

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PEDAGOGICKÁ FAKULTA

KATEDRA CHEMIE A DIDAKTIKY CHEMIE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Studium přípravy diastereomerních 3-arylflavinů

Vypracoval:

Ondřej Solnička

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Hana Kotoučová

Studijní obor:

Biologie – chemie

V Praze dne 21. června 2013

.....
podpis

Předkládaná diplomová práce byla vypracována na Katedře chemie a didaktiky chemie Pedagogické fakulty Univerzity Karlovy v Praze ve spolupráci s Ústavem organické chemie Vysoké školy chemicko-technologické v Praze v období listopad 2010 až červen 2013.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Praze dne 21. 6. 2013

.....
podpis

SOUHRN

Předkládanou diplomovou prací volně navazuji na svou bakalářskou práci, ve které jsem se zabýval přípravou prekurzorů pro syntézu atropoizomerních *ortho*-substituovaných 3-fenylflavinů. V práci se zabývám studiem podmínek pro převedení 3-*ortho*-tolylflavinu a 3-*ortho*-tolylflavin-*N*-oxidu na odpovídající flavinové kyseliny, které by mohly být dále derivatizovány na *ortho*-substituované flavin-amidy nebo flavin-estery. Získané látky by mohly být využity jako potenciální katalyzátory redoxních reakcí, především enantioselektivních sulfoxidací.

SUMMARY

The presented diploma thesis is built on my bachelor thesis and deals with the study of preparation of *ortho*-substituted 3-phenylflavins. The target is preparation of 3-*ortho*-tolylflavin and 3-*ortho*-tolylflavin-*N*-oxide and their potential transformation to diastereomeric *ortho*-substituted flavin-amides or flavin-esters. Obtained substances could be tested as potential catalysts for redox reactions, especially for enantioselective sulfoxidations.

Rád bych poděkoval především vedoucí své práce Ing. Haně Kotoučové za mnoho času a cenných zkušeností, které mi věnovala a za její velmi vstřícný a trpělivý přístup k mému vzdělávání.

Dále pak děkuji kolektivu laboratoře Hyde Park za pohodové pracovní prostředí, připomínky a rady během mé práce.

V neposlední řadě děkuji své rodině za vytrvalou podporu při studiu.

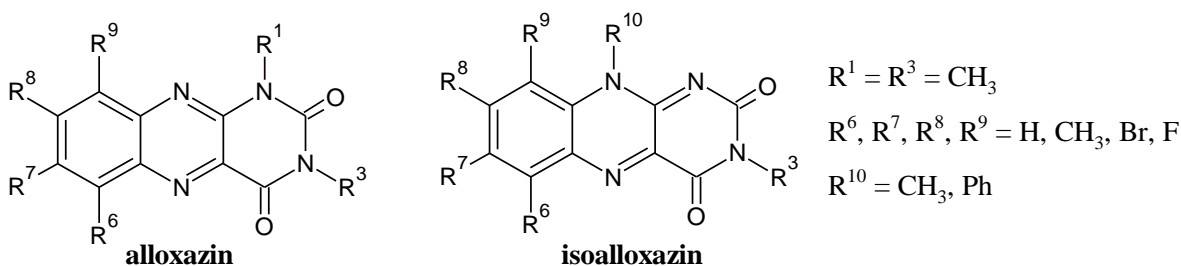
Obsah

SOUHRN	IV
SUMMARY	V
1 ÚVOD	1
2 CÍL PRÁCE	3
3 TEORETICKÁ ČÁST	4
3.1 Historie a vlastnosti flavinů.....	4
3.2 Využití flavinů v organické syntéze.....	6
3.3 Axiálně chirální flaviny – možnost substituce fenylu v <i>ortho</i> poloze.....	11
3.3.1 Rozbor syntézy 3- <i>ortho</i> -tolylflavinu.....	13
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	16
4.1 Materiálové a přístrojové vybavení.....	16
4.1.1 Přístrojové vybavení.....	16
4.1.2 Chemikálie.....	16
4.2 Příprava <i>N</i> -methylanilino-3-(2-methylfenyl)uracilu 43.....	16
4.3 Příprava 3-(2-methylfenyl)alloxazin- <i>N</i> -oxidu 44.....	17
4.4 Příprava 3-(2-methylfenyl)isoalloxazinu 3.....	18
5 VÝSLEDKY A DISKUSE	19
5.1 Syntéza 3- <i>ortho</i> -tolylflavinu 3 a 3- <i>ortho</i> -tolylflavin- <i>N</i> -oxidu 41.....	19
5.2 Oxidace methylové skupiny na aromatickém jádře.....	20
5.2.1 Oxidace manganistanem draselným.....	21

5.2.2	Oxidace jodistanem sodným.....	23
5.2.3	Oxidace dichromanem sodným	24
5.2.4	Oxidace oxidem chromovým	25
5.3	Shrnutí výsledků	26
6	ZÁVĚR	27
7	LITERATURA	28
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	31

1 ÚVOD

Flaviny patří do skupiny biologicky aktivních látek, působících jako univerzální oxidační nebo redukční činidla v mnoha typech enzymů. Nejčastěji se jedná o oxidasy, disulfidové oxidoreduktasy, dehydrogenasy a elektron-transferasy. Jejich společnou strukturou je alloxaziniové nebo isoalloxaziniové seskupení. (Obr. 1) Systém konjugovaných dvojných vazeb umožňuje těmto látkám absorbovat světlo v oblasti viditelného spektra s vlnovou délkou cca 450 nm, díky čemuž mají flaviny intenzivní žluté zbarvení.^{1-3,7}



Obrázek 1. *Struktury flavinů a jejich možná substituce.*

Práce z posledních let, zabývající se touto tematikou ukazují, že flaviny jsou perspektivními katalyzátory oxidačních a redukčních reakcí nejen v přírodních ale i v umělých systémech. Jedním z hlavních předmětů studia je pak katalytická oxidace aminů na *N*-oxidy, Bayerova-Villigerova oxidace či oxidace sulfidů na sulfoxidy. Např. asymetrické sulfoxidy Omeprazol nebo Lansoprazol patřící do skupiny léčiv označovaných jako inhibitory protonové pumpy se používají jako léčiva hyperacidosy a jsou praktickým příkladem sulfoxidů, které lze získat z původních asymetrických sulfidů katalytickou enantioselektivní oxidací. Flaviniové soli typu **1** lze využít jako organokatalyzátory v reakcích, ve kterých je použit peroxid vodíku nebo kyslík jako oxidační činidlo. V organické syntéze se pak stávají šetrnější alternativou k životnímu prostředí.³ Podstatou katalytického působení flaviniových solí je vznik flavin-4a-hydroperoxidu **2**, který je silnějším oxidačním činidlem než samotný peroxid vodíku nebo kyslík. (Schéma 1)^{5,6} Různě derivatizované flaviniové systémy se tak stávají zajímavým terčem zájmu mnoha vědeckých pracovišť.

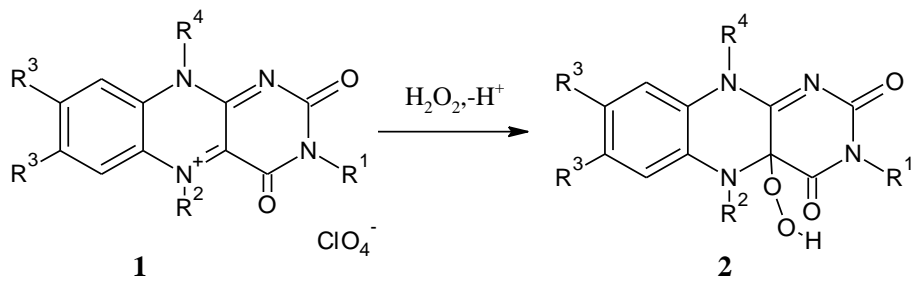


Schéma 1. *Flavin-4a-hydroperoxid – oxidační činidlo.*

2 CÍL PRÁCE

Ve své diplomové práci jsem se zabýval přípravou atropoizomerního 3-*ortho*-tolylflavinu **3**, který byl dále oxidován na odpovídající flavinovou karboxylovou kyselinu **4**. Reakcí s chirálním alkoholem nebo aminem by pak tato flavinová kyselina mohla poskytnout diastereomerní flavin-ester **5** nebo flavin-amid **6**. Jednotlivé oddělené diastereomery flavin-esteru **5** nebo flavin-amidu **6** by pak mohly být testovány jako potenciální katalyzátory redoxních reakcí. (Schéma 2)

Samotná methylová skupina v poloze *ortho* není totiž tak objemná, aby zabránila volné rotaci kolem jednoduché vazby uhlík – dusík v poloze 3 flavinového skeletu a tudíž je obtížné jednotlivé enantiomery původního 3-*ortho*-tolylflavinu **3** separovat.²⁷ Objemnější esterová nebo amidová skupina by tak mohla spíše bránit ve volné rotaci kolem této vazby a navíc by bylo možné vznikající diastereomery oddělit sloupcovou chromatografií.⁷ (Schéma 2)

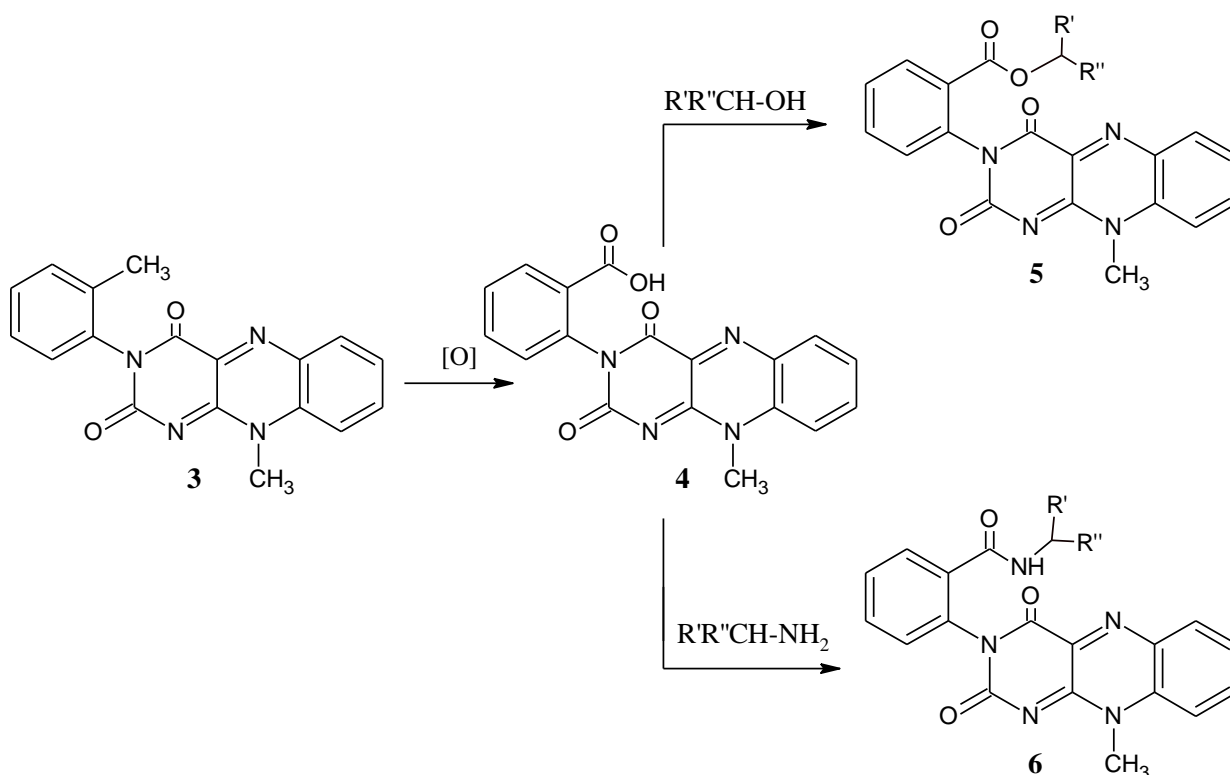
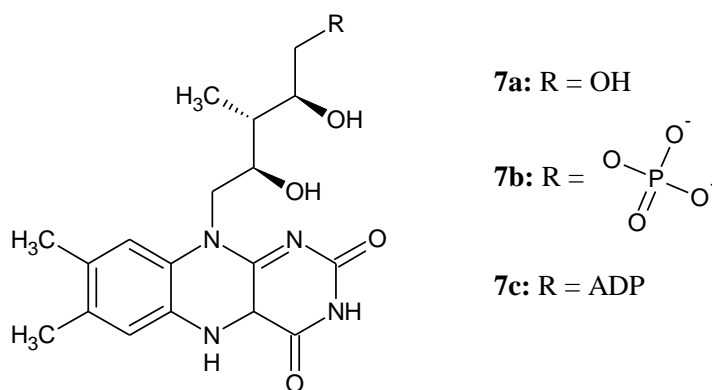


