

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA ORGANICKÉ A JADERNÉ CHEMIE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**[2+2+2] Cykloadiční reakce katalyzovaná komplexy přechodných kovů
jako robustní nástroj syntézy derivátů pyridinu**

Praha 2008

Tereza Šálová

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením externího školitele Mgr. Filipa Teplého, PhD., a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze a pracoviště externího školitele Mgr. Filipa Teplého, PhD. je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity a pracoviště externího školitele Mgr. Filipa Teplého, PhD.

V Praze dne ...*5.5.2008*.....

.....
Štvoř
.....
podpis

Ráda bych poděkovala všem lidem, kteří přispěli k vypracování této práce. Především svému externímu školiteli Mgr. Filipu Teplému, PhD. za téma mé diplomové práce, za čas, který mi věnoval a za četné a cenné rady.

Rovněž děkuji Doc. Jindřichu Jindřichovi, CSc., který se ujal role interního školitele a umožnil mi tak vykonat tuto diplomovou práci na ÚOCHB AV ČR.

Dále děkuji Dr. R. Pohlovi za změření a interpretaci NMR spekter, RNDr. P. Fiedlerovi, CSc. za změření a interpretaci IR spekter, kolektivu Laboratoře hmotové spektroskopie ÚOCHB AV ČR za změření hmotnostních spekter a Dr. J. Konvalinkovi a M. Kožíškovi za poskytnutí biologických médií.

Zároveň děkuji svým spolupracovníkům a kolegům za ochotu, všestrannou pomoc a příjemnou pracovní atmosféru.

V neposlední řadě děkuji svým rodičům, sestře a přátelům za jejich podporu během mé práce.

Obsah

Použité zkratky	5
1. Úvod	6
2. Současný stav problematiky	7
2.1 Pyridin a jeho význam	7
2.1.1 Vlastnosti pyridinu	7
2.1.2 Význam pyridinu	8
2.1.3 Syntéza pyridinu a jeho derivátů	13
2.1.3.1 Kondenzační reakce	13
2.1.3.2 Cykloadice	14
2.2 [2+2+2] Cykloadiční reakce	16
2.2.1 Mechanismus [2+2+2] cykloadiční reakce	17
2.2.2 Syntéza pyridinových derivátů pomocí [2+2+2] cykloadiční reakce	18
2.2.2.1 Katalýza komplexy kobaltu	18
2.2.2.2 Katalýza komplexy rhodia	19
2.2.2.3 Katalýza komplexy ruthenia	20
2.2.3 Mechanismus syntézy pyridinů katalyzované komplexem ruthenia	20
2.3 Bioorganometalická chemie	22
2.3.1 Přirozeně se vyskytující organometalické sloučeniny	23
2.3.2 Organometalické sloučeniny v medicíně	25
2.3.3 Organometalické sloučeniny jako katalyzátory	27
3. Cíl práce	28
4. Výsledky a diskuse	29
5. Závěr	38
6. Experimentální část	39
6.1 Obecné informace	39
6.2 Pracovní postupy	40
7. Použitá literatura	52

Použité zkratky

Ad	adenosyl
cod	1,5-cyklooktadien
Cp	cyklopentadienyl
Cp [*]	pentamethylcyklopentadienyl
DBU	1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-en
DCE	1,2-dichloroethan
DNA	deoxyribonukleová kyselina
Et	ethyl
FBS	fetal bovine serum (fetální hovězí sérum)
Gln	glutamin
GSK	glykogen syntház kináza
IC ₅₀	inhibiční koncentrace, která představuje 50 % snížení růstu nebo růstové rychlosti ve vztahu ke kontrolnímu vzorku
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
IR	infračervená spektroskopie
Me	methyl
MPA	mercaptophenyl amino
MS	hmotnostní spektroskopie
NMR	nukleární magnetická rezonance
Ph	fenyl
TBDMS	tert-butyldimethylsilyl
TFA	kyselina trifluoroctová
TLC	Thin layer chromatography (tenkovrstvá chromatografie)
TMS	tetramethylsilan

1. Úvod

Tvorba vazeb uhlík-uhlík (C-C) je základem organické syntézy. [2+2+2] Cykloadiční reakce katalyzované komplexy přechodných kovů patří mezi důležité reakce, ve kterých dochází k současné tvorbě několika C-C vazeb v jednom reakčním kroku. [2+2+2] Cykloadiční reakce díky svým vlastnostem nacházejí uplatnění i při syntéze přírodních a biologicky aktivních sloučenin¹.

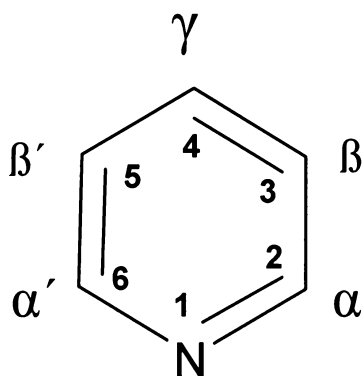
Konvenčně bývají reakce náležející do oblasti organometalické chemie a katalýzy přechodnými kovy prováděny v inertní atmosféře, kdy je nutné vyloučit vlhkost a zamezit přítomnosti molekulárního kyslíku. Ačkoli je vznik C-C vazby prostřednictvím katalýzy přechodných kovů ve vodných médiích známý², tolerance k přítomnosti vzduchu je popsána jen v několika publikovaných pracích^{3,4}. [2+2+2] Cykloadice, které by probíhaly za mírných podmínek a v živých organismech nejsou dosud známy. Proto je nalezení takových podmínek, které by tolerovaly přítomnost vzduchu nebo dokonce přítomnost živé hmoty výzvou.

Pokud by se podařilo nalézt podmínky, které by se daly aplikovat v živé hmotě, mohly by [2+2+2] cykloadiční reakce vést k přípravě účinné látky přímo v organismu a najít tak využití v chemické biologii nebo dokonce terapii. Právě organometalickým sloučeninám je věnováno stále více pozornosti pro jejich významné chemicko-fyzikální vlastnosti, reaktivitu a schopnost katalyzovat širokou škálu chemických reakcí. Takové katalyzátory by mohly být použity například ke katalytickému značení nebo deaktivaci cílových biomolekul nebo k přeměně profarmaka na farmakum a to přímo v buněčném prostředí^{25,26,31}. Tato práce je zaměřena na syntézu pyridinového kruhu, který je častým strukturním motivem biologicky účinných látek.

2. Současný stav problematiky

2.1 Pyridin a jeho význam

Směs tzv. pyridinových bází v roce 1846 poprvé izoloval T. Anderson z kostního oleje⁵, později byl bohatý zdroj nalezen v černouhelném dehtu. Jedná se především o pyridin, methylpyridiny (pikoliny), dimethylpyridiny (lutidiny) a trimethylpyridiny (kolidiny).



Obr. 1 Struktura molekuly pyridinu

2.1.1 Vlastnosti pyridinu

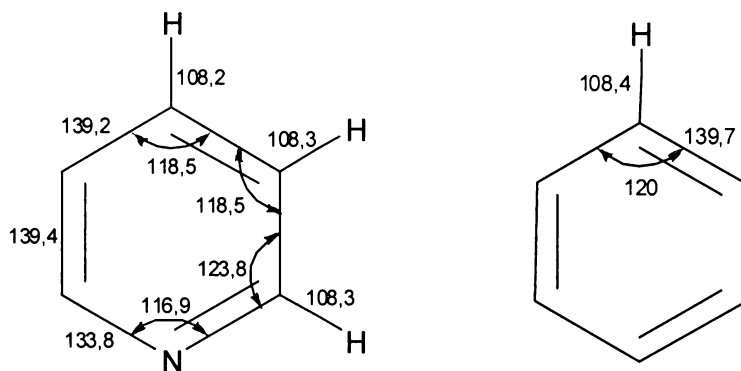
Pyridin je nejjednodušší heterocyklus azinového typu (obr. 1). Jedná se o derivát benzenu, ve kterém je CH skupina nahrazena atomem dusíku.

Pyridin je zásaditá, kapalná látka, neomezeně mísitelná s vodou a s jinými rozpouštědly, s teplotou varu 115 °C. Vyznačuje se charakteristickým zápachem.

Uhlíkové atomy a dusík v pyridinovém cyklu mohou být popsány sp^2 hybridními orbitály, přičemž nehybridizovaný orbital dusíku je obsazen jedním elektronem. Volný elektronový pár dusíku leží v rovině kruhu a delokalizace π -elektronů se neúčastní. Projevuje se to v ultrafialovém spektru, v němž je patrný absorpční pás $n-\pi^*$ -přechodu. Tím se pyridin liší od benzenu. Důsledky této elektronové dispozice jsou následující:

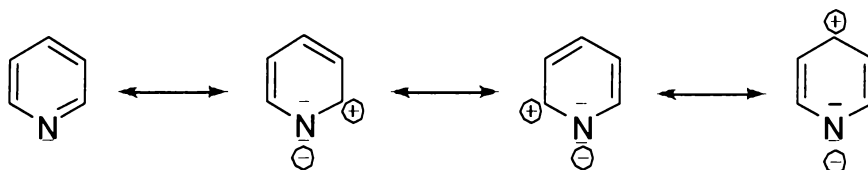
Heteroatom (N) má vyšší elektroafinitu než CH skupiny. Rozložení elektronů v pyridinu nemůže být tudíž symetrické jako u benzenu, ale je polarizováno tak, že vyšší elektronová hustota je na dusíku. Pyridin má tedy výrazný dipólový moment ($\mu = 2.26 \text{ D}$)⁶.

Pyridin je planární nepravidelný šestiúhelník s následujícími geometrickými parametry (obr. 2)⁷.



Obr. 2 Geometrické parametry pyridinu a benzenu
(délky vazeb v ppm, vazebné úhly ve stupních)

Vazebný stav pyridinu můžeme tedy znázornit pomocí kanonických mezomerních struktur, kdy v polohách 2, 4, 6 je elektronová hustota π -elektronů nejnižší a na dusíku nejvyšší (obr. 3)⁷.

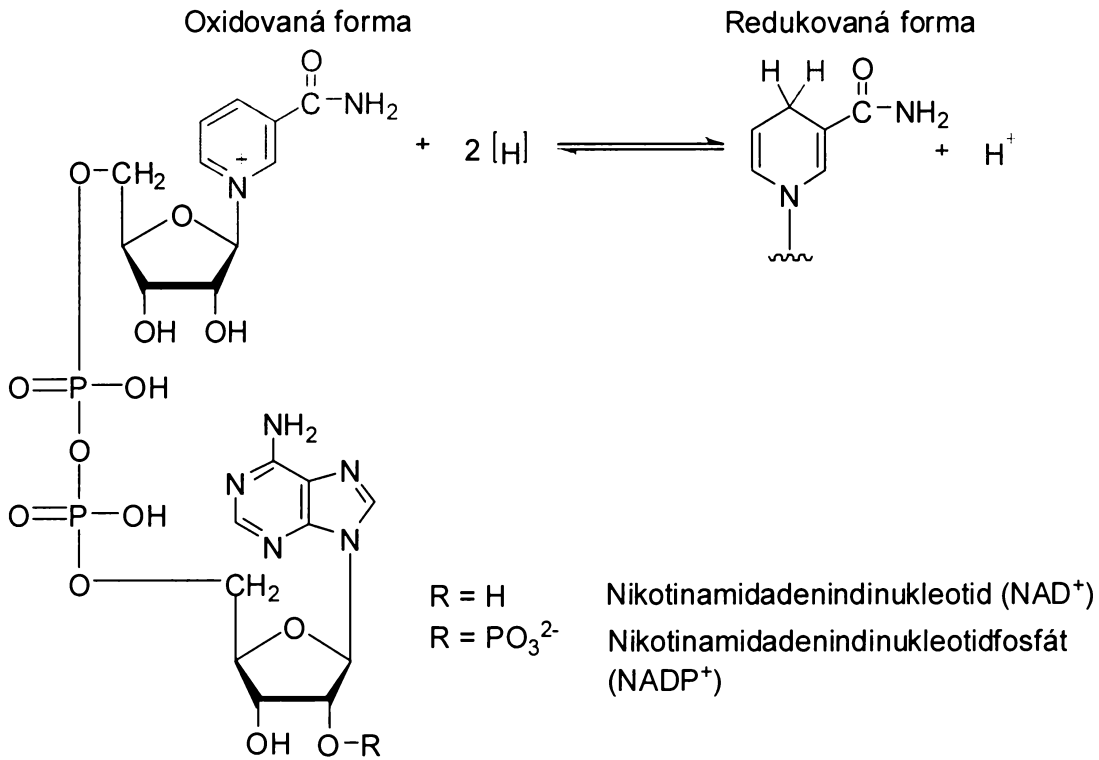


Obr. 3 Mezomerní formy pyridinu

2.1.2 Význam pyridinu

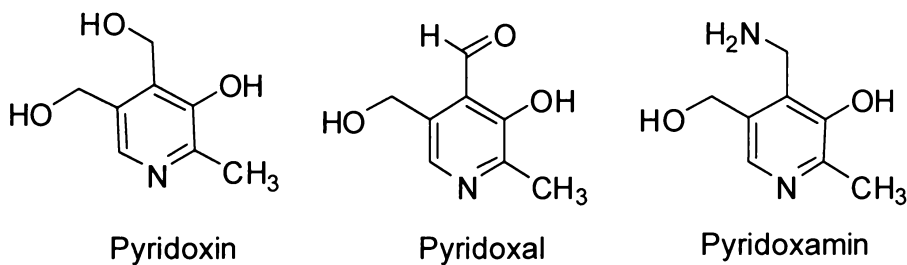
Pyridin je průmyslově důležitou látkou a vzhledem ke svým neurotoickým účinkům je předmětem zájmu průmyslové toxikologie. Pyridinové jádro se vyskytuje v řadě fyziologicky, farmakologicky i toxikologicky důležitých látkách. Od pyridinu se odvozují významné funkční metabolity (např. vitamíny) a sekundární metabolity (např. alkaloidy).

Příkladem je amid kyseliny nikotinové, který je spolu s adeninem součástí pyridinových koenzymů (obr. 4), které se v biosyntetických procesech účastní tkáňového dýchání (NAD, NADP).



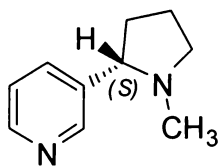
Obr. 4 Nikotinamidové koenzymy

Podobné postavení má vitamín B₆, což je společné označení pro tři pyridinové deriváty pyridoxin, pyridoxal a pyridoxamin (obr. 5). Je velmi důležitý jako koenzym pro metabolismus bílkovin. Významnou roli hraje také v krvetvorbě při tvorbě hemu, molekuly, která přenáší kyslík. Ovlivňuje funkce nervového systému, dále má vliv na kvalitu kůže a zúčastňuje se také při metabolismu cukrů.



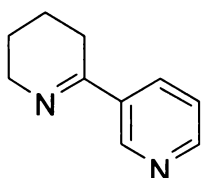
Obr. 5 Pyridinové deriváty vitamínu B₆

Další zajímavé látky jsou pyridinové alkaloidy tabáku nikotin (Obr. 6) a anabasin. Nikotin je biosyntetizován z aminokyseliny ornithinu a nikotinové kyseliny. Anabasin je syntetizován z lysinu a nikotinové kyseliny. U nikotinu bylo prokázáno, že významným způsobem snižuje výskyt Alzheimerovy choroby u kuřáků. Jsou proto intenzivně hledány látky s nikotinovým účinkem, ale bez jeho nežádoucích efektů, které by mohly sloužit jako nový typ léčiv této choroby. Takovéto látky byly nalezeny v přírodních zdrojích. Jedna v sekretu jedové žlázy severoamerického mravence *Aphaenogaster ruidis* tzv. anabasein (Obr. 7) a druhá v jedovém sekretu jihoamerické žáby *Epipedobates tricolor* tzv. epibatidin (Obr. 8).⁸ Obě látky jsou silnými a specifickými agonisty nikotinových cholinergních receptorů a představují farmakologicky velmi zajímavou skupinu látek s možným využitím při léčbě Alzheimerovy choroby.

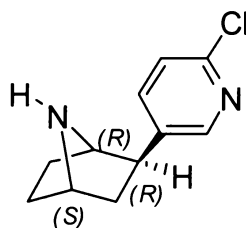


Obr. 6 (S)-Nikotin

ruidis tzv. anabasein (Obr. 7) a druhá v jedovém sekretu jihoamerické žáby *Epipedobates tricolor* tzv. epibatidin (Obr. 8).⁸ Obě látky jsou silnými a specifickými agonisty nikotinových cholinergních receptorů a představují farmakologicky velmi zajímavou skupinu látek s možným využitím při léčbě Alzheimerovy choroby.

