2013).

Alebo priamo zo superoxidu, ktorý sa v bunke mohol vytvoriť iným mechanizmom. Lakkázy využívajú ako donor elektrónu kyslík, ktorý sa tak redukuje na vodu. Čo sa týka substrátu, peroxidázy využívajú pri POC ako substrát monolignany aj oligoméry lignanov. Lakkázy len monolignany (Wang a spol., 2013). Možné podmienky reakcie POC využitím peroxidáz a lakkáz pri tvorbe benzofuranovej kostry sú zhrnuté v Tabuľke 2.

Biomimetická oxidácia a príprava benzofuranovej kostry za použitia kovov

Iná cesta ku benzofuranovej kostre využíva biomimetickú oxidáciu fenylypropanoidov. Tá je založená na využívaní environmentálne prijateľných oxidačných činidiel, medzi ktoré patrí hlavne molekulárny kyslík, peroxid vodíku a elektrochemická oxidácia (Nishiyama a spol. 1983).

Príroda ale inšpiruje v mnohých smeroch a prispela aj ku novým oxidačným systémom. Využitím tranzitných kovov sa preto vyvinuli mnohé oxidačné systémy ktoré imitujú katalytické systémy nachádzajúce sa v živých organizmoch (Kurosawa a spol., 2004).

Iné prípravy benzofuranovej kostry

Okrem týchto troch najhlavnejších príprav benzofuranového jadra mechanizmom jednoelektronového fenolového oxidačného couplingu, sa využívajú aj iné alternatívne stratégie. Napríklad UV v bezkyslíkatom prostredí (Chiang a Li, 1978) alebo v prítomnosti farbiva proflavinu (methylénová modrá; Kuo a spol. 1991). Ďalej oxidácia pomocou kyseliny dusitej (Ziodrou a Fruton, 1957), dusičnanov (pH 1; Cotelle a Vezin, 2001), stabilných radikálov (Miller, 1972), prípadne organokovovými zlúčeninami jódu v oxidačnom stave +5 (hypervalentný jód; Juhász a spol., 2000). Možno najprekvapivejšia oxidácia prebehla za použitia huby *Caldariomyces fumago* (Whitlock, 1976) a baktérie *Bacillus megaterium*, (Torres a Rosazza, 2001), ktoré ju sprostredkovali využitím vlastných peroxidáz.

látka	oxidač. Činidlo, katalyzátor	rozpušťaďlo	výt'ažok	referencie
Radikálové reakcie bez prítomnosti kovov				
Caf	O ₂	voda, pH <7		Cilliers
Et-Fer	elektrochemický POC	acetonitril	13%	Neudorffer
Et-Fer	anodická elektrolýza, LiClO ₄	acetonitril-tetramethylammonium hydroxid	13%	Neudorffer
HCA methylester	hypervalentný I, MnTTPCl	benzen-aceton	36%	Maeda
Tranzitné kovy				
Et-Fer	PhH-H ₂ O; K ₃ [Fe(CN) ₆]	pH <7	84%	Wang
Me-Fer	Mn(III)TPPOAc	metanol, pH 3.0	22%	Chioccara
	H ₂ O ₂ s MnTPPCl		25%	
Me-HCA	Ag ₂ O	benzen-aceton	15%	Maeda
Me-p-Cou	Ag ₂ O	PhH-aceton bezvodý	23%	Pieters
Me-Caf	- -	- -	33%	- -
Me-Fer	- -	- -	50%	- -
Me-Fer	FeCl ₃	aceton	34%	Kuo a Wu
Me-Fer	Ag ₂ O	toluen-aceton (2:1)	45%	Rakotondramanana
Me-Fer	Ag ₂ O	PhH-aceton bezvodý	29%	Subbaraju
Et-Caf	Ag ₂ O	PhH-THF	20%	Antus
Et-Caf a ConAl	Ag ₂ O/Ag ₂ CO ₃	benzen-aceton	6%/8%	
Me-Fer	Ag ₂ O	benzen-aceton	38%	
CAPE	Ag ₂ O	chloroform	58%	Daquino
Me-Fer	CH ₃ COOAg	toluen	20%	Snyder a Kontes
Me-CafA +Me-SinA	MnO ₂ in CH ₂ Cl ₂	dioxan, pH 3.2	14%	Saliu
Me-FerA +Me-SinA	- -	- -	24%	- -
Enzýmová katalýza				
FerA	lakáza	etanol, pH 6.0		Carunchio
Evans'2-oxazolidinonamid FerA	HRP-H ₂ O ₂	aceton, pH 3,5		Bruschi
Et-Fer + ConAl	HRP-H ₂ O ₂ urea komplex	aceton, pH 5.0	6,4%	Zhang
CafA + FerA	APP/HRP-H ₂ O ₂	fosfátový pufr pH 6.1		Arriente-Baez a Stark
CafA + SinA				
Me-CafA +Me-SinA	HRP- H ₂ O ₂	dioxan, pH 3.2	12%	Saliu

látka	oxidač. Činidlo, katalyzátor	rozpúšťadlo	výt'azok	referencie
Me-FerA +Me-SinA			19%	
Me-CafA +Me-FerA			32%	
Spm-CouA hybrid (S)- dihydroxyverbacin	O ₂ ; extrakt zo semena jačmeňa	metanol	17%	Nezbedova
kumaroylagmatin CafA + (R)-DplA	extrakt zo semena jačmeňa	metanol	19%	- -
Iné prípravy	UV/ bez O ₂ UV, proflavin HNO ₂ NO ₂ ⁻ <i>Caldariomyces fumago</i> <i>Bacillus megaterium</i>			Chiang a Li Kuo Ziodrou a Fruton Cotelle a Vezin Whitlock Torres a Rosazza

Tabuľka 2: Podmienky reakcie fenolového oxidačného couplingu (POC).

2.5 Príprava boehmenanu

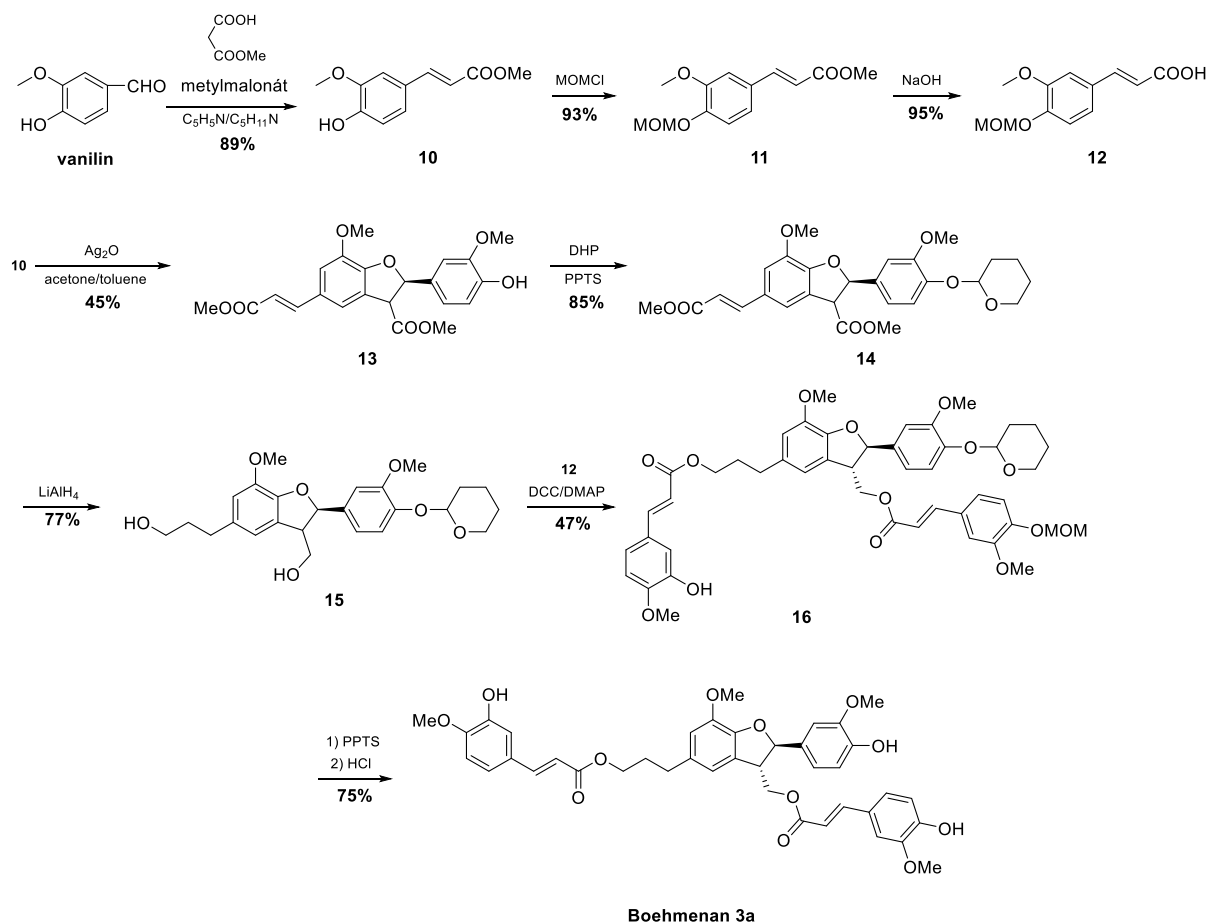


Schéma 8: Príprava boehmenanu (prevzaté z Xia a spol., 2014).

Zo skupiny boehmenanov je v literatúre popísaná len jedna celková príprava, a to samotného boehmenanu v jeho racemickej forme (Xia a spol., 2014). Kľúčový krok syntézy spočíva v tvorbe benzofuranovej kostry. Tá bola pripravená pomocou oxidačného couplingu metylesteru kyseliny ferulevej katalyzovaným oxidom strieborným. Celková príprava je zaznamenaná na Schéme 8.

Prvým krokom syntéznej cesty bola Knoevenagelová kondenzácia vanilínu s methyl malonátom a dala za vznik zlúčenine **10** s výťažkom 89%. Následným naviazaním protektívnej skupiny methylmethyletheru (MOM) za pomoci chlormethylmetyleteru (MOMCl) na 4-hydroxylovú skupinu sa vytvorí produkt **11** (93%), ktorý hydrolyzou prechádza na zlúčeninu **12** (95%; metylester kyseliny ferulevej). Biomimetickým oxidačným couplingom zlúčeniny **10** v prítomnosti Ag_2O sa tvorí základná kostra benzofuranového neolignan (**13**). Výťažnosť reakcie sa líši v závislosti na podmienkach reakcie. Čerstvo pripravený Ag_2O poskytoval adukt **13** s vyšším výťažkom ako komerčne dostupný alebo recyklovaný Ag_2O . Systém rozpúšťadiel mal len malý efekt na výťažok zlúčeniny **13**. Znižovanie reakčnej teploty zvýšilo výťažnosť zlúčeniny **13** a znížilo množstvo vedľajšieho produktu. Navyše, ak výťažok došiel do maxima no reakcia nebola pozastavená, začal výťažok klesať. Optimálne podmienky

boli následné: čerstvo priravený Ag_2O , bezvodý aceton a toluen, 30 h a $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Pri týchto podmienkach bol výtťažok zlúčeniny **13** 45%. Konverzia zlúčeniny **13** na intermediát **15** bola prevedená v dvoch krochoch. Prvým krokom bolo ochránenie hydroxylovej skupiny pomocou dihydropyranu (DHP) za vzniku zlúčeniny **14**. Druhým krokom následná redukcia esterových skupín a násobnej väzby v látke **14** pomocou LiAlH_4 . Látka **15** bola získana vo výtťažku 77%. Ďalší krok zahŕňa kondenzáciu s methylesterom kyseliny ferulovej v prítomnosti DCC a DMAP za izbovej teploty za vzniku zlúčeniny **16** (47%). Globálne odstránenie ochranných skupín za využitia PPTS a HCl dalo za vznik konečnej štruktúry boehmenanu **3a**.

Boehmenan (**3a**) bol tak pripravený v deviatich krokoch s výtťažkom posledného kroku 75% (Xia a spol., 2014).

2.6 Príprava DCG

Rovnako ako v prípade skupiny boehmenanov, je aj pri DCG v literatúre popísaná len jedna príprava, a to konkrétne príprava izomérov DCG A a B. Celková syntéza dehydrodikoniferyl alkohol-4- β -D-glukosidu (DCG) je zaznamenaná na Schéme 9 (Teutonico a spol., 1991).

Príprava vychádza z metylesteru kyseliny ferulovej **10**, ktorá v prvom kroku podstupuje oxidatívnu dimerizáciu za použitia $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ v chloroforme za vzniku zlúčeniny **17**. Nasledovaná Misunobu glykosylácia v prítomnosti DEAD, Ph_3P a acetylovanej glukózy v dichlormetane dala za vznik intermediátu **18**. Po ochránení glukózy a simultánnej redukcii methyleteru na alkohol v prítomnosti DIBAL, vznikli konečné produkty DCG-A **8a** a DCG-B **8b**. Látky boli identifikované na základe porovnania spektroskopických a chromatografických spektier s vyizolovanými prírodnými látkami s potvrdenou štruktúrou.

Zdroj bohužiaľ neposkytuje o syntéze dostatočujúce informácie vrátane výtťažnosti jednotlivých krokov a analytických dát samotného produktu (Teutonico a spol., 1991).

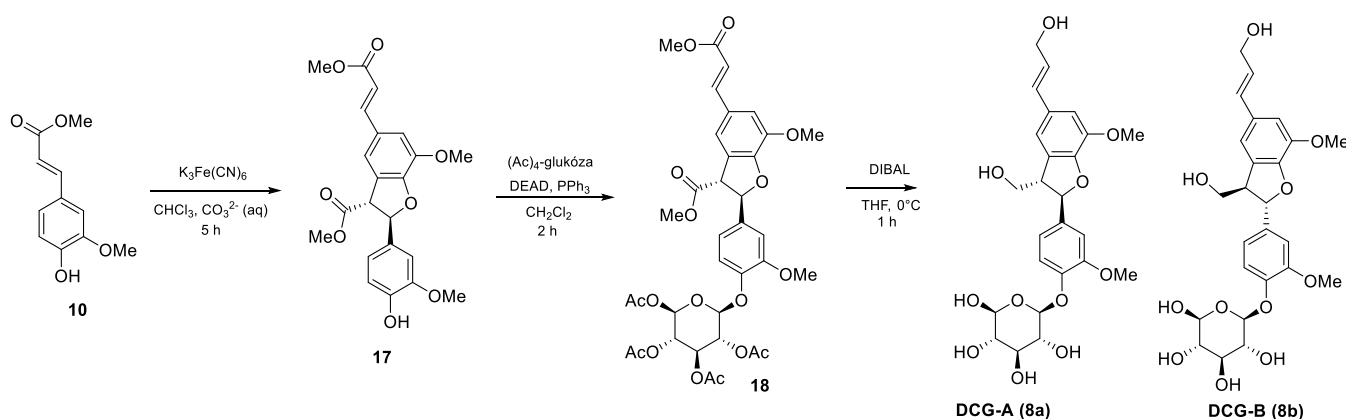


Schéma 9: Príprava DCG-A 8a a DCG-B 8b (prevzané z Teutonico a spol., 1991).

3. Experimentálna časť

3.1 Chemikálie

Použité chemikálie: vanilin, *N,N*-diisopropylethylamin (DIPEA), chlormethyl methyl ether (MOM-Cl), L-prolin, LiAlH_4 , KOH, triethylamin (TEA), di-*tert*-butyl dikarbonát (Boc_2O), Na_2SO_4 , NaH, benzylbromid (BnBr), *tert*-butyldimethylsilyl chlorid (TBS-Cl), *N,N*-diisopropylkarbodiimid (DIC), 4-dimethylaminopyridin (DMAP), LiCl, diisobutylaluminium hydrid (DIBAL-H), tetrabutylamonium fluorid (TBAF), tetra-*O*-acetylglukopyranosyl bromid, pyridin, Ag_2CO_3 , methanolát sodný (MeONa), katex Dowex (H^+), *para*-toluensulfonová kyselina (pTSA), ethylen glykol, triethyl ortoformiát, kyselina malonová, methylbromacetát, FeCl, práškový Mg, pyridinium chlorchromát (PCC), dichlormethan (DCM), toluen, tetrahydrofuran (THF), ethylacetát (EtOAc), *N,N*-dimethylformamid (DMF), petrolether (PE). Chemikálie boli získané od firem Sigma-Aldrich, Merck, Lachner, Fluka a Alfa Aesar. 1 M vodný roztok HCl, nasýtený vodný roztok NH_4Cl a NaCl boli pripravené v Laboratóriu Rastových regulátorov technickým personálom.

3.2 Metody a materiál

3.2.1 Obecné informácie

Priebeh reakcií bol kontrolovaný pomocou tenkovrstvej chromatografie (TLC) na hliníkových doskách pokrytých silikagelom 60 SIL G/UV254 s fluorescenčným indikátorom (Machery-Nagel). Jednotlivé zlúčeniny prítomné v reakčnej zmesi boli ďalej vizualizované pomocou vizualizačných roztokov a to konkrétne pomocou vanilínového roztoku, Hannesianovho roztoku a KMnO_4 .

Vzhľadom k povahe pripravovaných látok bola hlavnou analytickou metódou slúžiacou na potvrdenie štruktúry molekúl, nukleárna magnetická spektroskopia (NMR). Spektra z NMR boli získané na prístroji Jeol 500 JNM-ECA 500 MHz, ktorý pracuje pri frekvencii 500 MHz (^1H) a 125 MHz (^{13}C). Vzorok boli rozpustené v jednom z nasledujúcich rozpúšťadiel (chloroform (CDCl_3) a methanol (CD_3OD)) a merané pri laboratórnej teplote. Kalibrácia chemických posunov bola prevedená na interný štandard alebo signál reziduálneho nedeuterovaného rozpúšťadla. Chemické posuny pro vybrané rozpúšťadla sú nasledujúce: CDCl_3 – ^1H : 7.27 ppm; ^{13}C : 77,23 ppm; MeOD – ^1H : 3.31 ppm; ^{13}C – 49.0 ppm.

Syntéza pomocou mikrovlnného reaktoru bola prevedená na prístroji CEM Discove SP pracujúcom s maximálnym výkonom 300 W. Finálne produkty boli purifikované pomocou kolonovej chromatografie na silikageli. Hmotnostné spektra boli získané na prístroji značky Waters (Q-TOF MICRO).

Pre stĺpcovú chromatografiu (CC) bol využitý silikagel ako stacionárna fáza a zmes PE : EtOAc (V/V) alebo DCM : MeOH (V/V) v rôznych pomeroch špecifikovaných pri každej purifikácii. Eluované

frakcie boli jímame po 15-30 ml frakciách a ich obsah monitorovaný pomocou TLC. Frakcie obsahujúce rovnaký produkt boli spojené a následne po zahustení na rotačnej vakuovej odparke (RVO) analyzované pomocou spektrálnych metód.