Schéma 2. Cíl práce – syntéza flavinové karboxylové kyseliny a její další potenciální derivatizace.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Historie a vlastnosti flavinů

Flaviny se významně podílejí na mnoha oxidačních a redukčních procesech v živých organismech, zejména pak jako kofaktory v řadě enzymů. ⁸ Tyto látky se účastní mnoha biochemických reakcí jako koenzymy či fotoreceptory. V přírodě se nejčastěji vyskytuje riboflavin, který poprvé izoloval anglický chemik Wynter Blyth roku 1879 z kravského mléka. ⁹ Volné flaviny se však v organismu nevyskytují. Většinou jsou vedle riboflavinu **7a** fosforylovány nebo jinak substituovány např. do podoby FMN **7b** (*flavinmononukleotid*) nebo FAD **7c** (*flavinadenindinukleotid*). (Obr. 2)*

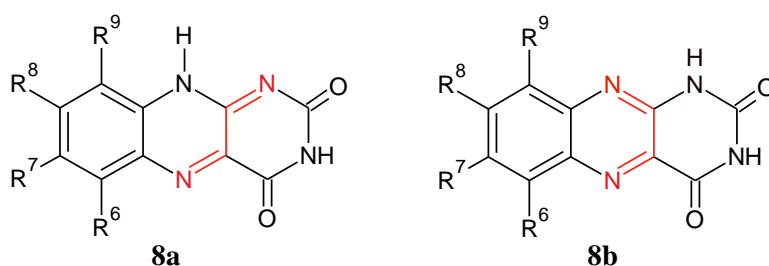


Obrázek 2. *Důležité biologické deriváty flavinů.*

Oxidačně-redukční a fotochemické vlastnosti přírodních flavinů inspirovaly mnoho chemiků a v roce 1935 Krebs ¹⁰ a Warburg ¹¹ dokázali, že riboflavin má zásadní úlohu jako prekurzor ve stavbě FAD. Kromě toho hrají flaviny, díky svým fotofyzikálním vlastnostem, důležitou roli ve fotoreceptorech a v enzymech, které potřebují pro svou činnost světlo. Snadný přechod flavinů do excitovaného stavu a následné vyzáření světla při návratu na základní hladinu je podstatou bioluminiscence. ^{3, 13} To vedlo mimo jiné k tomu, že jsou flaviny v dnešní době používány jako fluorescenční značky v bakteriích, rostlinách, houbách a řasách. ¹² Od tohoto roku byly objeveny již stovky flavoproteinových enzymů. ⁸

* Názvy *flavinmononukleotid* a *flavinadenindinukleotid* neodpovídají chemické struktuře těchto látek. Vzhledem k historii se tyto názvy běžně používají.

Další důležitou vlastností flavinů je jejich schopnost katalyzovat dvouelektronové reakce nebo radikálové jednoelektronové reakce.¹⁴ Proto jsou flaviny součástí dehydrogenas a oxidas. Tuto vlastnost mají flaviny typu **8a** a **8b** díky přítomnému azedienovému seskupení. (Obr. 3) Takový radikálový mechanismus popisuje (Schéma 3). Flavin **9** snadno přijímá dva elektrony za vzniku redukované formy 1,5-dihydroflavinu **10**, který je takřka bezbarvý a lze ho snadno oxidovat zpět na výchozí flavin **9**.¹³ Přijetím pouze jednoho elektronu však flavin přechází na stabilní radikál označovaný jako semichinon **11**. Ten se pak v závislosti na okolním pH vyskytuje ve dvou barevně odlišných formách. Neutrální forma **11** (Schéma 3) je modrá. Po ztrátě protonu v alkalickém prostředí pak mění barvu na červenou.



Obrázek 3. Azedienová seskupení v molekulách flavinů.

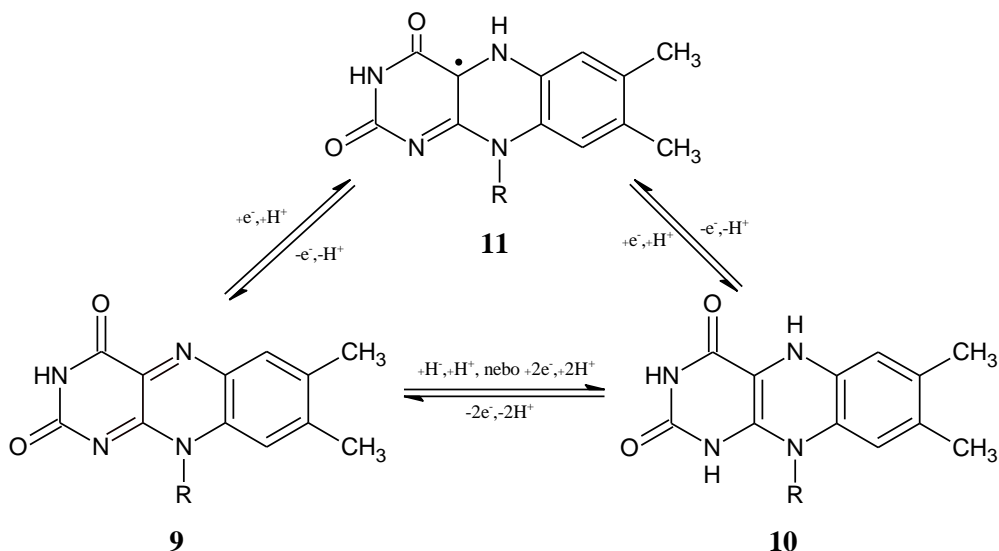


Schéma 3. Jedno a dvouelektronová redukce isoalloxazinu.

Flaviny se účastní i mnoha elektrofilních a nukleofilních reakcí za vzniku kovalentních vazeb. Nejreaktivnějším místem je pak poloha 4a isoalloxazinového nebo alloxazinového skeletu. Nejlepším příkladem je reakce redukované formy flavinu **12** s kyslíkem za vzniku flavin-4a-hydroperoxidu **13**, který je používán jako univerzální oxidační činidlo ve flavinových monooxygenázách.¹⁵ (Schéma 4)

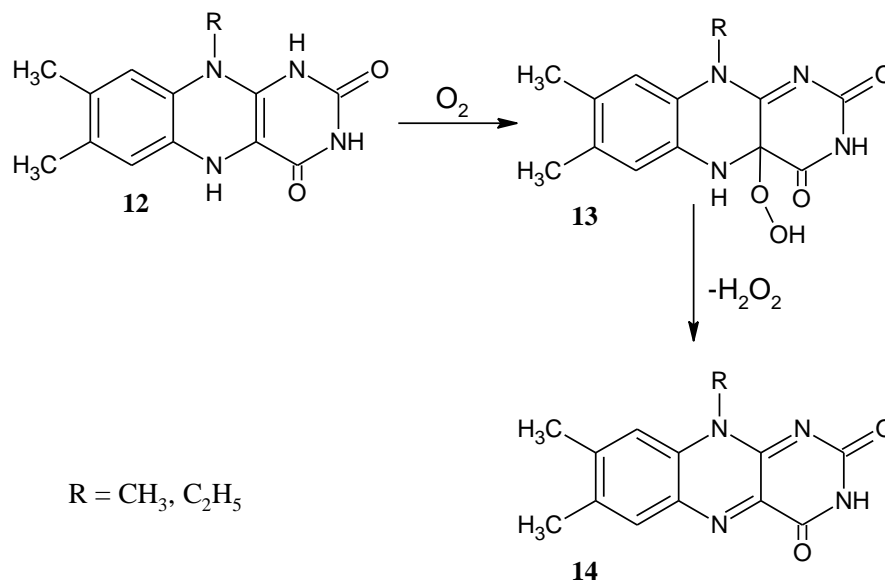


Schéma 4. *Reakce dihydroflavinu s kyslíkem.*

3.2 Využití flavinů v organické syntéze

V organické syntéze se hojně využívají právě výše uvedené vlastnosti flavinů redukovat a oxidovat vhodné substráty. V umělých systémech se zatím nepodařilo provést oxidaci substrátu pomocí nesubstituovaného flavin-4a-hydroperoxidu, což způsobuje nejspíše jeho nízká stabilita. Proto se používá již zmíněný stabilnější 5-alkyl-flavin-4a-hydroperoxid **13** (Schéma 4). Flavínové systémy se ukázaly již v minulém století jako účinné katalyzátory enantioselektivních *S*- a *N*-oxidací. Obecné katalytické působení je znázorněno níže. (Schéma 5) Flavíniová sůl **15** aduje molekulu peroxidu vodíku za vzniku flavin-4a-hydroperoxidu **16**, který oxiduje substrát a přechází při tomto procesu na redukovaný flavin-4a-hydroxid **17**. Jeho reakcí s vodou v kyselém prostředí se obnovuje oxidovaná forma flavíniové soli **15**.^{19, 20}

Obdobným mechanismem poskytuje alloxaziniová sůl **18** při reakci s peroxidem vodíku flavin-4a-hydroperoxid alloxazinového typu **19**. (Schéma 6)

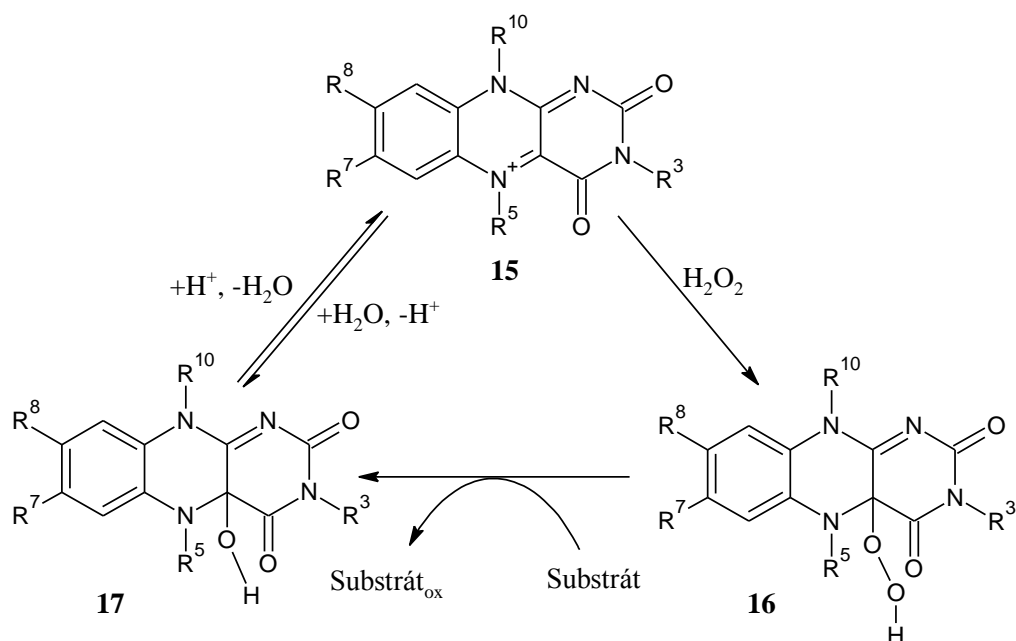


Schéma 5. Zjednodušený katalytický cyklus isoalloxaziniových solí.

