

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**Potenciálisan biológiailag aktív pterokarpán származékok
előállítása**

Németh István

Témavezető/Supervisor: Antus Sándor akadémikus

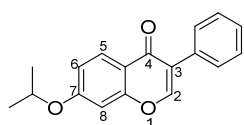


DEBRECENI EGYETEM
Természettudományi Doktori Tanács
Kémiai Doktori Iskola
Debrecen, 2012

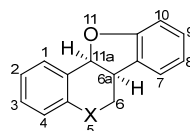
1. Az értekezés előzményei és célkitűzései

A flavonoidok az *O*-heterociklusos természetes anyagok egyik legnagyobb és legfontosabb csoportját alkotják. Általánosságban flavonoid összefoglaló névvel a difenilpropán vázas ($C_6-C_3-C_6$) oxigéntartalmú heterociklusos vegyületeket és velük rokon szerkezetű nyíltláncú származékokat illetik. Az elmúlt évtizedekben végzett széles körű farmakológiai vizsgálatok igazolták, hogy a flavonoidok az antioxidáns hatásuk mellett, többek között antibakteriális, antivirális, antifungális, gyulladáscsökkentő, vizelethajtó, tumor-, valamint csontritkulás ellenes hatással is rendelkeznek.

A doktori munkámban célul tűztük ki a 7-izopropiloxiizoflavonnal [Ipriflavonnal (**1a**)] rokonszerkezetű potenciálisan csontritkulás ellenes hatású pterokarpánok (**1b**) és rokon vegyületeik (**1c,d**) előállítását racém és optikai aktív formában, valamint sztereokémiai vizsgálatukat.



Ipriflavon, vagy
7-izopropiloxiizoflavon (**1a**)



Pterokarpán (**1b-d**)
X= O, CH₂, N-R

Az optikai antipódok enantioszelektív szintézise kapcsán a kutatómunkám a flavanon enol metil-éterének [(±)-**189**] és enol-acetátjának [(±)-**205**] tallium(III)-nitráttal (TTN), ólom-tetraacetáttal (LTA) és fenil-jodozónium reagensekkel (PIDA, HTIB) végzett oxidatív átalakításának beható tanulmányozására is kiterjedt.

2. Az alkalmazott vizsgálati módszerek

A szintetikus munka során a preparatív szerves kémia makro-,

félmikro- és mikromódszereit alkalmaztuk. A reakciók követésére, az anyagok tisztaságának ellenőrzésére és a termékarányok meghatározására kromatográfiás módszereket (TLC, HPLC) használtunk, a nyerstekek tisztítását és az izomerek szétválasztását kristályosítással, valamint oszlopkromatográfiával hajtottuk végre. Az előállított vegyületek jellemzésére, azonosítására és szerkezetének igazolására olvadáspont meghatározást, egy- (^1H - és ^{13}C -) és kétdimenziós (^1H - ^1H -COSY, ^{13}C - ^1H -HSQC, TOCSY, ROESY) NMR spektroszkópiát és MALDI/ESI-TOF tömegspektrometriai módszert, valamint RP-HPLC méréseket használtunk.

3. Az értekezés új tudományos eredményei

3.1. Potenciálisan csontritkulás ellenes hatású pterokarpán származékok előállítása

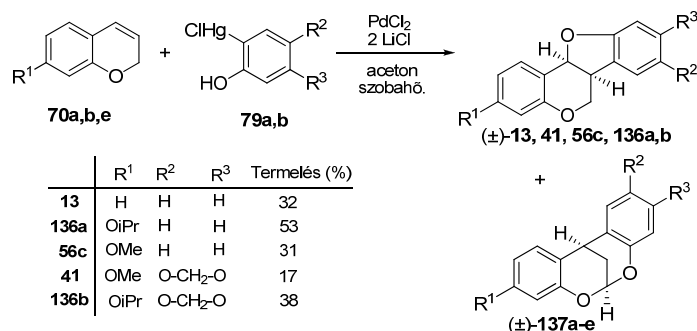
A pterokarpán származékok előállítását egyrészt a megfelelő *2H*-kromének Heck-féle oxiarilezésével, másrészt pedig a 7,2'-dihidroxi-4'-metoxiizoflavon (**140**) nátrium-tetrahidro-borátos redukcióját követő savas gyűrűzárásával kapott racém 3-hidroxi-9-metoxipterokarpánon [(±)-**136c**] keresztül valósítottuk meg.

