

# Totalna sinteza tetrodotoksina

---

**Jularić, Antonio**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2024**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:462032>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-29**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Antonio Jularić

Student 3. godine Prijediplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

# TOTALNA SINTEZA TETRODOTOKSINA

## Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za organsku kemiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Nikola Cindro

Zagreb, 2024.



Datum predaje prve verzije Završnog rada:

14. lipnja 2024.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

12. srpnja 2024.

Mentor rada: doc. dr. sc. Nikola Cindro

Potpis:



## Sadržaj

<b>§ SAŽETAK.....</b>	<b>VII</b>
<b>§ 1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Totalna sinteza u organskoj kemiji .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Tetrodotoksin .....</b>	<b>2</b>
<i>1.2.1. Kratka povijest tetrodotoksina .....</i>	<i>2</i>
<i>1.2.2. Struktura tetrodotoksina .....</i>	<i>2</i>
<i>1.2.3. Biološka aktivnost tetrodotoksina .....</i>	<i>3</i>
<b>§ 2. TOTALNA SINTEZA TETRODOTOKSINA.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1. Prethodno objavljene totalne sinteze tetrodotoksina .....</b>	<b>4</b>
<b>2.2. Traunerova totalna sinteza tetrodotoksina.....</b>	<b>4</b>
<i>2.2.1. Retrosintetska analiza .....</i>	<i>4</i>
<i>2.2.2. Prva faza totalne sinteze – priprava alkinil-izoksazolidinskog građevnog bloka.....</i>	<i>5</i>
<i>2.2.3. Druga faza totalne sinteze – dobivanje hidroksilaktonskog prekursora.....</i>	<i>11</i>
<i>2.2.4. Treća faza totalne sinteze – nastanak ortho-kiseline te ugradnja gvanidinskog motiva.....</i>	<i>15</i>
<b>§ 3. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>17</b>
<b>§ 4. LITERATURNI IZVORI.....</b>	<b>18</b>



## § Sažetak

Tetrodotoksin (TTX) je potentni neurotoksin koji se u prirodi može susresti kod određenih vrsta riba napuhača, morskih puževa, daždevnjaka, žaba, hobotnica, zvjezdača i bakterija. Zbog svog djelovanja na natrijeve kanale često se koristi u neurološkim ispitivanjima, a sintetskim je kemičarima zanimljiv zbog svoje složene strukture koja iziskuje pomno planiranje sinteze. Od rješavanja strukture TTX 1964. godine do danas objavljeno je desetak totalnih sinteza, pri čemu će se ovaj rad primarno fokusirati na totalnu sintezu koju su 2022. godine objavili Trauner i suradnici. Ona se temelji na ranoj uspostavi središnjeg cikloheksanskog prstena i  $\alpha$ -tercijarnog amina intramolekulskom 1,3-dipolarnog cikloadicijom nitril-oksidne i alkenilne skupine, popraćene ugradnjom alkinilne skupine. Slijedi rutenijem katalizirana hidroksilaktonizacija kojom se dobiva prekursor za stvaranje dioksaadamantanske jezgre. Konačno, ugradnjom gvanidinskog motiva, oksidacijom primarnog alkohola i epimerizacijom u posljednjem koraku dobiva se smjesa prirodnog (-)-tetrodotoksina i 4,9-anhidrida tetrodotoksina.





## § 1. UVOD

### 1.1. Totalna sinteza u organskoj kemiji

Sve do 19. stoljeća uvriježeno je mišljenje bilo da samo živi organizmi mogu proizvesti organske tvari, odnosno da nije moguće sintetizirati organske spojeve iz anorganskih. Smatralo se kako je za nastanak organskih spojeva potrebna tzv. „životna sila“ (lat. *vis vitalis*), prema kojoj je teorija dobila naziv vitalistička teorija, a njezini sljedbenici nazivali su se vitalistima. Ozbiljan udarac vitalizmu zadala je Wöhlerova sinteza metabolita uree iz amonijevog cijanata 1828. godine. Uslijedila je i sinteza octene kiseline iz elemenata (Kolbe 1845.), nakon čega su znanstvenici počeli polako napuštati vitalističku teoriju. Ovi događaji često se smatraju začetkom organske kemije.<sup>1</sup>