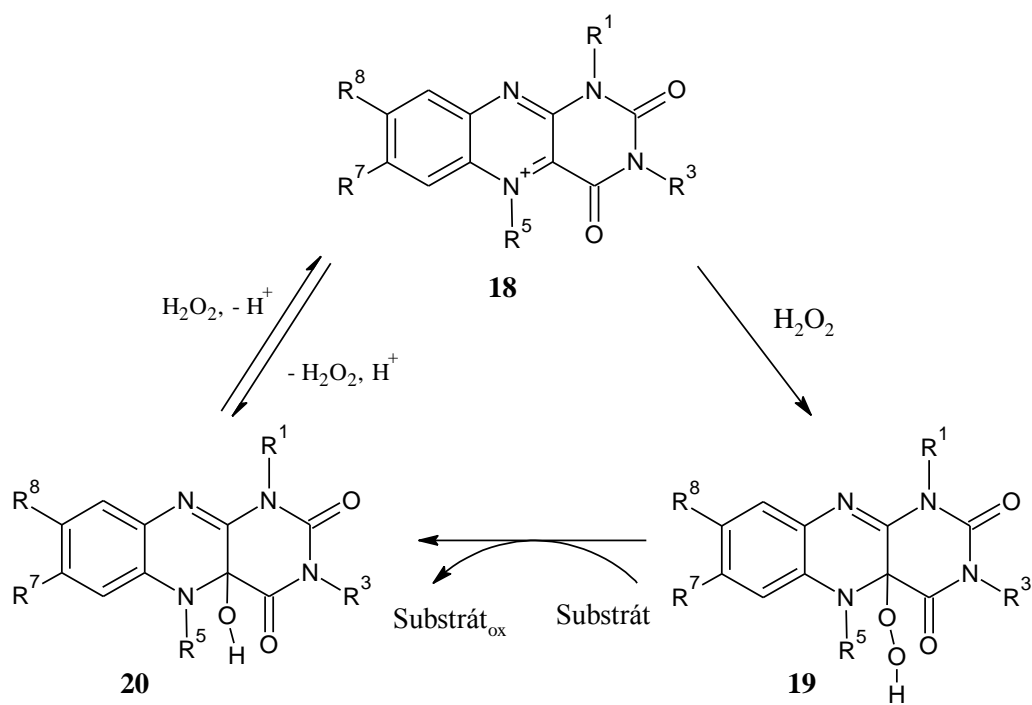


Schéma 6. Zjednodušený katalytický cyklus alloxaziniových solí.

Alkylovaný flavin-4a-hydroperoxid **16** nebo **18** je generován *in situ* ze stechiometrického množství isoalloxaziniové nebo alloxaziniové soli a je schopný oxidovat sulfidy na sulfoxidy, terciární aminy na příslušné *N*-oxidy¹⁶ a cyklické ketony na laktony při Baeyerově-Villigerově oxidaci.¹⁷

Yasushi Imada s kolektivem se konkrétně zabývali organokatalytickou oxidací boronových kyselin molekulárním kyslíkem v prostředí zinku jako redukčního činidla. Pomocí této metody pro organokatalytické aerobní oxidace organických sloučenin dochází totiž k simulaci enzymatické funkce FAD.¹⁸ Z výše uvedeného vyplývá, že právě flavin-4a-hydroperoxid **13**, resp. **16** je vysoce reaktivní oxidační činidlo.

Vhodně derivatizované flaviniové soli se uplatňují jako katalyzátory enantioselektivních oxidačních reakcí. Příkladem těchto reakcí je i Baeyerova – Villigerova oxidace cyklobutanonů na laktony s 61 – 74 % *ee*.²¹ (Schéma 7) Dále je to oxidace asymetrických sulfidů na sulfoxidy. Jako modelové substráty se pro tyto oxidace používají asymetrické aryl(methyl)sulfidy nejčastěji pak thioanisol. **21**^{21, 22} (Schéma 8) Pro přípravu opticky čistých sulfoxidů či laktonů je třeba použít chirální flaviniové soli, které mohou svou strukturou ovlivnit jak přístup oxidačního činidla (kyslíku nebo peroxidu vodíku), tak přístup substrátu. Pro tyto sulfoxidace byla například použita přemostěná chirální flaviniová sůl²² **22**, dále stericky bráněná flaviniová sůl s „pokličkou“²³ **23** a cyklodextrinový konjugát^{24, 25} **24**.

Ze struktury planárně chirální flavinové soli **23** (Schéma 8), kterou navrhli Cibulka a Jurok je zřejmé, že flaviniové seskupení je z jedné strany blokováno aromatickou „pokličkou“, což zajišťuje přístup substrátu pouze z nebráněné strany.²³

Zatím nejúčinnější enantioselektivní organokatalyzátory využívané pro oxidace sulfidů jsou cyklodextriny **24**. Ty vytvářejí inkluzivní komplexy s alifatickými i aromatickými sulfidy čímž je dosaženo až 91 % *ee*.^{24, 25}

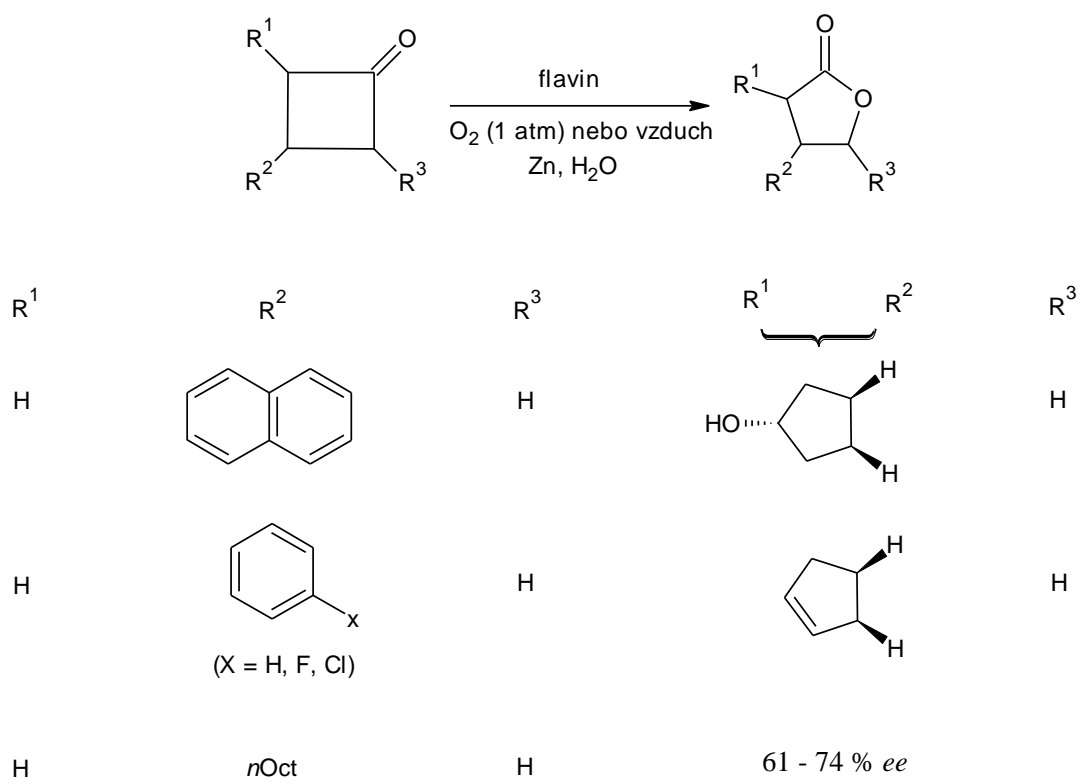


Schéma 7. Baeyerova–Villigerova oxidace cyklobutanonů.

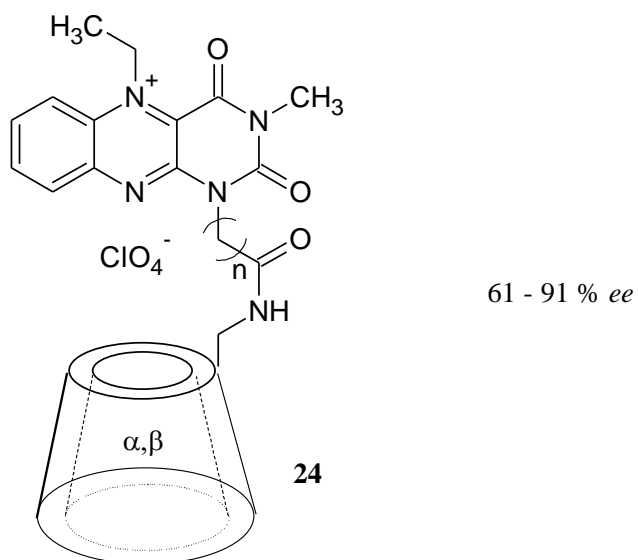
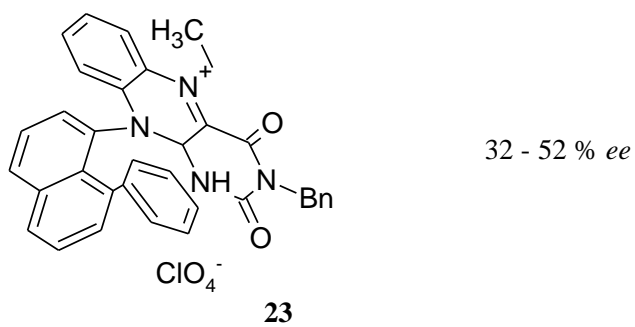
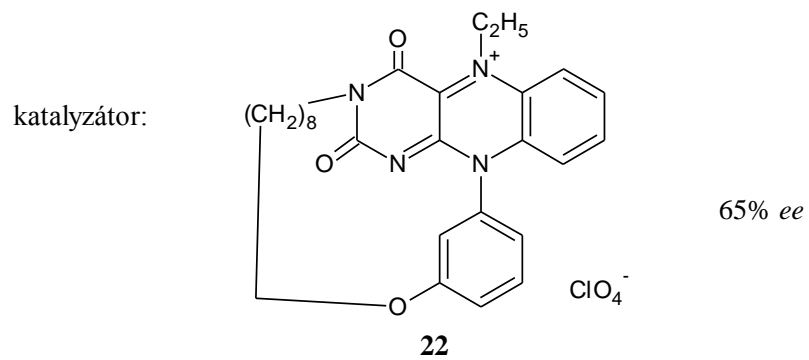
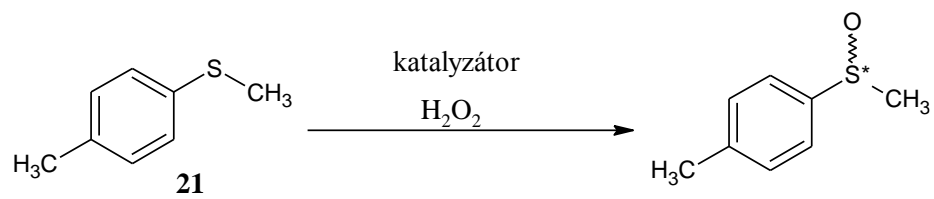
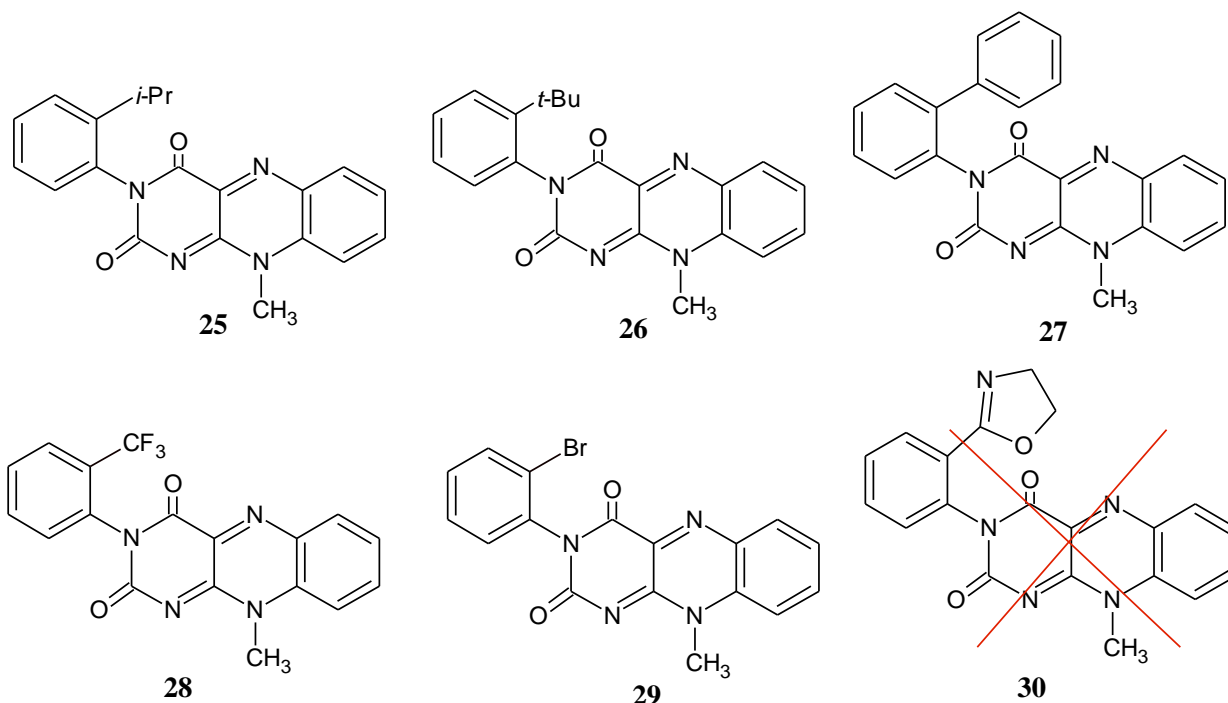