3.1.1. A racém pterokarpán [(±)-**13**], pterokarpin [(±)-**41**], 3-metoxipterokarpán [(±)-**56c**], 3-izopropiloxipterokarpán [(±)-**136a**] és 3-izopropiloxi-8,9-metiléndioxipterokarpán [(±)-**136b**] szintézise.

A Heck-féle oxiarilezési módszer megvalósításához a megfelelő *2H*-kromén (**70a,b,e**) és *orto*-klórmerkurifenol (**79a,b**) származékokat az irodalomban leírt módon állítottuk elő. Ezt követően a kutatócsoportunk által korábban is tanulmányozott Heck-oxiarilezési reakciót Inoue és munkatársai által leírt körülmények között végeztük el és a reakció

nyertermékéből oszlopkromatográfiás tisztítással alacsony és közepes hozammal jutottunk a megfelelő pterokarpán származékok [(±)-**13**, **41**, **56c**, **136a**, **136b**] racemátjaihoz.

Meg kell jegyezni, hogy a kapcsolás során a kutatócsoportunk korábbi tapasztalataival megegyezően az áthidalt *O*-heterociklusok [(±)-**137a-e**] képződését is megfigyeltük, melyek keletkezése az átalakulás kationos mechanizmusú nem regioszelektív lefutását tanúsították.



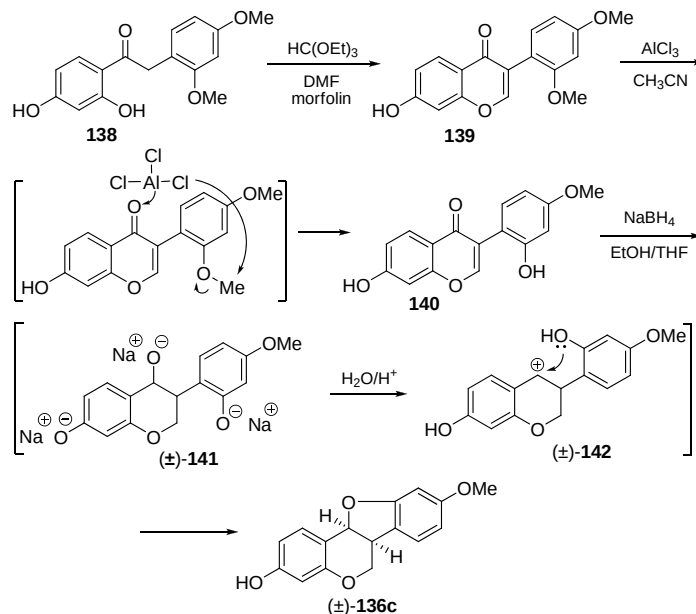
1. ábra: Pterokarpán származékok [(±)-**13**, **41**, **56c**, **136a,b**] előállítása.

3.1.2. A racém 3-hidroxi-9-metoxipterokarpán [(±)-**136c**], 3-izopropiloxi-9-metoxipterokarpán [(±)-**136d**], 3-etoxi-9-metoxipterokarpán [(±)-**136e**] és 3-propiloxi-9-metoxipterokarpán [(±)-**136f**] szintézise.

A tervezett farmakológiai vizsgálatokhoz a (±)-**136d-f** származékokat a racém 3-hidroxi-9-metoxipterokarpánból [(±)-**136c**] állítottuk elő, melyhez a kutatócsoportunk korábbi kutatásai során előállított 2,4-dihidroxifenil-2,4-dimetoxibenzil-ketonból (**138**) négy lépésben jutottunk.

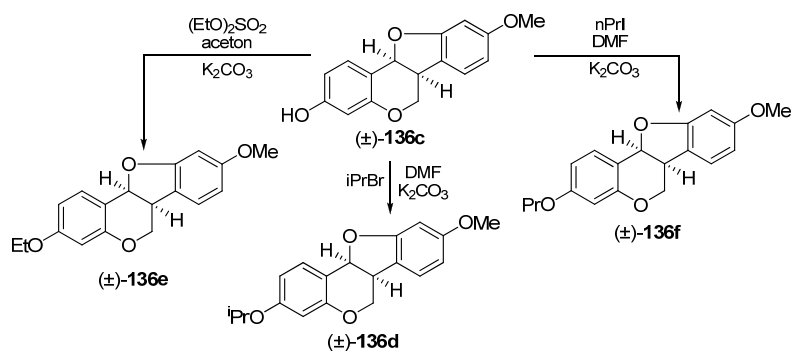
A szintézis kritikus lépése a 2'-helyzetű metoxicsoport alumínium-kloriddal történő szelektív eltávolítása (**139**→**140**) volt, melynek sikere e reagensnek a **139** vegyület karbonil csoportjával történő komplexálódásától függött. Ezt követően nátrium-tetrahidro-borátos redukcióval a **141** fenolátot, majd savanyítással a 2,3-dihidrobzeno[b]furán gyűrűt kialakítva a

racém 3-hidroxi-9-metoxipterokarpánt [(±)-**136c**] kaptuk meg.