Posebno važnu ulogu u organskoj kemiji ima totalna sinteza. Totalna sinteza podrazumijeva pripremu složenijih organskih spojeva iz komercijalno dostupnih prekursora. Njezin značaj krije se u tome da ljudima omogućava pripremu spojeva koji se mogu pronaći u prirodi umjetnim putem, a čiji su resursi ograničeni. Tako je Adolf von Baeyer još 1882. uspio umjetnim putem sintetizirati indigo čiji je primarni izvor dotad bila biljka *Indigofera tinctoria* koja raste isključivo u tropskim klimama. Njegovo otkriće otvorilo je put za razvoj sintetskih postupaka primjenjivih na industrijskoj skali, što je umanjilo tržišnu cijenu i povećalo komercijalnu dostupnost indiga.<sup>2</sup> Naredno stoljeće obilježila su neka od najvećih dostignuća u području sintetske kemije. Posebno valja istaknuti Woodwardove totalne sinteze klorofila a (1960.) i vitamina B12 (1973.), koje se ističu što zbog strukturne kompleksnosti tih spojeva, što zbog njihovog biološkog značaja. Važnu ulogu odigrao je i razvoj asimetričnih reakcija koje su sintetičarima omogućile enantioselektivnu sintezu prirodnih spojeva, što se pokazalo kao važan alat u razvoju modernih lijekova. Razvojem novih sintetskih metoda, reagensa i reakcija značajno je smanjen broj koraka te povećan prinos totalnih sinteza, čime je povećana njihova novčana i vremenska isplativost.

## 1.2. Tetrodotoksin

### 1.2.1. Kratka povijest tetrodotoksina

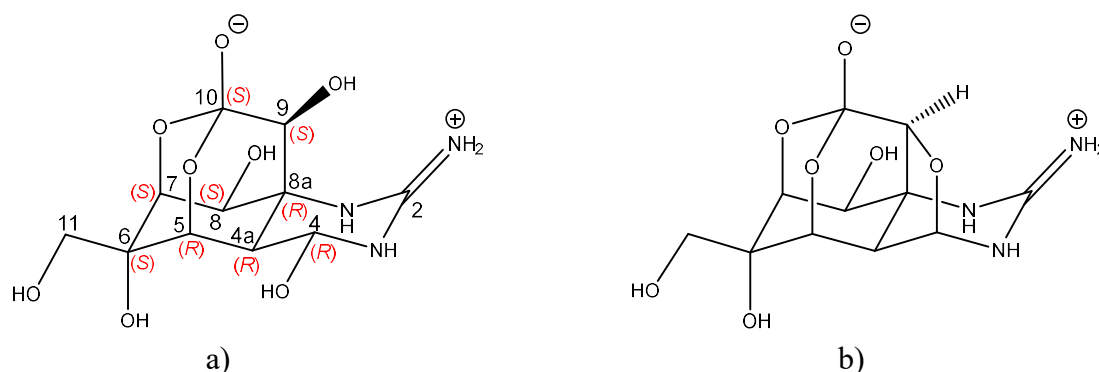
Tetrodotoksin prvi je izolirao dr. Yoshizumi Tahara 1909. godine iz jajnika ribe napuhače. Iako je njezina toksičnost odavno poznata ljudima, u Japanu riba napuhača (*fugu*) predstavlja kulinarsku deliciju koju smiju pripremati samo posebno obučeni i licencirani šefovi kuhinje.<sup>3</sup>

Strukturu TTX riješili su Robert B. Woodward i suradnici 1964. godine koristeći tradicionalne analitičke metode kao što su elementna analiza i reakcije odgradnje, ali i neke od instrumentnih tehnika (IR spektroskopiju, NMR spektroskopiju i masenu spektrometriju),<sup>4</sup> koje su tada još bile u svojim začetcima. Njihova predložena struktura potvrđena metodom rendgenske difrakcije 1970. godine,<sup>5</sup> a ubrzo je uslijedila i prva totalna sinteza racemičnog TTX (Kishi i suradnici, 1972.).<sup>6</sup> Prvu asimetričnu sintezu TTX objavili su Isobe i suradnici 2003. godine.<sup>7</sup>

### 1.2.2. Struktura tetrodotoksina

TTX posjeduje relativno jednostavan ugljični skelet koji uključuje cikloheksanski prsten kao komponentu 2,4-dioksaadamantanskog motiva sraštenog sa šesteročlanim prstenom s integriranim gvanidinskim motivom. Od ostalih motiva i funkcijskih skupina ističu se jedna primarna, dvije sekundarne i jedna tercijarna hidroksilna skupina,  $\alpha$ -tercijarni amin te hemiaminal. Molekula spoja broji ukupno četiri prstena te devet stereocentara.<sup>8</sup> (Slika 1.a)