Schéma 8. *Enantioselektivní sulfoxidace.*

3.3 Axiálně chirální flaviny – možnost substituce fenylu v *ortho* poloze

Byla navržena řada molekul axiálně chirálních 3-arylflavinů, které nesou v poloze *ortho* na fenylovém zbytku objemnější alkylovou nebo arylovou skupinu. Tato poměrně objemná skupina by měla na rozdíl od skupiny methylové zabránit volné rotaci kolem vazby uhlík - dusík v poloze 3 flavinového skeletu. Na pracovišti Organické chemie VŠCHT v Praze byly připraveny flavinové deriváty se zavedenou *iso*-propylovou **25**, *terc*-butylovou **26**, fenylovou **27** či trifluormethylovou skupinou **28** v *ortho* poloze na fenylovém zbytku. Také byl připraven obdobný brom derivát **29** a rovněž byl proveden pokus o zavedení oxazolinového seskupení do molekuly 3-arylflavinu, derivát **30**. Zavádění oxazolinového seskupení však nebylo úspěšné.³⁵ (Obr. 4)



Obrázek 4. Struktury axiálně chirálních flavinů.

Vzhledem k tomu, že problematika volné otáčivosti u těchto derivátů a s tím spojená separace enantiomerů derivátů **25**, **26** a **27** se v současné době na pracovišti Ústavu organické chemie zpracovává, byly mými kolegy také syntetizovány flavin-estery **31a – 31c** a **32a – 32c**. Tyto estery **31a – 31c** a **32a – 32c** byly převedeny sledem reakcí na chirální flavin-amidy **33a – 33c** a **34a – 34c**, které se podařilo separovat sloupcovou chromatografií.⁷ (Schéma 9) Stejně tak byla úspěšná separace diastereomerů isomerního isoalloxazinu typu **35**, kde se jedná o substituci flavinového skeletu v poloze 10.³⁶ (Obr. 5)

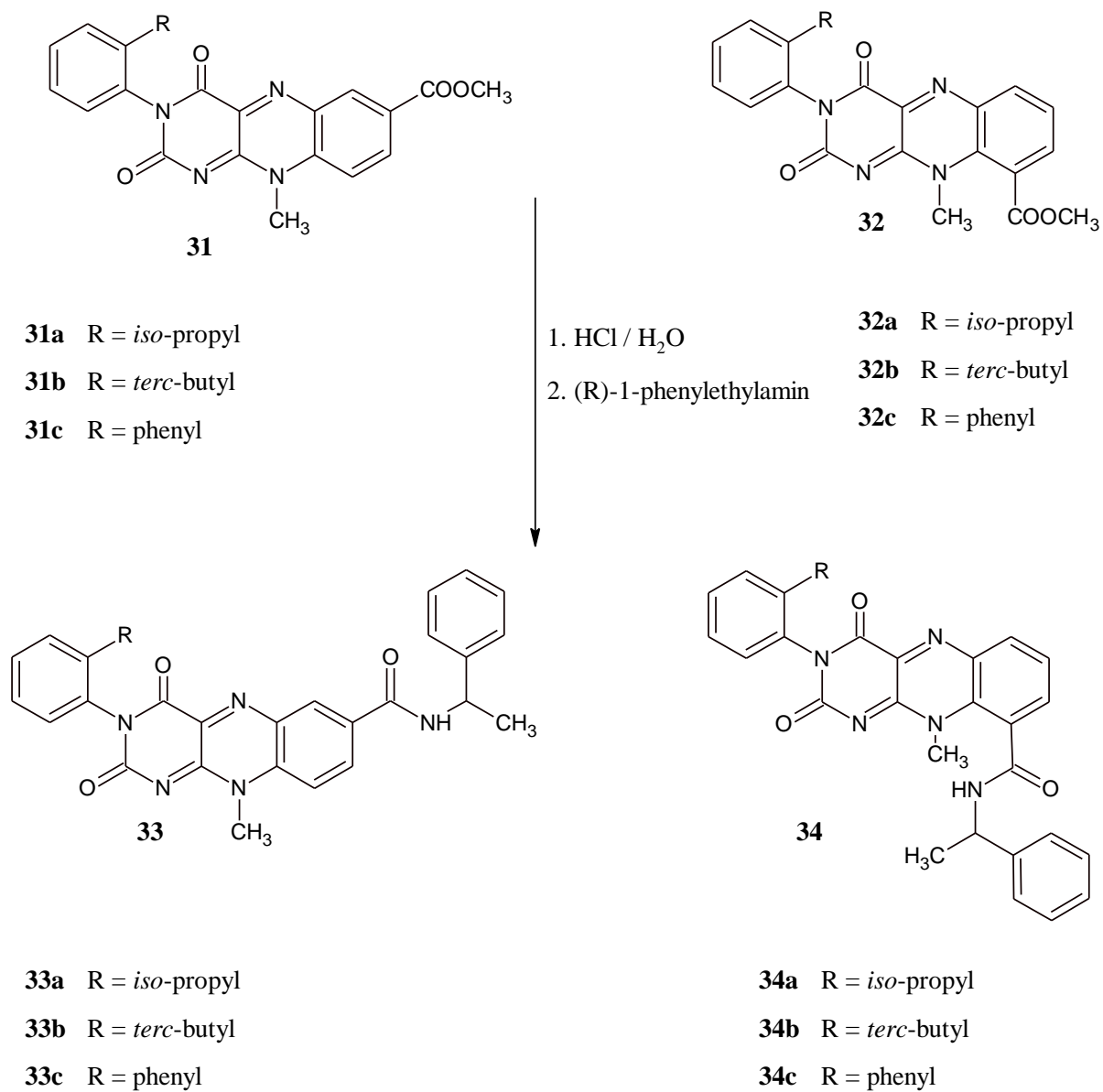
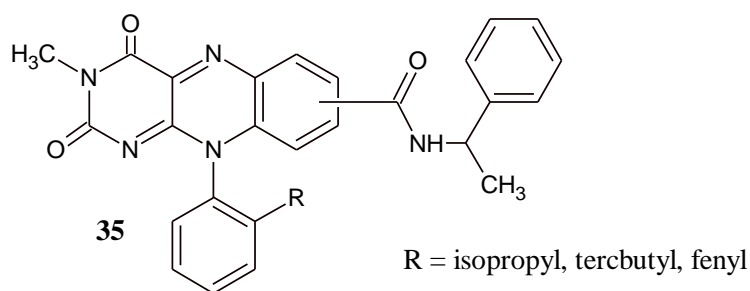


Schéma 9. Přehled získaných flavinových derivátů.



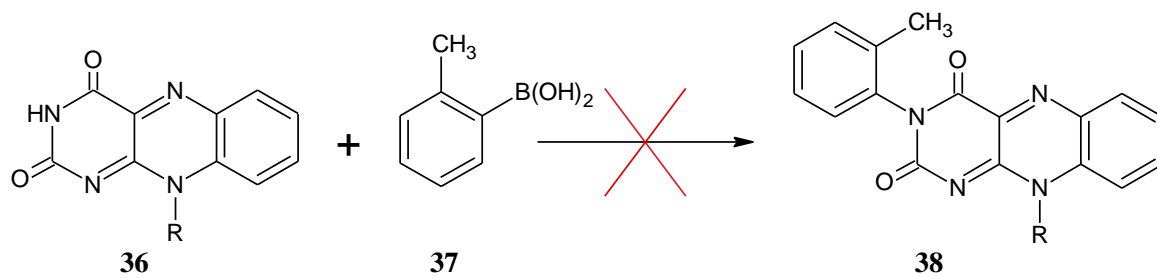
Obrázek 5. *Izomerní isoalloxazinový derivát – substituce v poloze 10.*

Ovšem již dříve byly provedeny pokusy o separaci atropoizomerních flavinů **28** a **29** metodou preparativní HPLC, bohužel neúspěšně. Izomery se podařilo separovat pouze v analytickém měřítku, v preparativním nikoliv.²⁷ Proto se nabízela možnost nasyntetizovat 3-*ortho*-tolylflavin a 3-*ortho*-tolylflavin-*N*-oxid a pokusit se o oxidaci přítomné methylové skupiny. Vlastnosti potenciálně získaných kyselin, esterů či amidů by pak mohly být podobné látkám typu **31**, **32**, **33** a **34** a cílená derivatizace by tak přispěla k snadnější separaci diastereomerů či enantiomerů.