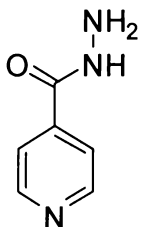


Obr. 7 Anabasein



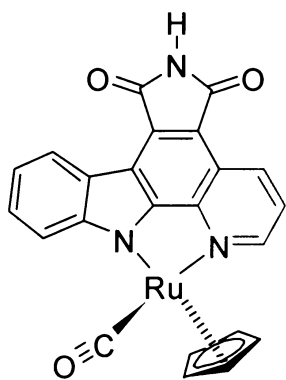
Obr. 8 (R)-Epibatidin

Před zavedením antibiotik našla významné uplatnění některá chemoterapeutika odvozená od pyridinu. Jedním z nich byl hydrazid kyseliny pyridin-4-karboxylové (izonikotinové), který je účinný při léčbě tuberkulózy (Obr. 9).

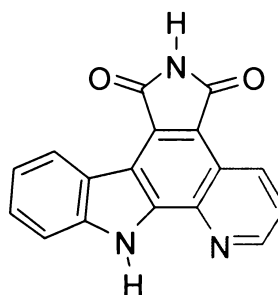


Obr. 9 Hydrazid kyseliny izonikotinové

Jako další příklad využití pyridinu lze uvést vysoce účinný organokovový inhibitor glykogen syntház kinázy 3 (GSK-3). Jedná se o rutheniový komplex, jehož hlavní skelet tvoří pyridokarbazolový ligand (obr. 10). Pyridokarbazolový ligand je sám o sobě velmi slabý inhibitor GSK-3 s IC_{50} pouze 50 μ M. Rutheniový komplex je odvozen od přírodního produktu staurosporinu, účinného protein-kinasového inhibitoru ($IC_{50} = 50$ nM), který ve své molekule obsahuje planární indolokarbazolový aglykon (obr. 11)⁹.

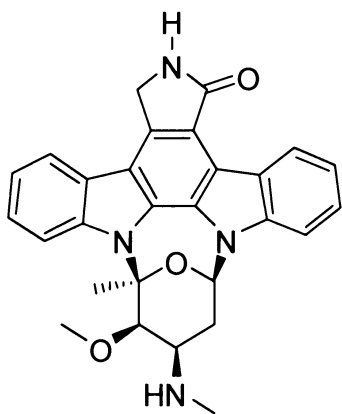


Rutheniový komplex

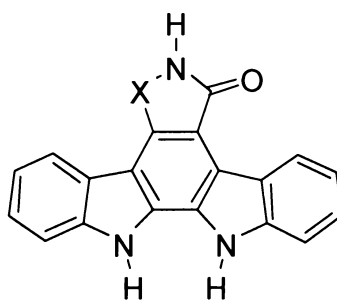


Pyridokarbazolový ligand

Obr. 10 Struktura organokovového inhibitoru glykogen syntház kinázy 3



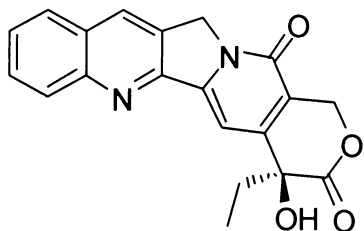
Staurosporin



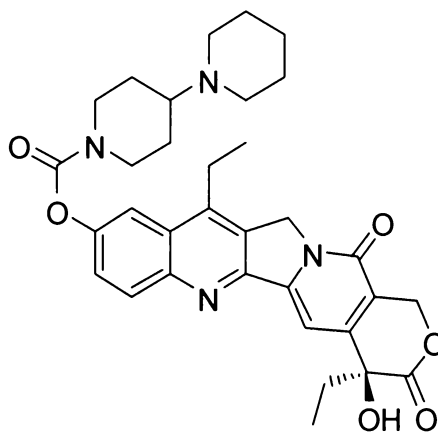
Indolokarbazolový aglykon (X = CH₂)
Arcyriaflavin A (X = CO)

Obr. 11 Struktura přírodního produktu staurosporinu

Pyridinovou jednotku lze nalézt i ve struktuře irinotecanu, semisyntetického derivátu camptothecinu, alkaloidu izolovaného v roce 1966 ze stromu *Camptotheca acuminata* rostoucího v Číně (obr. 12)¹⁰. Jedná se o protinádorové chemoterapeutikum působící jako specifický inhibitor DNA topoisomerázy I. Do klinické praxe se irinotecan prosadil především v léčbě kolorektálního karcinomu.



Camptothecin



Irinotecan

Obr. 12 Struktura irinotecanu, semisyntetického derivátu camptothecinu

2.1.3 Syntéza pyridinu a jeho derivátů

Je mnoho způsobů jak syntetizovat pyridinový kruh^{7,11,12}. Zde jsou uvedeny jen některé z nich.

2.1.3.1 Kondenzační reakce

Kondenzace 1,5-dikarbonylových sloučenin

Obecné syntézy pyridinových derivátů se zakládají na cyklizaci δ -diketonů. Cyklizace δ -diketonů s amoniakem vede k 1,4-dihydropyridinovým derivátům, které musí být v dalším kroku dehydrogenovány. Při použití nenasyčených 1,5-dikarbonylových sloučenin dehydrogenační stupeň odpadá (schéma 1).

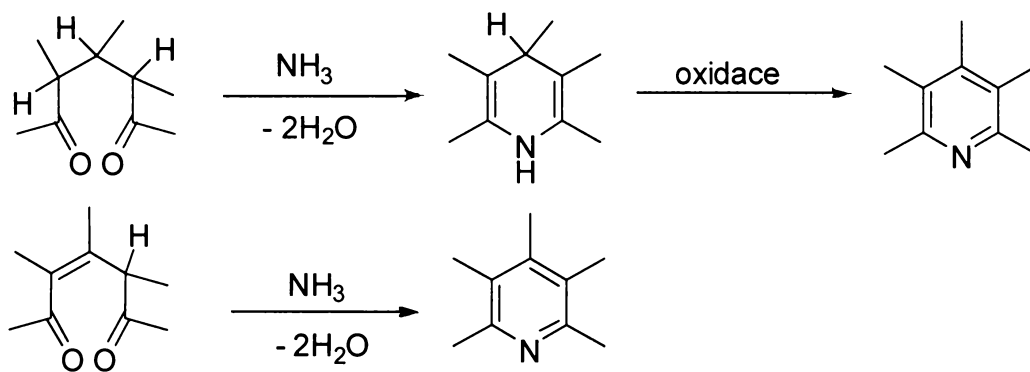


Schéma 1 Kondenzace 1,5-dikarbonylových sloučenin

Hantzschova syntéza

Symetrický 1,4-dihydropyridin, který snadno podléhá dehydrogenaci, vzniká reakcí amoniaku, aldehydu a dvou ekvivalentů 1,3-dikarbonylových sloučenin, které musí ve svém řetězci obsahovat centrální methylen (schéma 2).

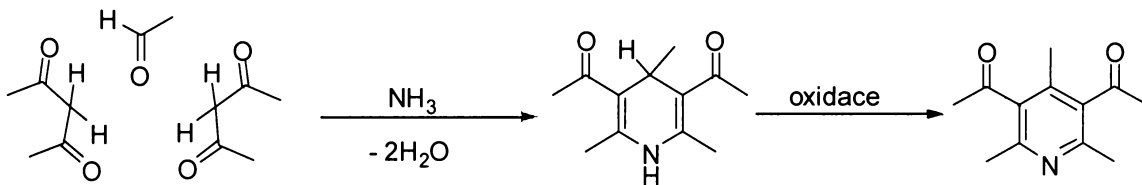


Schéma 2 Hantzschova syntéza

Guareschiho syntéza

Reakce 1,3-dikarboonylových sloučenin s kyanoacetamidem vede ke vzniku 3-kyano-2-pyridonů (schéma 3). S touto reakcí se můžeme například setkat v prvním kroku syntézy pyridoxinu, vitamínu B₆¹².

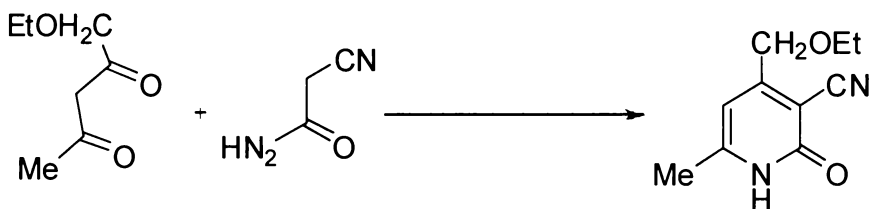


Schéma 3 Guareschiho syntéza

2.1.3.2 Cykloadice

[2+2+2] Cykloadice katalyzované komplexy přechodných kovů

Reakce nadbytku acetylenů s jedním ekvivalentem nitrilu katalyzovaná komplexy přechodných kovů, nejčastěji CpCo(CO)₂¹, vede ke vzniku 2-substituovaných pyridinů (schéma 4).

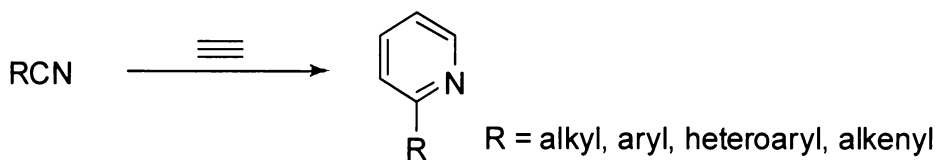


Schéma 4 Reakce nadbytku acetylenů s jedním ekvivalentem nitrilu

[2+2+2] Cykloadičním reakcím je bližší pozornost věnována v kapitole 2.2.

Diels-Alderova reakce s 1-azadieny

Dielsova-Alderova reakce 1-azadienů s alkeny nebo alkyny je přímým cykloadičním přístupem vzniku pyridinů (schéma 6). Tato reakce málokdy nachází své uplatnění, jelikož není podporována z důvodů elektronických, konformačních a termodynamických^{7,12}.

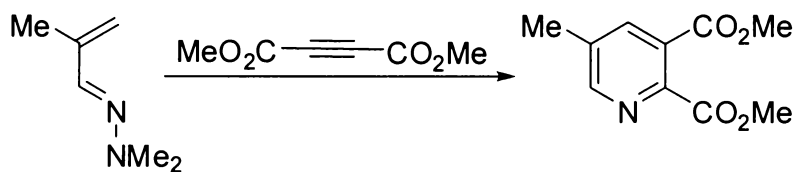


Schéma 6 Dielsova-Alderova reakce s 1-azadieny

2.2 [2+2+2] Cykloadiční reakce

První termální [2+2+2] cykloadici acetylenů provedl v roce 1866 Berthelot¹³. Produktem této reakce byl dehet obsahující benzen ale i další aromatické uhlovodíky. První, kdo provedl úspěšný experiment s přechodnými kovy jako katalyzátory pro [2+2+2] cykloadici byl v roce 1949 Reppe¹⁴. Katalýza komplexem niklu vedla k výraznému snížení reakční teploty nutné k provedení této reakce. Dnes je [2+2+2] cykloadiční reakce alkynů, diynů a oligoynů běžně využívána při syntéze vysoce funkcionalizovaných karbo- a heterocyklů. Nachází své uplatnění například při syntéze přírodních a biologicky aktivních látek¹.

Cykloadiční reakce katalyzované komplexy přechodných kovů patří mezi jedny z nejdůležitějších reakcí, ve kterých dochází k současnému formování několika C-C vazeb v jednom reakčním kroku. Vykazují toleranci k velkému množství funkčních skupin jako jsou alkoholy, aminy, alkeny, ethery, estery, halogeny a nitrily. Nevýhodou těchto reakcí je regioselektivita. Při provedení reakce zcela intermolekulárním způsobem je dosažení vysokého stupně regioselektivity problémem (schéma 7). Reakce je obvykle komplikována možností vzniku mnoha různých izomerů.

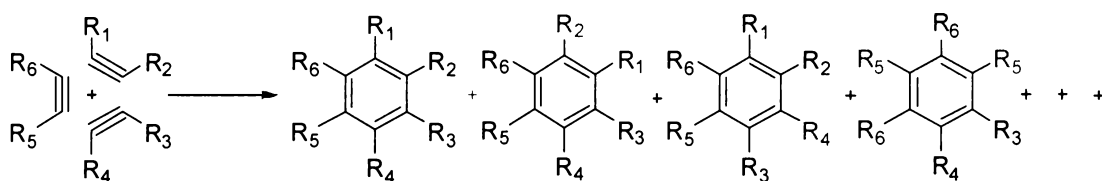


Schéma 7 Intermolekulární přístup k [2+2+2] cykloadici

Proto byly vyvinuty nové způsoby provedení [2+2+2] cykloadičních reakcí. Prvním je zcela intramolekulární přístup (schéma 8). Zde se s problémem dosažení vysokého stupně regioselektivity nesetkáváme, ale výchozí triyny je často obtížné připravit. Dalším způsobem je částečně intramolekulární přístup (schéma 9). Nevýhodou však je případná dimerizace výchozího diynu, proto je často nutný nadbytek monoalkynu.

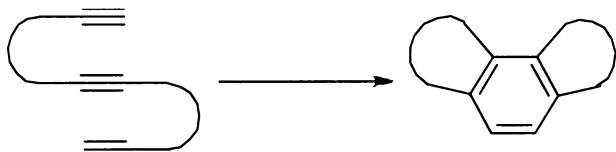


Schéma 8 Zcela intramolekulární přístup

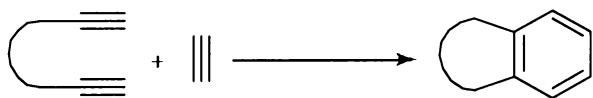


Schéma 9 Částečně intramolekulární přístup

2.2.1 Mechanismus [2+2+2] cykloadiční reakce

Ke katalýze [2+2+2] cykloadičních reakcí může být využita řada komplexů přechodných kovů, které se navzájem od sebe liší v reaktivitě a v toleranci k různým funkčním skupinám. Zajímavé je, že mechanismy jednotlivých katalytických systémů často používaných kovů (kobalt, rhodium, ruthenium, nikl a zirkonium) mají společné rysy (schéma 10)¹⁵:

V prvním kroku dochází k aktivaci komplexu přechodného kovu, který v následujícím kroku reaguje se substrátem (acetyleny nebo diyeny). Dále probíhá oxidativní coupling koordinovaných alkynových jednotek za vzniku metalocyklopentadienu. V konečném kroku tento nenasycený metalocyklus reaguje s další trojnou vazbou acetyleny nebo nitrilové jednotky a to buď inzercí nebo cykloadiční reakcí. Následná reductivní eliminace kovového centra poskytne konečný benzenový nebo pyridinový derivát.

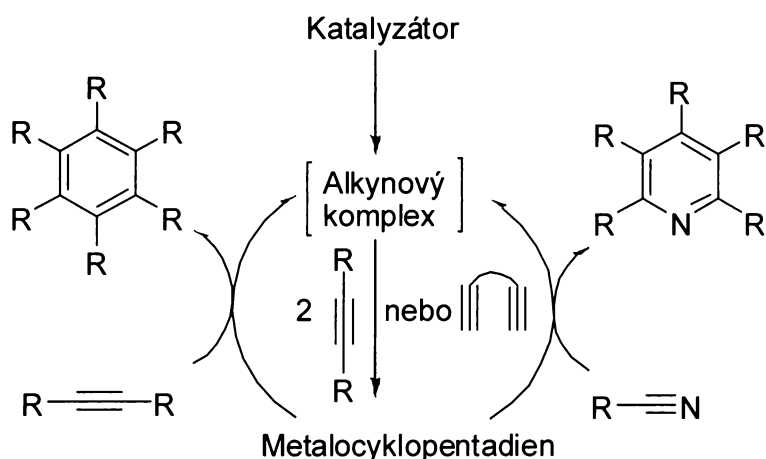


Schéma 10 Obecný mechanismus katalytického cyklu [2+2+2] cykloadiční reakce alkynů.

2.2.2 Syntéza pyridinových derivátů pomocí [2+2+2] cykloadiční reakce

Substituované pyridinové kruhy jsou obecně syntetizovány pomocí kondenzačních metod, jako je Hantzschova syntéza. Přechodnými kovy zprostředkovaná [2+2+2] cykloadice dvou molekul alkynů s nitrily je alternativní atomově-ekonomickou metodou syntézy mnohonásobně substituovaných pyridinů za mírných podmínek (schéma 11)¹⁶. Zde jsou uvedeny jen některé přechodné kovy využívané při syntéze pyridinů.