2. ábra: A (±)-**136c** pterokarpán származék előállítása.

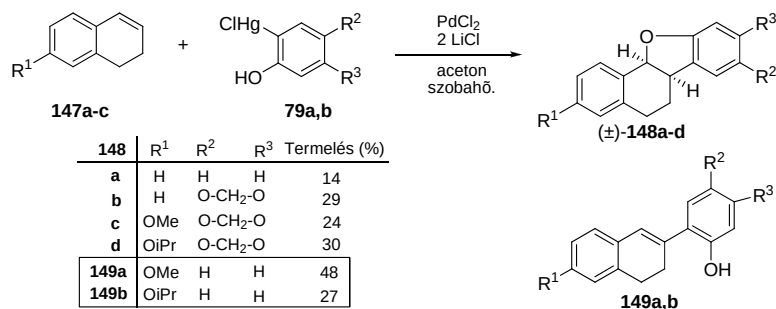
Ezt követően a [(±)-**136c**] pterokarpánból a megfelelő reagenssel alkilezve a [(±)-**136d**] izopropil-, [(±)-**136e**] etil- és a [(±)-**136f**] n-propil származékot állítottuk elő.



3. ábra: A (±)-**136d-f** pterokarpán származékok előállítása.

3.1.3. Az 5-karba- [(±)-**148a-d**] és azapterokarpánok [(±)-**159a,b**] szintézise.

Úgy gondoltuk, hogy a pterokarpánok 5-ös helyzetű oxigén atomját szénatomra cserélve a molekulák nagyobb hasonlóságot mutatnak az ösztrogén receptorok természetes ligandumaival. Ezért a hatás-szerkezet összefüggés vizsgálatokhoz a [(±)-**148a-d**] 5-karbapterokarpánok racemátjait a megfelelően szubsztituált 1,2-dihidronaftalin származékokból (**147a-c**) és **79a,b** *orto*-klórmerkurifenolokból Heck-féle oxiarilezési reakcióval állítottuk elő.



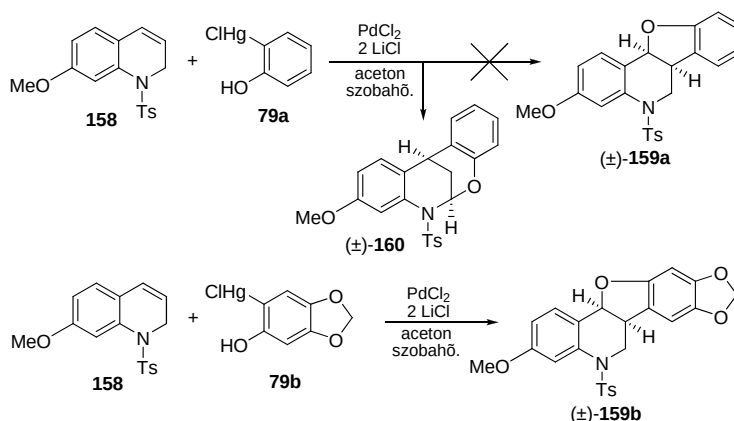
4. ábra: A (±)-**148a-d** karbaszármazékok előállítása.

A várakozásunknak megfelelően az oxiarilezési reakcióban a kívánt 5-karbapterokarpánokat [(±)-**148a-d**] kaptuk meg. Érdekes módon, a **147b,c** 1,2-dihidronaftalin származékokkal végzett kapcsolás során a gyűrűzárás mellett β eliminációt is észleltünk (**147b,c**+**79a**→**149a,b**). A megfelelő áthidalt vegyületeket kimutatni nem tudtuk, és ez arra utalt, hogy eltérően a kromán származékok körében tapasztaltakkal, az aril-palládium intermedier addíciója a kettős kötésre ez esetben regioszelektív módon játszódtott le, a β -elimináció pedig a gyűrűzárás kationos mechanizmusát valószínűsítette.