3.3.1 Rozbor syntézy 3-*ortho*-tolylflavinu

3-*ortho*-tolylflavin a 3-*ortho*-tolylflavin-*N*-oxid jsou cílové molekuly pro testování oxidací methylové skupiny na skupinu karboxylovou. Obecně lze k flavinům substituovaným v poloze 3 synteticky dojít buď přímou arylací flavinového skeletu²⁷ (Schéma 10), nebo postupnou syntézou z 2-methylanilinu. (Schéma 11) Přímá arylace boronovými kyselinami se jevila v případě *ortho*-substituovaných aromatických kyselin jako neúspěšná a to především v případě *ortho*-substituovaných boronových kyselin.²⁷ Proto byla pro přípravu zvolena postupná syntéza vycházející z 2-methylanilinu **39**.^{26, 28}

2-methylanilin **39** je v prvním syntetickém kroku převeden na *ortho*-tolylmočovinu **40**, která reakcí s diethylmalonátem poskytuje příslušnou barbiturovou kyselinu **41**. Tato kyselina dále reaguje s trichloridem kyseliny fosforečné za vzniku chloruracilu **42**, který podléhá substituci *N*-methylanilinem a poskytuje příslušný aminouracil **43**. Aminouracil **43** v kyselém prostředí reaguje s dusitanem sodným a vznikající 3-*ortho*-tolylflavin-*N*-oxid **44** podléhá redukci dithioničtanem sodným na 3-*ortho*-tolylflavin **3**.²⁶ Předpokládá se, že 3-*ortho*-tolylflavin-*N*-oxid **44** a 3-*ortho*-tolylflavin **3** budou dále oxidovány na příslušné flavinové kyseliny **45** a **4**.



R = C₄H₉, CH₃, tetraacetylribityl

Reakční podmínky: CuSO₄ · 5H₂O, TMEDA, CH₃OH / H₂O

Schéma 10. *Přímá syntéza flavinů substituovaných v poloze 3.*²⁷

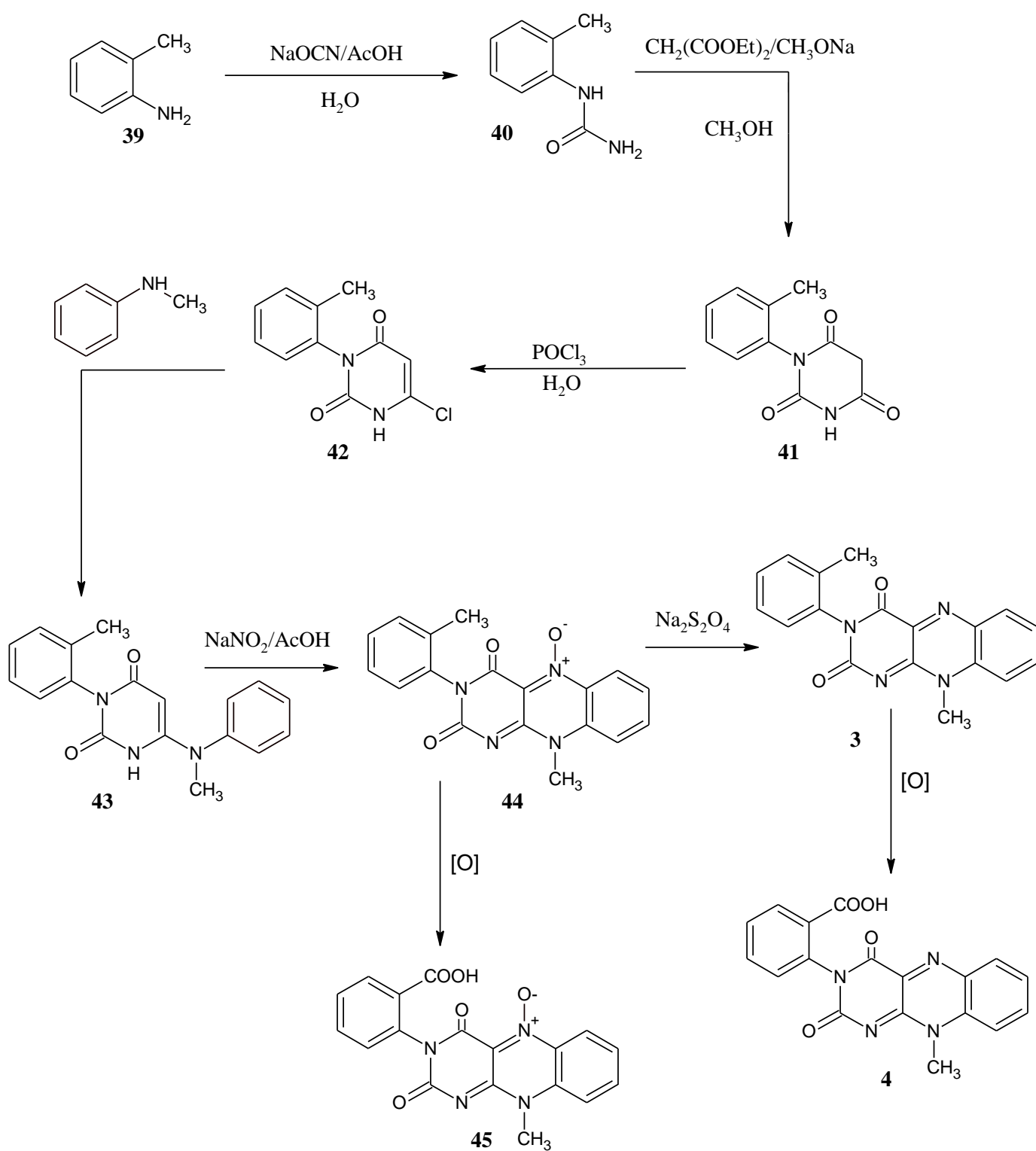


Schéma 11. Postupná syntéza cílových molekul.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiálové a přístrojové vybavení

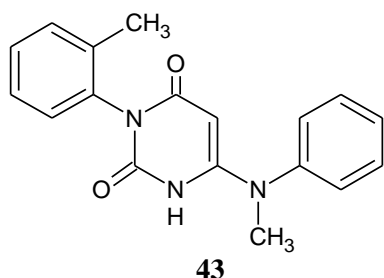
4.1.1 Přístrojové vybavení

NMR spektra byla měřena na spektrometru Varian Merkury Plus 300 (pracovní frekvence 299,97 MHz pro ^1H), Jako vnitřní standard byl použit tetramethylsilan. Chemické posuny δ jsou uvedeny v jednotkách ppm a interakční konstanty J v Hz. Elementární analýza (C, H, N) byla provedena na přístroji Perkin-Elmer 240 a Elementar vario EL III. Hmotnostní spektra (MS) byla měřena, na přístroji Thermo Scientific LXQ (elektrosprej). Teploty tání byly stanoveny na přístroji Boetius.

4.1.2 Chemikálie

Použité chemikálie byly v kvalitě „čistý“ pořízeny ze skladů VŠCHT (2-methylanilin, trichlorid kyseliny fosforečné, kovový sodík, methanol, ethylacetát, ethanol, diethylether, dichlormethan), nebo zakoupeny od firmem Sigma-Aldrich (kyanatan sodný), Fluka (diethylmalonát, *N*-methylamin), Lachema Brno (hydrogenuhličitan sodný, dusitan sodný, thiosířičitan sodný, dichroman sodný), Penta (kyselina octová), Merck (methylamin, *N*-methylanilin), Lach-Ner (kyselina chlorovodíková, hydroxid sodný), Eurorad (deuterovaná rozpouštědla: CDCl_3 , $\text{DMSO-}d_6$, $\text{CH}_3\text{OH-}d_4$). TLC analýzy byly nanášeny na desky DC Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck). Separace při sloupcové chromatografii byla prováděna na silica gelu Kieselgel 60, zrnitost 0.040-0.063 mm (Merck). Rozpouštědla byla sušena a čištěna obvyklými postupy.²⁹

4.2 Příprava *N*-methylanilino-3-(2-methylfenyl)uracilu 43



Do tříhrdlé baňky osazené zpětným chladičem bylo předloženo 5,7 g (25,6 mmol) 6-chloro-3-(2-methylfenyl)uracilu **42**. Do prvního hrdla byl přes septum přiveden plynný dusík.

Druhým hrdlem bylo přidáno 16 ml (150 mmol) *N*-methylanilinu. Směs byla zahřívána a míchána na olejové lázni při teplotě 190°C po dobu 45 min. Po zchladnutí byl ke směsi přidán diethylether. Z fialového roztoku se vyloučily bílé krystaly, které byly odfiltrovány a rekrystalovány z ethanolu. Celkem bylo izolováno 3,6 g (45 %) jemných bílých krystalů *N*-methylanilino-3-(2-methylfenyl)uracilu **43** o bodu tání 195 – 196°C.

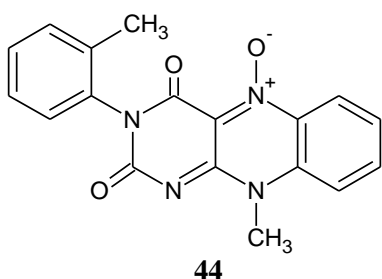
$^1\text{H NMR}$ (300 MHz CDCl_3) δ = 1.95 (s, 3H, Ph- CH_3), 3.07 (s, 3H, N- CH_3), 5.51 (s, 1H), 6.57 (m, 3H), 6.57 (t, J = 7.62 Hz, 1H), 7.01 (m, 5H), 8.92 (brs, 1H N-H) ppm.

MS pro $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_2$ (307.132) $[\text{M} (21) + \text{H}^+]$ bylo vypočteno 307.35; nalezeno 307.24.

$[\text{M} (21) + \text{Na}^+]$ bylo vypočteno 330.34; nalezeno 330.19.

EA: pro $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_2$: (307.132) bylo vypočteno/nalezeno: C 70.34/70.67 %, H 5.58/5.83 %, N 13.67/13.55 %.

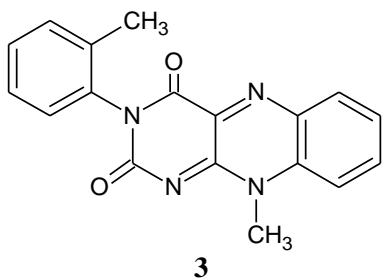
4.3 Příprava 3-(2-methylfenyl)alloxazin-*N*-oxidu **44**



Do baňky bylo předloženo 1,5 g (4,8 mmol) *N*-methylanilino-3-(2-methylfenyl)uracilu **43** a 1,08 g (15 mmol) dusitanu sodného. Ke směsi ponořené do ledové lázně bylo následně přilito 30 ml koncentrované kyseliny octové. Baňka byla osazena zpětným chladičem a směs pak míchána po dobu 5 min. Následně byla směs míchána 40 hodin za laboratorní teploty. Po skončení reakce byl obsah baňky několikrát odpařen s toluenem, dokud byla čichově detekovatelná kyselina octová. Po přidání diethyletheru se vyloučily oranžové krystaly, které byly odsáty na fritě. Bylo získáno 330 mg látky, která byla použita do další reakce bez čištění.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6): δ = 2.02 (s, 3H, Ph- CH_3), 3.98 (s, 3H, N- CH_3), 7.09 (d, J = 6.45 Hz, 1H_{Ar}), 7.30 (m, 3H_{Ar}), 7.62 (t, J = 7.62 Hz, 1H_{Ar}), 8.02 (m, 2H_{Ar}), 8.35 (d, J = 8.49 Hz, 1H_{Ar}) ppm.