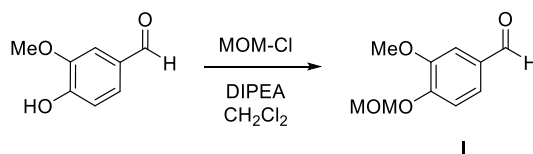
3.3.2 Vizualizačné roztoky pro TLC

Zásaditý roztok KMnO_4 bol pripravený rozpustením 9 g KMnO_4 , 20 g K_2CO_3 v 150 ml 10% NaOH . Vanilinový roztok bol pripravený rozpustením 2 g vanilínu, 100 ml ethanolu obsahujúci 1 ml koncentrovanej H_2SO_4 . Hannesianov vizualizačný roztok bol pripravený rozpustením 12 g fosfomolybdenovej kyseliny v 250 ml ethanolu.

3.3 Syntéza

3.3.1 Príprava prekursorov pre CDC coupling

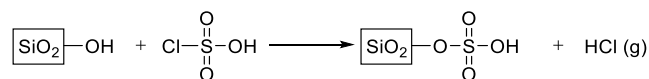
MOM-chránený vanilín (Green a Wuts, 1999)



Roztok vanilínu (10 g, 65,7 mmol, 1.0 equiv) v DCM (66 ml, 1 M voči vanilínu) bol ochladený na 0°C (voda/ľad). Následne sa pridala DIPEA (diisopropylethylamin, 18,3 ml, 105 mmol, 1,6 equiv) pomocou injekčnej striekačky a roztok MOM-Cl (chlormethyl methyl ether) v toluene (40,7 ml, 85,4 mmol, 1,3 equiv, 2,1 M roztok v toluene). Po 30 min je ľad odobraný a zmes ponechaná miešať pod ochrannou atmosférou argonu 5 dní. Následne sa pridá nasýtený roztok NH_4Cl (50 ml) a vrstvy sú separované. Vodná fáza extrahovaná pomocou CH_2Cl_2 (3x50 ml). Spojené organické vrstvy sú premyté pomocou solanky (50 ml), sušené nad Na_2SO_4 , zfiltrované a odparené na RVO. Produkt **I** bol vyčistený pomocou sípcovej chromatografie (PE:EtOAc = 4:1 až 2:1).

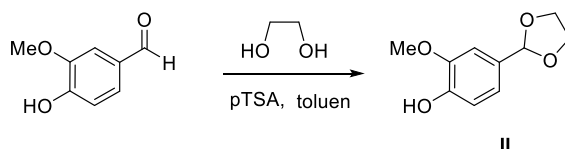
Výtťažok 12,5 g (85 %). ^1H NMR (500 MHz, $\text{CHLOROFORM-}d$) δ ppm 3.53 (s, 3H), 3.95 (s, 3H), 5.33 (s, 2H), 7.15–7.19 (m, 1H), 7.28 (dd, $J = 7.7, 1.0$ Hz, 1H), 7.44 (d, $J = 1.1$ Hz, 1H), 9.87 (s, 1H) ppm. ^{13}C NMR (125 MHz, $\text{CHLOROFORM-}d$) δ ppm 56.2, 56.7, 95.2, 109.7, 114.8, 126.6, 131.2, 150.2, 152.2, 191.2 ppm.

Naviazanie kys. sírovej na silikagel (Chen a spol., 2005)



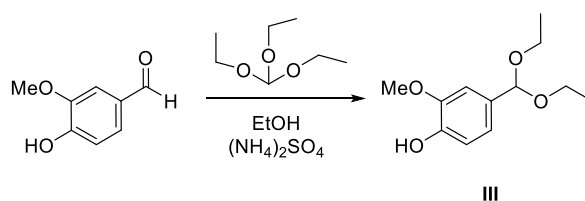
Do 50 ml dvojhrdlej banky s guľatým dnom a sa pridal silikagel (15 g) a miešadlo. Pomocou bočného hrdla, gumovej trubici a sklenenej pasterky vedúcej do destilovanej vody, sa pripravil odvodný systém pre vyvíjajúci sa HCl (g). Do zmesi sa postupne pridávala kyselina chlorsírová pomocou prikápavaceho lievika s vyrovnávaním tlakov. Zmes sa ponechala miešať 1 hod a pre následné reakcie bola použitá bez ďalšieho spracovania.

Ochránenie aldehydickej skupiny pomocou H₂SO₄-SiO₂ (Chávez a Godinez., 1992)



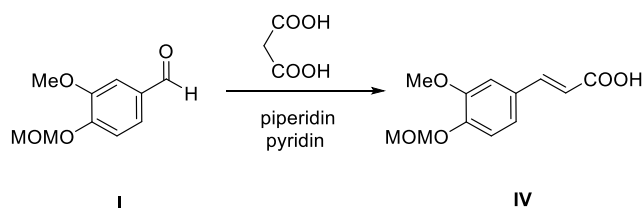
Vanilin (5 g, 32,9 mmol, 1,0 equiv) a kyselina para-toluensulfonová kyselina (pTSA, 600 mg, 3,48 mmol) sa pridajú do roztoku ethylen glykolu (7,3 ml, 131,4 mmol, 4,0 equiv) v toluene (100 ml, 0,35 M voči vanilinu). Výsledná zmes je refluxovaná (155 °C) pod azeotropickým nástavcom po dobu 16h. Po ochladení zmesi pod tečúcou vodou na laboratórnu teplotu sa oddelí oranžová tekutina od čierneho oleju. Po pridaní nasýteného roztoku NaHCO₃ (50 ml) do tekutiny je organická fáza ponechaná a vodná extrahovaná pomocou EtOAc (3x50 ml). Spojené organické frakcie sú vysušené nad Na₂SO₄, odparené na RVO a prečistené pomocou stĺpcovej chromatografie (PE:EtOAc 10:1- 4:1). Frakcia s produktom **II** bola zahustená na RVO.

Ochránenie aldehydickej skupiny vanilinu pomocou ethylorthoformiátu (Kurti a spol., 1999)



Vanilin (6,6 mmol, 1 g, 1,0 equiv) a (NH₄)SO₄ (1,6 mmol, 211,42 mg, 0,05 equiv) sa rozpustí v 0,6 M roztoku etanolu a etylorthoformiátu (0,6 M, voči vanilinu). Zmes sa ponechá na refluxe (90 °C) reagovať 2 h, po ktorých sa reakcia zastaví pridaním piperidínu (200 µl), čím roztok zmení farbu z oranžovej na tmavo zelenú. Zmes s produktom **III** sa následne prefiltruje od soli a zahustí na RVO. Výťažok 1,49 g (98 %). ¹H NMR (500 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 3.51 (dd, *J*=9.48, 7.03 Hz, 2 H) 3.68 - 3.74 (m, 2 H) 3.90 (s, 3 H) 5.17 (s, 3 H) 5.40 (s, 1 H) 6.85 - 6.90 (m, 1 H) 6.92 - 6.96 (m, 1 H) 7.00 (d, *J*=1.53 Hz, 1 H).

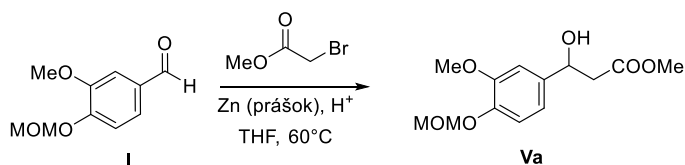
Príprava MOM-ochránenej kyseliny ferulovej (štandardný protokol)



MOM-vanilin (1 g, 5,1 mmol, 1 equiv) a kyselina malonová (800 mg, 7,6 mmol, 1,5 equiv) sa rozpustia v Schlenkovej nádobe v pyridíne (1,7 ml, 3 M voči MOM-vanilínu) a ponechajú miešať pri laboratórnej teplote po dobu 5 min. Do roztoku sa následne pridá piperidín (100 μ l, 1 mmol, 0,2 equiv). Schlenkova nádoba sa uzavrie a ponechá reagovať pri 85°C cez noc. Nádoba sa nechá vychladiť na laboratórnu teplotu. Následne sa kvapalina vyleje do zmesi voda/l'ad (20g/30 ml) a ponechá miešať 5 min, po ktorých sa zmes okyslí 1M HCl (8,3 μ l do 10 ml H₂O) približne na pH 3. Vyzrážaná ochránená kyselina ferulová **IV** sa odfiltruje na frite a nechá usušiť v sušiarňi na 30 °C .

Výtťažok 1,17 g (98 %). ¹H NMR (500 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 3.50 - 3.54 (m, 3 H) 3.91 - 3.95 (m, 3 H) 5.29 (s, 2 H) 6.35 (d, *J*=15.89 Hz, 1 H) 7.08 - 7.14 (m, 2 H) 7.16 - 7.19 (m, 1 H) 7.74 (d, *J*=15.89 Hz, 1 H).

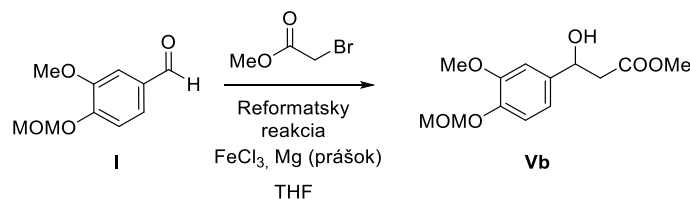
Príprava β -hydroxyesteru (Rakotondramanan a spol., 2007)



Do bezvodého THF (10,2 ml, 0,5M) so Zn (prášok, 1g, 3equiv) sa pridalo pár kvapiek kyseliny methansulfonovej. Po zahriatí zmesi na 60 °C, sa do zmesi pridala MOM-vanilin **I** (1 g, 5,1 mmol, 1 equiv) a postupne sa začal prikvapkávať methylbromacetát (1,45 ml, 15,3 mmol, 3 equiv) rozpustený v 0,2 ml THF (bezvod.). Reakčná zmes sa ponechala miešať v inertnej atmosfére argonu po dobu 2 hod, po ktorých sa zmes s predpokladaným produktom Va, nechá zahustiť na RVO.

Výtťažok 345 mg (25 %). ¹H NMR (500 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 2.71 (dd, *J* = 16.4, 3.6 Hz, 1H), 2.78 (dd, *J* = 16.3, 9.3 Hz, 1H), 3.52 (s, 3H), 3.74 (s, 3H), 3.90 (s, 3H), 5.10 (dd, *J* = 9.2, 3.6 Hz, 1H), 5.22 (s, 2H), 5.64 (broad s, 1H), 6.88 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 6.98 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.12 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H) ppm; ¹³C NMR (125 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 43.4, 52.2, 56.1, 56.4, 70.3, 95.7, 109.4, 116.5, 137.1, 146.2, 150.1, 173.1.

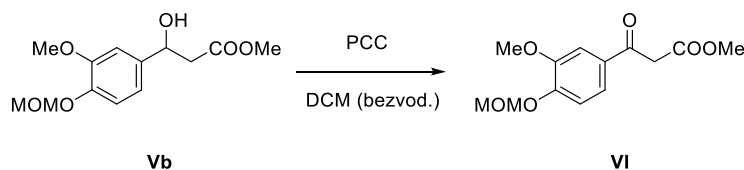
Príprava β -hydroxyesteru (Chattopadhyay a Dubey, 2007)



Do zmesi MOM-vanilinu (1 g, 5,1 mmol, 1 equiv), methylbromacetátu (960 μ l, 10,2 mmol, 2equiv) a FeCl₃ (2,48 g, 15,3 mmol, 3 equiv) sa v jednom kroku pridal práškový Mg (372 mg). Zmes sa nechá miešať pod atmosférou argónu za laboratórnej teploty do druhého dňa. Následne sa pridá 35 ml H₂O a 65 ml EtOAc a zmes sa mieša ďalších 10 min. Po odfiltrovaní reakčnej zmesi na Buchnerovom lieviku sa filtrát preleje do deliaceho lieviku a pridá sa 20 ml 2% HCl (400 μ l 35% HCl do 19,6 ml H₂O). Vodná fáza sa premyje 3x25 ml EtOAc. Spojené organické fázy sú následne premyté 25 ml H₂O a 25 ml solanky, vysušené pomocou Na₂SO₄ a zahustené na RVO. Odparok bol prečistený pomocou stĺpcovej chromatografie (P.E.:EtOAc 4:1 - 2:1 - 1:1). Frakcia s produktom **V** zahustená na RVO.

Výtťažok 345 mg (25 %). ¹H NMR (500 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 2.71 (dd, *J* = 16.4, 3.6 Hz, 1H), 2.78 (dd, *J* = 16.3, 9.3 Hz, 1H), 3.52 (s, 3H), 3.74 (s, 3H), 3.90 (s, 3H), 5.10 (dd, *J* = 9.2, 3.6 Hz, 1H), 5.22 (s, 2H), 5.64 (broad s, 1H), 6.88 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 6.98 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.12 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H) ppm; ¹³C NMR (125 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 43.4, 52.2, 56.1, 56.4, 70.3, 95.7, 109.4, 116.5, 137.1, 146.2, 150.1, 173.1.

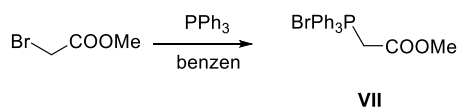
Príprava β -ketoesteru (štandardný protokol)



β -hydroxyester **V** (110 mg, 0,4 mmol, 1 equiv) sa rozpustil v bezvodom DCM (4 ml, 0,1 M voči β -hydroxyester) a PCC (175,56 mg, 0,8 mmol, 2 equiv) sa pridal po častiach. Výsledná zmes bola miešaná pri LT cez noc. Následne sa pridalo 300 mg Celite® a ponechalo miešať ďalších 10 min, po ktorých sa zmes prefiltrovala cez tenkú vrstvu Celite®, premyla 3x20 ml DCM, vysušila pomocou Na₂SO₄ a zakoncentrovala na RVO. Odparok bol prečistený pomocou stĺpcovej chromatografie (P.E.:EtOAc 4:1 - 1:1). Frakcia s produktom **VI** sa zahustí na RVO.

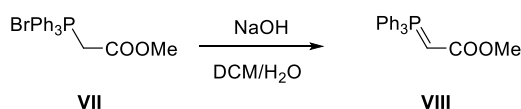
3.3.2 Príprava východziech látok pre esterový coupling

Príprava trifenyfosfín bromidu (Hoffmann, 2001)



Trifenyfosfín (PPh₃; 50 g, 190 mmol, 1 equiv) sa presype do banky. Pridá sa benzén (1 equiv, 4M, 47,5 ml) a 2-metyl bromacetát (29,06 g, 190 mmol, 1 equiv, 1,67 g/l, 17 ml). Zmes sa takto ponechá miešať 2 hod., po ktorých sa začne roztok zakaľovať – nastáva precipitácia produktu **VII**. Reakčná zmes sa následne prefiltruje vytrepe do benzenu (2x 50ml) a hexanu (2x 50 ml). Produkt sa nechá vysušiť. Výťažok 58,5 g (80 %).

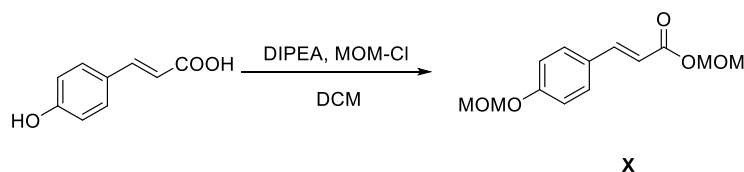
Príprava Wittigovej soli (Hoffmann, 2001)



Do trifenyfosfín bromidu **VII** (58,5 g, 140 mmol, 1 equiv) v chladenej banke (ľad/voda) sa postupne prikvapáva NaOH (5,62 g, 140 mmol, 1 equiv). Reakčná zmes sa takto ponechá miešať 1,5 hod. Následne sa zmes vytrepe do chloroformu, vysuší sa pomocou nasý. roztoku NaCl. Organické fáze s produktom **VII** sa zahustia na RVO.

Výťažok 57,23 g (90%).

MOM-chránená kyselina kumarová (Green a Wuts, 1999)

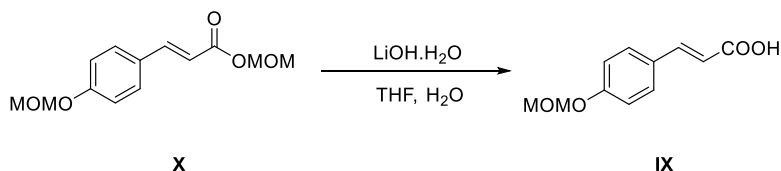


Roztok kyseliny kumarovej (10 g, 65,7 mmol, 1.0 equiv) v DCM (66 ml, 1 M voči vanilínu) bol ochladený na 0 °C (voda/ľad). Následne sa pridala DIPEA (diisopropylethylamin, 18,3 ml, 105 mmol, 1,6 equiv) pomocou injekčnej striekačky a roztok MOM-Cl (chlormethyl methyl ether) v toluene (40,7 ml, 85,4 mmol, 1,3 equiv, 2,1 M roztok v toluene). Po 30 min je ľad odobraný a zmes ponechaná miešať pod ochrannou atmosférou argonu 5 dní. Nasýtený roztok NH₄Cl (50 ml) je pridaný a vrstvy sú separované. Vodná fáza extrahovaná pomocou CH₂Cl₂ (3x50 ml). Spojené organické vrstvy

s produktom **X** sú premyté pomocou solanky (50 ml), sušené nad Na₂SO₄, zfiltrované a odparené na RVO.

Výťažok 14,75 g (89 %). ¹H NMR (500 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 3.49 (s, 3 H) 3.52 (s, 3 H) 5.22 (s, 2 H) 5.37 (s, 2 H) 6.35 (d, *J*=15.90 Hz, 1 H) 7.02 - 7.08 (m, 2 H) 7.46 - 7.52 (m, 2 H) 7.71 (d, *J*=15.89 Hz, 1 H).

Selektívne odMOMmovanie kyseliny kumarovej (štandardný protokol)

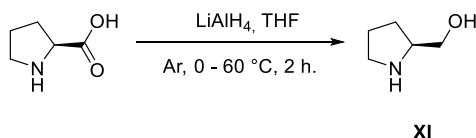


MOM-chránená kyselina kumarová (4,24 g, 0,0168 mol, 1 equiv) bola rozpuštená v THF:H₂O (1:1; 0,2 M, 100 ml) Následne sa postupne pridal LiOH.H₂O (0,05 mol, 3 equiv) a reakčná zmes sa ponechala miešať pod refluxom a inertnou atmosférou. Produkt **IX** bol extrahovaný pomocou sústavy EtOAc : 6 M HCl/H₂O. Spojené organické extrakty (3 x 20 ml) boli zahustené pomocou RVO.