Az 5-aza-analagonok [(±)-**159a,b**] szintéziséhez a megfelelően védett **158** 1,2-dihidrokinolin származékot *m*-anizidinből és metil-akrilátból

kiindulva 7 lépésben állítottuk elő.

Ezt a már előzőekben is alkalmazott **79a** *orto*-klórmerkurifenollal kapcsoltuk és azt tapasztaltuk, hogy jelentős mennyiségű 1,2-dihidrokinolin származék (**158**) maradt reagálatlanul és a kívánt azapterokarpán származék [(±)-**159a**] nem keletkezett vagy csak nyomokban, melyet az izolálás során veszítettük el.



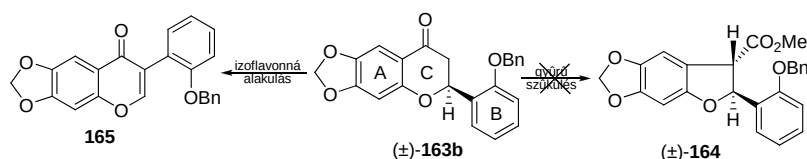
5. ábra: A (±)-**159a,b** azaszármazékok előállítása.

Az áthidalt gyűrűs vegyületet [(±)-**160**] ugyanakkor 26%-os termeléssel kaptuk meg. A **79b** klórmerkurifenollal végzett kapcsolásban pedig, alacsony hozammal (20%) ugyan, de a kívánt [(±)-**159b**] azapterokarpán származékhoz jutottunk.

3.1.4. Kísérletek pterokarpánok enantiomer tiszta formában történő előállítására.

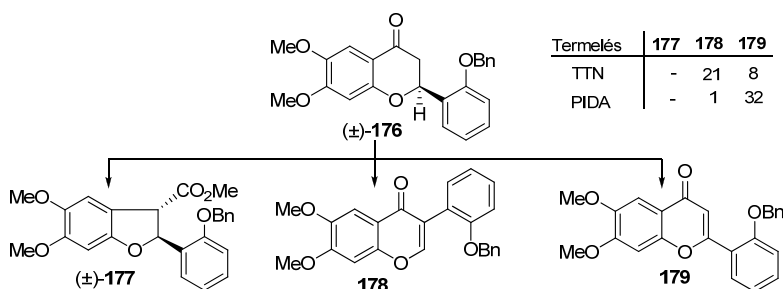
A farmakológiai vizsgálatokhoz a fentebb ismertetett pterokarpánok enantiomerjeinek előállítását a kutatócsoportunk által kidolgozott módszerrel, a megfelelő szubsztitúciójú (+)-(2*R*)- vagy (2*S*)-2'-benzioxiflavanon származékból kiindulva kívántuk megvalósítani. A *Maackia amurensis*-ből izolált (+)-(6*aS*,11*aS*)-maackiain (**14c**) 3-

deoxiszármazékának (**14a**) szintézise kapcsán a racém ($\pm$)-**163b** 2'-benziloxiflavanon származék tallium(III)-nitráttal (TTN), valamint feniliodozónium-diacetáttal (PIDA) végzett oxidációban azonban nem a várt gyűrűszűkülés [$(\pm)$ -**163b** $\rightarrow$ $(\pm)$ -**164**] játszódott le, jöllehet az A-gyűrűn C-6–C-7 helyzetben lévő elektronküldő metiléndioxi csoport vélhetően ezen aril csoport vándorló készségét fokozta. A reakció nyerstermékének ^1H -NMR vizsgálata szerint a kívánt 2,3-dihidrobenzo[b]furán észter [$(\pm)$ -**164**] még nyomokban sem keletkezett, helyette főtermékként a 2'-benziloxi-6,7-metiléndioxiizoflavont (**165**) izoláltuk, melyet többszöri oszlopkromatográfiás tisztítás után kristályos formában 27%-os termeléssel különítettük el.



6. ábra: A $(\pm)$ -**163b** flavanon gyűrűszűkítési átalakítása.