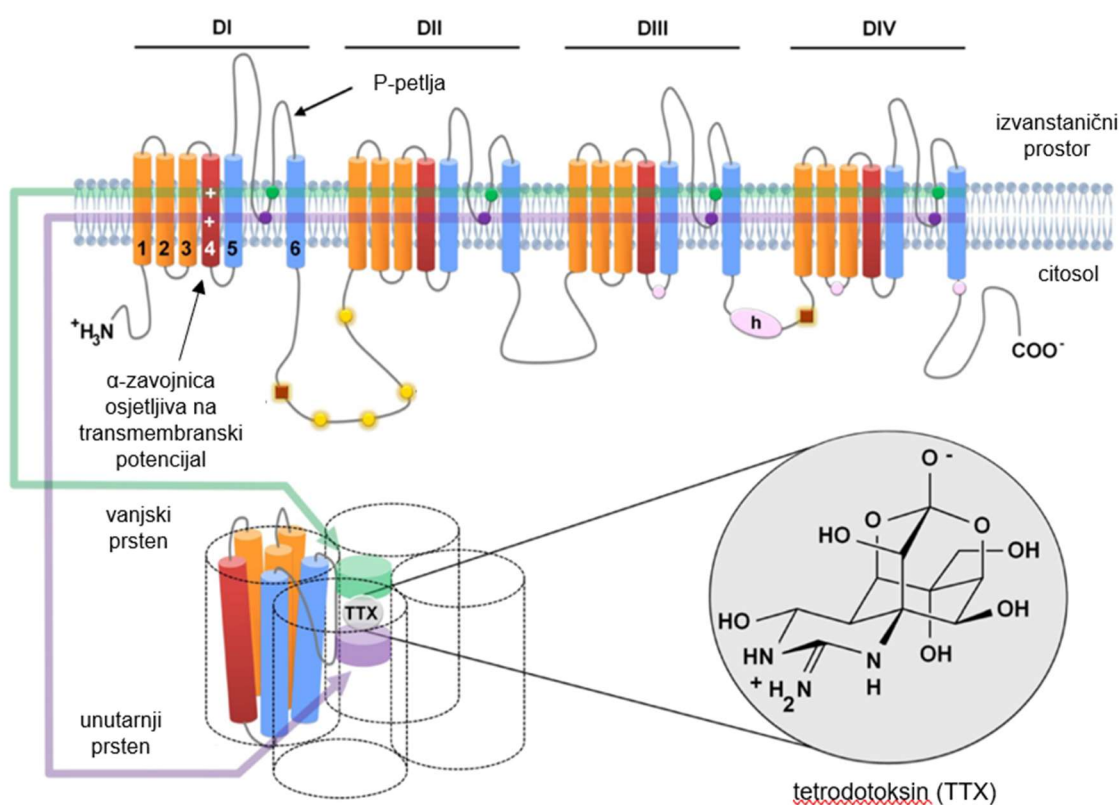
Do danas je poznato oko trideset strukturnih analoga tetrodotoksina, od kojih je među prvima otkriven 4,9-anhidrid TTX (1964.) (Slika 1.b), s kojim je TTX u kemijskoj ravnoteži.<sup>3</sup>



Slika 1. Strukturni dijagrami: a) (-)-TTX s naznačenim lokantima ugljikovih atoma te apsolutnim konfiguracijama kiralnih ugljikovih atoma, b) 4,9-anhidrid TTX

### 1.2.3. Biološka aktivnost tetrodotoksina

TTX se ponaša kao blokator natrijevih kanala čije je otvaranje regulirano transmembranskim potencijalom. Natrijev kanal sastoji se od  $\alpha$ ,  $\beta_1$  i  $\beta_2$  podjedinica.  $\alpha$ -podjedinicu čine četiri homologne domene (DI-DIV), a svaka od njih sastoji se od šest transmembranskih  $\alpha$ -zavojnica. Mjesto vezanja tetrodotoksina nalazi se na segmentu P-petlje, između  $\alpha$ -zavojnica 5 i 6. (Slika 2.) Kada se veže na natrijev kanal, TTX onemogućava difuziju natrijevih iona preko stanične membrane, što sprječava depolarizaciju i propagaciju akcijskog potencijala u neuronima; to dovodi do gubitka osjeta i imobilizacije mišićnog i živčanog tkiva.<sup>9</sup> Organizmi koji nose TTX imuni su na njega zbog razlike u primarnoj strukturi polipeptida koji izgrađuje natrijev kanal, što onemogućava njegovo vezanje, dok neke vrste posjeduju i proteine koji vežu TTX. Letalna doza TTX za čovjeka iznosi oko 9  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , a antidot još uvijek nije razvijen.<sup>3,10</sup>



Slika 2. Struktura  $\alpha$ -podjedinice natrijevog kanala uz prikaz vezanog mjesta za tetrodotoksin (prilagođeno prema: F. R. Nieto *et al.*, *Mar. Drugs* **10** (2012) 281-305.)