4.4 Příprava 3-(2-methylfenyl)isoalloxazinu **3**



Do baňky bylo předloženo 330 mg 3-(2-methylfenyl)alloxazinu-*N*-oxidu **44**, které bylo následně rozpuštěno ve směsi ethanol – voda (3:1) celkem 60 ml. Ke směsi bylo přisypáno 350 mg (2 mmol) thiosířičitanu sodného. Směs byla míchána za laboratorní teploty 24 hodin. Organická vrstva byla oddělena a vodná vrstva byla extrahována dichlormethanem, dokud se organická vrstva zbarvovala žlutě (průměrně 5x 5 ml). Spojené organické extrakty byly vysušeny síranem hořečnatým. Sušidlo bylo odfiltrováno a dichlormethan odpařen na vakuové rotační odparce. Získaný 3-(2-methylfenyl)isoalloxazin **3** byl přečištěn sloupcovou chromatografií, (silikagel zrnitost 0.040-0.063 mm, mobilní fáze ethylacetát/dichlormethan 1:1). Bylo získáno 120 mg (37%) oranžových krystalů o bodu tání 287 – 289°C.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 2.06 (s, 3H, Ph- CH_3), 4.05 (s, 3H, N- CH_3), 7.16 (m, 1H_{Ar}), 7.30 (m, 3H_{Ar}), 7.69 (m, 1H_{Ar}), 8.00 (m, 2H_{Ar}), 8.1 (d, J = 7.9 Hz, 1H_{Ar}) ppm.

MS pro $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2$ (318.11) [M (23) + H^+] bylo vypočteno 319.12; nalezeno 319.20. [M (23) + Na^+] bylo vypočteno 341.10; nalezeno 341.10.

EA: pro $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2$: (318.11) bylo vypočteno/nalezeno: C 67.91/67.81 %, H 4.43/4.75 %, N 17.6/16.8 %.

5 VÝSLEDKY A DISKUSE

5.1 Syntéza 3-ortho-tolyflavinu 3 a 3-ortho-tolyflavin-N-oxidu 41

Výchozí látkou pro přípravu 3-ortho-tolyflavin-N-oxidu **44** a 3-ortho-tolyflavinu **3** byl chloruracil **42**, který byl připraven již během řešení mé bakalářské práce. Chloruracil **42** byl substituován *N*-metylanilinem a získaný substituovaný aminouracil **43** byl uzavřen na 3-ortho-tolyflavin-N-oxid **44** účinkem dusitanu sodného v kyselině octové. 3-ortho-tolyflavin-N-oxid **44** byl poté redukován dithioničitanem sodným za vzniku 3-ortho-tolyflavinu **3**. (Schéma 12) Všechny reakce proběhly v uspokojivém výtěžku. Struktury substituovaného aminouracilu **43**, 3-ortho-tolyflavin-N-oxidu **44** a 3-ortho-tolyflavinu **3** byly potvrzeny ¹H NMR spektry. Struktury substituovaného aminouracilu **43** a 3-ortho-tolyflavinu **3** byly navíc potvrzeny hmotnostní spektrometrií a elementární analýzou. Celkový výtěžek této třístupňové syntézy byl 65 %.

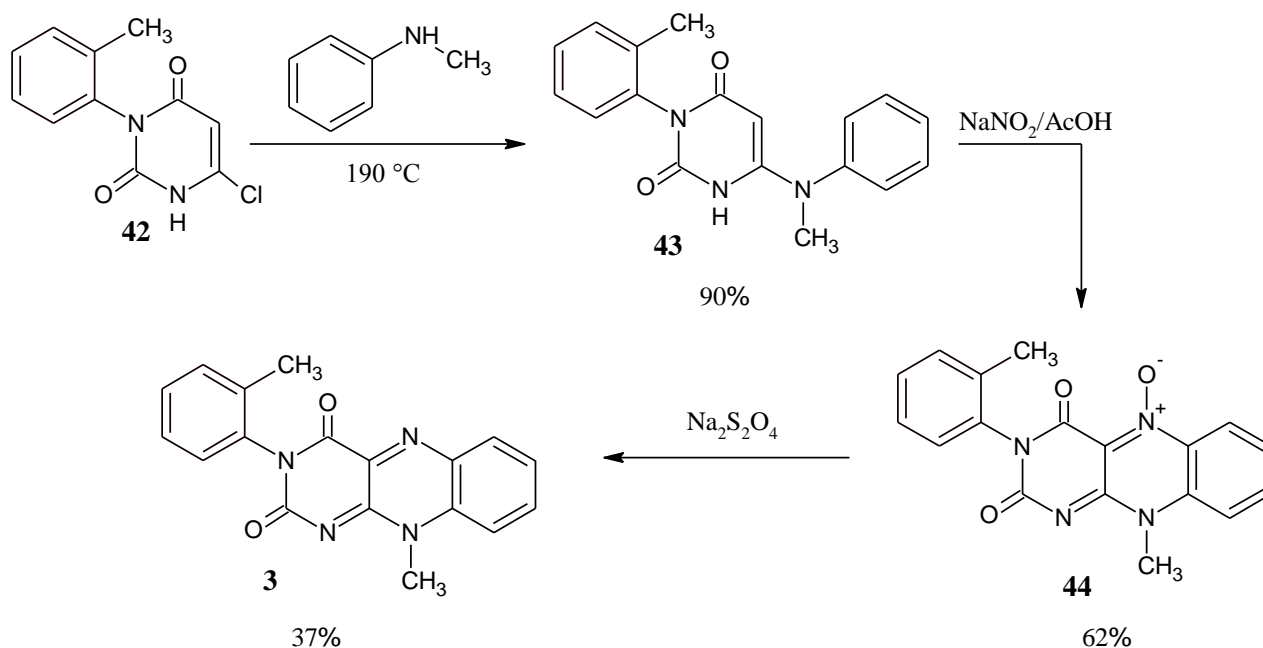


Schéma 12. Navržená syntéza 3-ortho-tolyflavinu.

5.2 Oxidace methylové skupiny na aromatickém jádře

Možnost oxidace methylové skupiny byla studována jak na 3-*ortho*-tolylflavin-*N*-oxidu **44**, tak na 3-*ortho*-tolylflavinu **3**. Podmínky oxidací byly zvoleny podle podobných reakcí nalezených v literatuře³²⁻³⁴, pouze v jednom případě³⁰ se však jednalo o oxidaci methylové skupiny umístěné přímo na flavinovém skeletu. Jednotlivé analogické postupy jsou podrobně uvedeny v následujících podkapitolách a pro přehlednost shrnuty do krátké tabulky. (Tab. 1)

Substrát	Ox. Činidlo	Výtěžek (%)	Podmínky: čas/teplota/ koncentrace H ₂ SO ₄ !!! = rozpad flavinového skeletu
44	KMnO ₄	0	48 h / 25 °C / 20 % !!!
44	KMnO ₄	0	48 h / 25 °C / 2 %
3	KMnO ₄	0	48 h / 25 °C / 20 % !!!
3	KMnO ₄	0	24 h / 25 °C / 2 %
44	NaIO ₄	0	24 h / 95 °C / 2 %
44	NaIO ₄	0	18 h / 25 °C / 2 %
3	NaIO ₄	0	24 h / 95 °C / 2 %
3	NaIO ₄	0	18 h / 25 °C / 2 %
44	Na ₂ Cr ₂ O ₇	0	36 h / 25 °C / 2 %
3	Na ₂ Cr ₂ O ₇	0	72 h / 25 °C / 2 %
44	CrO ₃	0	40 min / 60 °C !!!
3	CrO ₃	0	40 min / 60 °C !!!

44: 3-*ortho*-tolylflavin-*N*-oxid

3: 3-*ortho*-tolylflavin

Tab. 1. Přehled provedených reakcí.

5.2.1 Oxidace manganistanem draselným

Oxidace 3-*ortho*-tolylflavin-*N*-oxidu **44** a 3-*ortho*-tolylflavinu **3** byla provedena manganistanem draselným v přítomnosti vodného roztoku kyseliny sírové za laboratorní teploty podle obdobného postupu nalezeného v literatuře.³² (Schéma 13)

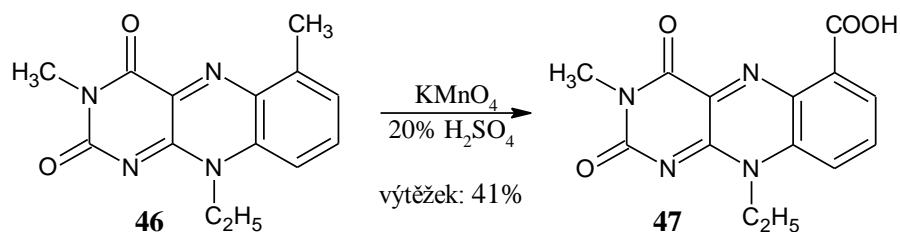


Schéma 13. Oxidace methylové skupiny na aromatickém jádře.³²

Oproti předpisu v literatuře, kde bylo za daných podmínek získáno 41 % očekávané kyseliny **47**, nebyla oxidace methylové skupiny na aromatickém jádře ani v případě oxidace 3-*ortho*-tolylflavin-*N*-oxidu **44** ani v případě 3-*ortho*-tolylflavinu **3** úspěšná. (Schéma 14) Navíc při použití 20 % kyseliny sírové, jak uvádí původní předpis³², docházelo k rozpadu flavinového systému. Proto byla pro další experimenty použita kyselina sírová pouze 2 %. K destrukci flavinu následně nedocházelo, nedošlo ovšem ani k oxidaci methylové skupiny. V obou případech se ale podařilo izolovat výchozí látky v původním množství vstupujícím do reakce.

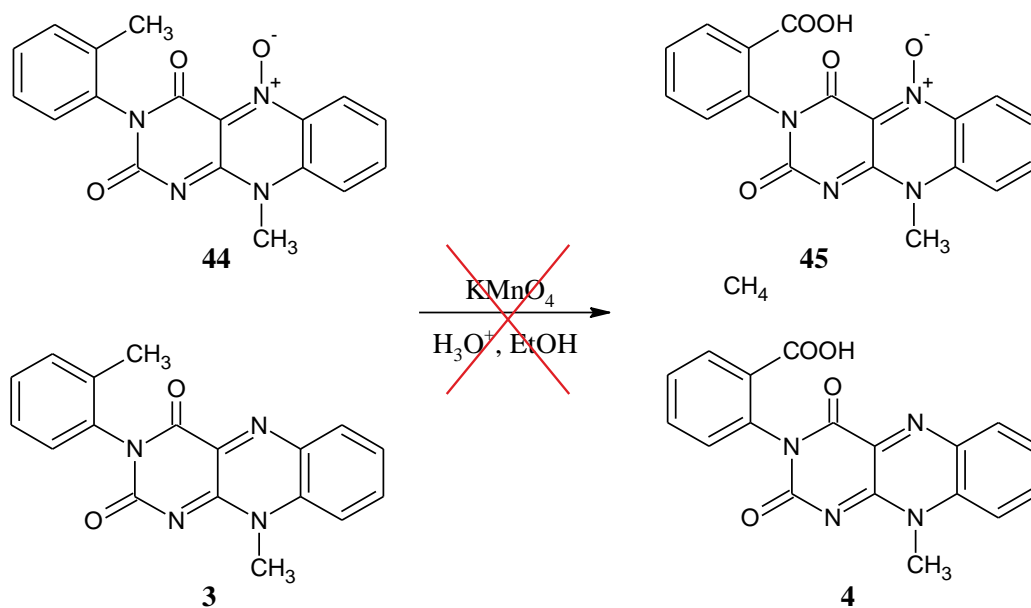


Schéma 14. Oxidace manganistanem draselným.

Obdobný rozpad flavinového skeletu byl pozorován v případě pokusu o získání flavinové kyseliny **4** z trifluormethylového derivátu **28** účinkem koncentrované i zředěné kyseliny sírové.⁷ (Schéma 15) Tento postup byl proveden podle práce Yonedy a kol.³⁷ (Schéma 16), který získal flavin karboxylovou kyselinu **49** v 89 % výtěžku. Oxidace byla v případě práce Yonedy prováděna na deaza-flavinu **48**, což patrně ovlivňuje stabilitu celého flavinového skeletu.