Výťažok 2,80 g (80 %). ¹H NMR (500 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 3.50 (s, 3 H) 5.22 (s, 2 H) 6.34 (d, *J*=15.89 Hz, 1 H) 7.03 - 7.09 (m, 2 H) 7.48 - 7.54 (m, 2 H) 7.75 (d, *J*=15.89 Hz, 1 H).

3.3.3 Príprava chirálnej pomocnej skupiny pre syntézu opticky čistého produktu

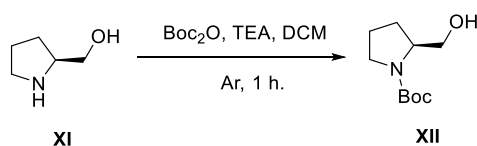
Redukcia L-prolinu na L-prolinol (Khong a Kwon, 2012)



Do vyžihanej dvojhrdlej banky pod inertnou atmosférou (argon) sa pridala suspenzia L-prolinu (1g, 8,6 mmol, 1,0 equiv) s THF (zo zásobnej fľaše; 20 ml, 0,04 M voči L-prolinu). Do suspenzii, sa po ochladení na 0°C (ľad/voda) pridal LiAlH₄. Po 30 minútach bola zmes ponechaná 1,5 hodinu pod ochrannou atmosférou na refluxe (60°C). Po ochladení sa do zmesi pridal 20 % KOH (10 ml). Do prefiltrovanej zmesi sa pridalo 30 ml THF (zo zásobnej fľaše) a ponechalo na refluxe ďalších 30 min pri 60°C. Slabožltá kvapalina (bez zrazenin) bola prefiltrovaná a filtrát s produktom **XI** zahustený pomocou RVO (45°C, 400 mbar).

Výťažok 786 mg (91 %). ¹H NMR (500 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 1.36 - 1.94 (m, 4 H) 2.37 - 2.72 (m, 4 H) 2.77 - 3.08 (m, 2 H) 3.15 - 3.45 (m, 2 H) 3.46 - 3.63 (m, 1 H).

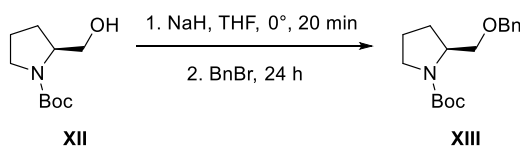
Ochránenie sekundárneho aminu L-prolinolu pomocou Boc₂O (Khong a Kwon, 2012)



Do L-prolinolu **XI** (0,7 g, 6,9 mmol, 1,0 equiv) v CH₂Cl₂ (35 ml, 0,2 M voči BAZ-01-010) pridáme TEA (3ml, 22 mmol, 3,67 equiv) a di-*tert*-butyl dikarbonát (Boc₂O; 1,92 g, 8,8 mmol, 1,27 equiv). Zmes následne miešame pod inertnou atmosférou Ar, 1 hod., po ktorej ju prelejeme do 40 ml vody. Organickú fázu premyjeme 2x10ml vody, vysušíme pomocou Na₂SO₄, zfiltrujeme a zahustíme na RVO. Odparok bol prečistený pomocou stĺpcovej chromatografie na silikageli (P.E.: EtOAc = 4:1 až 1:1), ktorá poskytla cielený produkt **XII**.

Výťažok 283 mg (20 %). ¹H NMR (500 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 1.39 - 1.54 (m, 9 H) 1.77 - 2.01 (m, 4 H) 3.36 (br. s., 2 H) 3.90 - 4.16 (m, 2 H) 4.22 (br. s., 1 H). ¹³C NMR (125 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 28.42, 55.41, 155.06.

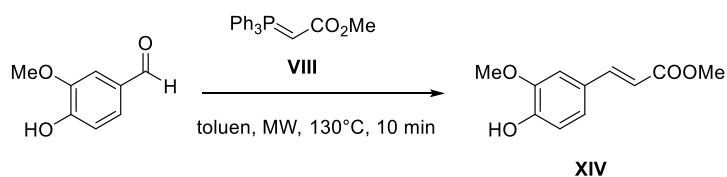
Ochránenie alkoholovej skupiny pomocou Bn (Sternfeld a spol., 1999)



Do vyžihanej dvojhrdlej banky pod inertnou atmosférou (argon) sa pridala suspenzia NaH (84 mg, 1,5 equiv; 2,1 mmol; 60% dispergovaný v oleji) v THF (6ml, 0,4 M ku NaH). Do suspenzii sa po ochladení na 0 °C (voda/ľad) prikvapkal pomocou striekačky, cez septum, ochránený L-prolinol **XII** (283mg, 1,4 mmol, 1 equiv) v THF (zo zásobnej fľaše, 14ml, 0,1 M ku BAZ-01-011) a nechal miešať pod ochrannou atmosférou po dobu 20min. Následne sa prikvapkal BnBr (191 μl, 1,15 equiv, 1,61 mmol) v THF (1ml, 1,6M ku BnBr) a zmes sa takto ponechala po dobu 24 hodín miešať pri laboratórnej teplote, kedy sa reakcia ukončila pridaním 10ml vody. Výsledná zmes bola extrahovaná pomocou EtOAc (3x 50ml) a spojené organické frakcie boli premyté nasýteným roztokom NaCl, presušené nad Na₂SO₄, zfiltrované a zahustené pomocou RVO. Odparok bol prečistený pomocou stĺpcovej chromatografie na silikageli (MeOH: CH₂Cl₂, gradient 0:100 – 3:97) a jednotlivé frakcie zahustené na RVO.

3.3.4 Cílená syntéza boehmenanu X pomocou esterového couplingu

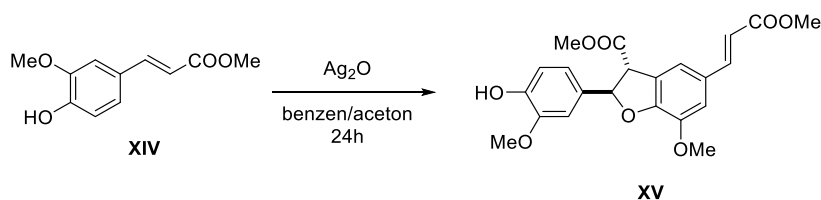
Methylester kyseliny ferulovej (štandardný protokol)



Suspenzia vanilínu (0,76 g, 5 mmol) a látky **VIII** (1,84 g, 5,5 mmol) v 5 ml toluenu bola umiestená do špecializovanej vialky o objemu 35 ml spolu s magnetickým miešadlom. Vialka bola uzavretá vrškou zo smesi silikónu a teflonu a umiestená do mikrovlnného reaktoru. Výsledná zmes bola ožiarovaná (300 W) po dobu 10 min pri 150 °C. Po ochladení bola zmes presunutá do banky s guľatým dnom. Toluén bol z reakčnej zmesi odstránený na RVO a odparek s produktom **XIV** bol prečistený pomocou stĺpcovej chromatografie na silikageli (P.E.: EtOAc, 4:1 - 2:1).

Výtťažok 1,02 g (98 %). ^1H NMR (500 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 7.60 (d, $J = 16.0$ Hz, 1H), 7.03 (ddd, $J = 16.2, 7.9, 1.9$ Hz, 2H), 6.90 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 6.27 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H), 6.15–5.98 (m, 1H), 3.89 (s, 3H), 3.78 (s, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 167.92, 148.10, 146.89, 145.11, 126.98, 123.13, 115.15, 114.87, 109.48, 56.00, 51.74.

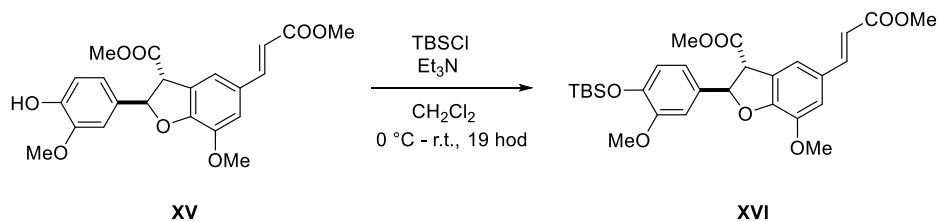
Dimerizácia methylesteru kyseliny ferulovej (Konrádová a spol., 2017)



Do dvojhrdlej vyžihanej banky obalenej alobalom sa ku zlúčenine **XIV** pridal benzen (1M, 20 ml) a aceton (1M, 20 ml). Vsypal sa Ag_2O (3 g, 12 mmol, 1 equiv) a pod inertnou atmosférou argónu sa reakčná zmes ponechala miešať 24 hod, po ktorých sa reakčná zmes prefiltrovala cez kremelinu a premyla acetonom. Po zahutnení reakčného roztoku na RVO bol odparek prečistený pomocou stĺpcovej chromatografie na silikageli (P.E.: EtOAc, 4:1 - 2:1). Frakcie s produktom **XV** zahutnená na RVO.

Výtťažok 290 mg (11%). ^1H NMR (400 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 3.50 (s, 3H), 3.94 (s, 3 H), 3.96 (s, 3 H), 4.02 (s, 3 H), 4.04 (s, 3H), 5.06 (s, 2 H), 6.41 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H), 6.95 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.23 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H), 7.44 (dd, $J = 8.4, 1.6$ Hz, 1H), 7.56 (d, $J = 1.7$ Hz, 1H), 7.76 (d, $J = 15.8$ Hz, 1H), 7.80 (s, 1 H). ^{13}C NMR (100 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 51.2, 52.4, 54.2, 56.4, 58.9, 92.7, 110.0, 111.5, 111.6, 114.5, 115.6, 116.2, 121.2, 122.9, 128.1, 131.2, 143.3, 146.4, 146.6, 148.9, 149.9, 160.4, 167.5, 167.9.

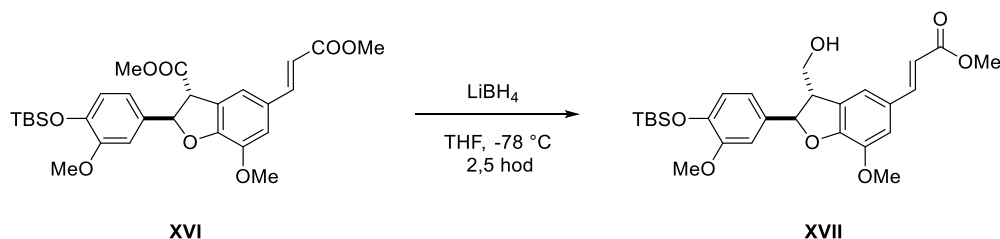
Ochráňenie hydroxylovej skupiny dimeru pomocou TBSCl (štandardný protokol)



Dimer **XV** (414 mg, 1 mmol) sa v inertnej atmosfére Ar rozpustil v DCM (0,5 M, 52 ml) a ochladil na 0 °C (ľad/voda) a pridal sa Et₃N (2,17 ml, 1,58 g, 0,726 g/l, 3 equiv). Po 5 min sa pridal TBSCl (1,25 equiv), po 15 min bol odstránený ľad a zmes sa ponechala miešať pri l.t. 19 hod. Následne sa pridal 50 ml nasýteného roztoku NaHCO₃ a vodná fáza sa 3x pretrepala s 20 ml DCM. Organická fáza sa pretrepala s nasýteným roztokom NaCl (20 ml), presušila pomocou Na₂SO₄ a zahustila na RVO. Odparok bol prečistený pomocou stĺpcovej chromatografie (PE:EtOAc, 10:1 – 2:1). Frakcia obsahujúca produkt **XVI** zahustená na RVO.

Výťažok 501 mg (95 %). ¹H NMR (500 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 0.13 (s, 6H), 0.96 (s, 9H), 3.81 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 3.87 (s, 3H), 3.93 (s, 3H), 4.35 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 6.14 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 6.33 (d, J = 15.9 Hz, 1H), 6.92 (dd, J = 12.0, 2.5 Hz, 1H), 6.95 (s, 2H), 7.03 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 7.13 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.19 (d, J = 1.3 Hz, 1H), 7.65 (d, J = 16.0 Hz, 1H). ¹³C NMR (125 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm -4.5, 19.1, 25.8, 53.1, 55.6, 56.2, 56.3, 56.4, 87.4, 109.8, 112.3, 115.8, 116.5, 118.1, 118.9, 125.8, 128.8, 133.8, 144.9, 146.9, 150.1, 150.1, 167.8, 170.9.

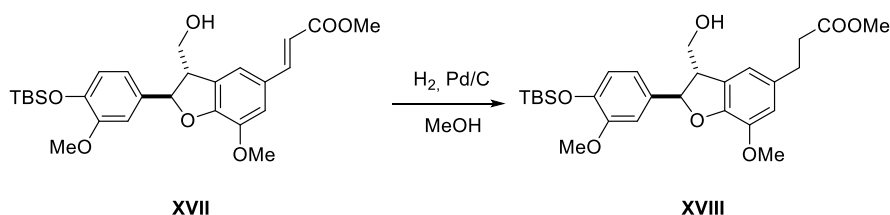
Selektívna redukcia methylesteru (Konrádová a spol., 2017)



Do vyžihanej banky pod inertnou atmosférou (Ar) bol pridaný TBS-ochránený diester **XVI** (264 mg, 0,5 mmol) v THF (0,05 M) a vzniklý roztok bol ochladený na -78 °C (aceton/suchý ľad). Potom sa pridal bezvodý THF (10 ml, 0,05 M) a roztok LiBH₄ v THF (1,42 mmol., 0,7 ml, 3 equiv). Zmes bola takto ponechaná po 30 min, ďalšie 2 hod pri pokojovej teplote. Po pomalom pridaní vodného roztoku THF (THF/voda = 4:1) a nasýteného roztoku NH₄Cl, bola zmes extrahovaná do EtOAc (3x15ml). Organická fáza bola následne premytá vodou, vysušená pomocou Na₂SO₄ a zahustená na vákuovej odparke. Odparok bol prečistený pomocou stĺpcovej chromatografie na silikageli (PE:EtOAc, 45:55) a frakcia s produktom **XVII** zahustená na RVO.

Výtťažok 202 mg (82 %). ^1H NMR (500 MHz, benzene- d_6) δ ppm 0.11 (s, 6H), 1.01 (s, 9H), 3.18 (s, 3H), 3.26 (p, $J = 6.1$ Hz, 1H), 3.29 (s, 3H), 3.34 (dd, $J = 10.2, 6.5$ Hz, 1H), 3.38 (dd, $J = 10.7, 5.5$ Hz, 1H), 3.49 (s, 3H), 5.55 (d, $J = 6.5$ Hz, 1H), 6.43 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H), 6.69 (d, $J = 1.4$ Hz, 1H), 6.71 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H), 6.82 (6.69 (d, $J = 1.4$ Hz, 1H), 6.86 (d, $J = 1.1$ Hz, 1H), 7.86 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (126 MHz, benzene- d_6): -4.7, 18.4, 25.7, 50.9, 53.5, 54.8, 55.4, 64.0, 88.2, 110.0, 112.6, 115.2, 117.5, 118.5, 120.9, 128.0, 128.4, 129.2, 135.1, 145.0, 145.1, 145.2, 151.3, 167.2.

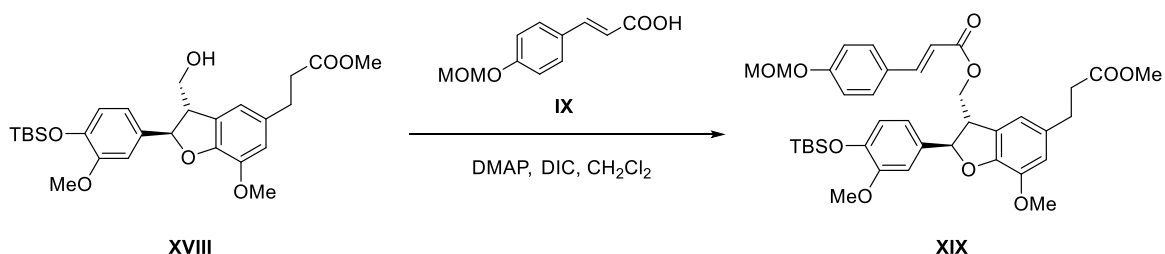
Hydrogenácia dvojitej väzby zredukovaného TBS-dimeru (Orlandi a spol., 2001)



Selektívne zredukovaný TBS-dimer **XVII** (50 mg, 0,1 mmol) sa rozpustí v MeOH (3-5 ml), do ktorého sa opatrne pridá 1 mg 5% Pd/C. Do zmesi sa cez septum zavedie balón s H_2 s ihlou siahajúcou tesne nad hladinu reakčnej zmesi. Takto sa reakcia ponechá 40 minút, po ktorých sa reakčná zmes prefiltruje cez jemnú vrstvu Celite® a odparok s produktom **XVIII** sa zahustí na RVO.

Výtťažok 47 mg (95 %). ^1H NMR (500 MHz, CHLOROFORM- d) δ ppm 0.13 (s, 6H), 0.98 (s, 9H), 2.58 (dd, $J = 8.4, 7.1$ Hz, 1H), 2.64 (dd, $J = 8.4, 7.1$ Hz, 1H), 2.85 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H), 2.88–2.99 (m, 1H), 3.46 (p, $J = 7.2$ Hz, 1H), 3.69 (s, 3H), 3.78 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 3.98 (dd, $J = 11.1, 5.8$ Hz, 1H), 4.04 (dd, $J = 12.6, 5.9$ Hz, 1H), 5.54 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 6.66–6.70 (m, 1H), 6.71 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 6.80 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 6.85 (dd, $J = 8.2, 2.1$ Hz, 1H), 6.91 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (126 MHz, CHLOROFORM- d) δ ppm - 4.5, - 4.4, 18.7, 25.6, 25.9, 31.1, 36.4, 51.9, 53.9, 55.6, 55.7, 64.1, 88.1, 110.4, 112.5, 116.1, 119.0, 121.0, 132.0, 134.2, 134.7, 142.4, 144.4, 147.1, 151.3, 173.7.

Naviazanie MOM-kumarovej na hydrogenovaný TBS-dimer (štandardný protokol)

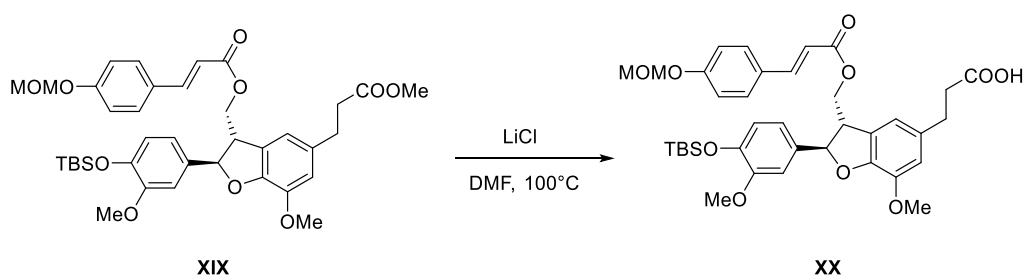


Selektívne hydrogenovaný TBS-dimer **XVIII** (80 mg, 0,16 mmol, 1 equiv) a MOM-kyselina kumarová **IX** sa rozpustia v bezvodom DCM (0,2 M voči MOM-kumarovej kyseline) a postupne sa pridá N,N-diisopropylcarbodiimid (DIC, 25 μl , 0,16 mmol, 1 equiv, 0,815 g/cm³). Následne sa pridá 4-

dimethylaminopyridin (DMAP, 9,8 mg, 0,08 mmol, 0,5 equiv) a ponechá sa reagovať 24 hod. Reakčná zmes sa naleje do hexanu (0,1 M voči MOM-kumarovej), prefiltruje cez Celite® a zahustí na RVO. Odparok bol prečistený pomocou stĺpcovej chromatografie na silikageli (PE:EtOAc, 10:1 – 5:1 – 3:1 – 2:1) a frakcia s produktom **XIX** zahustená na RVO.