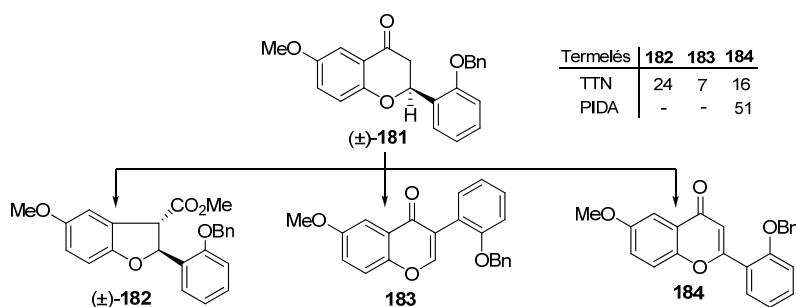
E meglepő átalakulás okának felderítésére a racém 2'-benziloxi-6,7-dimetoxiflavanont [$(\pm)$ -**176**] állítottuk elő és vizsgáltuk, hogy e vegyület miként viselkedik a TTN-tal és a PIDA-val végzett oxidáció körülményei között.



7. ábra: A $(\pm)$ -**176** flavanon gyűrűszűkítési reakciója.

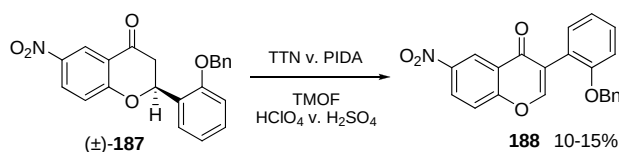
Hasonlóan a 6,7-metiléndioxi csoportot viselő ($\pm$)-**163b** flavanon származékhoz, a TTN-el vagy a PIDA-val végzett oxidációs reakcióban ez esetben sem a gyűrűszűkült termék [($\pm$)-**177**] keletkezett, hanem az ábrán feltüntetett hozamokkal a megfelelő izoflavon (**178**) és flavon (**179**) származékhoz jutottunk.

Ugyanakkor, a 2'-benziloxi-6-metoxiflavanon [($\pm$)-**181**] esetében a TTN-el végzett átalakítás során a megfelelő izoflavon (**183**) és flavon (**184**) származékok mellett főtermékként a ($\pm$)-**182** 2,3-dihidrobenzo[b]furan észtert kaptuk meg, melyet azonban a PIDA-val végzett reakció termékei között kimutatni sem lehetett. A reakció főterméke ez esetben viszont a 2'-benziloxi-6-metoxiflavan (**184**) volt.



8. ábra: A ($\pm$)-**181** flavanon származék gyűrűszűkítése

A 2'-benziloxi-6-nitroflavanon [($\pm$)-**187**] oxidációja pedig mindkét reagenssel a 2'-benziloxi-6-nitroizoflavont (**188**) eredményezte.



9. ábra: A ($\pm$)-**187** flavanon származék gyűrűszűkítése.

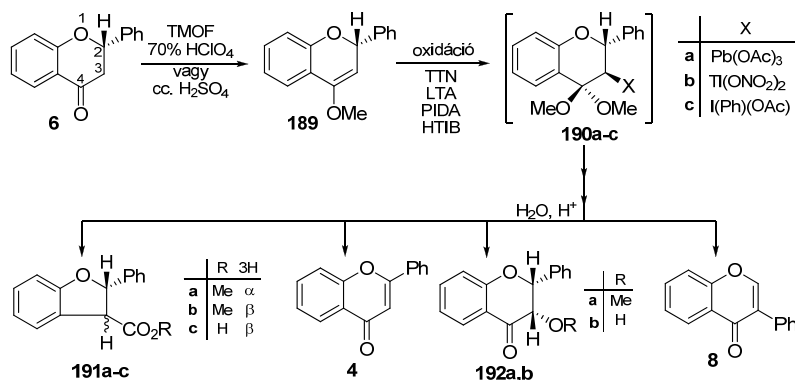
Ezen eredmények egyértelműen azt mutatták, hogy a flavanonok gyűrűszűkítési reakciója erősen szubsztitúció függő átalakulás és így e

módszer a természetben előforduló 8,9-helyzetben hidroxi, metoxi, vagy metiléndioxi csoporttal szubsztituált pterokarpánok szintézisére alkalmatlan. E meglepő eredmény okainak alaposabb megismerése érdekében célszerűnek láttuk magát az „alap” reakciót, azaz a racém flavanon [(±)-6] enol metil-éterének [(±)-189] a *rac*-metil-(2-fenil-2,3-dihidrobenzo[b]furán-3-karboxiláthoz) [(±)-191a] vezető gyűrűszűkülését HPLC-vel követve megvizsgálni. A kutatócsoportunk ugyanis erről az átalakításról a közelmúltban mutatta ki, hogy a gyűrűszűkülési lépése is sztereoszelektív szinkron folyamat, melyben nem közvetlenül a 204 karbónium ion intermedieren keresztül képződött a (±)-191a *transz* észter.