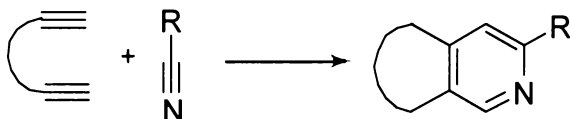


Schéma 11 [2+2+2] Cykloadiční reakce vedoucí k pyridinům

2.2.2.1 Katalýza komplexy kobaltu

Katalyzátory na bázi kobaltu jsou jedny z nejběžněji využívaných kovových katalyzátorů v [2+2+2] cykloadičních reakcích. Nejčastějším strukturním motivem [2+2+2] cykloadičních katalyzátorů je fragment CpCo. Modifikace Cp kruhu různými substituenty umožňuje rozpustnost v polárních rozpouštědlech nebo zavedení chiralitu do struktury katalyzátoru¹⁵. Nejvíce používaným katalyzátorem je komplex CpCo(CO)₂, uplatňující se například v zcela intramolekulární [2+2+2] cykloadici při totální syntéze přírodního

antibiotika rubiginonu B₂ (schéma 12)¹⁷. Nevýhodou tohoto katalyzátoru je však často vysoká teplota, při které se reakce musí provádět. Jako další příklad katalýzy komplexem kobaltu lze uvést syntézu axiálně chirálních nesymetrických bipyridinů¹⁸.

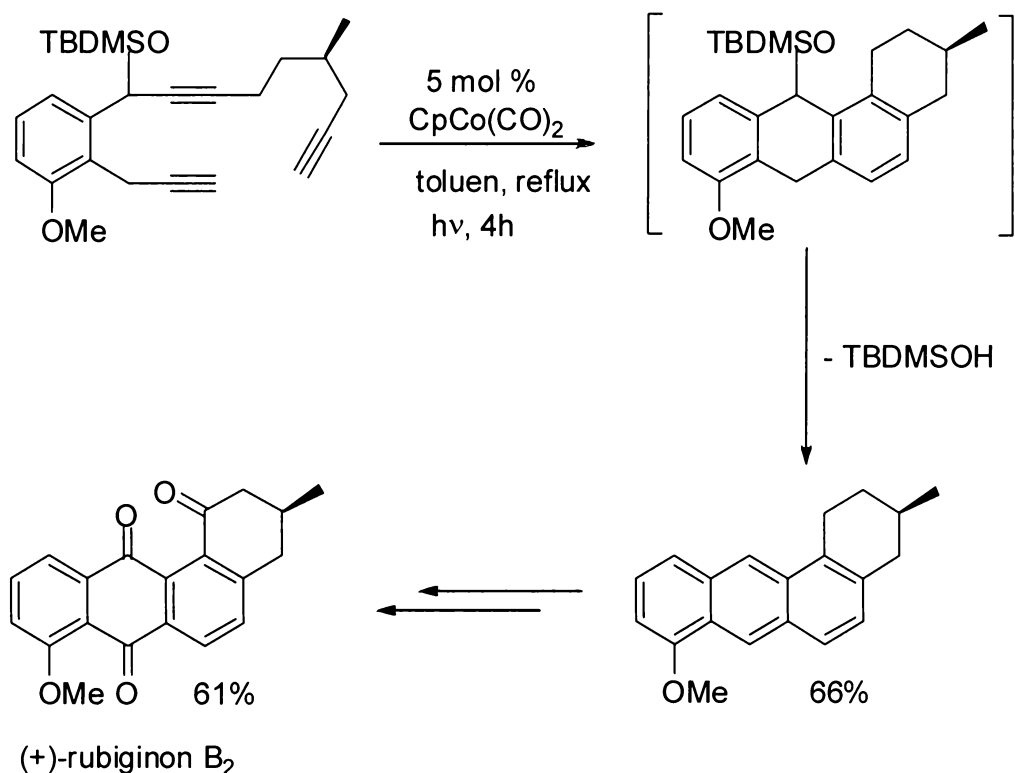


Schéma 12 Totální syntéza přírodního antibiotika rubiginonu B₂

2.2.2.2 Katalýza komplexy rhodia

Rhodium je další přechodný kov alkyňové cyklotrimerizace. Byl použit například v cyklotrimerizaci 1,6-diyňů s monoalkyny a to ve formě Wilkinsonova katalyzátoru RhCl(PPh₃)₃¹⁹. Wilkinsonův katalyzátor je dalším užitečným katalyzátorem pro syntézu komplexních látek. Tento katalyzátor dovoluje u některých substrátů provést reakci za velmi mírných podmínek. Jako příklad lze uvést syntézu tetracyklického karbazolu (schéma 13)²⁰. Katalýza komplexy rhodia se využívá jak k syntéze substituovaných pyridinových derivátů tak k přípravě substituovaných benzenových a 1,3-cyklohexadienových derivátů²¹.

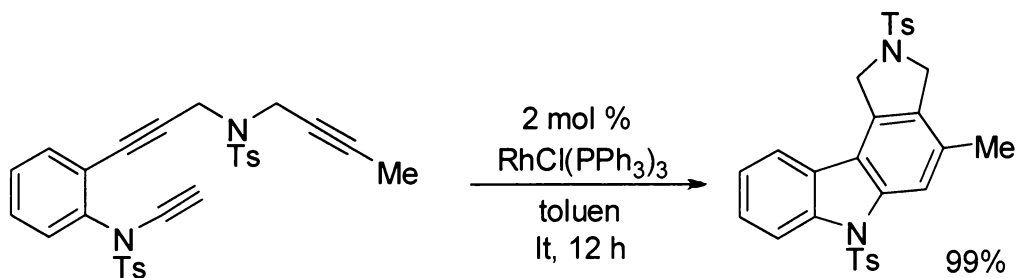


Schéma 13 Syntéza tetracyklického karbazolu pomocí katalytického množství Wilkinsonova katalyzátoru

2.2.2.3 Katalýza komplexy ruthenia

Během posledních deseti let byl zaznamenán velký rozvoj v organické syntéze a ve vědě o polymerech zavedením ruthenia jako katalyzátoru reakcí, při níž dochází k tvorbě vazby C-C. Využívá se k přípravě cyklických a polycyklických sloučenin a to nejčastěji při reakci se substráty obsahující několik nenasycených vazeb²². Nedávný výzkum poukázal na možnost syntézy pyridinů reakcí 1,6-diyňů s nitrily zprostředkovanou [2+2+2] cykloadiční reakcí v přítomnosti katalytického množství $\text{Cp}^*\text{RuCl}(\text{cod})$ ²³. Tento způsob syntézy a typ katalyzátoru je součástí i mé práce. Stejný katalyzátor byl použit například i v syntéze bicyklických pyridonů za použití isokyanátů jako reaktantů (schéma 14)²⁴.

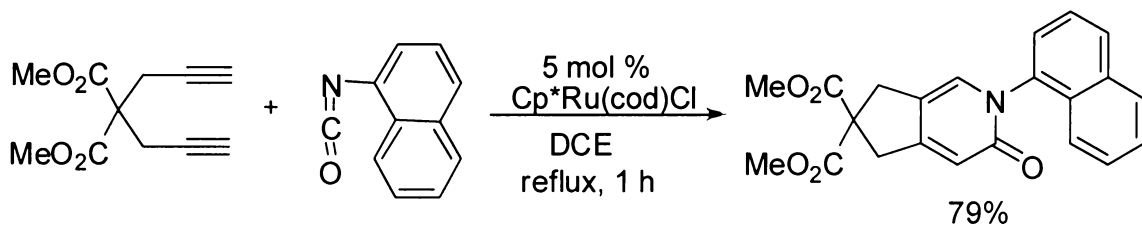


Schéma 14 Syntéza bicyklických pyridonů působením katalytického množství $\text{Cp}^*\text{RuCl}(\text{cod})$

2.2.3 Mechanismus syntézy pyridinů katalyzované komplexem ruthenia¹⁵

Katalytický cyklus je zahájen reakcí alkyne nebo diyne s rutheniovým komplexem za vzniku komplexu **1** (schéma 15). Následně probíhá oxidativní coupling dvou alkykových jednotek v rámci komplexu za vzniku ruthenacyklopentadienu **2**. Tento krok je považován za krok určující rychlost celkového exothermického cyklu. Koordinací nitrilového substrátu

vzniká ruthenacyklopentadienový intermediát **3** (znázorněn v nejpravděpodobnějším η^2 uspořádání). V dalším kroku vzniká azaruthenabicykloheptatrien **4**, který je klíčovým meziproduktem v rutheniem katalyzované cykloadici. Rozštěpení vazby mezi rutheniem a přemostujícím uhlíkem bicyklu má za následek vznik azaruthenacykloheptatrienu **5**. Následující krok je silně exothermický, protože dochází k tvorbě pyridinového kruhu. Pyridin je následně odštěpen reakcí katalyzátoru s alkyновým substrátem a regenerovaný katalyzátor se vrací zpět na začátek katalytického cyklu.

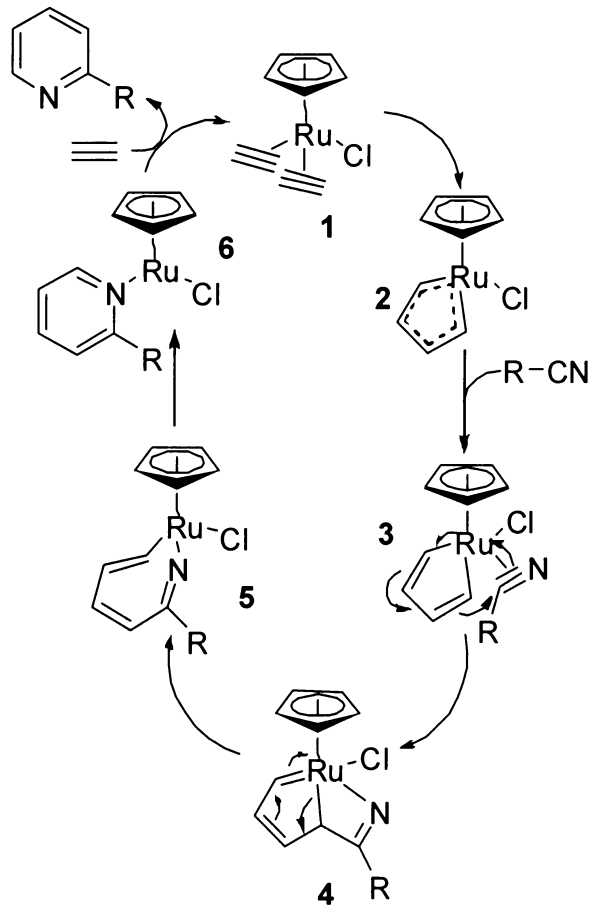
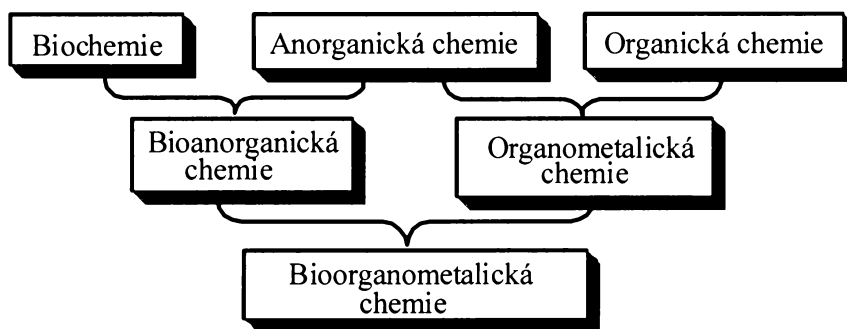


Schéma 15 Mechanismus syntézy pyridinů katalyzované komplexem ruthenia

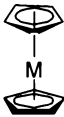
2.3 Bioorganometalická chemie

Pro vývoj chemie je charakteristické, že z dříve vzájemně oddělených oblastí výzkumu jako je biochemie, anorganická chemie a organická chemie vyrůstají nové oblasti výzkumu (obr. 13). Tak se mezi biochemií a anorganickou chemií vyvinula chemie bioanorganická a mezi anorganickou a organickou chemií vyrostla dnešní velká oblast chemie organometalické.



Obr. 13 Bioorganometalická chemie: interdisciplinární oblast výzkumu

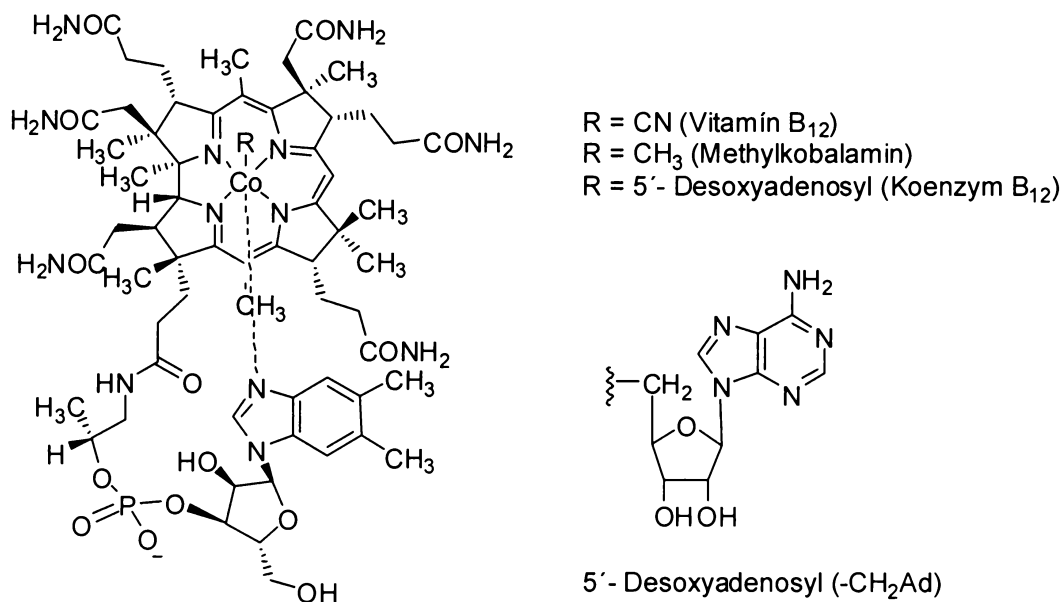
Organometalické sloučeniny jsou definovány jako sloučeniny s vazbou kov-uhlík (obr. 14). Především role přechodných kovů v životních procesech budí obrovský zájem mezi biochemiky. Tak se v poslední době vyvinula nová oblast výzkumu, bioorganometalická chemie²⁵. Jedná se zejména o organokovové komplexy, které mají biologický účinek a nacházejí uplatnění v medicíně.

	Obecný vzorec	Příklad
Karbonyl kovu: (Hieber, Berthelot)	$L_nM-C\equiv O$ \updownarrow $L_nM=C=O$	Ni(CO) ₄ , Fe(CO) ₅
Alkyl kovu: (Pope)	L_nM-C (with three bonds to other groups)	(CH ₃) ₃ Pt-I, (CO) ₄ Co-CH ₃
Karben kovu: (Fischer, Schrock)	$L_nM=C$ (with two bonds to other groups)	(CO) ₅ Cr=C ^{Ph} ₂ OCH ₃
Metalocen: (Wilkinson, Fischer)		Fe(C ₅ H ₅) ₂ (Ferrocen)
Hydrid kovu: (Hieber, Cotton)	L_nM-H	H ₂ Fe(CO) ₄ , HCo(CO) ₄

Obr. 14 Organometalické sloučeniny přechodných kovů

2.3.1 Přirozeně se vyskytující organometalické sloučeniny

Mezi první objevené organometalické sloučeniny vyskytující se v přírodě patří vitamín B₁₂, jeho koenzym a methylkobalamin, které byly dlouhou dobu považovány za jediné přirozeně se vyskytující organometalické sloučeniny s vazbou kov-uhlík (obr. 15)²⁶.



Obr. 15 Struktura vitamínu B₁₂, methylkobalaminu a koenzymu B₁₂

Role koenzymu B₁₂ je dnes velmi dobře prozkoumána. Katalyzuje významný [1,2]-přesmyk, při kterém je vyměněn substituent R za atom vodíku sousedícího atomu uhlíku (schéma 16). Mnoho rozborů vedlo k závěru, že tato reakce probíhá radikálově²⁷. Homolytickým štěpením vazby Co-C vzniká radikál adenosylu, na který se může navázat atom vodíku z uhlíku C₁. Po migraci R-zbytku na sousední atom uhlíku obdrží nově vytvořený radikál C₂ opět atom vodíku z methyladenosylu, přičemž dochází k regeneraci radikálu CH₂-adenosylu (CH₂Ad, viz. obr. 15). Radikál kobaltu zde má funkci tzv. „stand by“²⁶.