Výťažok 42 mg (38 %). ¹H NMR (500 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 0.13 (s, 6 H) 0.98 (s, 9 H) 2.63 (t, *J*=7.79 Hz, 2 H) 2.92 (t, *J*=7.79 Hz, 2 H) 3.49 (s, 3 H) 3.68 (s, 3 H) 3.76 (s, 3 H) 3.89 (s, 3 H) 4.43 (d, *J*=7.64 Hz, 1 H) 4.56 (d, *J*=5.20 Hz, 1 H) 4.93 - 5.03 (m, 1 H) 5.21 (s, 2 H) 5.50 (d, *J*=7.64 Hz, 1 H) 6.28 (d, *J*=16.20 Hz, 1 H) 6.67 - 6.73 (m, 2 H) 6.81 (d, *J*=8.25 Hz, 1 H) 6.84 - 6.89 (m, 1 H) 6.92 (d, *J*=1.83 Hz, 1 H) 7.01 - 7.07 (m, 2 H) 7.43 - 7.48 (m, 2 H) 7.55 (d, *J*=16.20 Hz, 1 H).

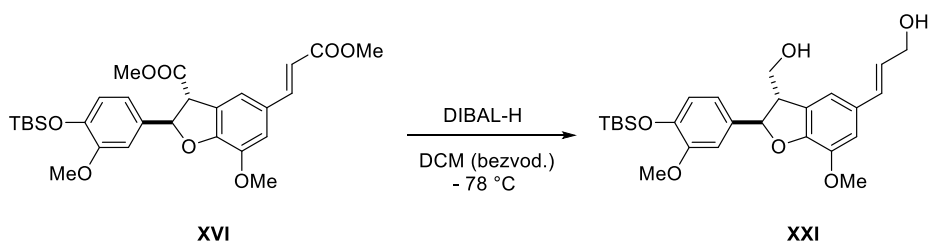
Hydrolyza methylesteru TBS-dimeru (ref. Elsinger a spol, 1960)



TBS-dimer **XIX** s naviazanou MOM-kyselinou kumarovou (30 mg, 0,043 mmol, 1 equiv) sa zmieša s LiCl (7,64 mg, 0,18 mmol, 4,16 ekuiv) v DMF (20 ml/1 mmol = 0,9 ml) a ponechá pod refluxom 8 hod. Po vychladnutí na laboratórnu teplotu sa do reakčnej zmesi postupne pridáva koncentrovaná ľadová kyselina octová. Zmes s predpokladaným produktom **XX** sa zahustí na RVO pri (70 °C, 20 min).

3.3.5 Syntéza DCG

Redukcia methylesteru dimeru (štandardný protokol)

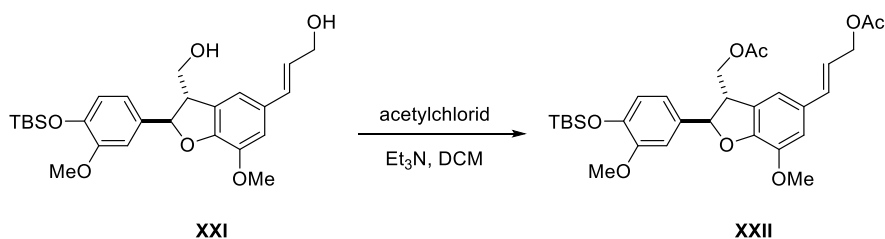


TBS-dimer **XVI** (500 mg, 0,95 mmol, 1 equiv) sa rozpustil v bezvodom DCM (9,5 ml, 0,1 M). Zmes sa ochladí na -78°C (suchý led/acetón) v Dewarovej nádobe a nechá miešať 5 min. Následne sa pridá diisobutylaluminiumhydrid (DIBAL-H; 4,8 ml, 1M v DCM, 4,73 mmol, 5 equiv) a reakcia sa takto ponechá 30 min, po ktorých sa suchý ľad odoberie a zmes sa voľne oteplí na laboratórnu teplotu,

pri ktorej sa následne mieša ďalšie 2 hodiny. Zastavenie reakcie sa uskutoční pomocou druhého schladenia zmesi na -78°C a pridania nasýteného roztoku Rochelovej soli (10 ml) pomocou prikápavaceho lievika. Takto sa reakčná zmes ponechá miešať do ďalšieho dňa, prípadne do doby, do ktorej sa soli úplne nerozpustia a roztok sa nevyčerí. Reakčná zmes sa extrahuje do DCM (3x20 ml). Organická fáza bola následne premytá nasýteným roztokom NaCl (20 ml), vysušená pomocou Na_2SO_4 a zahustená na RVO. Odparok bol prečistený pomocou stĺpcovej chromatografie na silikageli (PE:EtOAc, 2:1 – 1:1) a frakcie s produktom **XXI** zahustené na RVO.

Výťažok 449 mg (105 %; nedostatočne vysušené). ^1H NMR (500 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 0.12 (s, 6 H) 0.98 (s, 9 H) 2.84 - 3.05 (m, 2 H) 3.43 - 3.52 (m, 1 H) 3.71 (s, 3 H) 3.84 (d, $J=6.11$ Hz, 2 H) 3.89 - 3.91 (m, 3 H) 4.30 (dd, $J=5.96, 1.38$ Hz, 2 H) 6.12 - 6.26 (m, 1 H) 6.44 - 6.54 (m, 1 H) 6.54 - 6.64 (m, 2 H) 6.69 - 6.73 (m, 1 H) 6.74 - 6.79 (m, 1 H) 6.81 - 6.84 (m, 1 H).

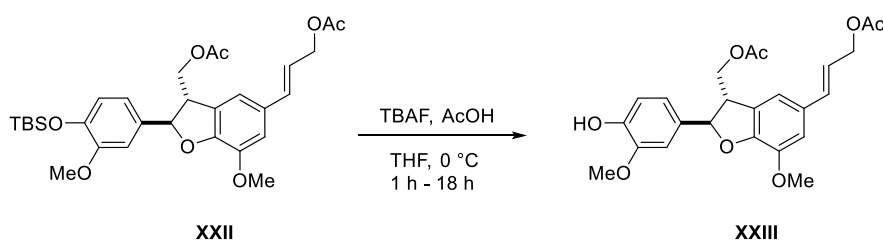
Acetylcia redukovaného TBS-dimeru (štandardný protokol)



Redukovaný dimer **XXI** (300 mg, 0,6 mmol, 1 equiv) a Et_3N (0,886 μl , 6,35 mmol, 10 equiv) sa rozpustili v DCM (0,1 M voči **XXI**, 6 ml). Po ochladení zmesi na 0°C (voda/ľad) a pridaní acetylchloridu (0,213 μl , 3 mmol, 5 equiv) sa reakčná zmes ponechala miešať 48 h. Reakcia sa zastaví pridaním nasýteného roztoku NaHCO_3 . Následne sa vodná fáza premyje DCM (3x20 ml). Spojené organické fázy sa presušia nad Na_2SO_4 a zakoncentrujú na RVO. Odparok bol prečistený pomocou stĺpcovej chromatografie na silikageli (PE:EtOAc, 4:1 – 2:1) a frakcie s produktom **XXII** zahustené na RVO.

Výťažok 109,4 mg (22 %). ^1H NMR (500 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 0.14 - 0.15 (m, 6 H) 0.99 (s, 9 H) 2.02 (s, 3 H) 2.11 (s, 3 H) 3.78 (s, 3 H) 3.91 (s, 3 H) 4.28 - 4.33 (m, 1 H) 4.43 - 4.48 (m, 1 H) 4.71 - 4.73 (m, 2 H) 5.48 (d, $J=7.64$ Hz, 1 H) 6.14 - 6.18 (m, 1 H) 6.61 (d, $J=15.59$ Hz, 1 H) 6.82 (s, 1 H) 6.83 (d, $J=1.83$ Hz, 1 H) 6.88 (d, $J=1.83$ Hz, 1 H) 6.89 (s, 2 H). ^{13}C NMR (125 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 18.43, 20.79, 21.05, 25.68, 50.19, 55.50, 55.96, 65.24, 65.32, 88.93, 110.11, 110.41, 115.25, 118.92, 120.84, 121.06, 127.71, 130.40, 133.62, 134.41, 144.38, 145.29, 151.11, 170.80, 170.93.

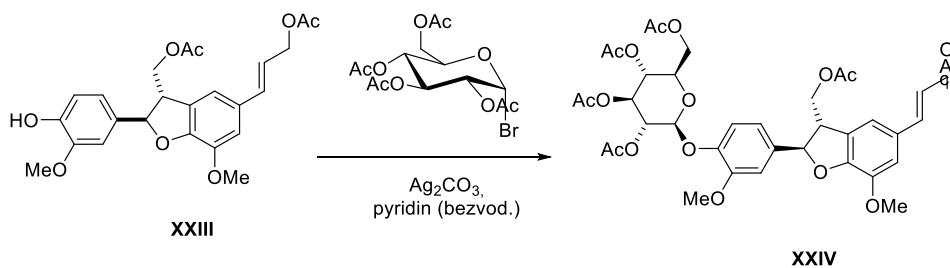
Odchráňenie dimeru (štandardný protokol)



Tetrabutylamonium florid (TBAF; 575,21 mg, 2,2 mmol, 2 equiv) sa rozpustil ve zmesi THF (4,5 ml) a kyseliny octovej (AcOH; 621,5 μ l, 11,0 mmol, 10 equiv) a výsledný roztok bol ochladený na 0 °C (voda/ľad). Do zmesi sa nasledne pridal acylovaný TBS-dimer **XXII** (600 mg, 1,1 mmol) a reakčná zmes sa ponechala miešať 1 hodinu. Po skončení reakcie sa zmes naliata do 1M HCl (15 ml) a extrahovala pomocou EtOAc (3x 25 ml). Organické fáze sa vysušili pomocou Na₂SO₄ a zahustili na RVO. Odparok bol prečistený pomocou stĺpcovej chromatografie na silikageli (PE:EtOAc, 4:1 – 2:1 – 1:1) a frakcie s produktom **XXIII** zahustené na RVO.

Výťažok 311 mg (64 %). ¹H NMR (500 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 2.06 (s, 3 H) 2.11 (s, 3 H) 3.88 (s, 3 H) 3.92 (s, 3 H) 4.32 (d, *J*=7.64 Hz, 1 H) 4.44 (d, *J*=5.50 Hz, 1 H) 4.70 (s, 1 H) 4.72 - 4.73 (m, 2 H) 5.48 (d, *J*=7.34 Hz, 1 H) 6.11 - 6.23 (m, 2 H) 6.61 (d, *J*=15.90 Hz, 2 H).

Naviazanie glukosylu na alkohol (štandardný protokol)

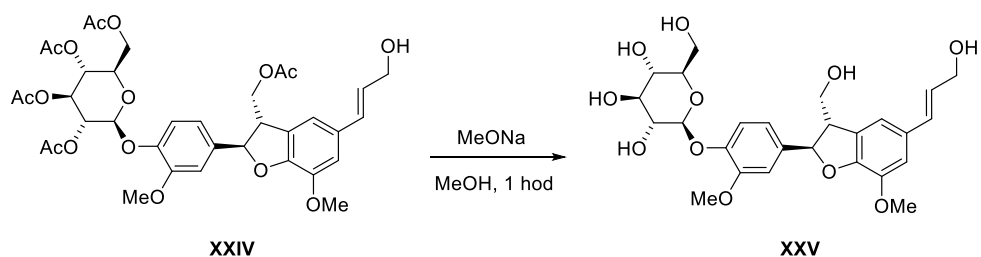


Do zmesi odchráňeného acylovaného dimeru **XXIII** (100 mg, 0,23 mmol, 1 equiv) a tetra-O-acetylglukopyranosyl bromidu (212,8 mg, 0,517 mmol, 2,25 equiv) v bezvodom pyridine (0,05 M voči **XXII**, 4,6 ml), ochladenej na 0°C (voda/ľad) bol pridaný Ag₂CO₃ (249,5 mg, 0,905 mmol, 4 equiv). Zmes sa takto ponechala miešať po dobu 15 min, po ktorých sa ľad odobral a reakcia sa ponechala reagovať ďalších 18 h. Následne sa reakčná zmes prefiltrovala cez Celite®, zriedila pomocou EtOAc (25 ml) a premyla 5% HCl (2x 10 ml), vodou (10 ml) a solankou (10 ml). Organické fáze boli vysušené pomocou Na₂SO₄ a zakoncentrované na RVO. Odparok bol prečistený pomocou stĺpcovej chromatografie na silikageli (Chloroform:EtOAc, 4:1 – 2:1 – 1:1 – 1:1,25) a jednotlivé frakcie obsahujúce produkt **XXIV** zahustené na RVO.

Výťažok 73 mg (41 %). ¹H NMR (500 MHz, CHLOROFORM-*d*) δ ppm 2.02 - 2.11 (m, 18 H) 3.69 - 3.77 (m, 2 H) 3.78 - 3.84 (m, 3 H) 3.88 - 3.94 (m, 3 H) 4.08 - 4.18 (m, 1 H) 4.19 - 4.36 (m, 2 H) 4.37 -

4.52 (m, 1 H) 4.67 - 4.74 (m, 2 H) 4.93 (dd, $J=5.96, 1.68$ Hz, 1 H) 5.09 - 5.20 (m, 1 H) 5.21 - 5.35 (m, 2 H) 5.50 (d, $J=6.72$ Hz, 1 H) 6.16 (dt, $J=15.51, 6.15$ Hz, 1 H) 6.60 (d, $J=15.59$ Hz, 1 H) 6.77 - 6.99 (m, 4 H) 7.00 - 7.14 (m, 1 H). ^{13}C NMR (125 MHz, CHLOROFORM- d) δ ppm 20.60, 50.37, 55.95, 56.03, 61.83, 65.17, 65.28, 68.27, 71.11, 71.93, 72.50, 88.06, 100.74, 100.79, 110.17, 110.49, 115.26, 118.29, 118.59, 120.11, 120.23, 121.24, 127.32, 130.63, 134.24, 137.03, 137.07, 144.37, 146.04, 148.09, 150.75, 150.91, 169.36, 169.40, 170.28, 170.60, 170.75, 170.90.

Zempenova deacetylácia (štandardný protokol)



Glukosylovaný dimer **XXIV** (150 mg, 1 equiv, 0,17 mmol) bol rozpustený v suchom methanole (2ml/ 100mg látky). Následne bol pridaný MeONa (4 μl , 0,1 equiv, 0,017 mmol, 1M, 0,947 g mol^{-1} , 25% roztok v MeOH). Do reakčnej zmesi sa pridal katex Dowex (H^+), zmes s predpokladaným produktom **XXV** sa prefiltrovala cez fritu a zahustila na RVO.

4. Výsledky

4.1 Príprava prekursorov pre „cross-dehydrogenačný“ coupling (CDC)

Príprava prekursorov prvej syntéznej dráhy vychádzala z vanilínu. Zahrňovala prípravu MOM-chránenej kyseliny ferulovej, dimetylacetalu vanilínu a prípravu β -ketoesteru (Schéma 10).

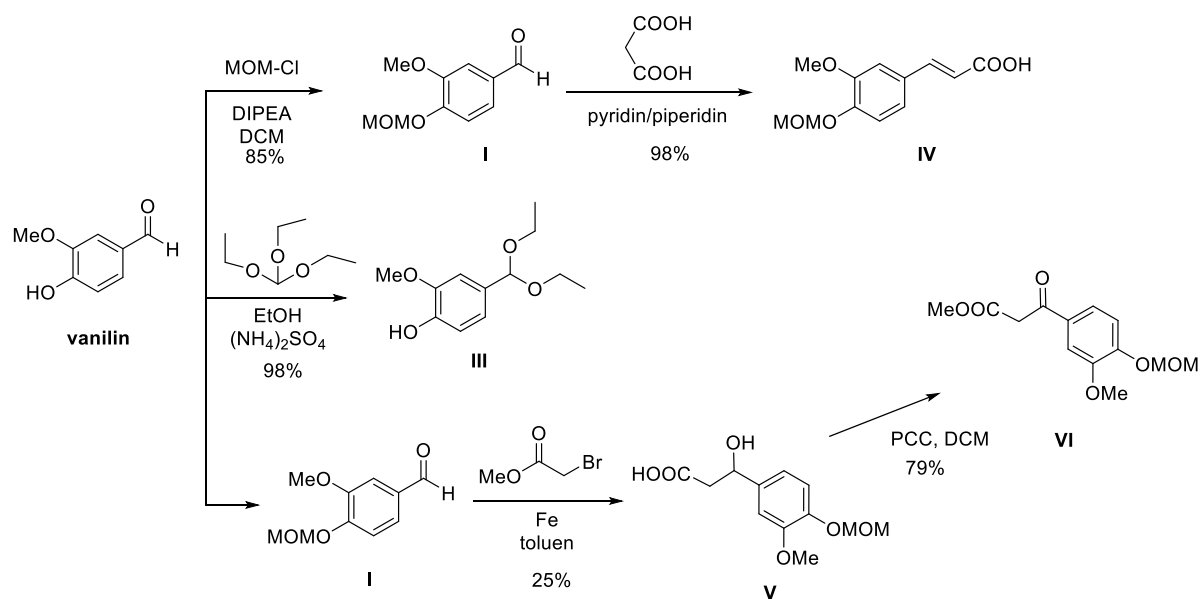


Schéma 10: Príprava prekursorov CDC-couplingu.

Syntéza MOM chránenej kyseliny ferulovej prebiehala cez medziprodukt MOM-chránený vanilín I. V prvom kroku ochranná skupina MOMCl v prítomnosti DIPEA substituovala hydroxylový vodík za vývoja HCl a bielych pár chloridu amonného NH_4Cl . Nasledovala Knoevenagelova kondenzácia MOM-vanilínu I a kyseliny malonovej v prítomnosti piperidínu za vzniku MOM-chránenej kyseliny ferulovej IV. Druhý prekursor predstavoval vanilín s chránenou aldehydicou skupinou. Tá bola úspešne ochránená pomocou etylformiátu za vzniku dimetylacetalu III. Ochránenie aldehydickej skupiny vanilínu pomocou etylenglykolu v prítomnosti pTSA, prípadne pomocou kyseliny sírovej naviazanej na silikagel, nebolo úspešné (Schéma 11). Podmienky reakcie prípravy kyseliny sírovej naviazanej na silikagel, ktorá bola následne použitá v reakcii s etylenglykolom, boli optimalizované a sú zhrnuté v Tabuľke 3.