3.2. A racém flavanon [(±)-6] gyűrűszűkülési mechanizmusának felülvizsgálata

3.2.1. A racém flavanon enol metil-éterének [(±)-189] gyűrűszűkítése

A racém flavanont [(±)-6] 1.1 mol ekvivalens TTN-al, trimetil-ortoformiátban, katalitikus mennyiségű 70%-os perklórsav jelenétében, szobahőmérsékleten reagáltattuk.



10. ábra: A (±)-6 flavanon gyűrűszűkítési reakciója.

A reakció HPLC-s követése egyértelműen jelezte, hogy a (±)-6

konverziója 30 perc után érte el a 98%-ot és meglehetősen komplex reakcióelegy keletkezett. Ebben - a keverék alapvonalú HPLC elválasztását megoldva - a *rac*-flavanon [(±)-**6**, (2%)] mellett a *rac*-metil-(2-fenil-2,3-dihidrobenzo[b]furán-3-karboxilátot) [(±)-**191a** (76%)], a flavont [**4** (3%)] és az izoflavont [**8** (9%)] az összehasonlító minták segítségével egyértelműen azonosítottuk és a részarányukat meghatároztuk (1. táblázat).

Sor	Reag.	Módsz.	6 (7.26)	191a (7.90)	191b (7.20)	4 (6.30)	192a (8.47)	192b (7.03)	8 (6.70)	197 (8.95)	202 (8.14)
1	TTN	A	2	76	-	3	<1	1	9	3	<1
2	TTN	B	15	40	-	28	-	1	2	9	<1
3	TTN	C	<1	45	-	3	3	<1	3	3	-
4	LTA	D	1	33	-	11	1	18	23	1	-
5	PIDA	E	4	66	-	10	<1	-	2	2	-
6	HTIB	E	3	49	-	6	2	-	1	5	-

A módszer: TMOF/70% HClO₄/szobahő./5 perc TTN

B módszer: TMOF/70% HClO₄/-10°C/5 perc TTN

C módszer: TMOF/70% HClO₄/szobahő./30 perc TTN

D módszer: TMOF/cc. H₂SO₄/szobahő./5 perc LTA

E módszer: TMOF/cc. H₂SO₄/szobahő./5 perc HTIB

1. táblázat: A (±)-**6** flavanon átalakítása során keletkező vegyületek termelése (%) és a retenciós idők (t_R= perc)

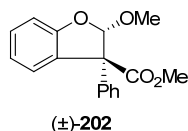
A további komponensek közül a 8,95 perces retenciós idejű vegyületet kromatográfiával izoláltuk és az MS és NMR adatai alapján metil-(2-fenilbenzo[b]furán-3-karboxilátként) (**197**) azonosítottuk, a szerkezetét a (±)-**191a** észter 2,3-diklór-5,6-diciano-1,4-benzokinonnal (DDQ) végzett kémiai korrelációjával is igazoltuk.



11. ábra: A **197** származék szintézise DDQ-val.

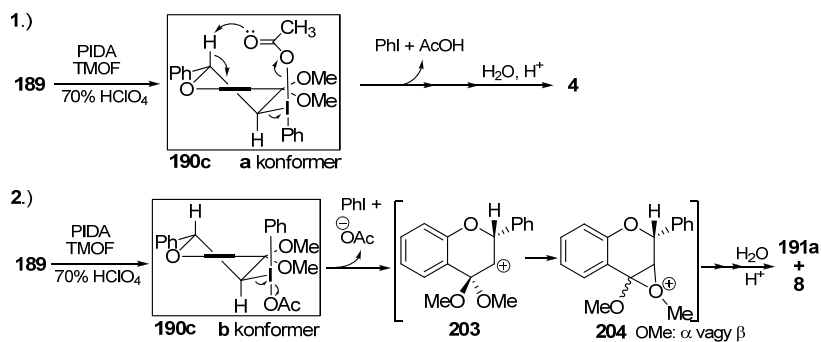
A (±)-**6** TTN-os reakcióját -10°C-on végezve a várakozásunknak

megfelelően az **189** enol éter lényegesebben lassabban keletkezett és 30 perc alatt csak 85%-os konverziót értünk el. Ez a termékek arányát jelentősen megváltoztatta (1. táblázat 2. sor). A közel 1%-os hozammal keletkezett mellékterméket is sikerült preparatív rétegen izolálni. A szerkezetét NMR és MS mérések alapján a (2*S**,3*S**) metil-(2,3-dihidro-2-metoxi-3-fenilbenzo[b]furán-3-karboxilátként) [(±)-**202**] határoztuk meg.