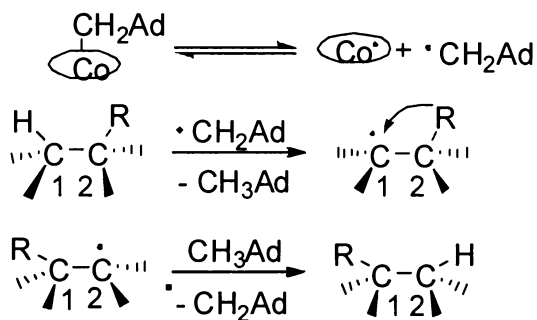
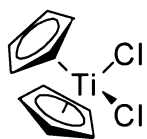


Schéma 16 Koenzymem B₁₂ katalyzovaný [1,2]-přesmyk

Methylkobalamin se podílí na biosyntéze aminokyseliny methioninu, potřebného při biosyntéze červených krvinek. Je důležitý i pro některé bakterie, kde se účastní biomethylace iontů kovu (schéma 17). Jedná se především o biomethylaci rtuti, ve formě Hg²⁺, kdy se vytváří stabilní, ve vodě rozpustný kation methylrtuti [H₃C-Hg]⁺, který je schopný překonat hematoencefalickou bariéru a způsobit tak těžké poškození nervů. Je pozoruhodné, že bakterie si v průběhu evoluce vytvořily detoxikační mechanismus proti těmto kationům rtuti²⁸. Tyto organismy, které obsahují rtuťové lyázy (peptidy obsahující cystein), dovedou rozštěpit vazbu rtuť-uhlík.

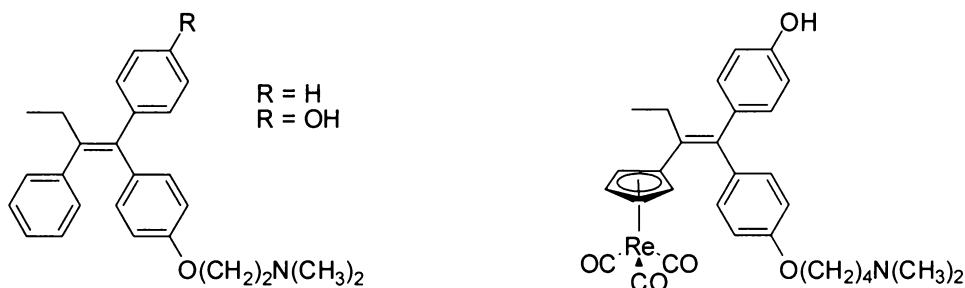
Patří sem například komplex Cp_2TiCl_2 (obr. 17), který je účinný proti mnoha karcinomům



Obr. 17 Struktura komplexu Cp_2TiCl_2

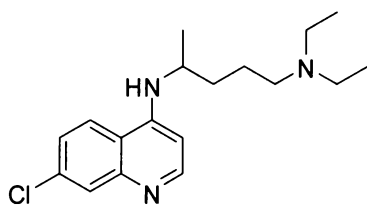
a nachází se ve fázi klinického testování. V terapii karcinomu prsu, nejčastějšího druhu rakoviny u žen, se jako velmi aktivní ukázala sloučenina obsahující komplex $\text{CpRe}(\text{CO})_3$. Tento komplex, cyklopentadienyl- Re^{I} , nahradil fenylový substituent v tamoxifenu, v dnešní době nejrozšířenějším prostředku proti rakovině prsu. Tento přístup založený na modifikaci známých bioligandů

(tamoxifen, chloroquin) je slibným prostředkem, který může vést k optimalizaci účinků těchto komplexů (obr. 18).



Antiestrogen tamoxifen ($\text{R} = \text{H}$)
Aktivní metabolit hydroxy tamoxifen ($\text{R} = \text{OH}$)

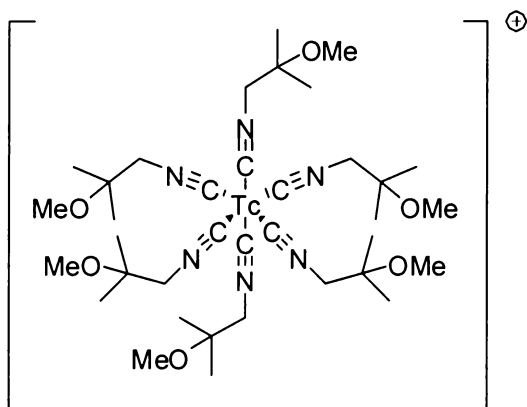
Cytostatikum



Chemická struktura chloroquinu

Obr. 18 Struktura známých bioligandů a modifikace tamoxifenu

Do této skupiny organometalických sloučenin patří i komplexy radioaktivního technecia a rhenia, které jsou využívány jako diagnostika ($^{99\text{m}}\text{Tc}$) a terapeutika (^{186}Re a ^{188}Re) v oblasti radiofarmacie. Ta zaznamenala největší rozvoj během posledních let. Jako příklad lze uvést komplex hexakis(alkylisokyanidu) technecia, komerčně dostupného jako Cardiolit, který je vhodný pro diagnostiku srdce (obr. 19)²⁵. Technecium je vůbec nejčastěji využívaný radioaktivní prvek v nukleární diagnostice díky svému krátkému poločasu rozpadu ($t_{1/2} = 6\text{h}$).



Obr. 19 Struktura komerčně dostupného diagnostika Cardiolit

2.3.3 Organometalické sloučeniny jako katalyzátory

Mimořádná schopnost organometalických sloučenin katalyzovat širokou škálu chemických reakcí nebyla dosud v biochemii úspěšně využita. Praktické použití těchto katalyzátorů je často limitováno jejich citlivostí na přítomnost molekulárního kyslíku a vlhkosti, a katalýza tedy musí téměř vždy probíhat v inertní atmosféře. Přesto jsou již v dnešní době známy katalyzátory, které umožňují vznik vazby C-C za aerobních podmínek. Patří sem například některé reakce katalyzované komplexy Cu, Pd, Rh nebo Ru³⁰. Navržení efektivních katalyzátorů, které by pracovaly za fyziologických podmínek, zůstává stále výzvou pro další výzkum. První krok v této oblasti nedávno provedli Meggers a Streu, kteří poukázali na schopnost katalyzátoru komplexu ruthenia Cp^{*}Ru(cod)Cl katalyzovat štěpení allylkarbamátů na příslušné aminy za aerobních fyziologických podmínek v živých savčích buňkách³¹.

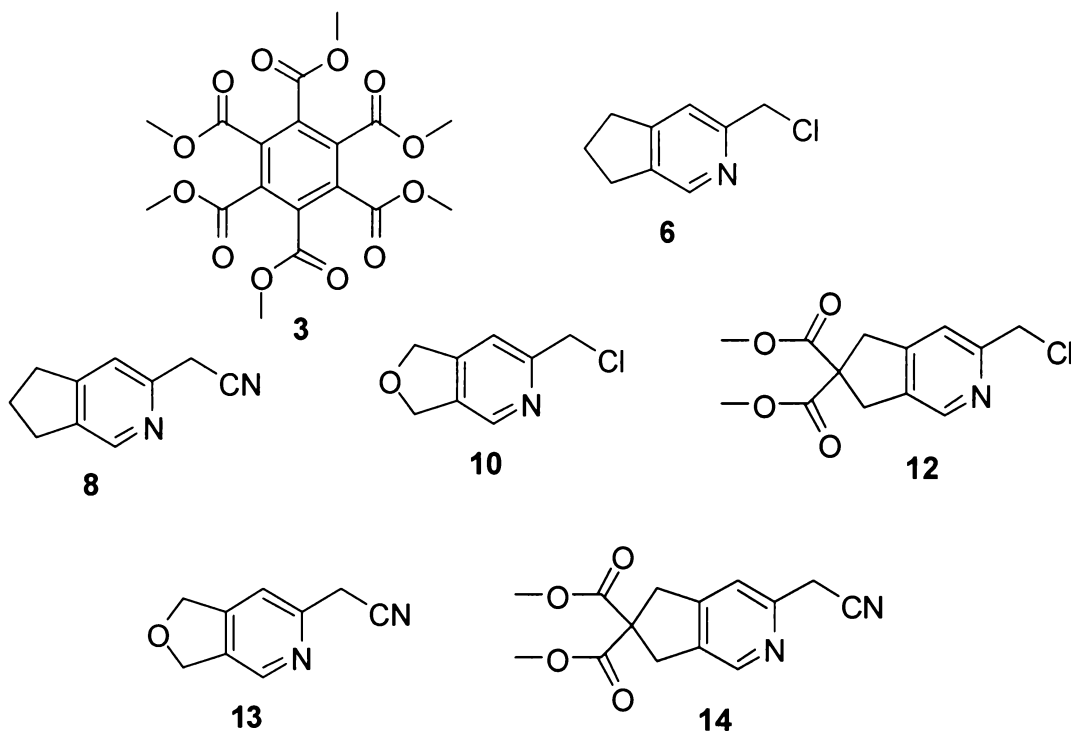
3. Cíl práce

Tato práce je součástí projektu, který se zabývá vznikem vazeb C-C pomocí katalýzy organokovy za aerobních podmínek.

Cílem této diplomové práce je nalézt [2+2+2] cykloadiční reakce, které by tolerovaly přítomnost vzduchu a vlhkosti. Hledání bylo zaměřeno na reakce, které byly popsány v inertní atmosféře^{23,32} a jejichž produkty jsou především deriváty pyridinu, protože právě pyridinová jednotka je často součástí biologicky aktivních sloučenin.

Mezi [2+2+2] cykloadiční reakce, které budou testovány patří syntéza:

- Hexamethyl benzen-1,2,3,4,5,6-hexakarboxylátu [3]
- 3-(Chloromethyl)-6,7-dihydro-5H-cyklopenta[c]pyridinu [6]
- 2-(6,7-Dihydro-5H-cyklopenta[c]pyridin-3-yl)acetonitrilu [8]
- 6-(Chloromethyl)-1,3-dihydrofuro[3,4-c]pyridinu [10]
- Dimethyl 3-(chloromethyl)-5H-cyklopenta[c]pyridin-6,6(7H)-dikarboxylátu [12]
- 2-(1,3-Dihydrofuro[3,4-c]pyridin-6-yl)acetonitrilu [13]
- Dimethyl 3-(kyanomethyl)-5H-cyklopenta[c]pyridin-6,6(7H)-dikarboxylátu [14]



S nadějnými kandidáty bude testována uskutečnitelnost [2+2+2] cykloadiční reakce ve vodném aerobním prostředí či ve vodném aerobním biomédium.

4. Výsledky a diskuse

4.1 Syntéza Hexamethyl benzen-1,2,3,4,5,6-hexakarboxylátu [3]

Jednou z reakcí, která byla testována v naší laboratoři, byla syntéza hexamethylesteru kyseliny mellitové **3** [2+2+2] cykloadicí komerčně dostupného acetylendikarboxylátu **2** v 1,2-dichloroethanu pomocí katalytického množství (1 mol %) komplexu $\text{Cp}^*\text{Ru}(\text{cod})\text{Cl}$ **1** při laboratorní teplotě (schéma 19). Ukázali jsme, že tato reakce popsaná v inertním prostředí za vyloučení vlhkosti³² probíhá se srovnatelným výtěžkem i v přítomnosti vzduchu a vlhkosti. Tak bylo po dvou hodinách při laboratorní teplotě izolováno 91 % produktu **3**. Tento výtěžek je srovnatelný s publikovanými 88 % při provedení reakce v nepřítomnosti vzduchu a vlhkosti.

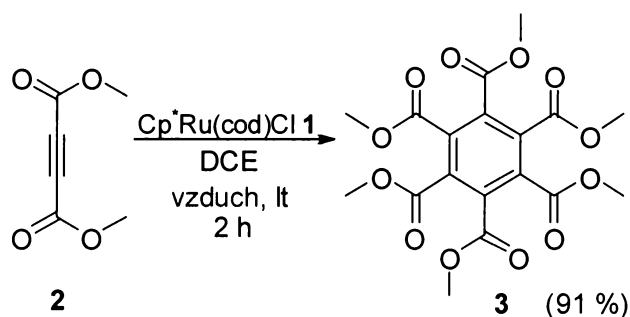


Schéma 19 Syntéza hexamethylesteru kyseliny mellitové za aerobních podmínek

Dále bylo zjištěno, že reakce probíhá v přítomnosti vzduchu, i když je 1,2-dichloroethan zcela nahrazen vodou (schéma 20). Po pěti a půl hodině s 1 molárním procentem katalyzátoru **1** bylo izolováno 76 % produktu **3**.

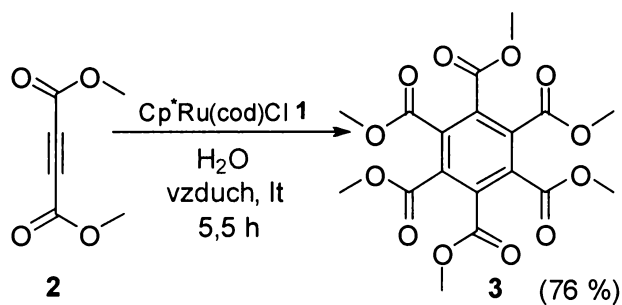


Schéma 20 Syntéza hexamethylesteru kyseliny mellitové ve vodě za aerobních podmínek

Tyto experimenty ukazují, že uvedené reakce dobře tolerují přítomnost vody i vzduchu. Testovali jsme proto možnost provedení této reakce v přítomnosti modelového biologického média za aerobních podmínek (schéma 21). Podmínky a výsledky těchto testovacích reakcí jsou shrnuty v tabulce 1.

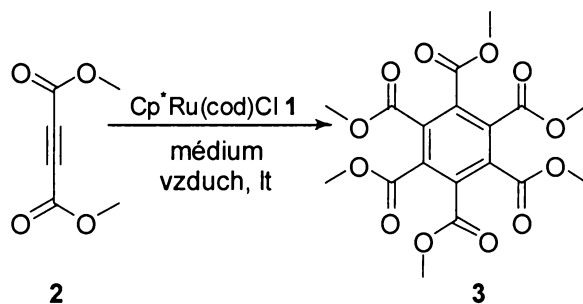


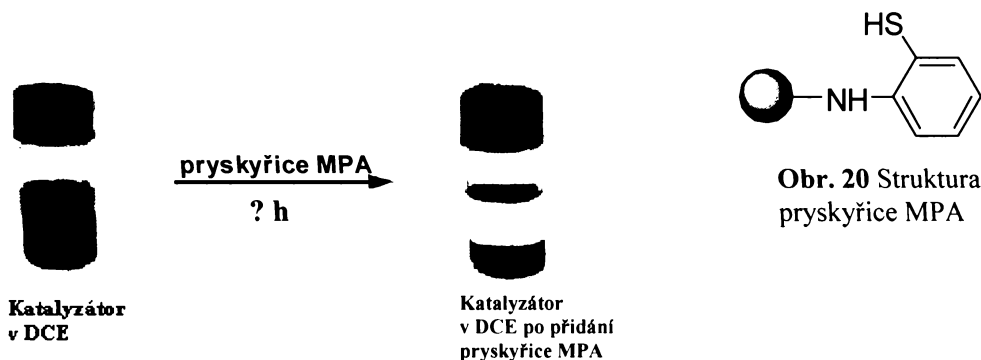
Schéma 21 Syntéza hexamethylesteru kyseliny mellitové v biologických médiích za aerobních podmínek

č. reakce	Katalyzátor (mol%)	Čas (h)	Médium	Výtěžek (%)
1	6	2	<i>E. coli</i> buněčný extrakt	84
2	0	20	<i>E. coli</i> buněčný extrakt	0

Tabulka 1 Podmínky a výsledky úvodních testovacích reakcí v modelovém biologickém médiu za aerobních podmínek

U reakce provedené v extraktu *E. coli* bylo po 2 hodinách v přítomnosti 6 mol % katalyzátoru **1** izolováno 84 % produktu **3**. Kontrolní experiment provedený v extraktu *E. coli* bez přítomnosti katalyzátoru **1** vyloučil katalytickou aktivitu tohoto biomédia při [2+2+2] cykloadici.