Reaktanty	Podmienky reakcie
-SiO ₂ OH	1. HSO ₃ Cl (0,05 mol), 1 hod 2. HSO ₃ Cl (0,05 mol), 24 hod 3. HSO ₃ Cl (0,1 mol; pomalé prikvapkávanie kyseliny do silikagelu), 24 hod

Tabuľka 3: Optimalizácia prípravy kyseliny sírovej naviazanej na silikagel.

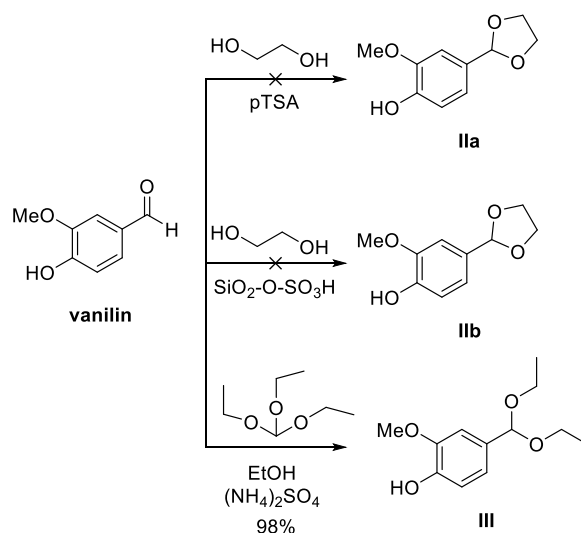


Schéma 11: Optimalizácia prípravy chráneného vanilínu.

Posledný prekursor pre CDC kapling predstavoval β -ketoester MOM-ochránenej kyseliny ferulovej **VI** (Schéma 12). Jeho príprava prebiehala z MOM-vanilínu **I** cez medziprodukt **V**, ktorý bol pripravený pomocou Reformatskeho reakcie v prítomnosti Fe³⁺ soli. Klasické podmienky Reformatského reakcie v prítomnosti práškoveho zinku poskytli len nepatrné výťažky (3-6%). Optimalizácia podmienok Reformatskeho reakcie je zhrnutá v Tabuľke 4. Nasledovná oxidácia β -hydroxyesteru **V** v prítomnosti PDC dala za vznik produktu β -ketoesteru **VI**.

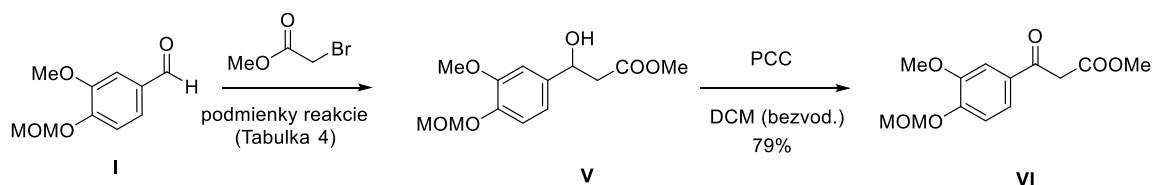


Schéma 12: Príprava β -ketoesteru MOM-ochránenej kyseliny ferulovej.

Reaktanty	Podmienky reakcie	Výt'aznosť %
MOM-vanilin, metyl-2-bromacetát	1. Zn (prášok; 10 equiv), toluen, 100 °C, 1,5 hod	4
	2. Zn (prášok; 10 equiv), toluen, 100 °C, metylsulfonová kys., 24 hod	3
	3. Zn (prášok; 10 equiv), THF, 60 °C, 1,5 hod, metylsulfonová kys., 4 hod	6
	4. FeCl ₃ (15 mmol), THF, Mg (prášok; 10 equiv), 60 °C, 24 hod	5
	5. FeCl ₃ (15 mmol), THF, Mg (prášok; 14 mmol), l. t., 3 dni	25

Tabuľka 4: Optimalizácia Reformatskeho reakcie MOM-vanilínu s metyl-2-bromacetátom.

4.2 Esterový coupling

Príprava prekursorov pre esterový coupling

Východzie zlúčeniny pre esterový coupling predstavovali: Wittigovu soľ **VIII**, MOM-chránenú kyselinu kumarovú **IX** a opticky čistú látku v podobe ochráneného L-prolinolu **XIII**.

Wittigová soľ bola pripravená cez medziprodukt bromid trifenyfosfínovej soli **VII**. Syntéza medziproduktu vychádzala z 2-metylbromacetátu v prítomnosti trifenyfosfinu a po bazickej hydrolýze dala za vznik produktu (Hoffmann, 2001).

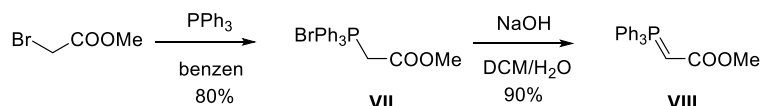


Schéma 13: príprava wittigovej soli vychádzajúca z 2-metylbromacetátu prebiehajúca cez medziprodukt bromid trifenyfosfínovej soli

Príprava druhej východzej látky **IX** prebiehala cez medziprodukt bis-MOM-kyselinu kumarovú **X**. V prvom kroku reakcie kyseliny kumarovej s MOMCl v prítomnosti DIPEA vznikla dvojnásobne substituovaná bis-MOM-kyselina kumarová **X**, ktorá po bazickej hydrolýze dala za vznik produktu **IX**.

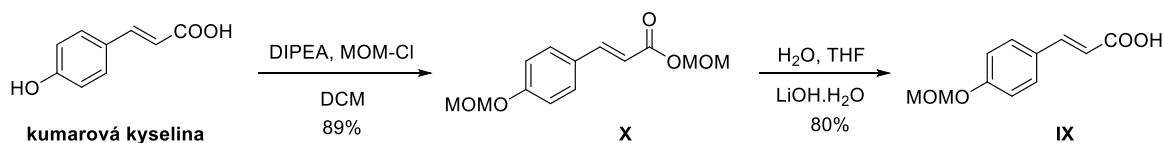


Schéma 14: Príprava chránenej MOM-kyseliny kumarovej prebiehajúca cez medziprodukt bis-MOM-kyselinu kumarovú vychádzajúca z kyseliny kumarovej.

Príprava chirálnej pomocnej skupiny a zároveň posledného prekursoru pre esterový coupling, prebiehala cez dve medziprodukty (Schéma 15; Khong a Kwon, 2012). Prvá reakcia zahrňovala redukciu L-prolinu na L-prolinol v prítomnosti LiAlH_4 , po ktorej nasledovala ochrana sekundárneho aminu L-prolinolu pomocou Boc_2O v prítomnosti TEA. Takto ochránený L-prolinol podstúpil reakciu ochránenia hydroxylovej skupiny, druhou ochrannou skupinou benzylchloridom (BnBr), ktorá bohužiaľ za daných podmienok neprebehla.

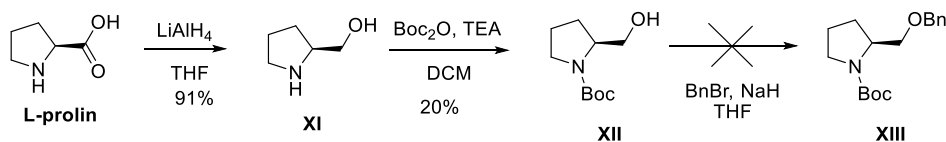


Schéma 15: Príprava ochráneného L-prolinolu **XIII**, vychádzajúca z L-prolinu a prebiehajúca cez medziprodukt Boc-L-prolinol **XII**.

Syntéza Boehmenanu X

Syntéza dráha vedúca ku prekursoru (XX) boehmenanu X (3g, Schéma 16) pomocou esterového kaplingu vychádzala z vanilínu a ako kľúčový krok syntézy zahrňovala fenolový oxidačný coupling (POC) v prítomnosti Ag₂O. Pripravená Wittigova soľ VIII sa použila v prvom kroku syntézy v reakcii s vanilínom. Táto Wittigova reakcia prebiehala za použitia mikrovlnného žiarenia (MW) pri 150 °C (Konrádová a spol., 2017) a dala za vznik methylesteru kyseliny ferulovej XIV, ktorý následne podstúpil v prítomnosti Ag₂O homodimerizáciu. Tento fenyl oxidačný kapling s radikálovým priebehom dal za vznik racemickej benzofuranovej kostre XV. Následne sa hydroxylová skupina na benzenovom jadre dimeru ochránila pomocou ochrannej skupiny (*tert*-butyl-dimethylsilylchlorid) TBSCl v prítomnosti TEA za vzniku XVI. Po ochránení reaktívnej skupiny mohol byť selektívne zredukovaný elektrónovo bohatší methylester na furanovom kruhu. Táto selektívna redukcia prebehla pri špecifických podmienkach v prítomnosti LiBH₄ pri -78 °C a poskytla produkt XVII. Nízka teplota bola dosiahnutá vytvorením zmesi suchého ľadu s acetonom. Nasledovala selektívna hydrogenácia konjugovanej dvojitej väzby v prítomnosti plynného vodíku za použitia katalyzátora paládia na aktívnom uhlí (XVIII). Optimalizácie reakčnej doby s produktmi reakcie sú uvedené v Tabuľke 5.

Reaktanty	Reakčná doba	Produkt (podiel)
látka č. XVII + H _{2(g)}	1. 16 hod	látka č.XVIII + ochránený produkt (2:8)
	2. 2 hod	látka č.XVIII + ochránený produkt (9:1)
	3. 40 min	látka č.XVIII

Tabuľka 5: Optimalizácia reakčnej doby selektívnej hydrogenácii látky č. v prítomnosti plynného vodíku.

Následne bola pripravená MOM-kyselina kumarová IX použitá pri transformácii voľnej hydroxy skupiny dimeru na odpovedajúci ester kyseliny XIX. Táto esterifikácia prebehla v prítomnosti DMAP a *i*Pr₂EtN. Ostávajúci metylester bol následne selektívne hydrolyzovaný pomocou LiCl za tvorby produktu XX (Schéma 16).

4.3 Syntéza dehydrodikoniferyl alkohol-4- β-glukosidu

Syntéza cesta DCG-A a B (8a, 8b; Schéma 17) vychádzala zo zmesi diastereoizomerov získaných z esterového couplingu (XVa, XVb; Schéma 22) methylesteru kyseliny škoricovej, bola podrobená redukcii v prítomnosti DIBAL-H (XXI), po ktorej bola látka transformovaná na odpovedajúci bisacetát XXII. Následne bola TBS chrániaca skupina odstránená v prítomnosti TBAF (XXIII) a voľný fenolový hydroxyl ochránený pomocou peracetolovanej glukózy (XXIV). Výsledný produkt bol následne neúspešne podrobený Zemplenej deacetylácii, za účelom globálneho ochránenia (XXV). Druhý postup deacetylácie, v prítomnosti 5% NH₄OH/MeOH poskytol produkt (8a,8b) v zmesi s východnou látkou (XXIV; Tabuľka 6).

Východzia látka	Podmienky reakcie	Výt'aznosť %
peracetylovana gluukoza XXIV	MeOH (suchý), NaMeO (5 equiv)	-
-	MeOH (suchý), NaMeO (0,1 equiv)	východz. látka
-	5% NH ₄ OH/MeOH	výcho dz. (60%) + produkt (30%)

Tabuľka 6: Optimalizácia deacetylácie produktu **XXIV**.

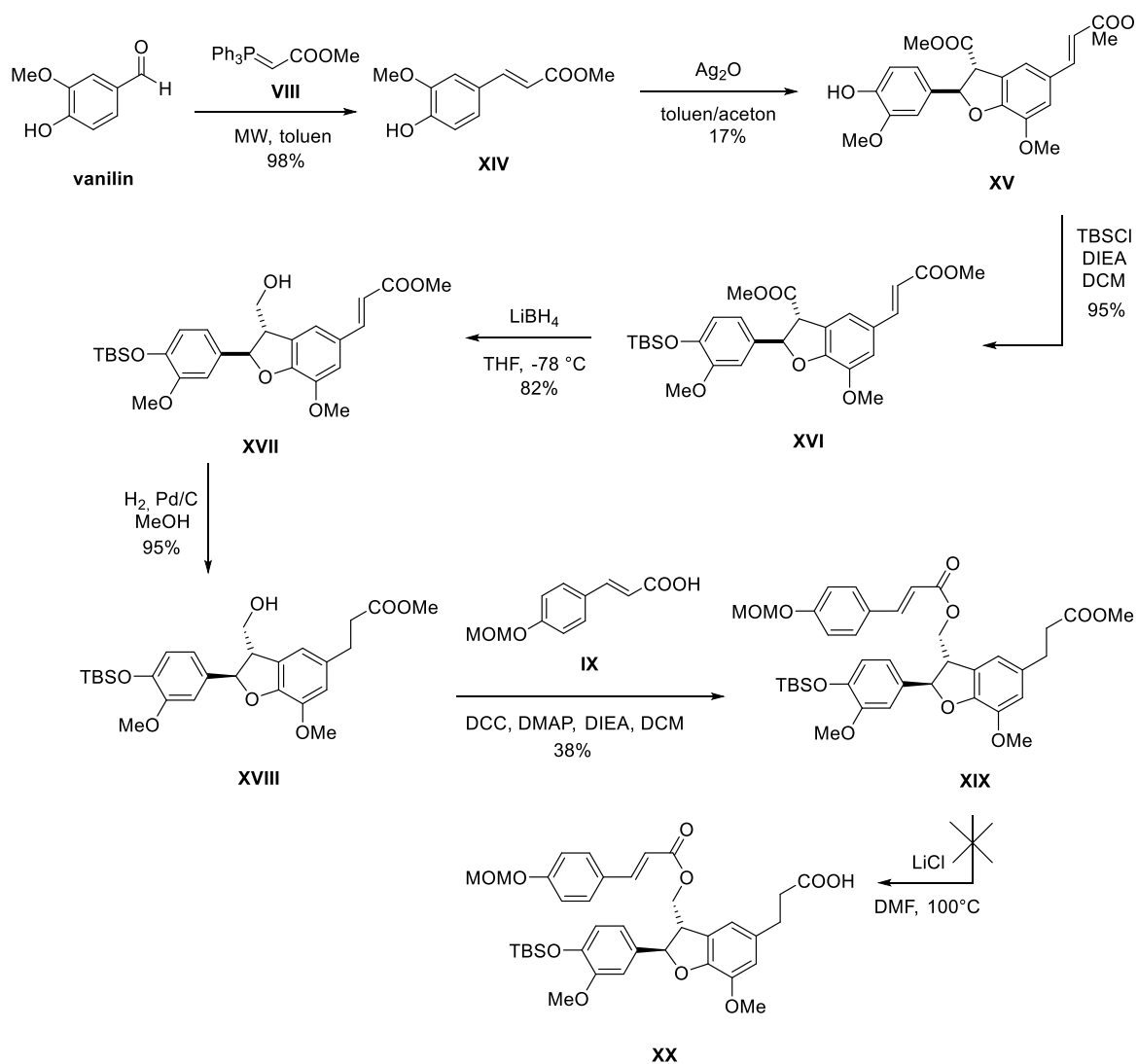


Schéma 16: Reakčné schéma vedúce ku prekursoru boehmenanu X (**XX**).

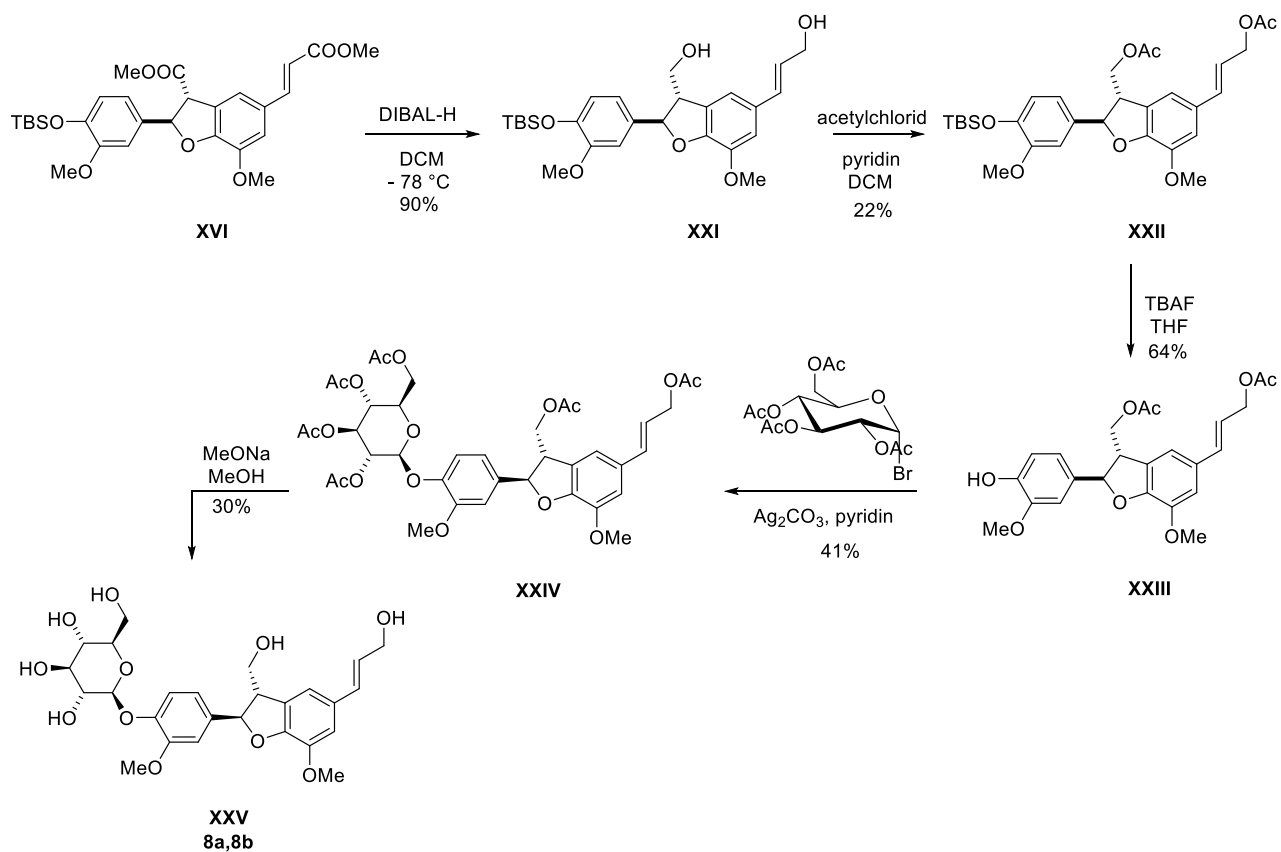


Schéma 17: Příprava dehydrodikoniferyl alkohol- β -glukosidu A a B.