A (±)-**6** átalakítása LTA-val 2 óra után érte el a 99%-os konverziót és a reakció nyersteamékében a (±)-**191a** (33%), a **4** (11%), a **192a** (1%), a **192b** (18%), a **8** (23%) és a **197** (1%) vegyületeket azonosítottuk (2. táblázat 4. sor). Ellentétben Kanne megfigyelésével, a reakció főterméke ez esetben sem a *cisz* relatív konfigurációjú észter [(±)-**191b**], hanem a *transz* volt.

Az (±)-**6** PIDA-val vagy HTIB-val, trimetil-ortoformiában, kénsav jelenlétében és szobahőmérsékleten végzett oxidációját HPLC-vel követve megállapítottuk, hogy mindkét esetben közel azonos összetételű termékelegy keletkezett, de ez jelentősen eltért a TTN esetében tapasztalttól. A PIDA-val végzett oxidáció főterméke, szintén a gyűrűszűküléssel keletkező *transz*-(±)-**191a** észter (66%) volt, és a melléktermékek közül nem az izoflavon (**8**), hanem a flavon (**4**) képződése volt a kedvezményezett (1. táblázat 1. és 5. sor).



12. ábra: A feniljodozónium(III) intermedierek [(±)-**190c/a** and **b**] szerkezete és átalakulása.

Ezt kvantumkémiai számításaink alapján értelmeztük, ami a (±)-**190c** finomszerkezetéről (**190c/a** és **190c/b**) adott felvilágosítást. A termodinamikailag kedvezőbb **190c/a** esetében a 12. ábrán jelölt módon a flavon (**4**), míg a **190c/b**-ből a **204** karbónium vagy/és a **204** epoxónium ionon keresztül jutottunk a (±)-**191a** *transz*-észterhez és az izoflavonhoz (**8**). A **204** epoxónium ion lehetősége a C-4 helyzetű metoxi csoportok un. szomszédcsoport részvételének irányító hatására utalt.

3.2.2. A flavanon enol-acetát [(±)-**205**] gyűrűszűkítésének vizsgálata

A fent említett gyűrűszűkülési reakciókban a szomszédcsoport részvétel szerepéről a racém flavanon enol-acetátjának [(±)-**205**] TTN-el és PIDA-val végzett átalakítások HPLC-és követése adott értékes felvilágosítást. E vegyület konverziója a szobahőmérsékleten végzett oxidációban két óra után érte el a 99%-ot és az izoflavon (**8**) (77%) mellett a flavont (**4**) (18%) kaptuk meg. Meglepő módon sem a *transz*-metil-(2,3-dihidro-2-fenilbenzo[b]furán-3-karboxilát) [(±)-**191a**], sem a *cisz*-3-metoxiflavanon (**192b**), sem pedig a **197** és **202** fenilbenzo[b]furán származékok nem keletkeztek (2. táblázat 1. sor).

Sor	Reag.	Módsz.	6 (7.20)	4 (6.10)	8 (6.65)	205 (7.76)
1	TTN	A	2	18	77	1
2	PIDA	B	7	13	78	-
3	PIDA	C	4	65	1	15

A módszer: TMOF/70%-os HClO₄/szobahő./5 perc TTN

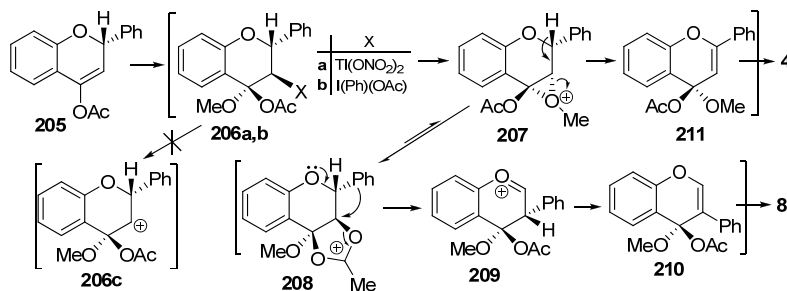
B módszer: TMOF/cc. H₂SO₄/szobahő./5 perc PIDA

C módszer: Jégecet/5 perc PIDA

2. táblázat: A (±)-**205** enol-acetát átalakítása során keletkező vegyületek termelése (%) és a retenciók idők (t_R= perc).