Vzhledem k možnému průběhu reakce během extrakce reakční směsi byl hledán vhodný inhibitor pro použitý katalyzátor, aby došlo k jeho deaktivaci ještě před zpracováním reakce. Jako inhibitory katalytické reakce byly vybrány pryskyřice na bázi funkcionalizovaného polystyrenu (QuadraPure™). Vhodným inhibitorem pro použitý katalyzátor je pryskyřice MPA (obr. 20). Čas potřebný k deaktivaci katalyzátoru pryskyřicí byl stanovován experimentálně pomocí metody popsané v následujícím odstavci (obr.21).



Obr. 21 Experimentální stanovení doby potřebné k deaktivaci katalyzátoru $\text{Cp}^*\text{Ru}(\text{cod})\text{Cl}$ při [2+2+2] cykloadici

K nabobtnané pryskyřici v DCE byl přidán katalyzátor **1** a směs byla míchána po dobu uvedenou v tabulce 2 (Čas 1). Poté byl přidán substrát **2** a po 2 hodinách, kdy reakce byla ukončena, byla zjištěna konverze výchozího substrátu. Na základě množství izolovaného produktu reakce bylo usouzeno, že 3 hodiny inkubace katalyzátoru s pryskyřicí by měly být dostačující k jeho podstatné deaktivaci. Experimenty byly prováděny s 10-ti násobným přebytkem pryskyřice (10g pryskyřice na 1,5 mmol kovu) než je v katalogu uváděné množství. Tento přebytek byl použit i v dalších experimentech prováděných v biologických médiích.

č. reakce	Katalyzátor (mol%)	Čas 1 (h) ^[a]	Čas 2 (h) ^[b]	Médium	Výtěžek (%)
1	1	0.5	2	DCE	53
2	1	2	2	DCE	22

[a] Reakční čas směsi bez výchozího alkylnu **2**. [b] Čas od přidání alkylnu **2**.

Tabulka 2 Výsledky stanovení doby potřebné k deaktivaci katalyzátoru $\text{Cp}^*\text{Ru}(\text{cod})\text{Cl}$

Po nalezení inhibitoru reakce a stanovení času potřebného k deaktivaci katalyzátoru byl tento postup aplikován v experimentech testujících schůdnost reakce v přítomnosti

biologických médií, kdy po konverzi výchozího substrátu byla k reakční směsi přidána pryskyřice a po uplynutí 3 hodin byla reakce teprve zpracována (schéma 22). V případě reakce provedené v extraktu *E. coli* bylo získáno 75 % látky **3** (reakce č.1). V obohaceném syntetickém médiu vhodném k rychlé proliferaci buněčných kultur (IMDM + 10% FBS + gln) bylo po 6 hodinách a 30 minutách izolováno 53 % produktu (reakce č.2) a po 24 hodinách 63 % produktu (reakce č.3). Výtěžek reakce provedené ve fetálním hovězím séru byl 52 % (reakce č.4). Výsledky s použitím pryskyřice MPA potvrzují, že [2+2+2] cykloadice probíhá v biologickém médiu a ne až při zpracování reakční směsi (tabulka 3).

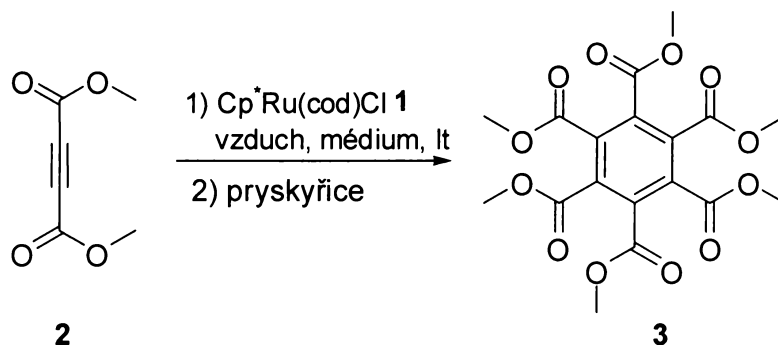


Schéma 22 Syntéza hexamethylesteru kyseliny mellitové v biologických médiích za aerobních podmínek

č. reakce	Katalyzátor (mol%)	Čas (h) ^[a]	Médium	Výtěžek (%)
1	5	6.5	<i>E. coli</i> buněčný extrakt	75
2	6	6.5	IMDM+10% FBS+gln	53
3	5	24	IMDM+10% FBS+gln	63
4	5	26	fetální hovězí sérum	52

[a] Celkový reakční čas = čas míchání reakční směsi bez pryskyřice + 3 h s pryskyřicí

Tabulka 3 Podmínky a výsledky testovacích reakcí v biologických médiích za aerobních podmínek

Na základě diskutovaných výsledků lze prohlásit, že tuto [2+2+2] cykloadiční reakci lze provést v přítomnosti vzduchu a v biologických médiích. Dále byla testována možnost využití [2+2+2] cykloadiční reakce při přípravě derivátů pyridinu. Cykloadiční reakce byly nejdříve prováděny v organickém rozpouštědle za přítomnosti vzduchu, kdy byly zkoumány různé kombinace výchozích substrátů. Tyto syntézy, jejichž průběh byl testován za aerobních podmínek, byly již dříve popsány skupinou Y. Yamamota, která tyto reakce prováděla výhradně v inertní atmosféře²³.

4.2 Syntéza 3-(Chloromethyl)-6,7-dihydro-5H-cyklopenta[c]pyridinu [6]

Výchozí substráty 1,6-heptadiyn **4** a chloroacetonitril **5** byly podrobeny [2+2+2] cykloadici působením katalytického množství $\text{Cp}^*\text{Ru}(\text{cod})\text{Cl}$ **1** (2 mol %) v 1,2-dichloroethanu za aerobních podmínek (schéma 23). Chloromethylpyridin **6** byl izolován ve výtěžku 25 %. Tento výtěžek je poměrně malý ve srovnání s výtěžkem publikovaným v inertní atmosféře, kdy bylo získáno 81 % látky **6**. Proto průběh této reakce v jiných médiích nebyl dále zkoušen.

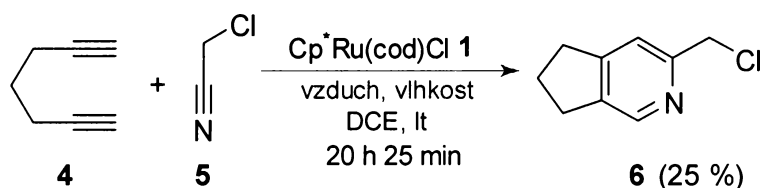


Schéma 23 [2+2+2] Cykloadice 1,6-heptadiynu a chloroacetonitrilu za aerobních podmínek

4.3 Syntéza 2-(6,7-Dihydro-5H-cyklopenta[c]pyridin-3-yl)acetonitrilu [8]

V další [2+2+2] cykloadiční reakci za použití katalyzátoru **1** (2 mol %) byl diyn **4** podroben reakci s malonitrilem **7** (schéma 24). Za stejných podmínek jako v předchozím experimentu (schéma 23) bylo izolováno 28 % kyanomethylpyridinu **8**.

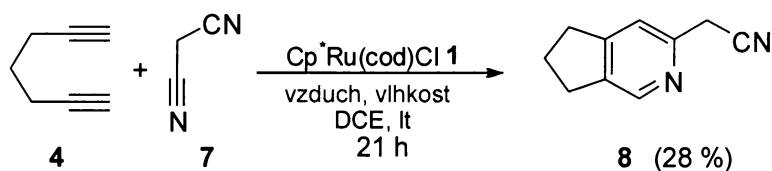


Schéma 24 [2+2+2] Cykloadice 1,6-heptadiynu a malonitrilu za aerobních podmínek

Vzhledem k předchozím dvěma izolovaným výtěžkům byla v dalších reakcích zkoušena reaktivita nitrilů **5** a **7** s různými diyny. Snahou bylo nalézt vhodný diyn, jehož konverze by byla vyšší.

4.4 Syntéza 6-(Chloromethyl)-1,3-dihydrofuro[3,4-c]pyridinu [10]

V této syntéze byl jako výchozí diyn použit komerčně dostupný propargylether **9**, který byl společně s nitrilovým substrátem **5** podroben cykloadici působením katalytického množství $\text{Cp}^*\text{Ru}(\text{cod})\text{Cl}$ **1** (2 mol %) v 1,2-dichloroethanu v přítomnosti vzduchu (schéma 25). V tomto případě byla cílová látka **10** získána ve výtěžku 37 %. Záměna diynového substrátu vedla ke zvýšení výtěžku téměř o 10 %.

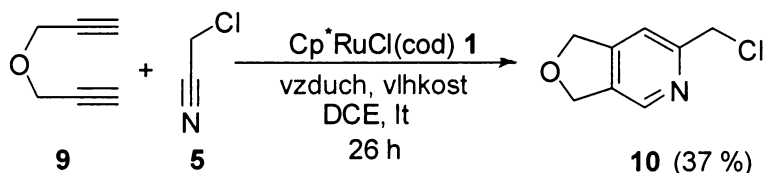
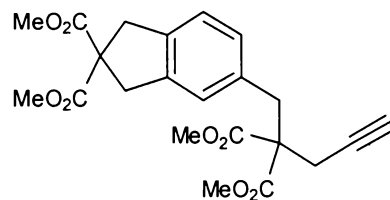


Schéma 25 [2+2+2] Cykloadice propargyletheru a chloroacetonitrilu za aerobních podmínek

4.5 Syntéza Dimethyl 3-(chloromethyl)-5H-cyklopenta[c]pyridin-6,6(7H)-dikarboxylátu [12]

V případě syntézy látky **12** byl příslušný nitrilový substrát **5** podroben cykloadici s dimethyldipropargylmalonátem **11** působením katalytického množství $\text{Cp}^*\text{Ru}(\text{cod})\text{Cl}$ **1** (5 mol %) (schéma 26). Reakce byla nejdříve provedena v organickém rozpouštědle (DCE), kdy bylo izolováno 61 % chloromethylpyridinu **12**. Na základě uspokojivého výtěžku byla reakce následně zkoušena ve vodě, kdy bylo získáno 42 % látky **12**. Během reakce byl pozorován vznik dimeru výchozího diynového substrátu **11** (obr. 22), který byl následně izolován ve 14 % výtěžku.



Obr. 22 Struktura dimeru vzniklého ze substrátu **11**

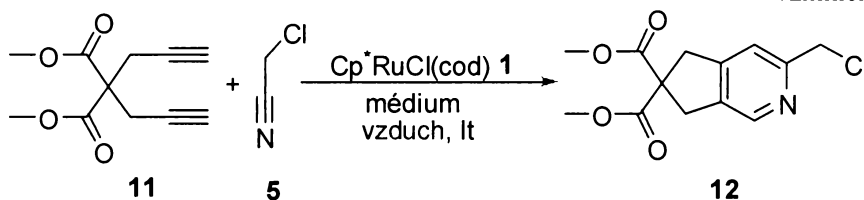


Schéma 26 [2+2+2] Cykloadice dimethyldipropargylmalonátu a chloroacetonitrilu za aerobních podmínek

4.6 Syntéza 2-(1,3-Dihydrofuro[3,4-c]pyridin-6-yl)acetonitrilu [13]

Nejlepší kombinací substrátů v této sérii testovacích reakcí se ukázal být pár propargylether **9** a malononitril **7** (schéma 27). Po 17 hodinách bylo z [2+2+2] cykloadiční reakce provedené v DCE v přítomnosti katalytického množství $\text{Cp}^*\text{Ru}(\text{cod})\text{Cl}$ **1** (2 mol %) izolováno 80 % látky **13**. Proto byla tato reakce vybrána pro screening v dalších médiích. Výsledky a podmínky těchto experimentů jsou shrnuty v tabulce 4.

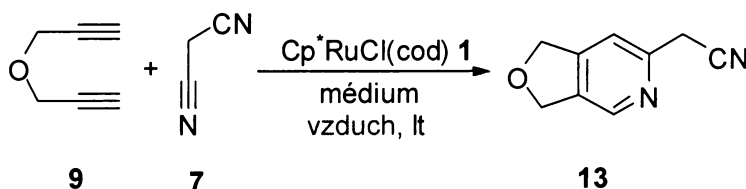


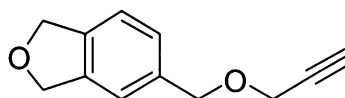
Schéma 27 [2+2+2] Cykloadice propargyletheru a malononitrilu za aerobních podmínek

č. reakce	Katalyzátor (mol%)	Čas (h)	Médium	Výtěžek (%)
1	2	17	DCE	80
2	2	3	DCE	66
3	2	3	DCE/H ₂ O	29
4	2	5.5	DCE/TFA	12
5	2	5.25	DCE/DBU	57
6	2	28.5	H ₂ O	23
7	2	3	fetální hovězí sérum	27
8	5	3	fetální hovězí sérum	20
9	5	5	<i>E.coli</i> buněčný extrakt	29

Tabulka 4 Výsledky a podmínky screeningu [2+2+2] cykloadice propargyletheru a malononitrilu za aerobních podmínek

V případě DCE bylo po 3 hodinách izolováno 66 % produktu **13** (reakce č.2) a při provedení reakce ve směsi DCE/H₂O (1:1) bylo získáno 29 % látky **13** (reakce č.3). Tento pokles je srovnatelný s výtěžky získanými v biologických médiích, kde ani použití většího množství katalyzátoru $\text{Cp}^*\text{Ru}(\text{cod})\text{Cl}$ **1** nevedlo ke zvýšení výtěžku produktu **13**. To je dokumentováno na příkladě reakce provedené ve fetálním hovězím séru (FBS), kdy v přítomnosti 2 mol % katalyzátoru **1** bylo izolováno po 3 hodinách 27 % produktu **13** (reakce č.7) a v přítomnosti 5 mol % katalyzátoru **1** bylo izolováno po 3 hodinách 20 % tohoto produktu (reakce č.8). Zároveň byl průběh této reakce testován v bazickém prostředí směsi DCE/DBU (2:5), kdy bylo izolováno 57 % látky **13** (reakce č.5), a v prostředí kyselém ve směsi DCE/TFA (2:5), kdy byla látka **13** získána ve výtěžku 12 % (reakce č.4). Během reakce

provedené ve vodě byl pozorován vznik dimeru výchozího diynového substrátu **9** (obr. 23), kdy bylo izolováno 11 % tohoto dimeru a 23 % produktu **13** (reakce č.6). V extraktu *E. coli* bylo izolováno 29 % látky **13** (reakce č.9).



Obr. 23 Struktura dimeru vzniklého ze substrátu **9**

4.7 Syntéza Dimethyl 3-(kyanomethyl)-5H-cyklopenta[c]pyridin-6,6(7H)-dikarboxylátu [14]

Současně byl proveden screening u další reakce. Výchozími substráty syntézy látky **14** byly dimethyldipropargylmalonát **11** a malononitril **7** (schéma 28). Výsledky jsou uvedeny v tabulce 5.

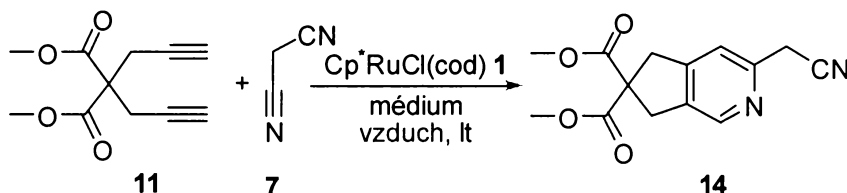


Schéma 28 [2+2+2] Cykloadice dimethyldipropargylmalonátu a malononitrilu za aerobních podmínek

č. reakce	Katalyzátor (mol%)	Čas (h)	Médium	Výtěžek (%)
1	5	33	DCE	70
2	2	22	DCE	51
3	5	22	DCE/H ₂ O	82
4	5	20	H ₂ O	46
5	5	3.5	fetální hovězí sérum	27
6	5	21	fetální hovězí sérum	20
7	5	23	fetální hovězí sérum	32
8	5	21	<i>E.coli</i> buněčný extrakt	39

Tabulka 5 Výsledky a podmínky screeningu [2+2+2] cykloadice dimethyldipropargylmalonátu a malononitrilu za aerobních podmínek

Screening u této reakce byl proveden v přítomnosti 5 mol % katalyzátoru **1**. Při srovnání experimentu provedeného v DCE (reakce č.1) a v přítomnosti samotné vody (reakce č.4) je snížení výtěžku nižší, než u předchozí kombinace substrátů (schéma 27, tabulka 4). V experimentu s použitím vody jako reakčního média (reakce č.4) nebyl pozorován vznik dimeru výchozího diynového substrátu **11** (obr. 22). V biologických médiích jsou výtěžky srovnatelné s předchozí reakcí (**9+7**→**13**). Reakce č.2 byla provedena za stejných podmínek jako reakce publikovaná²³ z důvodu porovnání výtěžku získaného za aerobních podmínek s výtěžkem publikovaným v inertní atmosféře, kdy publikovaný výtěžek byl 92 %.