5. Diskusia

Syntéza jedného zástupcu zo skupiny boehmenanov, konkrétne samotného boehmenanu je už v literatúre popísaná (Xia a spol., 2014). Vzhľadom na to, že to je jediná popísaná syntéza, bolo naším prvotným cieľom vyvinúť krátku a efektívnu cestu prípravy ostatných zástupcov skupiny boehmenanov (**3a-3g**). V mojej diplomovej práci som sa konkrétne zameriavala na optimalizáciu prípravy boehmenanu X (**3g**). V literatúre je popísaná aj syntéza dehydrodikoniferyl alkohol-4- β -D-glukosidu A a B (**8a, 8b**; Teutonico a spol., 1991), no dané podmienky syntézy nie sú reprodukovateľné (viď. nepublikované výsledky Konrádová H.). A vzhľadom na to, že táto skupina látok je veľmi zaujímavá a nepreskúmaná a medziprodukt v syntéze boehmenanu X (**3g**) je možné použiť taktiež na prípravu DCG-A a B (**8a, 8b**), sme sa chopili príležitosti a do výskumu boehmenanu X sme zapojili aj optimalizáciu prípravy DCG-A a B. Naším cieľom bolo preto vyvinúť krátku a efektívnu metódu prípravy nielen cielených zlúčenín, ale aj ich analógov.

5.1 Konvergentná retrosyntetická analýza

Ako bolo v predošlých kapitolách spomenuté, samotnú syntézu prírodných látok predchádza jej teoretické navrhnutie. Pri štruktúrne zložitejších látkach sa využíva konvergentná retrosyntetická analýza, pri ktorej dochádza ku zjednodušeniu molekuly jej pomyselným rozdelením na jednoduchšie časti. Tento prístup bol využitý aj pri návrhoch syntézy boehmenanu X (**3g**), kedy sa molekula pomyselne rozdelila na tri základné časti, a to benzofuranový skelet **A**, kyselinu ferulovú **B** a kyselinu kumarovú **C** (Schéma 18).

Celkovo boli navrhnuté dve rôzne prístupy prípravy, líšiace sa v syntéze benzofuranového skeletu. Prvá, nami navrhnutá cesta využíva CDC coupling, čiže radikálový coupling medzi dvoma rôznymi zlúčeninami. To poskytuje rozšírenie syntéznej cesty na prípravu všetkých zástupcov zo skupiny boehmenanov. Druhá cesta prípravy vychádza z už publikovaného esterového couplingu dvoch rovnakých molekúl metylesteru kyseliny ferulovej, čo umožňuje cielenú prípravu boehmenanu a boehmenanu X. Táto heterodimerizácia (v prvom prípade) a homodimerizácia (v druhom), dá za vznik benzofuranovej kostre (Schéma 18, **A**), čo je kľúčový krok pri príprave všetkých zástupcov zo skupiny boehmenanov. Príprava ostatných fragmentov a ich jednotlivé prepojenie môže prebiehať rôznymi prístupmi a bude diskutované v nasledujúcich kapitolách.

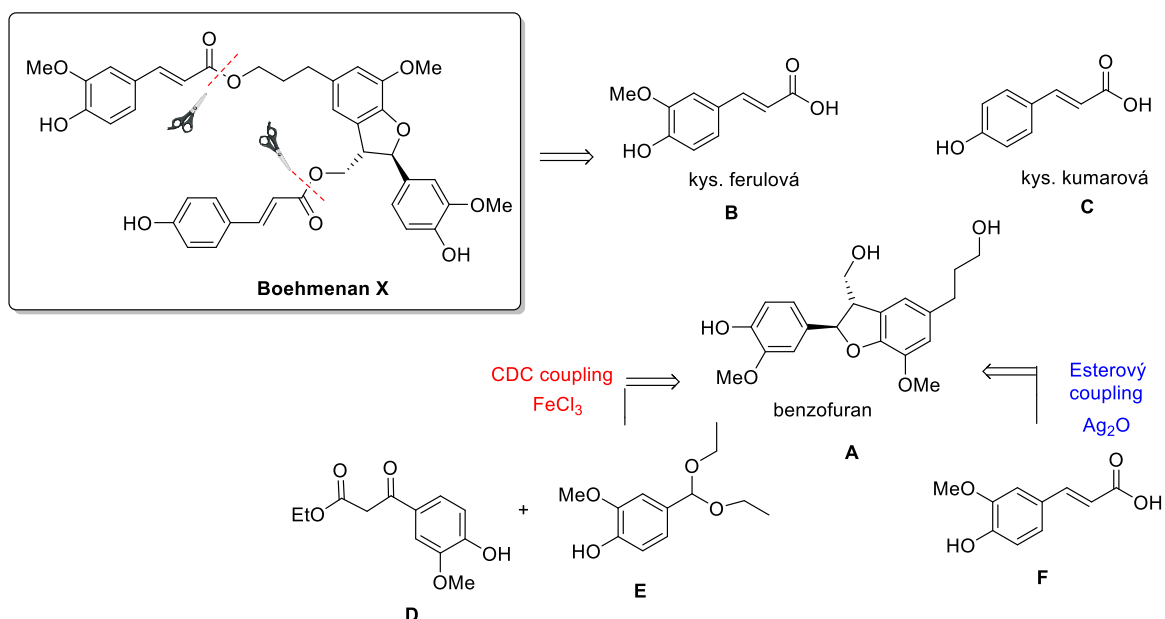


Schéma 18: konvergentná retrosyntetická analýza boehmenanu X

Pri niekoľkokrokových syntézach je potrebné predvídať aj reaktivnosť jednotlivých skupín a pred samotnou syntézou navrhnuť ich ochránenie pomocou špecifických protektívnych skupín. V inom prípade by mohlo dochádzať ku nežiadúcim reakciám a tým zníženiu výťažku, prípadne by k nami preferovaným reakciám nedochádzalo vôbec.

5.2 Prvá navrhnutá syntézna cesta: CDC coupling

Prvá, nami navrhnutá syntézna cesta bola založená na CDC couplingu. Takže na radikálovej heterodimerizácii ochráneného vanilínu I s β -ketoesterom MOM- kyseliny ferulovej VI. Tento coupling dvoch rôznych zlúčenín umožňuje diverzifikovať syntézu a potenciálne otvára možnosť následnej syntézy aj iných boehmenanov (3a-3f) ako je boehmenanu X (3g) a ďalších derivátov. Pre tento coupling bolo v prvom rade potrebné pripraviť samotné prekursor, ktoré zahrňovali syntézu MOM-kyseliny ferulovej, acetalu vanilínu a prípravu β -ketoesteru.

Syntéza prekursorov pre CDC-coupling

Chrániaca skupina metoxymetyler (MOM) je často využívaná pri ochránení reaktívnych hydroxylových skupín a bola použitá aj pri príprave ochránenej kyseliny ferulovej (Green a Wuts, 1999), ktorá prebiehala dvojkrokovou syntézou. V prvom kroku prebehla syntéza medziproduktu MOM-vanilínu I kvantitatívne, bez vedľajších produktov a za intenzívneho vývoja bielych par chloridu amónneho. V druhom kroku nasledovala Knoevenagelova kondenzácia MOM-vanilínu s kyselinou

malonovou za vzniku MOM- kyseliny ferulovej **IV**. Syntéza prebehla taktiež kvantitatívne a bez vedľajších produktov (Schéma 10).

Druhý prekursor predstavoval vanilin s chránenou aldehydicou skupinou. Prvý navrhnutý postup s využitím etylformiátu v prítomnosti pTSA (Schéma 11, **IIa**), bol napriek jeho bežnému využitiu (Trimble a Ebert, 1933; Chávez a Godínez., 1992) v našom prípade neúspešný. Keďže pri tejto reakcii dochádza ku reverzibilnému naviazaniu a disociácii vodíkového kationtu, musí byť sila kyseliny veľmi špecifická, preto bola zvolená iná forma kyslého prostredia vo forme kyseliny sírovej naviazanej na silikagel. Táto kyselina má mierne kyslé schopnosti a jej príprava je v literatúre uvádzaná viacerými postupmi (Chen a Lu, 2005). Príprava tohto vskutku zaujímavého produktu prebiehala v heterogennom prostredí oxidačnoredukčnou reakciou, čo malo za následok širokú škálu farieb, ktoré heterogénna zmes počas reakcie nadobúdala. Bohužiaľ výsledna reakcia **IIb** etylformiátu s danou kyselinou, napriek optimalizácii podmienok jej prípravy, nebola úspešná. Vzhľadom na neúspešnosť predošlých syntéz sa musela zvoliť úplne iná chrániaca skupina, ktorá vychádzala z etylformiátu. Ten poskytol s vanilínom jeho ochránenú formu vo forme aldolu **III**. Reakcia prebehla kvantitatívne a bez vedľajších produktov (Schéma 11)

Posledný prekursor pre CDC kapling predstavoval β -ketoester MOM-ochránenej kyseliny ferulovej **VI**. Jeho príprava prebiehala cez medziprodukt β -hydroxyester MOM-ochránenej kyseliny ferulovej **V**, ktorý bol pripravený pomocou Reformatskeho reakcie (Schéma 12). Táto reakcia prebiehajúca v prítomnosti práškoveho zinku, je v literatúre popísaná u mnohých rôznych typoch zlúčenín (Dekker a spol., 1984). Bohužiaľ dané podmienky v reakcii metyl-2-bromacetátu s ochráneným MOM-vanilínom **I** poskytovali príliš nízke výťažky (3-6%; Tabuľka 4). Menej využívaná je identická reakcia prebiehajúca v prítomnosti trojmocných solí železa, ktorá v reakcii s MOM-ochráneným vanilínom síce bola viac úspešná, ale taktiež poskytla príliš nízke výťažky na optimalizáciu nasledujúcej reakcie, ktorá spočívala v oxidácii pripraveného β -hydroxyesteru MOM-kyseliny ferulovej **V** na β -ketoester **VI** (Schéma 12). Vzhľadom na mechanizmus reakcie prebiehajúci cez cyklický medziprodukt komplexu kovu, mohla byť neúspešnosť reakcie spôsobená stérickým bránením benzénového jadra vanilínu. Ďalším dôvodom mohla byť prítomnosť substituentov s kladným mezomérnym efektom na benzénovom jadre vanilínu, ktoré spôsobujú zvyšovanie elektrónovej hustoty a tým pádom obtiažnejšie podmienky pre nukleofilnú adíciu na aldehydickej skupine vanilínu (Dekker a spol., 1984).

Syntéza β -ketoesteru MOM-kyseliny ferulovej prebiehala oxidáciou β -hydroxyesteru **V** v prítomnosti PDC (štandardný protokol) a dala za vznik produktu **VI**. Výťažky boli vzhľadom na nízku úspešnosť predchádzajúcej reakcii príliš nízke, kvôli čomu bohužiaľ nebolo možné pokračovať v syntéze boehmenanu cestou CDC kaplingu.

5.3 Druhá navrhnutá syntézná cesta: esterový coupling

Druhá syntézná cesta vedúca ku boehmenanu X vychádzala z publikovanej syntézy (Xia a spol., 2014) a ako kľúčový krok syntézy využívala POC metylesteru kyseliny ferulovej v prítomnosti Ag₂O. Ostatné fragmenty boli prepojené pomocou štandardných konvektívnych metód zahrňujúcich esterové couplingy.

Pred samotnou syntézou bolo potrebné pripraviť východzie látky, ktoré zahrňovali Wittigovu soľ **VIII**, MOM-kyselinu kumarovú **IX** a pomocnú skupinu reprezentovanú ochráneným L-prolinom (**XIII**; Khong a Kwon, 2010).

Syntéza prekurzorov pre esterový coupling

Syntéza Wittigovej soli **VIII** prebehala podľa štandardného protokolu (Hoffman, 2001), v kvantitatívnych výťažkoch a bez vedľajších produktov (Schéma 13). Čo sa týka kyseliny kumarovej, použila sa na ochranu hydroxylovej skupiny - rovnako ako v prípade MOM-chráneného vanilínu a kyseliny ferulovej - MOM chrániaca skupina za použitia identických podmienok (Green a Wuts, 1999). Keďže syntéza vychádzala zo samotnej kyseliny kumarovej, nachádzali sa na jej štruktúre dve hydroxylové skupiny. Reakcia MOMCl s kyselinou kumarovou tak dala za vznik dvojnásobne ochránenej kyseliny **X**. Keďže ale reakcia neprebehla kvantitatívne, ale len z 80 %, nachádzal sa v reakcii aj mono substitovaný produkt **IX**. Z toho dôvodu musela táto zmes podstúpiť ďalšiu reakciu s druhým ekvivalentom MOM, čím sa previedla aj ostávajúca monosubstituovaná kyselina **IX** na bis substituovanú **X**. Následnou bazickou hydrolyzou sa zhydrolyzovala reaktívnejšia MOM skupina na karboxylovej skupine, čo dalo za vznik produktu (Schéma 19).

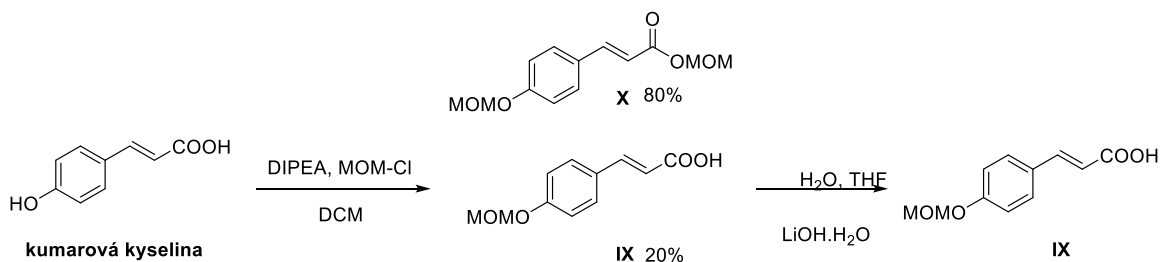


Schéma 19: hypotéza oddelenia enantiomérou pomocou opticky čistého chirálneho derivátu L-prolinu

Vzhľadom na vznik racemickej zmesi dvoch enantiomérov vytvorených pri homodimerizácii (Schéma 20; **XXVIa**, **XXVIb**) bola pri návrhu syntézy boehmenanu X esterovým couplingom vytvorená hypotéza oddelenia enantiomerov pomocou chirálnej pomocnej skupiny (**XXVII**). Reakcia alkoholu s derivátom L-prolinu mala poskytnúť zmes dvoch diastereoizomerov (Schéma 20; **XXVIIIa**, **XXVIIIb**), ktorých separácia pomocou stĺpcovej chromatografie mala umožniť prípravu oboch antipódov boehmenanu X (Schéma 20; **XXIXa**, **XXIXb**). Druhou hypotézou pri využití opticky

derivátu L-prolinu bol aj predpoklad, že táto chirálna pomocná skupina bude aplikovateľná na *in situ* selektívnu deprotekciju karbamoylovej skupiny a zároveň hydrogenáciu dvojnej väzby v postrannom reťazci látky **XXVIIIa** (Schéma 21). Zaujímavý bol predovšetkým predpokladaný mechanizmus ochránenia derivátu L-prolinu, ktorý po hydrogenácii a hydrolýze v prítomnosti *t*-BuOK mal poskytnúť cyklický produkt (**XXX**; Schéma 21). Došlo by tak ku vzdialenému selektívnemu ochráneniu len na jednej z dvoch karboxylových skupín. Selektívne ochránenie jednej karboxylovej kyseliny v prítomnosti druhej vo forme esteru je nevyhnutné k úspešnému zavŕšeniu syntézy boehmenanu X.

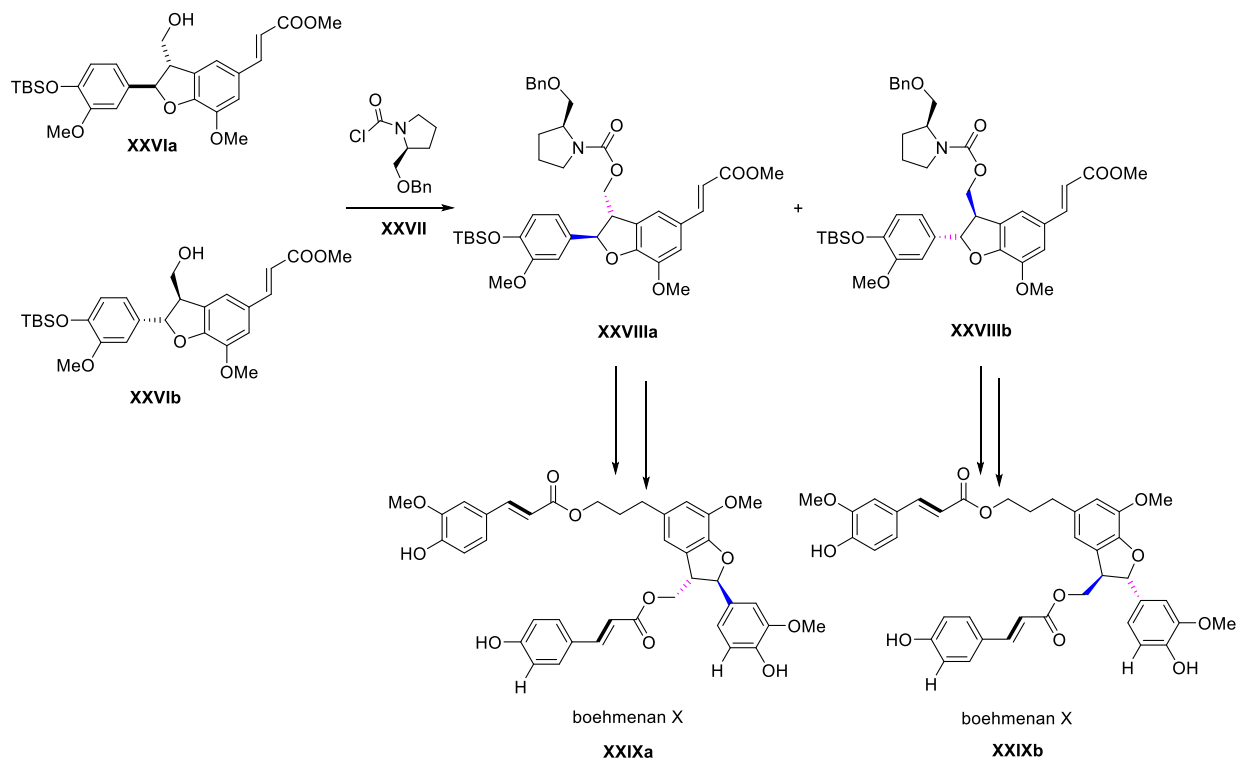


Schéma 20: Hypotéza oddelenia enantiomérov (**XXVIa**, **XXVIb**) pomocou chirálnej pomocnej skupiny vo forme derivátu L-prolinu **XXVII**.