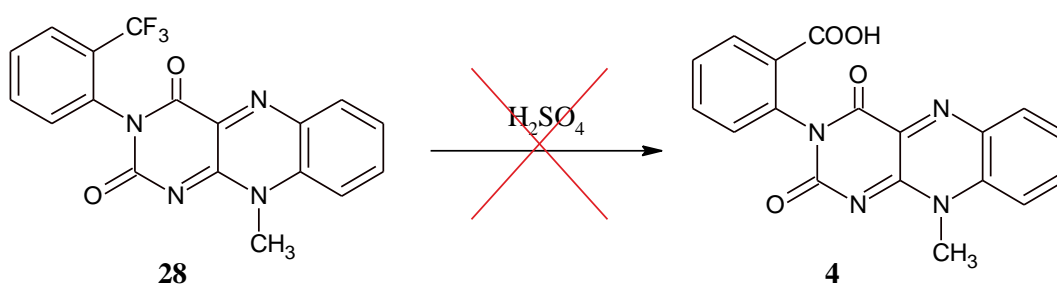


Schéma 15. Oxidace trifluormethylového derivátu.

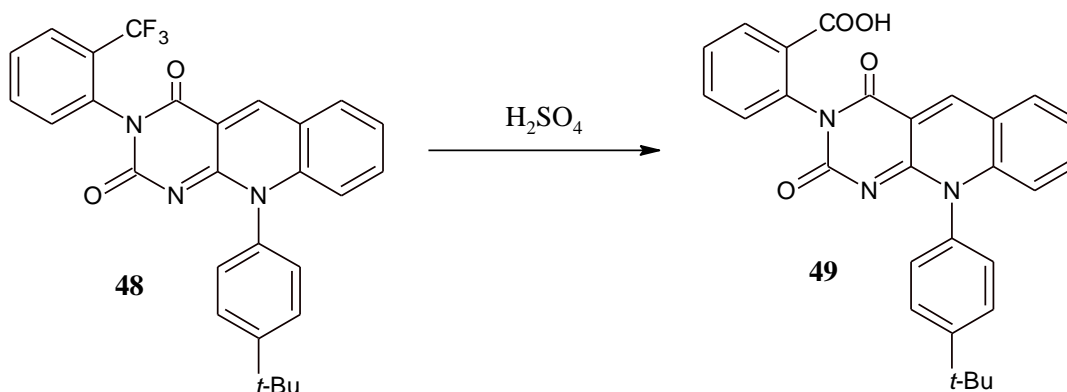
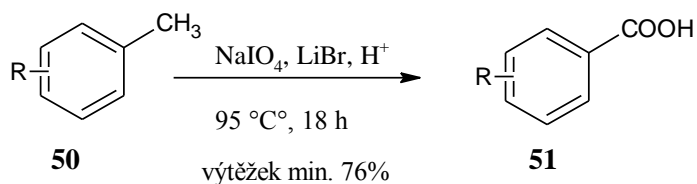


Schéma 16. Oxidace dle Yonedý a kol.³⁷

5.2.2 Oxidace jodistanem sodným

Oxidace jak 3-*ortho*-tolylflavin-*N*-oxidu **44**, tak 3-*ortho*-tolylflavinu **3** byla provedena jodistanem sodným v přítomnosti zředěné kyseliny sírové a bromidu lithného. Nalezenou předlohou pro tento typ reakce je uvedená ve Schématu 17.³³



R = halogen, alkyl, NO₂, atd.

Schéma 17. Oxidace methylové skupiny na aromatickém jádře.³³

Ačkoli literatura uvádí výtěžek nad 76 %, oxidace methylové skupiny ani v případě 3-*ortho*-tolylflavin-*N*-oxidu **41** ani 3-*ortho*-tolylflavinu **3** neproběhla. (Schéma 18) V obou případech se podařilo izolovat pouze výchozí látky a to v odpovídající hmotnosti před začátkem reakce.

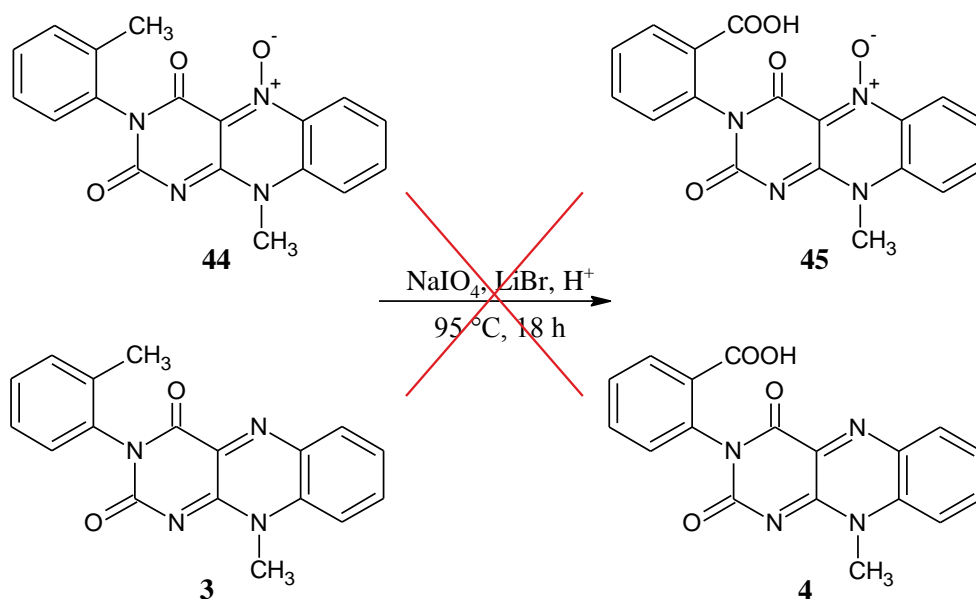


Schéma 18. Oxidace jodistanem sodným.

5.2.3 Oxidace dichromanem sodným

Oxidace 3-*ortho*-tolylflavin-*N*-oxidu **44** a 3-*ortho*-tolylflavinu **3** byla provedena dichromanem sodným v přítomnosti zředěné kyseliny sírové dle Schématu 19.³⁴

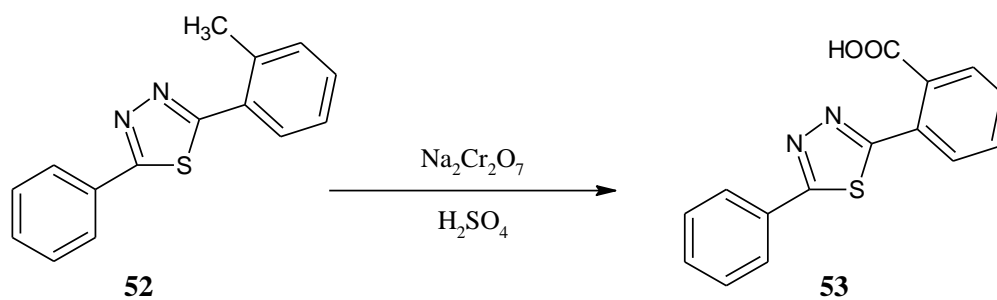


Schéma 19. Oxidace methylové skupiny na aromatickém jádře.³⁴

Ani v tomto případě se nepodařilo 3-*ortho*-tolylflavin-*N*-oxid **44** ani 3-*ortho*-tolylflavin **3** převést na odpovídající karboxylovou kyselinu. (Schéma 20) V obou případech se podařilo opět izolovat pouze výchozí látky.

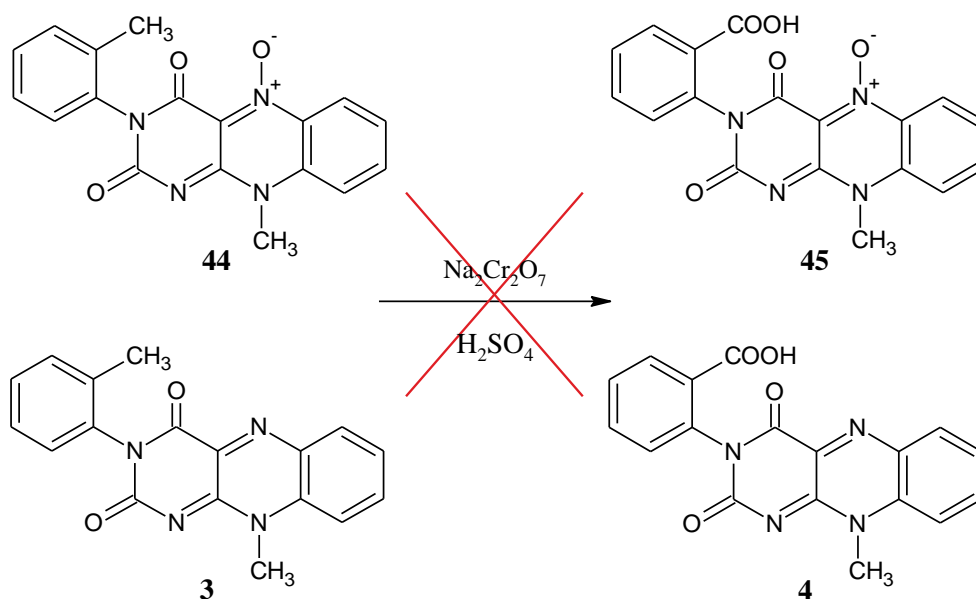


Schéma 20. Oxidace dichromanem sodným.

5.2.4 Oxidace oxidem chromovým

Oxidace 3-ortho-tolylflavin-N-oxidu **44** a 3-ortho-tolylflavinu **3** byla provedena oxidem chromovým ve vodném roztoku 80 % kyseliny octové jako alternativa k předchozí oxidaci dichromanem sodným.³⁸ Tento experiment však opět nebyl úspěšný, opět byl pozorován rozpad flavinové skeletu a z reakčních směsí bylo izolováno 46 % 3-ortho-tolylflavin-N-oxidu **44** a 52 % 3-ortho-tolylflavinu **3**. (Schéma 21)

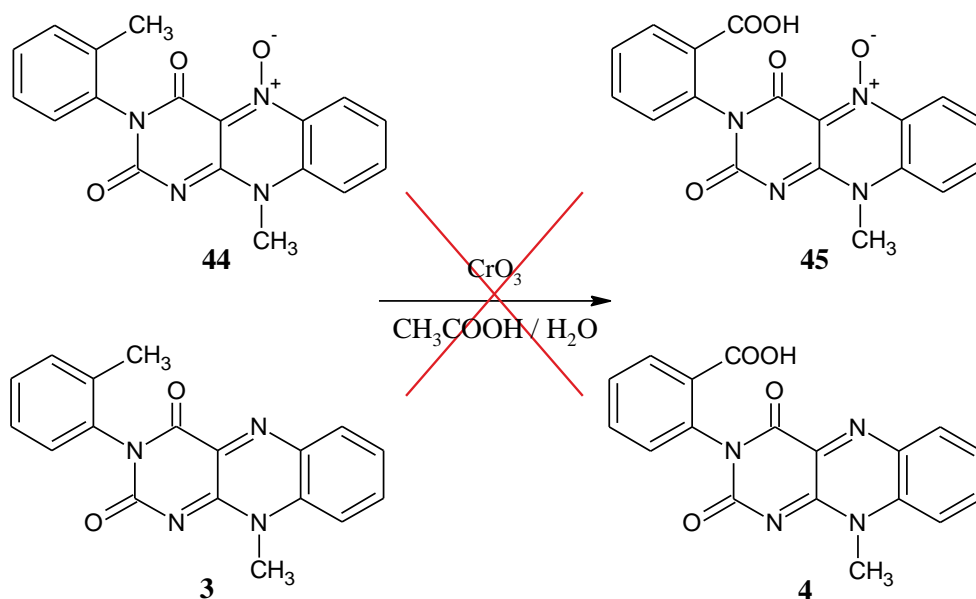


Schéma 21. Oxidace oxidem chromovým.