Je pozoruhodné, že malé koncentrace $\text{Cp}^*\text{Ru}(\text{cod})\text{Cl}$ **1**, neovlivní viabilitu buněk, jak je patrné z práce Meggerse a Streue³¹. Proto je vhodné pokračovat v tomto výzkumu a najít další katalyzátory a procesy, které by byly podobně, jako tyto reakce a reakce popisované v této diplomové práci, kompatibilní s aerobní biomotou. Takové procesy by mohly poskytnout cestu k přípravě biologicky účinných látek (například farmak účinných v nanomolárních koncentracích) nebo látek pro diagnostiku přímo v živém organismu. Je třeba poznamenat, že reakce popisované v této diplomové práci byly prováděny za podmínek, kdy docházelo pouze k nedokonalému rozpuštění katalyzátoru, výchozích látek a produktu ve zkoumaných biomédiích. To by mohlo být hlavním důvodem nižších izolovaných výtěžků. Dosažením lepší rozpustnosti, například přidáním kosolventu nebo aditiva podporujícího rozpustnost, by bylo možné docílit zvýšení výtěžků zkoumaných reakcí.

5. Závěr

Bylo zjištěno, že [2+2+2] cykloadiční reakce katalyzované komplexem ruthenia $Cp^*Ru(cod)Cl$ vedoucí k přípravě sloučenin **3**, **6**, **8**, **10**, **12**, **13** a **14**, je možné provést za aerobních podmínek. Ačkoli výtěžky jsou nižší ve srovnání s publikovanými výtěžky za použití inertní atmosféry, výsledky ukazují, že inertní atmosféra není nezbytná pro průběh [2+2+2] cykloadičních reakcí. Tyto reakce lze tedy provést za podmínek aerobních, kterým dříve nebyla věnována pozornost.

Jednotlivé cykloadice byly nejdříve prováděny v organickém rozpouštědle za přítomnosti vzduchu. U látek, které poskytly nejvyšší izolované výtěžky (**3**, **13**, **14**), bylo provedeno testování schůdnosti reakce ve vodných médiích za aerobních podmínek. Jmenovitě byla testována deionizovaná voda a biologická média jako fetální hovězí sérum (FBS), extrakt *E.coli* a obohacené syntetické médium vhodné k rychlé proliferaci buněčných kultur (IMDM + 10% FBS + gln). Látky **3**, **13** a **14** tak byly úspěšně připraveny v biologických médiích za aerobních podmínek, což je důkazem toho, že příprava aromatických kruhů pomocí organometalické katalýzy je možná v biologickém médiu za přítomnosti vzduchu.

Takový experimentální důkaz slibuje možnost provádět reakce za přítomnosti katalyzátoru v aerobních buněčných systémech. [2+2+2] Cykloadiční reakce by se tak mohly stát užitečným nástrojem využívaným v bioorganometalické chemii a v chemické biologii.

6. Experimentální část

6.1 Obecné informace

Průběh reakcí byl sledován pomocí TLC na silikagelových deskách typu Silica gel 60 F₂₅₄ od firmy Merck. Jako vyvíjecí soustavy byly použity tyto směsi rozpouštědel (jedná se o objemové poměry):

Soustava S₁: petrolether-ethylacetát 1:1

Soustava S₂: hexan-ethylacetát 1:1

Soustava S₃: petrolether-ethylacetát 9:1

Soustava S₄: petrolether-ethylacetát 2:1

K detekci látek na TLC byla použita UV lampa 254/365 nm typu Spectroline[®] Model ENF-240C/FE. K vizualizaci byla použita soustava KMnO₄ (1%) + Na₂CO₃ (2%).

Sloupcové chromatografie byly prováděny na silikagelu typu Silica gel 60 (40-63 μm) od firmy Fluka, ve dvou případech byla chromatografie provedena na přístroji Teledyne Isco CombiFlash[®] Companion[®].

NMR spektra byla měřena na spektrometru Bruker Avance I[™] 400 MHz, Bruker Avance I[™] 500 MHz nebo Bruker Avance II[™] 600 MHz. Jako rozpouštědlo byl používán CDCl₃. Chemické posuny (δ-stupnice) byly referencovány na vnitřní singlet standardu tetramethylsilanu při δ = 0.00 ppm pro ¹H NMR, resp. na triplet rozpouštědla při δ = 77.00 ppm pro ¹³C NMR.

IR spektra byla měřena v CCl₄, CHCl₃ nebo KBr tabletě na přístroji Bruker Equinox 55.

HRMS spektra byla získána EI, ESI nebo FAB technikou na spektrometru ZAB-EQ (VG Analytical) nebo Q-Tof micro (Waters).

Použité chemikálie byly získány od firem Fluka, Aldrich, Penta a Strem. Dimethyldipropargylmalonát **11** byl připraven v naší laboratoři na základě publikovaného postupu³³. Biologická média poskytl Dr. J. Konvalinka a M. Kožíšek z ÚOCHB AV ČR. **Escherichia coli extrakt:** Bakterie *Escherichia coli* DH5α, předem transformované plazmidem pET24a (Novagen, kat.č.69749-3) byly rozrůstány v LB broth médiu (Sigma, L3022) obsahujícím antibiotikum kanamycin (40 μg/ml, Fluka 60615). 40 ml LB média bylo očkováno 4 μl bakteriální kultury a poté inkubováno při 37°C přes noc. Narostlá kultura byla odstředěna při 3500g po dobu 15 min a bakteriální peleta byla rozsuspendována v 10 ml PBS

a sonikována (6 x 1 min, v 3 minutových intervalech). Suspenze bakteriální lyzáty byla odstředěna při 10000g po dobu 30 min a teplotě 4°C, nerozpuštěná peleta odstraněna a získaný supernatant zamražen na -20°C. Před experimentem byl bakteriální lyzát rozmražen ve vodní lázni při 30°C. **FBS (fetal bovine serum):** Bylo zakoupeno u Invitrogen-Gibco (cat. no. 10270-106). Před použitím bylo FBS inkubováno 30 min při 65°C, aby se deaktivovala složka přirozené imunity, komplement. **IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium):** je kompletní kapalně médium. Po přidání 10% FBS a L-glutaminu na výslednou koncentraci 4 mM bylo zamrazeno na -20°C. Před experimentem bylo rozmrazeno ve vodní lázni při 30°C. Jako inhibitor reakce byla použita Reaxa's QuadraPure™ MPA pryskyřice.

Rozpouštědla byla odpařována na rotační vakuové odparce při laboratorní teplotě a tlaku > 4 mbar. Produkty jednotlivých reakcí byly sušeny na vakuu olejové pumpy (200 Pa).

Není-li uvedeno jinak, byla použita deionizovaná voda získaná ze zařízení na úpravu vody na ÚOCHB AV ČR. Deionizace byla provedena pomocí filtrace přes kolony s iontoměničem (Lewatit S100 s katexovým filtrem, Lewatit MP500 s anexovým filtrem) v demineralizační iontostanici typu ID-PP a ID-KP (Kavalier, Votice, ČR).

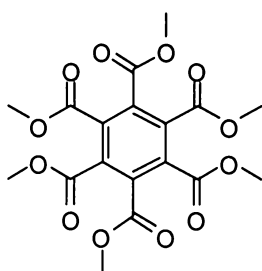
6.2 Pracovní postupy

Syntéza hexamethyl benzen-1,2,3,4,5,6-hexakarboxylátu [3]

Reakce v DCE:

K roztoku katalyzátoru Cp*^{*}Ru(cod)Cl (3,5 mg, 9,2 μmol, 1 mol %) v DCE (3 ml) byl po kapkách za laboratorní teploty přidán dimethyl acetylendikarboxylát **2** (100 μl, 115,6 mg, 0,813 mmol). Po dvou hodinách rychlého míchání za laboratorní teploty byla detekována kompletní konverze výchozí látky a vznik produktu pomocí TLC v soustavě S₁. Těkavé složky směsi byly odpařeny a pevný zbytek byl čištěn chromatograficky na sloupci silikagelu (průměr sloupce 2,5 cm, výška sloupce 6,5 cm, eluent: petrolether-ethylacetát 3:2). Bylo získáno 105 mg látky **3** (91 %, bílá pevná látka). TLC: R_f = 0,18 (SiO₂, hexan-ethylacetát

3:2) ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 3,89 (s, 18H, CH₃). ¹³C-NMR (100,6 MHz, CDCl₃): δ 53,48 (CH₃), 133,90 (C_{arom}), 165,13 (C=O). IR (CCl₄): ν̄ (cm⁻¹) 3031 (w, CH₃), 3003 (w, CH₃), 2953 (w, CH₃), 1748 (vs, C=O), 1572 (vw, ring), 1443 (s, CH₃), 1412 (w), 1356 (w), 1327 (m), 1250 (s), 1225 (s, C-O), 1183 (m), 1157 (w), 1117 (w), 997 (w,



C–O), 988 (w,sh C–O). HRMS (FAB) m/z: [M+H⁺] (C₁₈H₁₉O₁₂⁺): vypočtená 427,0868, naměřená 427,0877.

Reakce v H₂O:

K suspenzi katalyzátoru Cp^{*}Ru(cod)Cl (3,5 mg, 9,2 μmol, 1 mol%) v deionizované vodě (2 ml) byl po kapkách za laboratorní teploty přidán dimethyl acetylendikarboxylát **2** (100 μl, 115,6 mg, 0,813 mmol). Vznik produktu a kompletní konverze výchozí látky byla detekována pomocí TLC v soustavě S₁. Poté byla reakční směs naředěna deionizovanou vodou (4 ml) a extrahována CH₂Cl₂ (5×5 ml). Organické fáze byly spojeny a vysušeny bezvodým Na₂SO₄. Sušidlo bylo odfiltrováno a těkavé složky byly odpařeny. Pevný zbytek byl čištěn chromatograficky na sloupci silikagelu (průměr sloupce 2,5 cm, výška sloupce 7 cm, eluent: hexan-ethylacetát 3:2). Bylo získáno 88,3 mg látky **3** (76 %, bílá pevná látka).

Reakce v extraktu E.coli:

K suspenzi katalyzátoru Cp^{*}Ru(cod)Cl (18,4 mg, 48,4 μmol, 6 mol %) v 4% *E. Coli* DH5α lyzátu (2 ml) byl po kapkách za laboratorní teploty přidán dimethyl acetylendikarboxylát **2** (100 μl, 115,6 mg, 0,813 mmol). Průběh reakce byl sledován pomocí TLC v soustavě S₂. Reakční směs byla naředěna deionizovanou vodou (10 ml) a extrahována CH₂Cl₂ (4×5 ml). Organické fáze byly spojeny a vysušeny bezvodým Na₂SO₄. Sušidlo bylo odfiltrováno a těkavé složky byly odpařeny. Pevný zbytek byl čištěn chromatograficky na sloupci silikagelu (průměr sloupce 2,5 cm, výška sloupce 7 cm, eluent: hexan-ethylacetát 3:2). Bylo získáno 96,6 mg látky **3** (84 %).

Kontrolní pokus v extraktu E.coli:

Reakce byla provedena podle obecného postupu popsaného výše s tím rozdílem, že reakce byla provedena bez přítomnosti katalyzátoru. Vznik produktu nebyl pozorován. Chromatografií bylo získáno 64,4 mg výchozí látky **2** (56 %). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 3,85 (s, 6H). ¹³C NMR (CDCl₃): δ 53,4, 74,6, 152,2.

Stanovení času potřebného k deaktivaci katalyzátoru pryskyřicí:

Experimenty byly provedeny podle následujícího obecného postupu:

Pryskyřice (QuadraPure, 54 mg) byla nechána po dobu 30 minut bobtnat v DCE (2 ml). Poté byl přidán katalyzátor $\text{Cp}^*\text{Ru}(\text{cod})\text{Cl}$ (3,4 mg, 8,95 μmol , 1 mol %) a směs byla míchána po dobu T_1 . Následně byl po kapkách za laboratorní teploty přidán dimethyl acetylendikarboxylát **2** (100 μl , 115,6 mg, 0,813 mmol). Reakční směs byla míchána po dobu T_2 . Vznik produktu byl detekován pomocí TLC v soustavě S_2 . Těkavé složky byly odpařeny a pevný zbytek byl čištěn chromatograficky na sloupci silikagelu (průměr sloupce 2,5 cm, výška sloupce 6 cm, eluent: hexan-ethylacetát 3:2).

1. experiment: $T_1 = 30 \text{ min}$, $T_2 = 2 \text{ h}$, výtěžek 61,8 mg látky **3** (53 %)

2. experiment: $T_1 = 2 \text{ h}$, $T_2 = 2 \text{ h}$, výtěžek 25,6 mg látky **3** (22 %)

Reakce v biologických médiích za použití pryskyřice jako inhibitoru reakce:

Experimenty byly provedeny podle následujícího obecného postupu:

K suspenzi katalyzátoru $\text{Cp}^*\text{Ru}(\text{cod})\text{Cl}$ v biologickém médiu byl po kapkách za laboratorní teploty přidán dimethyl acetylendikarboxylát **2** (100 μl , 115,6 mg, 0,813 mmol). Průběh reakce byl sledován pomocí TLC v soustavě S_2 . K reakční směsi byla přidána pryskyřice (QuadraPure, 270 mg) a reakční směs byla míchána 3 hodiny při laboratorní teplotě. Poté byla reakční směs naředěna deionizovanou vodou (10 ml) a extrahována CH_2Cl_2 (4×5 ml). Organické fáze byly spojeny a vysušeny bezvodým Na_2SO_4 . Sušidlo spolu s pryskyřicí bylo odstraněno filtrací a těkavé složky byly odpařeny. Pevný zbytek byl čištěn chromatograficky na sloupci silikagelu (průměr sloupce 2,5 cm, výška sloupce 6 cm, eluent: hexan-ethylacetát 3:2).

1. experiment:

Byla použita suspenze $\text{Cp}^*\text{Ru}(\text{cod})\text{Cl}$ (17 mg, 44,7 μmol , 5 mol %) v 4% *E. Coli* DH5 α lyzátu (2 ml). Bylo získáno 87 mg látky **3** (75 %).

2. experiment:

Byla použita suspenze $\text{Cp}^*\text{Ru}(\text{cod})\text{Cl}$ (17,1 mg, 45,0 μmol , 6 mol %) v médiu IMDM + 10% FBS + gln (celkový objem 1 ml). Bylo získáno 61,8 mg látky **3** (53 %).

3. experiment:

Byla použita suspenze $\text{Cp}^*\text{Ru}(\text{cod})\text{Cl}$ (17 mg, 44,7 μmol , 5 mol %) v médiu IMDM + 10% FBS + gln (celkový objem 1 ml). Bylo získáno 72,4 mg látky **3** (63 %).

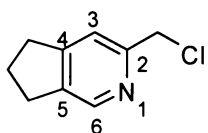
4. experiment:

Byla použita suspenze $\text{Cp}^*\text{Ru}(\text{cod})\text{Cl}$ (17 mg, 44,7 μmol , 5 mol %) ve 100% FBS (1 ml) a reakční směs byla extrahována Et_2O (4×10 ml). Bylo získáno 59,8 mg látky **3** (52 %).

Syntéza 3-(Chloromethyl)-6,7-dihydro-5H-cyklopenta[c]pyridinu [6]

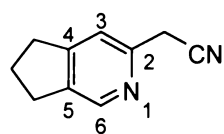
Ke směsi katalyzátoru $\text{Cp}^*\text{Ru}(\text{cod})\text{Cl}$ (5,0 mg, 13 μmol , 2 mol %), DCE (2 ml) a chloroacetonitrilu **5** (57 μl , 68,2 mg, 903 μmol , 1,5 ekv.) byl za míchání při laboratorní teplotě po kapkách přidán během 15 minut roztok 1,6-heptadiynu **4** (69 μl , 55,5 mg, 602 μmol , 1 ekv.) v 1,2-dichloroethanu (4 ml). Průběh reakce byl sledován pomocí TLC v soustavě S_3 . Těkavé složky směsi byly odpařeny a kapalný zbytek byl čištěn chromatograficky na sloupci silikagelu (průměr sloupce 2,5 cm, výška sloupce 8 cm, eluent: petrolether-ethylacetát 9:1). Bylo získáno 24,8 mg látky **6** (25 %, nažloutlý olej).