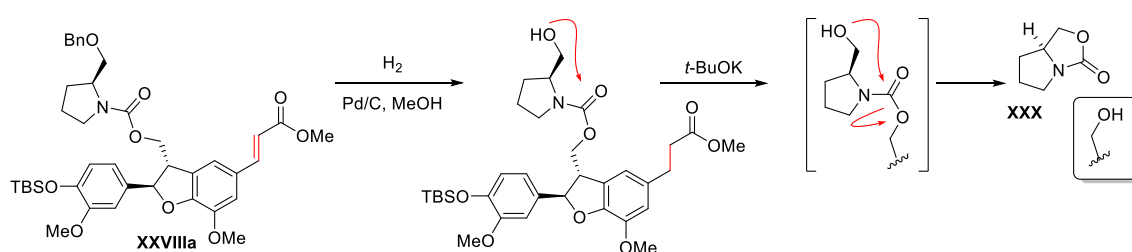


Schéma 21: Hypotéza vzdialeného selektívneho ochránenia jednej karboxylovej skupiny za vzniku cyklického produktu **XXX**.

Bohužiaľ, kvôli neúspechu syntézy chirálnej pomocnej skupiny (derivátu L-prolinu; Schéma 15) nebolo možné potvrdiť danú hypotézu. Jej príprava prebehala podľa publikovaných postupov (Khong a Kwon, 2012). Vychádzala z opticky čistého L-prolinu, ktorý bol najskôr redukovaný na L-prolinol **XI**. Následne podstúpila sekundárna aminová skupina ochránenie pomocou Boc anhydridu za vzniku látky **XII**. Táto ochranná skupina reaguje s aminmi za vzniku *N-terc*-butoxykarbonyl (Boc-) derivátov. Voľná hydroxylová skupina L-prolinolu následne podstúpila v prítomnosti benzylbromidu alkyláciu za vzniku benzyléteru. Benzylová ochranná skupina sa využíva na rôzne typy alkoholov, bohužiaľ v našom prípade ochráneného L-prolinolu reakcia neprebehla. Pomocou ¹H-NMR spektra sme identifikovali benzylalkohol, ktorý mohol vzniknúť počas reakcie, prípadne mohlo dôjsť ku kyslej hydrolyze na chromatografickej kolone. Neprítomnosť signálov v mieste vodíkov z prolinu dokazovala na neprítomnosť prolínového kruhu v spektre. Naopak signály v rozmedzí 0,5-1,5 ppm značili na prítomnosť alifatických reťazcov, ktoré mohli vzniknúť rozštiepením molekuly. Vzhľadom na neúspech syntézy opticky čistej látky sa musel pôvodný návrh nezávislého zavedenia postranných reťazcov na benzofuranové jadro upraviť.

Syntéza boehmenanu X

Prvý krok syntézy vychádzal z vyvinutej prípravy derivátov škoricovej kyseliny našou výskumnou skupinou (Kondrádová a spol. 2017). Táto príprava zahŕňa Wittigovú syntézu za použitia mikrovlnného žiarenia, pri ktorej reaguje vanilin s Wittigovou soľou (**VIII**, Schéma 16). Táto reakcia prebieha vo vysokých výťažkoch (90%) a bez vedľajších produktov. Nasledujúca radikálová reakcia v prítomnosti Ag₂O poskytla racemický benzofuran (Schéma 22). Výťažok reakcie sa pohyboval v rozmedzí 15-20 % a aby sa získalo dostatočné množstvo produktu na nasledujúce syntézy, musela sa reakcia prípravy benzofuranu niekoľkonásobne opakovať. Samotný radikálový priebeh reakcie predurčuje jej nízke výťažky, ktoré Xia a spol. zvýšili prípravou čerstvého Ag₂O (my sme sa o to ani nepokúšali, keďže sme predpokládali, že príprava obdobného produktu pomocou CDC couplingu nám poskytne ešte lepšie výťažky.

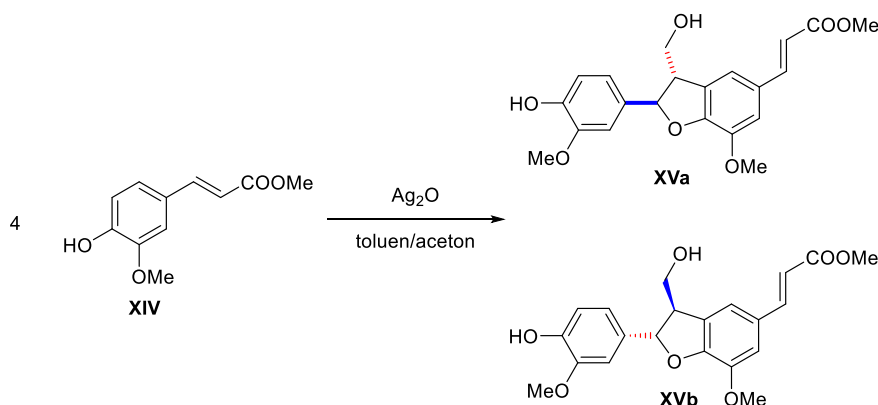
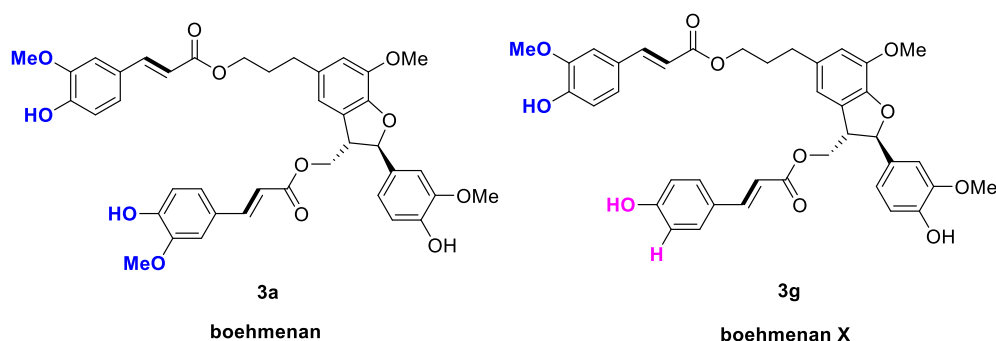


Schéma 22: Homodimerizácia kyseliny ferulovej, v prítomnosti Ag₂O za vzniku dvoch enantiomérnych produktov.

Pripravený homodimer následne podstúpil, tak ako v popísanom postupe v literatúre (Xia a spol., 2014) ochránenie reaktívnej fenolickej hydroxylovej skupiny. V literatúre uvádzaný dihydropyran (DHP) bol nahradený overenou chrániacou skupinou TBS.

Vzhľadom na to, že u boehmenanu sú postranné reťazce identické, zatiaľ čo u boehmenanu X sa líšia (Obrázok 9), musela byť v nasledujúcich krokoch popísaná príprava boehmenanu (**3a**; Xia a spol., 2014) modifikovaná. Pri príprave boehmenanu X bolo potrebné zaistiť selektívne a nezávislé zavedenie jednotlivých reťazcov do jeho výslednej kostry.



Obrázok 9: Štruktúrny rozdiel medzi molekulou boehmenanu a boehmenanu X.

Pôvodná hypotéza s využitím chirálnej pomocnej skupiny nemohla byť potvrdená pre neúspešnosť syntézy chráneného L-prolinu. Bola preto navrhnutá metóda selektívnej redukcie metylesteru **XVII** a selektívnej hydrogenácie olefinu **XVIII**, po ktorej mohli byť do štruktúry nezávisle zavedené postranné reťazce. Čo sa týka redukcie, predpokladaný selektívny mechanizmus reakcie sprostredkovaný LiBH_4 bol potvrdený a vskutku reagoval prednostne elektrónovo bohatší metylester na benzénovom jadre (**XVII**; Schéma 16). Následne prebehla selektívna hydrogenácia za využitia plynného vodíku v prítomnosti katalyzátoru (**XVII**; Schéma 16). Ten primárne hydrogenuje nenásýtené olefiny, no v nadmernej koncentrácii môže spôsobiť disociáciu chrániacej TBS skupiny na fenolickom alkohole, ktorá je náchylná na kyslé prostredie. Preto bolo nevyhnutné optimalizovať reakčnú dobu reakcie a predísť nežiadúcej disociácii TBS ochrannej skupiny. Hydrogenácia tak pri reakčnej dobe 30 minút poskytla produkt s minimálnym zastúpením vedľajších produktov (Tabuľka 5), ktorý sa mohol bez dodatočného čistenia použiť v nasledujúcej reakcii. Tá zahrňovala esterový coupling MOM-kyseliny kumarovej s voľnou hydroxylovou skupinou v prítomnosti DCC, čím sa umožnilo nezávisle zavedenie postranného reťazca **IX** na benzofuranovú kostru (**XIX**; Schéma 16). Takto sa postup prípravy boehmenanu uvádzaný v literatúre (Xia a spol., 2014) rozšíril na syntézu boehmenanu X. Poslednou overenou reakciou navrhutej syntézne dráhy boehmenanu X bola hydrolýza metylesteru prebiehajúca v prítomnosti LiCl (**XX**; Schéma 16). Bohužiaľ $^1\text{H-NMR}$ spektrum nepreukázalo prítomnosť produktu. Dovodom mohlo byť rozloženie produktu pri vysokej teplote ($100\text{ }^\circ\text{C}$).

Vzhľadom na nedostatok času nebolo možné poslednú reakciu optimalizovať a v syntéze pokračovať. Každopádne sme vyvinuli a overili kroky vedúce ku boehmenanu X a tým vyšliapali chodník ku dokončeniu doposiaľ úspešného výskumu totálnej syntézy prírodnej látky, boehmenanu X.

5.4 DCG

Ako bolo v predošlých kapitolách spomínané, skupina látok zaradzujúcich sa medzi substituované benzofuranové neolignany s názvom dehydrodikoniferyl alkohol-4- β -D-glukosidy (DCG; **8a-8f**) nás zaujala z viacerých hľadísk. V prvom rade to boli jej zaujímavé, no nedostatočne preskúmané vlastnosti uvádzané v literatúre (Attoumbre a spol., 2006). Následne to bola nereprodukovateľnosť ich publikovanej prípravy. V neposlednom rade pak skutočnosť, že DCG sa rovnako ako boehmenan X zaradzujú ku substituovaným benzofuranovým zlúčeninám. Z toho vyplýva, že kľúčová reakcia pri syntéze oboch týchto látok spočíva v príprave benzofuranovej kostry. To poskytuje využitie tohto medzi produktu ku príprave oboch zlúčenín (Schéma 23). Napriek obmedzenému množstvu času poskytnutém na výskum počas magisterského štúdia sa nedala táto šanca prípravy oboch typov zlúčenín nevyužiť.

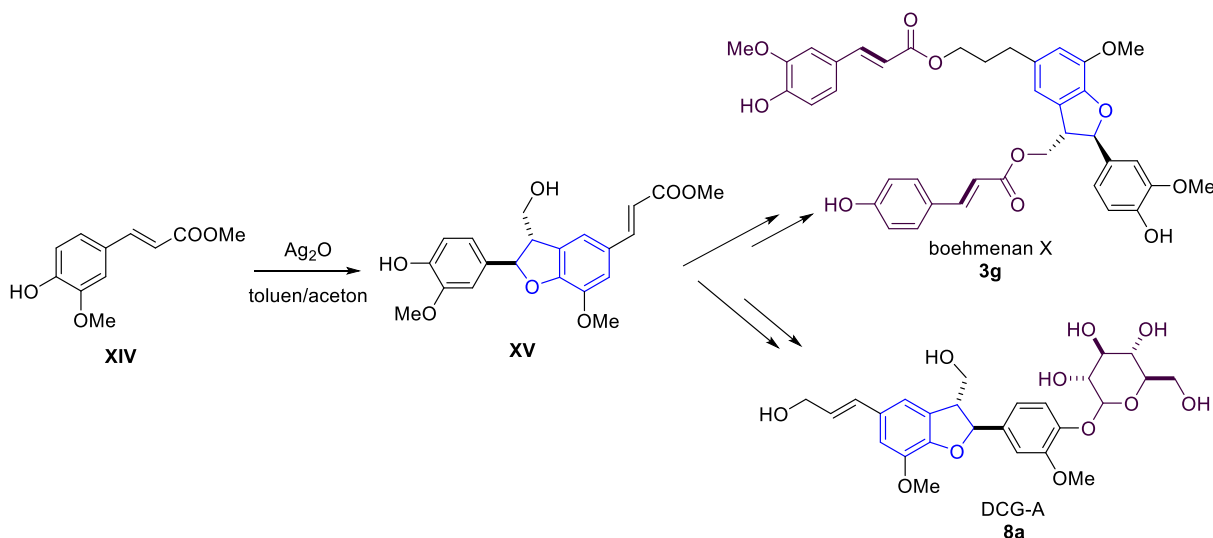
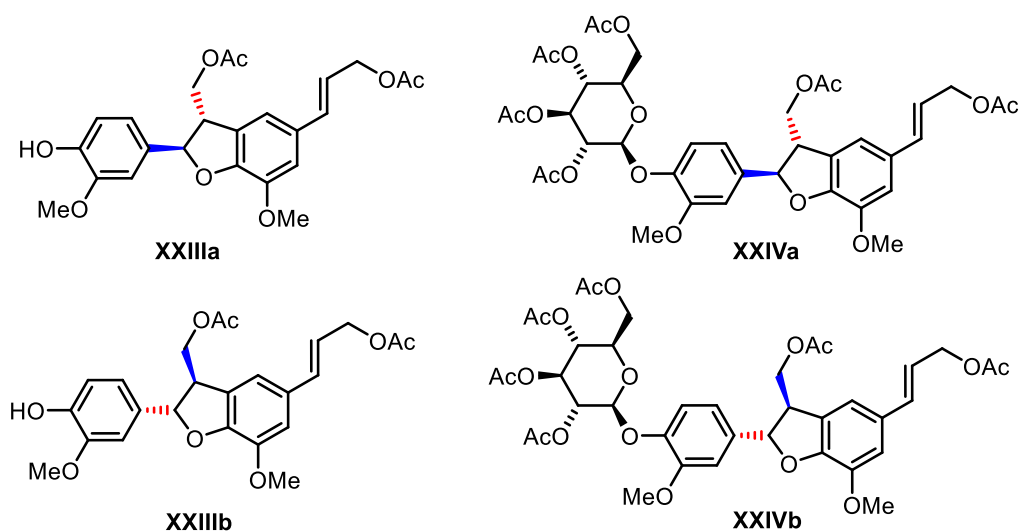


Schéma 23: Spoločné schéma znázorňujúce prístup k štruktúre boehmenanu X aj DCG-A.

Publikovaná príprava DCG-A,B (**8a,8b**; Schéma 9) vychádza z homodimerizačného POC metylesteru kyseliny ferulovej v prítomnosti $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$. V našom prípade sme využili medzi produkt z prípravy boehmenanu X, a to ochránený TBS-dimer. Publikovaný postup následne popisuje glukozyláciu voľného fenolického hydroxyly chránenou acetylovanou glukózou. Konečný krok zahŕňajúci ochránenie glukózy so simultánnou redukciou metylesterov nebol podľa podmienok v literatúre reprodukovateľný (viď. predchádzajúce nepublikované výsledky Mgr. H. Kozubíkové). Preto bola navrhnutá alternatívna cesta (Schéma 17) zahrňujúca v prvom kroku redukcii obidvoch

metylesterov (**XXI**) v prítomnosti redukčného činidla DIBAL-H, po ktorej sa voľné hydroxylové skupiny transformovali na bis acetát **XXII**. Následné ochránenie fenolického hydroxylu (**XXIII**) umožnilo selektívne zavedenie ochránenej peracetalovej glukózy na voľný hydroxyl (**XXIV**). Výsledný peracetalovaný produkt mal byť v konečnom kroku globálne ochránený za vzniku racemickej zmesi cielených štruktúr DCG-A a B (**8a, 8b**).

Surová zmes ochráneného bis acetátu (**XXIII**) aj glukozilyovaného produktu (**XXIV**) poskytovala možnosť rozdelenia oboch stereoizomérov na stĺpcovej chromatografii (Obrázok 10).



Obrázok 10: Stereoizoméry ochráneného bis acetátu a glukozilyovaného produktu.

Ich detekciu umožňovalo rôzne zafarbenie škvŕn na TLC po zafarbení vizualizačným vanilínovým roztokom (fialová/modrá škvŕna). Bohužiaľ ich takmer identické retenčné faktory nám nedovoľovali vyizolovať jednotlivé stereoizoméry **XXIVa** a **XXIVb** v dostatočnej čistote a v množstve, ktoré by postačovalo na ich identifikáciu a charakterizáciu, prípadne na zavedenie simultánnych nasledujúcich syntéz s každým stereoizomerom osobitne. Posledný krok globálneho ochránenia preto podstúpili obe stereoizoméry spoločne. Prvotný návrh globálneho ochránenia pomocou MeONa/MeOH systému napriek optimalizácii nebol úspešný (Tabuľka 6). ¹H-NMR spektra neposkytovali okrem rozpúšťadla a signálu metanolátu žiadny iný signál. Vzhľadom na to, že všeobecný zákon zachovania hmoty je stále v platnosti, sme si zjavné zmiznutie látky vysvetľovali jej veľmi nízkou koncentráciou oproti metanolátu sodnému. Zníženie koncentrácie metanolátu sodného síce poskytlo názornejšie ¹H-NMR spektrum, ktoré bohužiaľ nepotvrdilo prítomnosť produktu, len východzej látky. Keďže sa ale produkt v reakčnej zmesi mohol nachádzať v nízkych koncentráciách, bolo potrebné zmes prečistiť. Vzhľadom na príliš vysokú polaritu látky sa na prečistenie reakčnej zmesi nemohla využiť klasická stĺpcová chromatografia s polárnou stacionárnou fázou. Preto bola na prečistenie využitá semipreparatívna HPLC s reverznou stacionárnou fázou. Izolované frakcie síce neobsahovali frakciu s produktom, podarilo sa ale získať peracetalovú východziu látku s vysokou čistotou. Vzhľadom na hypotézu, podľa ktorej by v

biologických systémoch mohlo dochádzať ku ochráneniu a uvoľneniu prírodnej látky, bola táto čistá frakcia poskytnutá na biologické testovanie. Výsledky bohužiaľ neboli v období písania záverečnej práci k dispozícii.