Hasonló termékprofilt kaptunk a PIDA-val végzett oxidációban is. Ebben az esetben is az izoflavon (**8**) volt a főtermék (78%) és kisebb mennyiségben a flavon (**4**) (13%) is keletkezett (2. táblázat 2. sor).

Ezek az eredmények egyértelműen azt mutatták, hogy a *rac*-flavanon enol-éterében [(±)-**189**] a metilcsoportot acetilre cserélve [(±)-**189** → (±)-**205**] az utóbbi csoport a felelős nemcsak a gyűrűszűkülés elmaradásáért, hanem az izoflavon (**8**) kedvezményezett képződéséért is. Ezt a 13. ábrán vázolt módon értelmeztük.

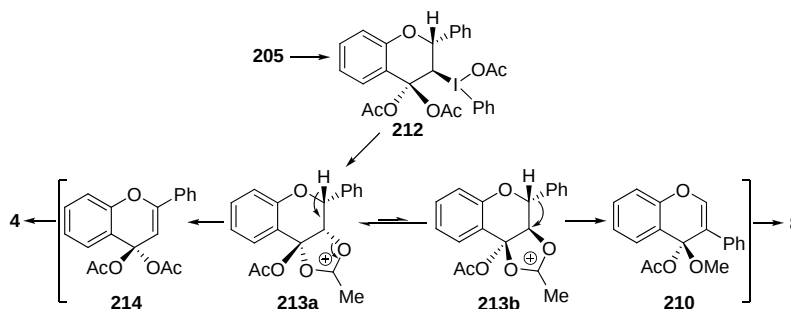


13. ábra: A (±)-**205** enol-acetát átalakítása TMOF-ben, PIDA-val.

Az átalakulás **206a,b** intermediere a polarizált C-3 tallium(III) vagy jodozónium(III) kötésének heterolízisével nem a **206c** karbónium ionná alakult át, hanem a kedvező térhelyzetben lévő C-4 metoxicsoprot nem kötő elektron pályájának a C-3 szénatomra történt támadását követően S_N2 típusú

nukleofil szubsztitúcióval a **207** α -epoxónium ionná alakult át. Ebből protonvesztéssel az ábrán jelölt módon nemcsak a flavon (**4**) (65%) keletkezett, hanem az C-4 acetoxicsoport szomszédcsoport részvételével a termodinamikailag stabilabb **208** 1,3-dioxolánium ionon keresztül főtermékként az izoflavont (**8**) kaptuk meg.

A ($\pm$)-**205**-t jégcetben, szobahőmérsékleten, PIDA-val végzett oxidációjának HPLC-és követése a reakció részleteiről további értékes információt adott. Az átalakulás konverziója két óra után érte el a 85%-ot, de most nem az izoflavon (**8**), hanem a flavon (**4**) volt a főtermék (65%) (2. táblázat 3. sor). Emellett nyomokban izoflavont (**8**) (1%), flavanont [($\pm$)-**6**] (4%) és a ($\pm$)-**205** enol-acetátot (15%) tudtunk kimutatni.



14. ábra: A ($\pm$)-**205** enol-acetát átalakítása jégcetben, PIDA-val.

Metanol hiányában az elektrofil reagens (PIDA) a ($\pm$)-**205**-re történő sztereo-kontrollált addíciója szükségszerűen a ($\pm$)-**212** triacetoxijodozónium intermedierhez vezetett, melyből a C-4-en lévő *alfa* konfigurációjú acetoxicsoport részvételével a **213a** 1,3-dioxolán típusú karbónium ion keletkezett. Ebből protonvesztéssel a 2-fenil-4,4-diacetoxi-4*H*-kromént (**214**), majd a reakció elegy feldolgozása során hidrolízissel a flavont (**4**), mint főterméket (65%) kaptuk meg. A **213a** karbónium ion a termodinamikailag kevésbé stabil **213b**-vel van egyensúlyban, melyben az izoflavon (**8**) keletkezésének sztereokémiai feltételei adottak, és így e

Németh István: Potenciálisan biológiailag aktív pterokarpán származékok előállítása

vegyület melléktermékként keletkezett.