TLC: $R_f = 0,2$ (SiO_2 , petrolether-ethylacetát 9:1). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) $\delta = 2,13$ (m, 2H, $J = 7,6$ Hz), 2,94 (m, 4H, $J = 7,2$ Hz), 4,66 (s, 2H), 7,34 (s, 1H), 8,41 (s, 1H). ^{13}C NMR (CDCl_3): δ 25,0, 30,0, 32,6, 47,1, 119,1, 139,8, 145,2, 154,0, 155,1. IR (CHCl_3): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) 3100 (w, =CH), 3013 (m, =CH), 2962 (vs, CH_2), 2872 (m, CH_2), 2853 (m, CH_2), 1460 (w, CH_2), 904 (w, cyklopropen), 1609 (s, kruh), 1565 (m, kruh), 1485 (m, kruh), 1393 (m, kruh), 1307 (w), 1295 (w), 1037 (w, =CH), 995 (vw), 694 (m, C–Cl), 1435 (m, CH_2 , $-\text{CH}_2\text{Cl}$). HRMS (EI) m/z : ($\text{C}_9\text{H}_{10}\text{ClN}$): vypočtená 167,0502, naměřená 167,0497.



Syntéza 2-(6,7-Dihydro-5H-cyklopenta[c]pyridin-3-yl)acetonitrilu [8]

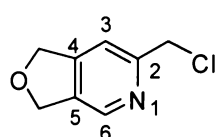
Ke směsi katalyzátoru $\text{Cp}^*\text{Ru}(\text{cod})\text{Cl}$ (4,6 mg, 12 μmol , 2 mol %), DCE (2 ml) a malononitrilu **7** (66,7 mg, 1,01 mmol, 1,7 ekv.) byl za míchání při laboratorní teplotě po kapkách přidán během 18 minut roztok 1,6-heptadiynu **4** (68 μl , 54,7 mg, 594 μmol , 1 ekv.) v 1,2-dichloroethanu (4 ml). Průběh reakce byl sledován pomocí TLC v soustavě S_4 . Těkavé složky směsi byly odpařeny a kapalný zbytek byl čištěn chromatograficky na sloupci silikagelu (průměr sloupce 2,5 cm, výška sloupce 8 cm, eluent: petrolether-ethylacetát 2:1). Bylo získáno 26,7 mg látky **6** (28 %, nažloutlý olej). TLC: $R_f = 0,2$ (SiO_2 , petrolether-ethylacetát 2:1). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) $\delta = 2,14$ (m, 2H, $J = 7,6\text{Hz}$), 2,93 (m, 4H,



$J = 7,2\text{Hz}$), 3,90 (s, 2H), 7,32 (s, 1H), 8,40 (s, 1H). ^{13}C NMR (CDCl_3): δ 25,0, 26,3, 29,9, 32,6, 117,4, 118,4, 139,7, 145,5, 147,7, 155,6. IR (CHCl_3): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) 3101 (vw, =C-H), 2963 (vs, CH_2), 2873 (m, CH_2), 2853 (m, CH_2), 2255 (w, $\text{C}\equiv\text{N}$), 1609 (vs, kruh), 1567 (m, kruh), 1486 (s, kruh), 1460 (w, CH_2), 1413 (s, $-\text{CH}_2-\text{CN}$), 1391 (m, kruh), 1038 (w, =CH). HRMS (EI) m/z : ($\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{N}_2$): vypočtená 158,0844, naměřená 158,0841.

Syntéza 6-(Chloromethyl)-1,3-dihydrofuro[3,4-c]pyridinu [10]

Ke směsi katalyzátoru $\text{Cp}^*\text{Ru}(\text{cod})\text{Cl}$ (4,5 mg, 12 μmol , 2 mol %), DCE (2 ml) a chloroacetonitrilu **5** (57 μl , 68,2 mg, 903 μmol , 1,5 ekv.) byl za míchání při laboratorní teplotě po kapkách přidán během 19 minut roztok propargyletheru **9** (62 μl , 56,7 mg, 602 μmol , 1 ekv.) v 1,2-dichloroethanu (4 ml). Průběh reakce byl sledován pomocí TLC v soustavě S_4 . Těkavé složky směsi byly odpařeny a kapalný zbytek byl čištěn chromatograficky na sloupci silikagelu (průměr sloupce 2,5 cm, výška sloupce 8 cm, eluent: petrolether-ethylacetát 2:1). Bylo získáno 37,2 mg látky **10** (37 %, nažloutlý olej). TLC: $R_f = 0,2$ (SiO_2 , petrolether-ethylacetát 2:1). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) $\delta = 4,71$ (s,



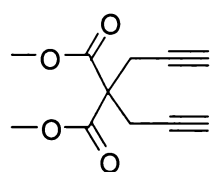
2H), 5,11 (s, 2H), 5,16 (s, 2H), 7,40 (s, 1H), 8,49 (s, 1H). ^{13}C NMR (CDCl_3): δ 46,6, 71,5, 72,8, 115,6, 134,9, 142,3, 150,2, 155,5. IR (CHCl_3): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) 3105 (vw, =CH), 3015 (m, =CH), 1615 (s, kruh), 1574 (m, kruh), 1485 (m, kruh), 1471 (m, kruh), 1462 (w, kruh), 1400 (m, kruh), 1362 (m, kruh), 1309 (m), 1270 (m), 1190 (w), 1118 (w), 1047 (vs, COC), 901 (s, kruh), 832 (m), 2922 (m, CH_2), 2862

(m, CH₂), 695 (m, C–Cl), 2974 (m, CH₂, –CH₂Cl), 1439 (w, CH₂, –CH₂Cl). HRMS (EI) m/z: (C₈H₈ClNO): vypočtená 169,0294, naměřená 169,0292.

Syntéza Dimethyl 3-(chloromethyl)-5H-cyklopenta[c]pyridin-6,6(7H)-dikarboxylátu [12]

Příprava výchozí látky dimethyldipropargylmalonátu 11:

Dimethylmalonát (2.3 g, 2 ml, 17.5 mmol) a uhličitan draselný (5.3 g, 38.5 mmol) byly umístěny do reakční baňky a byl přidán aceton (30 ml) jako rozpouštědlo. Poté byl přidán propargyl bromid jako 80% roztok v toluenu (7.8 ml roztoku, 70.0 mmol bromidu) a směs byla refluxována 65 hodin pod zpětným chladičem. Po zchlazení na laboratorní teplotu byl odpařen aceton, byla přidána voda (30 ml) a směs byla extrahována etherem (2x 200 ml). Organická fáze byla vysušena síranem hořečnatým a po odpaření bylo získáno 3.7 g surového produktu. Byla přidána směs hexan/AcOEt 6:1 (35 ml, 9.4 ml/1 g surového produktu), za horka byla pevná fáze rozpuštěna a po zchlazení v lednici, odsátí, promytí hexanem a vysušení bylo získáno 2.97 g bílé krystalické látky. Filtrát byl odpařen a procedura byla opakována s výsledkem 0.48 g krystalů. Výtěžek po dvou krystalizacích činil 95 % (3.4 g, nažloutlá krystalická látka). TLC: R_f = 0.62 (hexane/AcOEt 50:50, detekce H₂SO₄). ¹H NMR



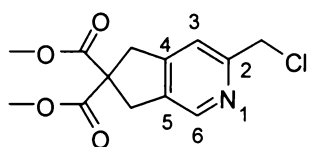
(600 MHz, CDCl₃): 2.05 (t, 2H, ⁴J = 2.7, HC≡C); 3.01 (d, 4H, ⁴J = 2.7, CH₂); 3.77 (s, 6H, CH₃O). ¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃): 22.61 (CH₂); 53.15 (CH₃O); 56.38 (C(COOMe)₂); 71.76 (HC≡C); 78.24 (C≡CH); 169.01 (CO). IR (CHCl₃): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3309 (s, ≡C–H), 3290 (w,sh, ≡C–H),

3032 (w, CH₃), 2956 (w, CH₃), 2845 (w, CH₂), 2125 (vw, C≡CH), 1755 (s,sh, C=O), 1741 (vs, C=O), 1438 (s, CH₃), 1428 (w, CH₂), 1298 (s), 1246 (m, C–O), 1078 (w, C–O), 1059 (m, C–O). MS (FAB) m/z (%): 209 [M+H⁺] (9). HRMS (FAB) m/z: (C₁₁H₁₃O₄): vypočtená 209.0814, naměřená 209.0824.

Reakce v DCE:

Ke směsi katalyzátoru Cp^{*}Ru(cod)Cl (6 mg, 15,8 μmol, 5 mol %), DCE (1 ml) a chloroacetonitrilu **5** (28 μl, 33,5 mg, 440 μmol, 1,5 ekv.) byl za míchání při laboratorní teplotě po kapkách přidán během 17 minut roztok dimethyldipropargylmalonátu **11** (62,6 mg, 300 μmol, 1 ekv.) v DCE (2 ml). Průběh reakce byl sledován pomocí TLC v soustavě S₂. Těkavé složky směsi byly odpařeny a kapalný zbytek byl čištěn chromatograficky na sloupci

silikagelu (průměr sloupce 2,5 cm, výška sloupce 12 cm, eluent: hexan-ethylacetát 3:1). Bylo získáno 51,5 mg látky **12** (61 %, žlutohnědý olej). TLC: $R_f = 0,46$ (SiO_2 , hexan-ethylacetát 1:1). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): 3,649 (bs, 2H, CH_2 -4); 3,653 (bs, 2H, CH_2 -5); 3,78 (s, 6H, CH_3O); 4,71 (bs, 2H, CH_2Cl); 7,42 (bs, 1H, H-3); 8,42 (bs, 1H, H-6). $^{13}\text{C NMR}$ (125,7 MHz, CDCl_3): 38,02 (CH_2 -5); 40,36 (CH_2 -4); 45,84 (CH_2Cl); 53,31 (CH_3O); 60,08 ($\text{C}(\text{COOMe})_2$); 119,30 (CH-3); 136,24 (C-5); 143,90 (CH-6); 152,32 (C-4); 154,54 (C-2); 171,12 (CO). IR (CHCl_3): $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) 1734 (vvs, C=O), 1279 (vs, C–O), 1073 (s), 3030 (m, CH_3), 1448 (m, CH_3), 1436 (s, CH_3 , CH_2 , $-\text{CH}_2\text{Cl}$), 1242 (s, CH_3), 1177 (s, CH_3), 1164 (s, CH_3), 647 (w, OCO), 3102 (w, =CH), 1611 (m, kruh), 1570 (m, kruh), 1487 (m, kruh), 1396 (w, kruh), 696 (w, C–Cl), 2957 (s, CH_2 , CH_3), 2846 (w, CH_2), 1459 (m, CH_2). HRMS (EI) m/z : ($\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{ClNO}_4$): vypočtená 283,0611, naměřená 283,0609.



Reakce v H_2O :

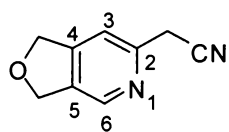
Ke směsi dimethyldipropargylmalonátu **11** (62,8 mg, 302 μmol , 1 ekv.), deionizované vody (1 ml) a chloroacetonitrilu **5** (28 μl , 33,5 mg, 440 μmol , 1,5 ekv.) byl za míchání při laboratorní teplotě přidán katalyzátor $\text{Cp}^*\text{Ru}(\text{cod})\text{Cl}$ (5,8 mg, 15 μmol , 5 mol %). Průběh reakce byl sledován pomocí TLC v soustavě S_2 . Reakční směs byla naředěna deionizovanou vodou (10 ml) a extrahována CH_2Cl_2 (3×4 ml). Organické fáze byly spojeny a vysušeny bezvodým Na_2SO_4 . Sušidlo bylo odfiltrováno a těkavé složky byly odpařeny. Kapalný zbytek byl čištěn CombiFlash chromatografií (hmotnost silikagelu 4 g, eluent: hexan-ethylacetát 1:1). Bylo získáno 35,4 mg látky **12** (42 %, žlutohnědý olej).

Syntéza 2-(1,3-Dihydrofuro[3,4-c]pyridin-6-yl)acetonitrilu [13]

Experimenty byly provedeny podle následujícího obecného postupu:

Ke směsi katalyzátoru $\text{Cp}^*\text{Ru}(\text{cod})\text{Cl}$ (4,5 mg, 12 μmol , 2 mol %), DCE (2 ml) a malononitrilu **7** (68,9 mg, 1,04 mmol, 1,7 ekv.) byl za míchání při laboratorní teplotě po kapkách přidán během 17 minut roztok propargyletheru **9** (62 μl , 56,7 mg, 602 μmol , 1 ekv.) v DCE (4 ml). Průběh reakce byl sledován pomocí TLC v soustavě S_2 . Těkavé složky směsi byly odpařeny a kapalný zbytek byl čištěn chromatograficky na sloupci silikagelu (průměr

sloupce 2,5 cm, výška sloupce 7 cm, eluent: hexan-ethylacetát 1:1). Bylo získáno 77 mg látky **13** (80 %, bílá pevná látka). TLC: $R_f = 0,18$ (SiO₂, hexan-ethylacetát 1:1). ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): 3,98 (s, 2H, CH₂CN); 5,12 (td, 2H, ⁴J = 2,3, 0,8, CH₂-5); 5,16 (m, 2H, CH₂-4);



7,37 (m, 1H, H-3); 8,49 (q, 1H, ⁴J = ⁵J = 0,8, H-6). ¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃): 26,46 (CH₂CN); 71,45 (CH₂-4); 72,72 (CH₂-5); 115,08 (CH-3); 116,98 (CN); 134,93 (C-5); 142,76 (CH-6); 149,17 (C-2); 150,71 (C-4).

IR (CHCl₃): $\tilde{\nu}$ (cm⁻¹) 3105 (vw, =CH), 3022 (s, =CH), 1614 (s, kruh), 1577 (m, kruh), 1485 (m, kruh), 1471 (m, kruh), 1461 (w, kruh), 1397 (s, kruh), 1360 (m, kruh), 1301 (w), 1273 (w), 1188 (w), 1117 (w), 1048 (vs, COC), 901(s, kruh), 828 (w), 2991 (m, CH₂), 2923 (m, CH₂), 2862 (m, CH₂), 2258 (w, C≡N), 1413 (m, CH₂, -CH₂CN), 949 (w, C-C, -CH₂CN). HRMS (EI) m/z: (C₉H₈N₂O): vypočtená 160,0637, naměřená 160,0634.

2. experiment:

Látka byla připravena podle obecného postupu, s tím rozdílem, že ke směsi katalyzátoru Cp^{*}Ru(cod)Cl (5,3 mg, 14 μmol, 2 mol %), DCE (1 ml) a malononitrilu **7** (60 mg, 908 μmol, 1,7 ekv.) byl za míchání při laboratorní teplotě po kapkách přidán během 15 minut propargylether **9** (62 μl, 56,7 mg, 602 μmol, 1 ekv.). Bylo získáno 63,7 mg látky **13** (66 %).

3. experiment:

Látka byla připravena podle obecného postupu, s tím rozdílem, že ke směsi katalyzátoru Cp^{*}Ru(cod)Cl (4,8 mg, 13 μmol, 2 mol %), deionizované vody (1 ml) a malononitrilu **7** (61,2 mg, 926 μmol, 1,5 ekv.) byl za míchání při laboratorní teplotě po kapkách přidán během 15 minut roztok propargyletheru **9** (62 μl, 56,7 mg, 602 μmol, 1 ekv.) v DCE (1 ml). Reakční směs byla naředěna deionizovanou vodou (5 ml) a extrahována Et₂O (4×5 ml). Organické fáze byly spojeny a vysušeny bezvodým Na₂SO₄. Sušidlo bylo odfiltrováno a těkavé složky byly odpařeny. Bylo získáno 27,4 mg látky **13** (29 %).

4. experiment:

Látka byla připravena podle obecného postupu, s tím rozdílem, že ke směsi katalyzátoru Cp^{*}Ru(cod)Cl (5,2 mg, 14 μmol, 2 mol %), DCE/TFA (1 ml, 2:5) a malononitrilu **7** (59,8 mg, 905 μmol, 1,5 ekv.) byl za míchání při laboratorní teplotě po kapkách přidán během 15 minut propargylether **9** (62 μl, 56,7 mg, 602 μmol, 1 ekv.). Bylo získáno 12 mg látky **13** (12 %).

5. experiment:

Látka byla připravena podle obecného postupu, s tím rozdílem, že ke směsi katalyzátoru $\text{Cp}^*\text{Ru}(\text{cod})\text{Cl}$ (4,8 mg, 13 μmol , 2 mol %), DCE/DBU (1 ml, 2:5) a malononitrilu **7** (59,8 mg, 905 μmol , 1,5 ekv.) byl za míchání při laboratorní teplotě po kapkách přidán během 15 minut propargylether **9** (62 μl , 56,7 mg, 602 μmol , 1 ekv.). Bylo získáno 54,6 mg látky **13** (57 %).