## § 2. TOTALNA SINTEZA TETRODOTOKSINA

### 2.1. Prethodno objavljene totalne sinteze tetradotoksina

Prvu totalnu sintezu racemičnog tetradotoksina objavili su Kishi i suradnici 1972. godine. Njihov se rad danas smatra jednim od klasika totalne sinteze, a o veličini njihova dostignuća svjedoči i činjenica da se na iduću totalnu sintezu ovog prirodnog spoja čekalo čak 31 godinu. Nakon tri desetljeća bezuspješne potrage za novim sintetskim putevima te pripreme različitih potencijalnih prekursora, Isobe i suradnici su 2003. godine objavili prvu totalnu sintezu optički čistog, prirodnog (–)-TTX, koja se sastojala od čak 72 koraka. Unatoč duljini Isobeove totalne sinteze, koja je od Kishijeve dulja za čak 40 koraka, ona predstavlja prekretnicu nakon koje je u narednih 20 godina objavljeno desetak totalnih i formalnih sinteza TTX. Prva je uslijedila već iste te godine (2003.) kada su Du Bois i suradnici objavili svoju verziju asimetrične totalne sinteze (–)-TTX u 33 koraka, a naredne je godine Isobe objavio i poboljšanu verziju svoje sinteze, ovoga puta u 41 korak.<sup>11</sup>

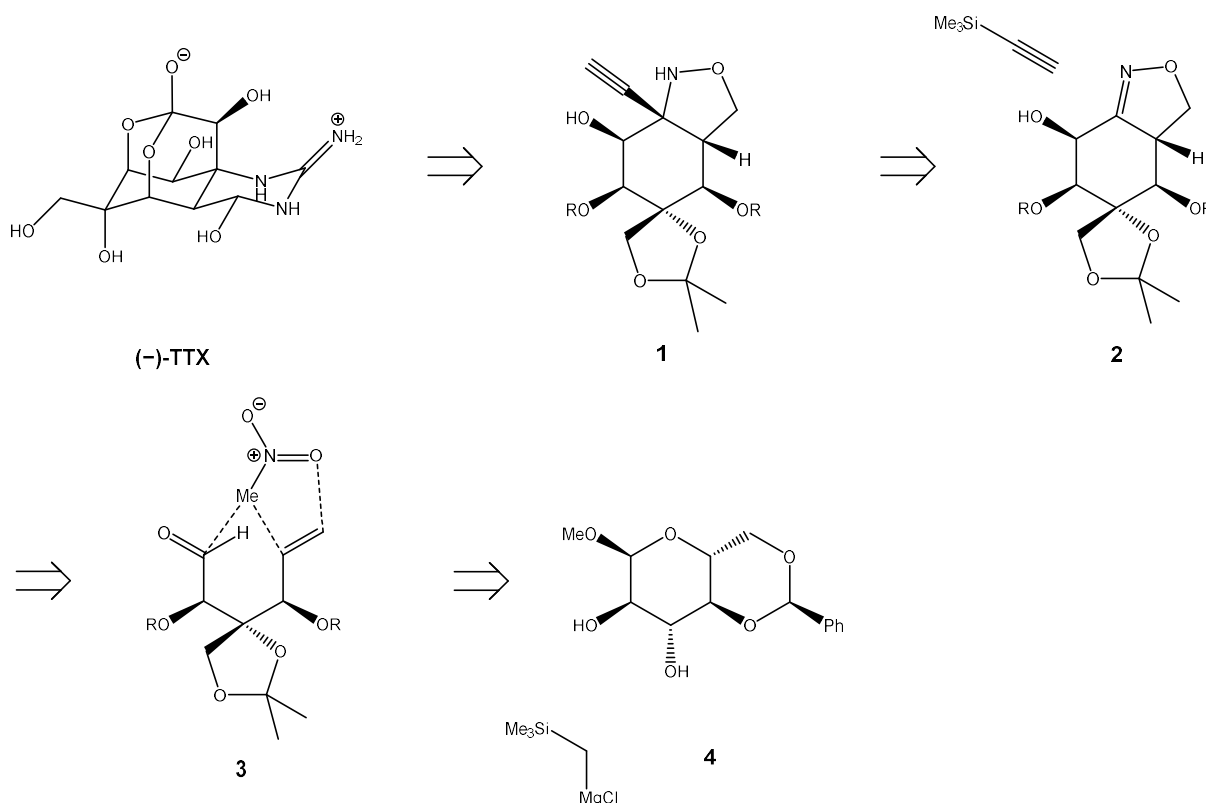
Razvoj novih reagensa i reakcija omogućio je znatno povećanje prinosa sinteza te smanjenje broja koraka u sintetskom putu. Ovaj rad će posebnu pažnju posvetiti sintezi optički čistog TTX koju su objavili Trauner i suradnici 2022. godine.<sup>8</sup> Ona se sastoji od 22 koraka uz ukupni prinos od 11%, što ju čini jednom od najkraćih i najefikasnijih totalnih sinteza TTX objavljenih do danas.