5.3 Shrnutí výsledků

Ačkoliv se oxidace methylové skupiny v 3-*ortho*-tolylflavinu **3** a 3-*ortho*-tolylflavin-*N*-oxidu **44** jevila podle postupů nalezených v literatuře jako jednoduchá záležitost, nepodařilo se mi ani jednu flavinovou kyselinu **4**, resp. **45** syntetizovat. Pro oxidace musí být voleny mírnější podmínky. Pokud je použita koncentrovaná kyselina sírová či agresivnější oxid chromový, dochází k destrukci flavinového skeletu, který se získává poměrně náročnou vícestupňovou syntézou.

Na pracovišti Ústavu organické chemie byly provedeny i pokusy o oxidaci methylové skupiny ve výchozím chloruracilu **42** nebo aminouracilu **43** (Str. 19), ale také byly neúspěšné a docházelo k rozpadu výchozích látek.²⁷ Pro zavedení karboxylové skupiny do polohy *ortho* fenylového zbytku by mohly být prověřeny i další reakce, které jsem z časových důvodů neprováděl.

Jednou z nich by mohla být například nukleofilní substituce bromu kyanidovými ionty a následná hydrolyza flavin-nitrilu **54** na požadovanou kyselinu **4**. (Schéma 22)

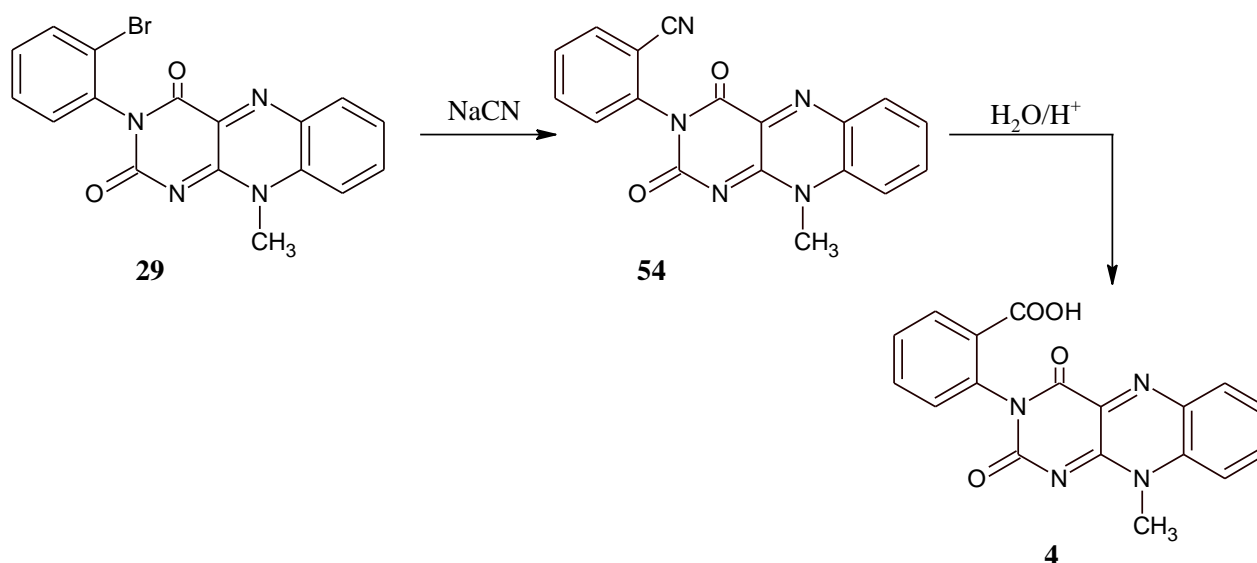


Schéma 22. Nukleofilní adice bromu a následná hydrolyza flavin-nitrilu.

6 ZÁVĚR

Byly připraveny 3-*ortho*-tolylflavin-*N*-oxid **44** a 3-*ortho*-tolylflavin **3**, u kterých byla studována možnost oxidace methylové skupiny na skupinu karboxylovou. Bohužel se nepodařilo naplnit cíl, kterým bylo získání flavin karboxylových kyselin **45** a **4**, kde by karboxylová skupina mohla být buď sama o sobě dostatečně objemná pro stabilizaci jednotlivých enantiomerů těchto flavinových kyselin a také by mohla být dále derivatizována chirálními alkoholy nebo aminy na diastereomerní flavin-estery **5** a flavin-amidy **6**. Tyto látky by mohly být separovány ve formě diastereomerů sloupcovou chromatografií a otestovány jako potenciální katalyzátory enantioselektivních oxidací.

Deriváty **44** a **3** byly připraveny postupnou syntézou (Schéma 11, str. 15.) a následně podrobeny sérii oxidačních reakcí, při kterých měla být methylová skupina převedena na skupinu karboxylovou. Ani v jednom případě se však nepodařilo karboxylovou kyselinu **45** a **4** získat. V případě oxidace manganistanem draselným a oxidem chromovým docházelo k destrukci flavinového systému.

Vzhledem k tomu, že se nepodařilo flavinové kyseliny **45** a **4** připravit touto oxidační cestou, nabízí se další téma ke studiu přípravy těchto látek, například nukleofilní substituce bromu v již dříve zmíněném derivátu **29** a následná hydrolýza vznikajícího nitrilu na karboxylovou kyselinu.

Za přínos této práce může být považována i samotná syntéza zatím nepopsaných látek **43**, **44** a **3**.

7 LITERATURA

- [1] Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes (Müller F., ed.). CRC, Boca Raton 1991.
- [2] Ghisla, S., Massey V.: *Eur. J. Biochem.* **1989**, *181*, 1.
- [3] Palfey, B., Massey V.: *Comprehensive Biological Catalysis* (Sinnott M., ed.), sv. 3, str. 83. Academic Press, London **1998**.
- [4] Moonen, M. J. H., Fraaije M. W., Rietjens I. M. C. M., Laane C., van Berkel W. J. H.: *Adv. Synth. Catal.* **2002**, *344*, 1023.
- [5] S. Caron, R. W. Dugger, S. G. Ruggeri, J. A. Ragan, D. H. B. Ripin: *Chem.Rev.* **2006**, *106*, 2943
- [6] I. Fernández, N. Khair: *Chem.Rev.* **2003**, *103*, 3651; M. C. Carreño: *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 1717
- [7] Kotoučová, H.: *osobní sdělení*
- [8] Ménová, P.: *Study of Properties of Flavinium Salts and Their C4a-Adducts*. Diploma thesis. INSTITUTE OF CHEMICAL TECHNOLOGY, PRAGUE, Prag **2010**.
- [9] Blyth, A. W.: *J. Chem. Soc.* **1879**, *35*, 530-539.
- [10] Krebs, H. A.: *Biochem. J.* **1935**, *29*, 1620-1644.
- [11] Warburg, O., Christian W.: *Biochem. Z.* **1933**, *266*, 377-411.
- [12] Silva, E; Edwards, A. M.: *Flavins Photochemistry and Photobiology*, Eds. RSC Publishing: Cambridge **2006**.
- [13] Massey, V.: *Chemical and Biological Versatility of Riboflavin*, Biochemical Society Transactions, **2000**, *28*, 283–296.
- [14] McMurry, J.: *Organická chemie*, český překlad 6. vydání, VUT Brno, VŠCHT Praha, **2007**, ISBN 978-80-214-3291-8.

- [15] M. J. H. Moonen, M. W. Fraaije, I. M. C. M. Rietjens, C. Laane, W. J. H. van Berkel: *Adv. Synth. Catal.* **2002**, *10*, 344.
- [16] a) S. Ball, T. C. Bruice: *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 4017; b) S. Ball, T. C. Bruice: *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 6498; c) T. C. Bruice: *Acc. Chem. Res.* **1980**, *13*, 256.
- [17] Murahashi, S. – I., Ono, S., Imada, Y.: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2366.
- [18] Y. Imada, H. Iida, S.-I. Murahashi, T. Naota,: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1704-1706.
- [19] Imada, Y., Iida, H., Ono, S., Murahashi, S.: -I.: *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 2868.
- [20] a) Bergstat, K., Bäckvall, J. –E.: *J. Org. Chem.*, **1998**, *63*, 6650; b) Minidis, A. B. E., Bäckvall, J. –E.: *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 297; c) Lindén, A. A., Hermanns, N., Ott S., Ott S., Krüger, L. Bäckvall, J. –E.: *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 112.
- [21] Wojacyzńska, E.; Wojacyzński,: *J. Chem. Rev.* **2010**, *110*, 4303.
- [22] Murahashi, S.-I.: *Angew. Chem. Int.* *34*, 2443-2465
- [23] Cibulka, R.; Jurok, R.: *Chem. Listy.* **2012**, *106*, 896-902.
- [24] Mojr, V.; Herzig, V.; Buděšínský, M.; Cibulka, R.; Kraus, T.: *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 7599-7601.
- [25] Mojr, V.; Buděšínský, M.; Cibulka, R.; Kraus, T.: *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 7318-7326.
- [26] Solnička, O.; *Příprava N-substituovaných 6-amino-3-(2-methylfenyl)uracilů*. Bakalářská práce. Univerzita Karlova v Praze, Praha. **2010**.
- [27] Kotoučová, H.; *Pokroky v organické, bioorganické a farmaceutické chemii*, Nymburk, 43. Konference, **14.-16. listopadu 2008**, (poster).
- [28] Kotoučová, H.; Solnička, O.; Cibulka, R.; Jurok, R.: *Syntéza a studium vlastností orthosubstituovaných 3-fenylisalloxazinů*. Chemické listy 6:433. **2010**.
- [29] Perrin, D. D.: Armarego WLF. 1996. *Purification of laboratory chemicals*. Oxford, **1996**.

- [30] Yoneda, F.; Sakuma, Y.; Ichiba, M.; Shinomura, K.: *J. Am. Chem. Soc.*, **1976**, 98, 830-835.
- [31] Sako, M.; Kojima, Y.; Hirota, K. and Maki, Y.: *Journal Chemical Society, Chemical Communications*, **1984**, 1691 - 1692.
- [32] Akiyama, T.; Simeno F.; Murakami, M.; Yoneda, F.: *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 6613-6620.
- [33] Shaik, M. T.; Emmanuvel, L.; Sudalai, A.: *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 5043-5046.
- [34] Harris, R. L. N.; Huppertz, J. L.: *Australian Journal of Chemistry*, **1977**, 30, 2225-2240.
- [35] Sika, J.: *Bakalářská práce*, Pedf UK v Praze, **2011**.
- [36] Zvoníček, V.: *Bakalářská práce*, VŠCHT, **2012**.
- [37] Ohno, A; Kunitomo, J.; Kawai, Y.; Kawamoto, T.; Tomishima, M.; Yoneda, F.: *J. Org. Chem.*, **1996**, 61, 9344-9355.
- [38] Brückmann, G.; Isaacs: S. D.: *J. Am. Chem. Soc*, **1949**, 71, 390.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

ADP	adenosin difosfát
DMSO	dimethylsulfoxid (deuterované rozpouštědlo)
EA	elementární analýza
FAD	flavin adenin dinukleotid
FNM	flavin mononukleotid
MS	hmotnostní spektrometrie
NMR	nukleární magnetická rezonanční spektroskopie
NMR zkratky:	
brs	broad singlet v NMR spektru
d	doublet v NMR spektru
dd	doublet doubletu v NMR spektru
m	multiplet v NMR spektru
s	singlet v NMR spektru
t	triplet v NMR spektru
TMEDA	tetramethylethyldiamin