6. experiment:

Látka byla připravena podle obecného postupu, s tím rozdílem, že ke směsi katalyzátoru $\text{Cp}^*\text{Ru}(\text{cod})\text{Cl}$ (4,9 mg, 13 μmol , 2 mol %), deionizované vody (1 ml) a malononitrilu **7** (61 mg, 923 μmol , 1,5 ekv.) byl za míchání při laboratorní teplotě po kapkách přidán během 15 minut propargylether **9** (62 μl , 56,7 mg, 602 μmol , 1 ekv.). Reakční směs byla naředěna deionizovanou vodou (10 ml) a extrahována Et_2O (4×5 ml). Organické fáze byly spojeny a vysušeny bezvodým Na_2SO_4 . Sušidlo bylo odfiltrováno a těkavé složky byly odpařeny. Bylo získáno 21,9 mg látky **13** (23 %).

7. experiment:

Látka byla připravena podle obecného postupu, s tím rozdílem, že ke směsi katalyzátoru $\text{Cp}^*\text{Ru}(\text{cod})\text{Cl}$ (4,8 mg, 13 μmol , 2 mol %), 100% FBS (1 ml) a malononitrilu **7** (61,2 mg, 926 μmol , 1,5 ekv.) byl za míchání při laboratorní teplotě po kapkách přidán během 15 minut propargylether **9** (62 μl , 56,7 mg, 602 μmol , 1 ekv.). Reakční směs byla naředěna deionizovanou vodou (10 ml) a extrahována Et_2O (4×5 ml). Organické fáze byly spojeny a vysušeny bezvodým Na_2SO_4 . Sušidlo bylo odfiltrováno a těkavé složky byly odpařeny. Bylo získáno 26,2 mg látky **13** (27 %).

8. experiment:

Látka byla připravena podle obecného postupu, s tím rozdílem, že ke směsi katalyzátoru $\text{Cp}^*\text{Ru}(\text{cod})\text{Cl}$ (11,9 mg, 31 μmol , 5 mol %), 100% FBS (1 ml) a malononitrilu **7** (61,6 mg, 932 μmol , 1,5 ekv.) byl za míchání při laboratorní teplotě po kapkách přidán během 15 minut propargylether **9** (62 μl , 56,7 mg, 602 μmol , 1 ekv.). Reakční směs byla naředěna deionizovanou vodou (10 ml) a extrahována Et_2O (4×5 ml). Organické fáze byly spojeny a vysušeny bezvodým Na_2SO_4 . Sušidlo bylo odfiltrováno a těkavé složky byly odpařeny. Bylo získáno 19,3 mg látky **13** (20 %).

9. experiment:

Látka byla připravena podle obecného postupu, s tím rozdílem, že ke směsi katalyzátoru Cp^{*}Ru(cod)Cl (11,4 mg, 30 μmol, 5 mol %), 4% *E. Coli* DH5α lyzátu (1 ml) a malononitrilu **7** (61,3 mg, 928 μmol, 1,5 ekv.) byl za míchání při laboratorní teplotě po kapkách přidán během 15 minut propargylether **9** (62 μl, 56,7 mg, 602 μmol, 1 ekv.). Reakční směs byla naředěna deionizovanou vodou (10 ml) a extrahována Et₂O (4×5 ml). Organické fáze byly spojeny a vysušeny bezvodým Na₂SO₄. Sušidlo bylo odfiltrováno a těkavé složky byly odpařeny. Bylo získáno 28,3 mg látky **13** (29 %).

Syntéza Dimethyl 3-(kyanomethyl)-5H-cyklopenta[c]pyridin-6,6(7H)-dikarboxylátu [14]

Experimenty byly provedeny podle následujícího obecného postupu:

Ke směsi katalyzátoru Cp^{*}Ru(cod)Cl (5,7 mg, 15 μmol, 5 mol %), DCE (1 ml) a malononitrilu **7** (30,3 mg, 460 μmol, 1,5 ekv.) byl za míchání při laboratorní teplotě po kapkách přidán během 15 minut roztok dimethyldipropargylmalonátu **11** (62,7 mg, 300 μmol, 1 ekv.) v DCE (2 ml). Průběh reakce byl sledován pomocí TLC v soustavě S₂. Těkavé složky směsi byly odpařeny a kapalný zbytek byl čištěn CombiFlash chromatografií (hmotnost silikagelu 4 g, eluent: hexan-ethylacetát 1:1). Bylo získáno 57,8 mg látky **14** (70 %, narůžovělý olej). TLC: R_f = 0,19 (SiO₂, hexan-ethylacetát 1:1) ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃): 3,62 (bs, 2H, CH₂-4); 3,63 (bs, 2H, CH₂-5); 3,78 (s, 6H, CH₃O); 3,90 (bs, 2H, CH₂CN); 7,32 (m, 1H, H-3); 8,41 (q, 1H, ⁴J = ⁵J = 1.0, H-6). ¹³C NMR (151 MHz, CDCl₃): 26,39 (CH₂CN); 34,93 (CH₂-5); 40,20 (CH₂-4); 53,24 (CH₃O); 60,08 (C(COOMe)₂); 117,13 (CN); 118,22 (CH-3); 135,71 (C-5); 145,50 (CH-6); 148,84 (C-2); 151,37 (C-4); 171,20 (CO). IR (CHCl₃): ν (cm⁻¹) 1735 (vs, C=O), 1280 (vs, C–O), 1074 (m), 3025 (m, CH₃), 1448 (m), 1436 (s), 1244 (s, CH₃), 1177 (s, CH₃), 1164 (s, CH₃), 648 (w, OCO), 3106 (w, =CH), 1611 (m, kruh), 1571 (m, kruh), 1487 (m, kruh), 1393 (m, kruh), 2257 (w, C≡N), 1413 (m, CH₂), 2957 (w, CH₂, CH₃), 2846 (w, CH₂), 1459 (m, CH₂). HRMS (ESI) m/z: (C₁₄H₁₅N₂O₄): vypočtená 275,1032, naměřená 275,1022.

2. experiment:

Látka byla připravena podle obecného postupu, s tím rozdílem, že reakce byla provedena v přítomnosti nižšího katalytického množství Cp^{*}Ru(cod)Cl. Ke směsi

katalyzátoru $\text{Cp}^*\text{Ru}(\text{cod})\text{Cl}$ (2,5 mg, 6,6 μmol , 2 mol %), DCE (1 ml) a malononitrilu **7** (30,9 mg, 468 μmol , 1,5 ekv.) byl za míchání při laboratorní teplotě po kapkách přidán během 15 minut roztok dimethyldipropargylmalonátu **11** (64,2 mg, 308 μmol , 1 ekv.) v DCE (2 ml). Bylo získáno 42 mg látky **14** (51 %). Reakce byla provedena za stejných podmínek jako reakce publikovaná z důvodu porovnání výtěžků, kdy publikovaný výtěžek získaný v inertní atmosféře byl 92 %.

3. experiment:

Látka byla připravena podle obecného postupu, s tím rozdílem, že ke směsi katalyzátoru $\text{Cp}^*\text{Ru}(\text{cod})\text{Cl}$ (6,1 mg, 16 μmol , 5 mol %), deionizované vody (1 ml) a malononitrilu **7** (29,9 mg, 453 μmol , 1,5 ekv.) byl za míchání při laboratorní teplotě po kapkách přidán během 20 minut roztok dimethyldipropargylmalonátu **11** (62,9 mg, 302 μmol , 1 ekv.) v DCE (1 ml). Reakční směs byla naředěna deionizovanou vodou (10 ml) a extrahována CH_2Cl_2 (4×5 ml). Organické fáze byly spojeny a vysušeny bezvodým Na_2SO_4 . Sušidlo bylo odfiltrováno a těkavé složky byly odpařeny. Bylo získáno 67,1 mg látky **14** (82 %).

4. experiment:

Látka byla připravena podle obecného postupu, s tím rozdílem, že ke směsi dimethyldipropargylmalonátu **11** (62,4 mg, 300 μmol , 1 ekv.), deionizované vody (1 ml) a malononitrilu **7** (30 mg, 454 μmol , 1,5 ekv.) byl za míchání při laboratorní teplotě přidán katalyzátor $\text{Cp}^*\text{Ru}(\text{cod})\text{Cl}$ (5,6 mg, 15 μmol , 5 mol %). Reakční směs byla naředěna deionizovanou vodou (10 ml) a extrahována CH_2Cl_2 (3×5 ml). Organické fáze byly spojeny a vysušeny bezvodým Na_2SO_4 . Sušidlo bylo odfiltrováno a těkavé složky byly odpařeny. Bylo získáno 37,5 mg látky **14** (46 %).

5. experiment:

Látka byla připravena podle obecného postupu, s tím rozdílem, že ke směsi dimethyldipropargylmalonátu **11** (62,6 mg, 301 μmol , 1 ekv.), 100% FBS (0,5 ml) a malononitrilu **7** (29 mg, 439 μmol , 1,5 ekv.) byl za míchání při laboratorní teplotě přidán katalyzátor $\text{Cp}^*\text{Ru}(\text{cod})\text{Cl}$ (5,8 mg, 15 μmol , 5 mol %). Reakční směs byla naředěna deionizovanou vodou (10 ml) a extrahována CH_2Cl_2 (3×5 ml). Organické fáze byly spojeny a vysušeny bezvodým Na_2SO_4 . Sušidlo bylo odfiltrováno a těkavé složky byly odpařeny. Bylo získáno 22,3 mg látky **14** (27 %).

6. experiment:

Látka byla připravena podle obecného postupu, s tím rozdílem, že ke směsi dimethyldipropargylmalonátu **11** (63 mg, 303 μ mol, 1 ekv.), 100% FBS (0,5 ml) a malononitrilu **7** (29,5 mg, 447 μ mol, 1,5 ekv.) byl za míchání při laboratorní teplotě přidán katalyzátor $\text{Cp}^*\text{Ru}(\text{cod})\text{Cl}$ (6 mg, 16 μ mol, 5 mol %). Reakční směs byla naředěna deionizovanou vodou (10 ml) a extrahována CH_2Cl_2 (3 \times 5 ml). Organické fáze byly spojeny a vysušeny bezvodým Na_2SO_4 . Sušidlo bylo odfiltrováno a těkavé složky byly odpařeny. Bylo získáno 16,4 mg látky **14** (20 %).

7. experiment:

Látka byla připravena podle obecného postupu, s tím rozdílem, že směs dimethyldipropargylmalonátu **11** (62,6 mg, 301 μ mol, 1 ekv.) a malononitrilu **7** (30,7 mg, 465 μ mol, 1,5 ekv.) byla roztavena při 66°C v olejové lázni. Po ochlazení na laboratorní teplotu bylo přidáno 100% FBS (1 ml) a poté katalyzátor $\text{Cp}^*\text{Ru}(\text{cod})\text{Cl}$ (5,8 mg, 15 μ mol, 5 mol %). Reakční směs byla naředěna deionizovanou vodou (10 ml) a extrahována Et_2O (4 \times 5 ml). Organické fáze byly spojeny a vysušeny bezvodým Na_2SO_4 . Sušidlo bylo odfiltrováno a těkavé složky byly odpařeny. Bylo získáno 26,7 mg látky **14** (32 %).

8. experiment:

Látka byla připravena podle obecného postupu, s tím rozdílem, že směs dimethyldipropargylmalonátu **11** (62,7 mg, 301 μ mol, 1 ekv.) a malononitrilu **7** (29,8 mg, 451 μ mol, 1,5 ekv.) byla roztavena při 66°C v olejové lázni. Po ochlazení na laboratorní teplotu byl přidán 4% *E. Coli* DH5 α lyzát (1 ml) a poté katalyzátor $\text{Cp}^*\text{Ru}(\text{cod})\text{Cl}$ (6,2 mg, 16 μ mol, 5 mol %). Reakční směs byla naředěna deionizovanou vodou (10 ml) a extrahována Et_2O (3 \times 5 ml). Organické fáze byly spojeny a vysušeny bezvodým Na_2SO_4 . Sušidlo bylo odfiltrováno a těkavé složky byly odpařeny. Bylo získáno 32,6 mg látky **14** (39 %).

7. Použitá literatura

1. (a) Vollhardt, K. P. C.: *Acc. Chem. Res.* **1977**, 10, 1; (b) Vollhardt, K. P. C.: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1984**, 23, 539; (c) Kotha, S.; Brahmachary, E.; Lahiri, K.: *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 4741 a uvedené odkazy; (d) Yamamoto, Y.: *Cur. Org. Chem.* **2005**, 9, 503; (e) Schore, E.: *In Comprehensive Organic Synthesis*; Trost, B. M.; Fleming I. Eds.; Pergamon Press: Oxford, 1992; Vol. 5, 1129.
2. Li, C.-J.: *Chem. Rev.* **2005**, 105, 3095.
3. Li, C.-J.: *Acc. Chem. Res.* **2002**, 35, 533.
4. Sherry, B. D.; Toste, D.: *ChemTracts Org. Chem.* **2005**, 18, 14.
5. <http://hilltop.bradley.edu/~rbg/org.html> [cit. 17.10.2007]
6. McMurry, J.: *Organic Chemistry* 5th edition USA, Brooks/Cole 1999.
7. Eicher, T.; Hauptmann, S.: *The Chemistry of Heterocycles* 2nd edition Germany, Wiley-VCH 2003.
8. <http://www.tigis.cz/PSYCHIAT/PSYCH400/05patoc.htm> [cit. 17.10.2007]
9. Bregman, H.; Williams, S. D.; Atilla, E. G.; Carroll, J. P.; Meggers, E.: *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 13594.
10. Du, W.: *Tetrahedron* **2003**, 59, 8649.
11. <http://www.scripps.edu/chem/baran/html/home.html> [cit. 17.10.2007]
12. Joule, J.A., Mills, K.: *Heterocyclic Chemistry*. 4th edition USA, Blackwell Publishing 2000.
13. Badger, G. M.; Lewis, G. E.; Napier, I. M. *J. Chem. Soc.* **1960**, 2825.
14. Reppe, W.; Schweckendiek, J.: *W. Justus Liebigs Ann. Chem.* **1948**, 560, 104.
15. Heller, B.; Hapke, M.: *Chem. Soc. Rev.* **2007**, 36, 1085.
16. Varela, J. A.; Saá, C.: *Chem. Rev.* **2003**, 103, 3787.
17. Kalogerakis, A.; Groth, U.: *Org. Lett.* **2003**, 5, 843.
18. Hrdina, R.; Kadlčíková, A.; Valterová, I.; Hodačová, J.; Kotora, M.: *Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, 17, 3185.
19. Muller, E.: *Synthesis* **1974**, 761.
20. Witulski, B.; Alayrac, C.: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 3281.
21. Chopade, P.R.; Louie, J.: *Adv. Synth. Catal.* **2006**, 348, 2307.
22. Bruneau, C.; Dixneuf, P. H.: *Topics in Organometallic Chemistry* Germany, Springer **2004**, 11, 1.

23. Yamamoto, Y.; Kinpara, K.; Ogawa, R.; Nishiyama, H.; Itoh, K.: *Chem. Eur. J.* **2006**, 12, 5618.
24. Yamamoto, Y.; Takagishi, H.; Itoh, K.: *Org. Lett.* **2001**, 3, 2117.
25. Jaouen, G.; Beck, W.; McGlinchey, M.: *Bioorganometallics* 1st edition (ed. Jaouen, G.) Weinheim, Wiley-VCH 2006.
26. Beck, W.; Severin, K.: *Chemie in unserer Zeit* **2002**, 36, 356.
27. Crabtree, H. R.: *The Organometallic Chemistry of the Transition Metals* 3rd edition USA, Wiley Interscience 2001.
28. Moore, J. M.; Distefano, D.M.; Zydowsky, L.; Cummings, T.R.; Walsh, T. Ch.: *Acc. Chem. Res.* **1990**, 23, 301.
29. Ragsdale, S. W.: *Chem. Rev.* **2006**, 106, 3317.
30. Li C.-J.: *Acc. Chem. Res.* **2002**, 35, 533.
31. Streu, C.; Meggers, E.: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 5645.
32. Yamamoto, Y.; Arakawa, T.; Ogawa, R.; Itoh, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 12143.
33. Costa, M.; Dias, S. F.; Chiusoli, G. P.; Gazzola, G. L.: *J. Organomet. Chem.* **1995**, 488, 47.