Druhý návrh kompletného ochránenia v prítomnosti 5% $\text{NH}_4\text{OH}/\text{MeOH}$ poskytol detekovateľný produkt v zmesi s východziou látkou. Z $^1\text{H-NMR}$ spektra reakčnej zmesi vyplýva, že intenzita signálu metylenovej skupiny esteru klesla o 1/3, čo naznačuje možnosť konverzie na produkt z približne 30%. Príliš nízka koncentrácia nám ale nedovoľovala izoláciu a charakterizáciu produktu, a tým pádom možnosť dokončiť optimalizáciu syntézy DCG-A (**8a**) a DCG-B (**8b**). Každopádne poskytla - rovnako ako v prípade boehmenanu X - cestu ku produktu a ďalšiemu výskumu v tejto oblasti.

6. Záver

Táto práca sa zaoberala substituovanými benzofuranovými neolignanmi, ktoré vystupujú ako potencionálne biologicky aktívne látky. V teoretickej časti som sa zamerala konkrétne na málo preskúmanú oblasť skupiny boehmenanov a dehydrodikoniferyl alkohol-4- β -D-glucidov (DCG), a to konkrétne na ich výskyt, biologickú aktivitu a prípravu. Ďalej som sa zamerala na prípravu benzofuranovej kostry v kontexte syntézy neolignanov. Experimentálna časť bola cielená na vývoj a optimalizáciu nových syntetických postupov boehmenanu X a DCG-A a B. Navrhnuté prípravy neolignanového skeletu boli overené a optimalizované a v prípade DCG-A a B viedli ku cielenému produktu. Z časových dôvodov nie sú uvedené výsledky biologickej aktivity, pretože v dobe dopisovania záverečnej práce neboli k dispozícii. Všetky izolované látky boli charakterizované pomocou NMR. Predbežné dosiahnuté výsledky boli akceptované v publikácii v impaktovanom časopise (viď príloha). Tento výskum nie je zďaleka u konca, každopádne sme pripravili pôdu pre nasledujúce generácie náruživých chemikov či experimentálnych biológov so záujmom o prírodné látky a ich syntézu ako v živých systémoch tak v laboratórnych podmienkach.

7. Zoznam použitých skratiek

- $\Delta\Psi_m$ – mitochondriálny membránový potenciál
- 4CL – 4-kumarát koenzym A ligázy
- A549 – epitelové línie ľudskeho pľúcneho adenokarcinómu
- CAD – škoricooát alkohol dehydrogenázy
- CAld5H – koniferyl aldehyd 5-hydroxyláza
- CE – kapilárna elektroforéza
- CCR – škoricooát koenzym A reduktázy
- COMT – kyselina 3-O metyl transferáza
- DCC – N-N'-dicyklohexylkarboimid
- DCM - dichlormethan
- DHP – dihydropyran
- DIBAL-H – diisobuthylaluminiumhydrid
- DIC – N,N-diisopropylkarbodiimid
- DIPEA – N,N-diisopropyethylamin
- DMF – N,N-dimethylformamid
- DMAP – 4-dimetylaminopyridin
- ED50 – polovičná účinná dávka
- EGFR – receptor epidermálneho rastového faktoru
- Et₃N/TEA – triethylamin
- FTIR – infračervená spektrometria s Fourierovou transformáciou
- GC – plynová chromatografia
- HeLa – nádorové línie krčku maternice
- Hep-2 – ľudské nádorové línie larynxu
- HL-60 – ľudské nádorové línie myeloidnej leukémie
- HO8910 – ľudské nádorové línie rakoviny vaječníku
- HPLC – vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
- HRESIMS – high-resolution hmotnostná spektrometria s ionizáciou elektrosprejom
- HSCCC – vysoko rýchlostná protiprúdová chromatografia
- HUVEC – kontrolná línia zdravých buniek
- IC50 – polovičná inhibičná koncentrácia
- LC – kvapalinová chromatografia
- LNCaP – ľudské nádorové línie karcinómu prostaty
- l. t. – laboratórna teplota
- Lu1 – ľudské nádorové línie karcinómu pľúc

MAP kináza – mitogénom aktivovaná proteinkináza
MCF-7 – línie ľudskej rakoviny prsníku
MOM – methyľmethylether
MOMCl – chlormetyľmetyleter
MS – hmotnostná spektrometria
MW – mikrovlny
NMR – nukľárna magnetická rezonancia
NSCLC – línie nemalobunkového pľúcného karcinómu, (“non-small cell lung cancer“)
PAL – fenylalanín amónium lyáza
PARP – poly (ADP-ribozyl) polymeráza
PCC – pyridínium chlorchromát
PDA – fotodiodový detektor
POC – fenyl oxidačný coupling (“phenyl oxidative coupling“)
PPTS – pyridínium p-toluensulfonát
PTP – proteín tyrozinové fosfatázy
PTP1B – proteín-tyrosín fosfatáza 1B
pTSA – para-toluensulfonová kyselina
ROS – reaktívne formy kyslíku
SIP₁ – sfingosín-1-fosfát
SOD – superoxid dizmutáza
STAT3 – signálový prenášeč a aktivátor transkripcie 3
T47D – ľudskej nádorovej línie prsníka
TAL – tyrozin amónium lyáza
TBAF – tetrabutylamónium fluorid
TBS – *tert*-butyľdimetyľsilyl
THF – tetrahydrofuran
THP – tetrahydropyran
TLC – tenkovrstevná chromatografia
TOS – Target-Oriented Synthesis

8. Literatura

- Attoumbre, J.; Hano, Ch.; Mesnard, F.; Lamblin, F.; Bensaddek, L.; Raynaud-Le Grandic, S.; Laine, É.; Fliniaux, M.-A.; Baltora-Roset, S. *C. R. Chimie* **2006**, *9*, 420-425.
- Binns, A. N.; Chent, R. H.; Woods, H. N.; Lynnt, D. G. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 980-984.
- Bolzacchini, E.; Brunow, G.; Meinardi, S.; Orlandi, M.; Rindone, B.; Rummakko, P.; Setala, H. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 3291-3294.
- Cai, Y. Z.; Luo, Q.; Sun, M.; Corke, H. *Life Sci.* **2004**, *74* (17), 2157-2184.
- Carunchio, F.; Crescenzi, C.; Girelli, A.M.; Messina, A.; Tarola, A.M. *Talanta* **2001**, *55*, 189-200.
- Clevers, H.; Nusse, R. *Cell* **2012**, *149* (6), 1192-1205.
- Cotelle, P.; Vezin, H. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 3303-3305.
- Cui, G. Y.; Tan, R. X. *Biochem. Syst. Ecol.* **2004**, *32* (1), 99-102.
- Cutillo, F.; D'Abrosca, B.; DellaGreca, M.; Fiorentino, A.; Zarrelli, A. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51* (21), 6165-6172.
- Dekker, J.; Budzelaar, P. H. M.; Boersma, J.; van der Kerk, G. J. M.; Spek, A. J. *Organometallics* **1948**, *9* (3) 1403-1407.
- Edmonds, M.; Payne, R. *J. Chem. Educ.* **2005**, *82* (4), 599-600.
- Elsinger, F.; Schrieber, J. Eschenmoser, A. *Helv. Chim. Acta* **1960**, *43*, 113-118.
- El-Seedi, H. R.; El-Said, A. M.; Khalifa, S. A. M.; Göransson, U.; Bohlin, L. Borg-Karlson, A.-K.; Verpoorte, R. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60* (44), 10877-10895.
- Fuss, E. *Phytochem. Rev.* **2003**, *2* (3), 307-320.
- Geissman, T.A.; Crout, D.H.G. *Organic Chemistry of Secondary Plant Metabolism*; Freeman, Cooper & Company: San Francisco, CA, USA, **1969**; Chapter V, 136-166; Chapter XIV, 372-400.
- Green, T. W.; Wuts, P. G. M.; *Protective Groups in Organic Synthesis*. Wiley-Interscience, New York, **1999**, 27-33, 708-711.
- Harmatha, J. *Chemie a biochemie přírodních látek. Cyklus Organická chemie, svazek 27. ÚOCHB-AVČR, Praha*, **2002**; *4*, 120.
- Hartmann, T. *Phytochemistry* **2007**, *68* (22), 2831-2846.
- Hermann, K. M.; Weaver, L. M. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1999**, *50*, 473-503.
- Hoffmann, R. W. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40* (8): 1411-1416.
- Chattopadhyay, A.; Dubey, A. J. *Org. Chem.* **2007**, *72* (24), 9357-9359.
- Chávez, F.; Godinez, R. *Chem. Inform.* **1992**, *22* (1), 159-164
- Chen, J.-J.; Yang, Ch.-S.; Peng, C.-F.; Chen, I.-S.; Miaw, Ch.-L. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71* (6), 1016-1021.
- Chen, W.; Lu, J. *Synlett* **2005**, *15*, 2293-2296
- Chiang, H.-C.; Li, S.-Y. *J. Chin. Chem. Soc.* **1978**, *25*, 141-147.

Chin, Y.-W.; Jones, W. P.; Rachman, I.; Riswan, S.; Kardono, L. B. S.; Chai, H.-B.; Farnsworth, N. R.; Cordell, G. A.; Swanson, S. M.; Cassady, J. M.; Kinghorn, A. D. *Phytother. Res.* **2006**, *20* (1), 62-65.

Chioccare, F.; Poli, S.; Rindone, B.; Pilati, T.; Brunow, G.; Pietikäinen, P.; Setälä, H. *Acta Chem. Scand.* **1993**, *47*, 610–616.

Jiangsu New College of Medicine, “Dictionary of Traditional Chinese Medicine,” Shanghai Science and Technology Publishing House, Shanghai, **1977**, 930.

Juhász, L.; Kürti, L.; Antus, S. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63* (6), 866-870.

Khanam, H.; Shamsuzzaman *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *97*, 483-504.

Khong, S. N.; Kwon, O. *Molecules* **2012**, *17*, 5626.

Konrádová, D.; Kozubíková, H.; Doležal, K.; Pospíšil, J. *Eur. J. Org. Chem.* **2017**, *2017*, 5204.

Koubaa, I.; Damak, M. *Fitoterapia* **2003**, *74* (1), 18-22.

Kuo, Y.-H.; Chen, L.-H.; Wang, L.-M. *Chem. Pharm. Bull.* **1991**, *39*, 2196-2200.

Nishiyama, A.; Eto, H.; Terada, Y.; Iguchi, M.; Yamamura, S. *Chem. Pharm. Bull.* **1983**, *31*, 2834-2844.

Kurti, L.; Szilágyi, L.; Antus, S.; Nogradi, M. *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 2579-2581.

Kuo, Y.-H.; Wu, C.-H. *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 625–628.

Lewis, N.G., Sarkanen, S., Eds. *Lignin and Lignan Biosynthesis* ACS Symposium Series; Washington, DC, USA, **1998**; Volume 697.

Lin, M.-T.; Chun, L.-Ch.; Chen, Ch.-K.; Liu, K. C. S. Ch.; Lee, S.-S. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64* (6), 707-709.

Maeda, S.; Masuda, H.; Tokoroyama, T. *Chem. Pharm. Bull.* **1995**, *43*, 84–90.

Magoulas, G.; Papaioannou, D. *Molecules* **2014**, *19* (12), 19769-19835.

Masubuchi, M.; Ebiike, H.; Kawasaki, K.; Sogabe, S.; Morikami, K.; Shiratori, Y.; Tsujii, S.; Fujii, T.; Sakata, K.; Hayase, M.; Shindoh, H.; Aoki, Y.; Ohtsuka, T.; Shimma, N. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11* (20), 4463-4478.

Miller, I. J. *Tetrahedron Lett.* **1972**, *13* (49), 4955-4958.

Moujir, L.; Seca, A. M. L.; Silva, A. M. S.; López, M. R.; Padilla, N.; Cavaleiro, J. A. S.; Neto, C. P. *Fitoterapia* **2007**, *78* (5), 385-387.

Neudorffer, A.; Deguin, B.; el Ha, C.; Fleury, M.-B.; Largeron, M. *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.* **2003**, *68*, 1515–1530.

Orlandi, M.; Rindone, B.; Molteni, G.; Rummakko, P.; Brunow, G. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 371.

Orr, J. D.; Lynn, D. G. *Plant. Physiol.* **1992**, *98*, 343–352

Osakabe, K.; Tsao, Ch. Ch.; Li, L.; Popko, J. L.; Umezawa, T.; Carraway, D. T.; Smeltzer, R. H.; Joshi, Ch. P.; Chiang, V. L. *PNAS* **1999**, *96* (16), 8955-8960.

Pan, L. L.; Wang, X. L.; Luo, X. L.; Liu, S. Y.; Xu, P.; Hu, J. F.; Liu, X. H. *Integr. Cancer. Ther.* **2017**, *16*(3), 351-359

Pan, L.-L.; Wang, X.-L.; Zhang, Q.-Y.; Luo, X.-L.; Xu, P.; Liu, S.-Y.; Hu, J.-F.; Liu, X.-H. *Phytomed.* **2016**, *23* (5), 468-476.

Patel, K. N.; Patel, J. K.; Patel, M. P.; Rajput, G. C.; Patel, H. A. *Pharm. Methods* **2010**, *1* (1), 2-13.

Paula, V. F.; Barbosa, L. C. A.; Demuner, A. J.; Howarth, Oliver W.; Veloso, D. P. *Quimica Nova* **1996**, *19* (3), 225-229.

Paula, V. F.; Barbosa, L. C. A.; Howarth, O. W.; Demuner, A. J.; Cass, Q. B.; Vieira, I. J. C. *Tetrahedron* **1995**, *51* (45), 12453-12462.

Pham, H. N. T.; Vuong, Q. V.; Bowyer, M. C.; Scarlett, Ch. J. *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants* **2017**, *7*, 113-123.

Pieters, L.; van Dyck, S.; Gao, M.; Bai, R.; Hamel, E.; Vlietinck, A.; Lemièrre, G. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 5475-5481.

Radadiya, A.; Shah, A. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *97*, 356-376.

Rakotondramanana, D. L. A.; Delomenede, M.; Baltas, M.; Duran, H.; Bedos-Belval, F.; Rasoanaivo, P.; Negre-Salvayre, A.; Gornitzka, H. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 6018-6026.

Ralph, J.; Garcia Conesa, M.T.; Williamson, G. Simple preparation of 8-5 coupled diferulate. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 2531-2532.

Rudiyansyah; Garson, M. J. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69* (8), 1218-1221.

Rudiyansyah; Lambert, L. K.; Garson, M. J. *J. Nat. Prod.* **2010**, *73* (10), 1649-1654.

Sasaki, T.; Li, W.; Morimura, H.; Li, S.; Li, Q.; Asada, Y.; Koike, K. *Chem. Pharm. Bull.* **2011**, *59* (11), 1396-1399.

Seca, A. M. L.; Silva, A. M. S.; Silvestre, A. J. D.; Cavaleiro, J. A. S.; Domingues, F. M. J.; Pascoal-Neto, C. *Phytochemistry* **2001**, *56* (7), 759-767.

Setälä, H. Regio- and Stereoselectivity of Oxidative Coupling Reactions of Phenols Spirodienones as Construction Units in Lignin. Ph.D. Thesis, University of Helsinki, Helsinki, Finland, **2008**.

Shadle, G. F.; Chen, F.; Reddy, M. S. S.; Jackson, L.; Nakashima, J.; Dixon, R. A. *Phytochemistry* **2007**, *68* (11), 1521-1529.

Shahidi, F.; Chandrasekara A. *Phytochem. Rev.* **2010**, *9* (1), 147-170.

Shono, T.; Ishikawa, N.; Toume, K.; Arai, M. A.; Ahmed, F.; Sadhu, S. K.; Ishibashi, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25* (14), 2735-2738.

Sih, C. J.; Ravikumar, P. R.; Huang, F.-C.; Buckner, C.; Whitlock, H. Jr. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 5412-5413.

Solecki, R. S.; Ralph S. *Science* **1975**, *190* (4217), 880-881.

Sternfeld, F.; Guiblin, A. R.; Jelley, R. A.; Matassa, V. G.; Reeve, A. J.; Hunt, P. A.; Beer, M. S.; Heald, A.; Stanton, J. A.; Sohal, B.; Watt, A. P.; Street, L. J. *Tetrahedron* **1999**, 677-690

Sumner, J. The Natural History of Medicinal Plants **2000**. Timber Press. ISBN 0-88192-483-0.

Takemoto, T.; Miyase, T.; *Yakugaku Zasshi.* **1975**, *95*(2), 180-184.

Teponno, R. B.; Kusari, S.; Spiteller, M. *Nat. Prod. Rep.* **2016**, *33* (9), 1044-1092.

Teutonico, R. A.; Dudley, M. W.; Orr, J. D.; Lynn, D. G.; Binns, A. N. *Plant Physiol.* **1991**, *97* (1), 288-297.

Torres y Torres, J. L.; Rosazza, J. P. N. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64* (11), 1408.

Trimble, H. M.; Ebert, P. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1933**, *55* (3), 958-968.

Umezawa, T. *Phytochem. Rev.* **2009**, *9* (1), 1-17.

Umezawa, T.; Okunishi, T.; Shimada, M. *Wood Res.: Bull. Wood Res. Inst. Kyoto Univ.* **1997**, *84*, 62–75.

Van Parijs, F. R. D.; Ruttink, T.; Boerjan, W.; Haesaert, G.; Byrne, S. L.; Asp, T.; Roldán-Ruiz, I.; Muylle, H. *Plant Biology* **2015**, *17* (4), 877–892.

Varbanova, M.; Porter, K.; Lu, F.; Ralph, J.; Hammerschmidt, R.; Jones, A. D.; Day, B. *Plant Physiol.* **2011**, *157* (3), 1056–1066.

Wang, Q.; Yang, Y.; Li, Y.; Yu, W.; Hou, Z. H. *Tetrahedron* **2006**, *62* (25), 6107–6112.

Wang, Y.; Chantreau, M.; Sibout, R.; Hawkins, S. *Front. Plant. Sci.* **2013**, *4*, 220.

Ward, R. S. *Nat. Prod. Rep.* **1995**, *12* (2), 183-205.

Weng, J.-K.; Chapple, C. *New Phytol.* **2010**, *187* (2), 273-285.

Wu, P.-L.; Chuang, T.-H.; He, C.-X.; Wu, T.-S. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12* (9), 2193–2197.

Xia, Y.; Dai, X.; Liu, H.; Chai, C. *J. Chem. Sci.* **2014**, *126* (3), 813-820.

Yang, D.-S.; Li, Z.-L.; Peng, W.-B.; Yang, Y.-P.; Wang, X.; Liu, K.-Ch.; Li, X.-L.; Xiao, W.-L. *Fitoterapia* **2015**, *103*, 165–170.

Ying, H.; Jiang, H.; Liu, H.; Chen, F.; Du, Q. *J. Chromatogr. A* **2014**, *1359*, 117–123.

Yu, O.; Jez, J. M. *Plant J.* **2008**, *54* (4), 750-762.

Zhang, A.; Lu, F.; Sun, R.; Ralph, J. *Planta* **2009**, *229*, 1099–1108.

Zioudrou, C.; Fruton, J. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 5951-5953.