### 2.2. Traunerova totalna sinteza tetradotoksina

#### 2.2.1. Retrosintetska analiza

Trauner i suradnici su pretpostavili da se TTX može pripremiti oksidacijom alkinil-izoksazolidina **1**, koji bi potjecao od bicikličkog izoksazolina **2** dobivenog intramolekulskom 1,3-dipolarnom cikloadicijom alkenilne i nitril-oksidne skupine. Ključnu ulogu u sintezi spoja **2** imala bi intermolekulska Henryjeva reakcija nitrometana i aldehida **3** popraćena dehidratacijom. Njezin bi se produkt zatim preveo u reaktivni nitril-oksidni međuprodukt, koji bi se intramolekulskom (3+2) cikloadicijom zaciklizirao tvoreći središnji cikloheksanski prsten. Premda su autori prethodno razvili metodologiju za enantioselektivnu sintezu nezasićenih

aldehida sličnima **3** Kiyookinom aldolnom reakcijom, procijenjeno je da je prikladnije započeti sintezu s derivatom glukoze **4**.<sup>12</sup>

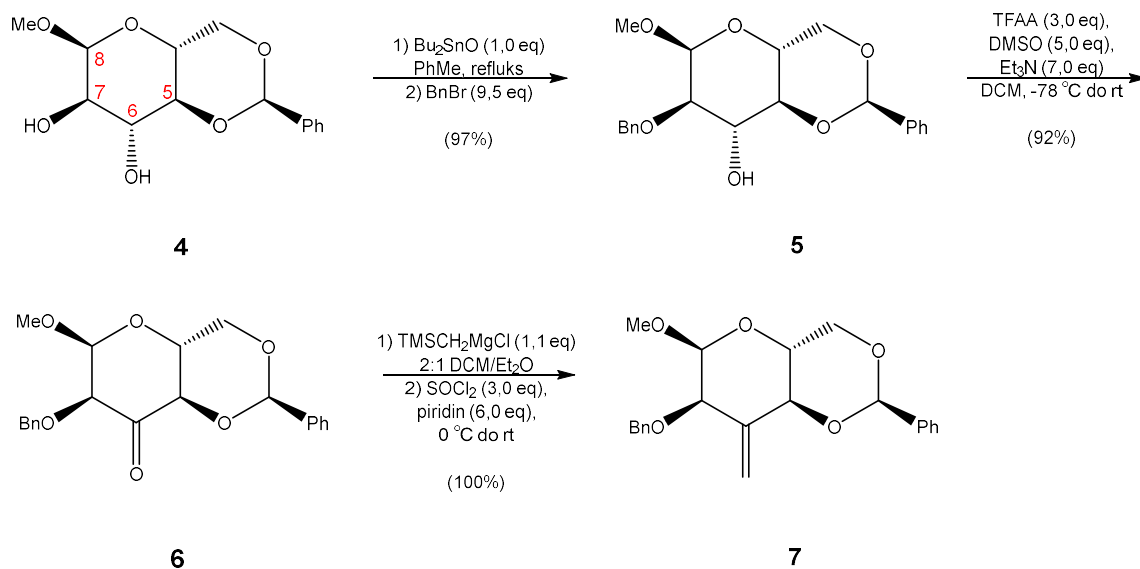


Slika 3. Retrosintetska analiza totalne sinteze TTX prema Trauneru

### 2.2.2. Prva faza totalne sinteze – priprava alkinil-izoksazolidinskog građevnog bloka

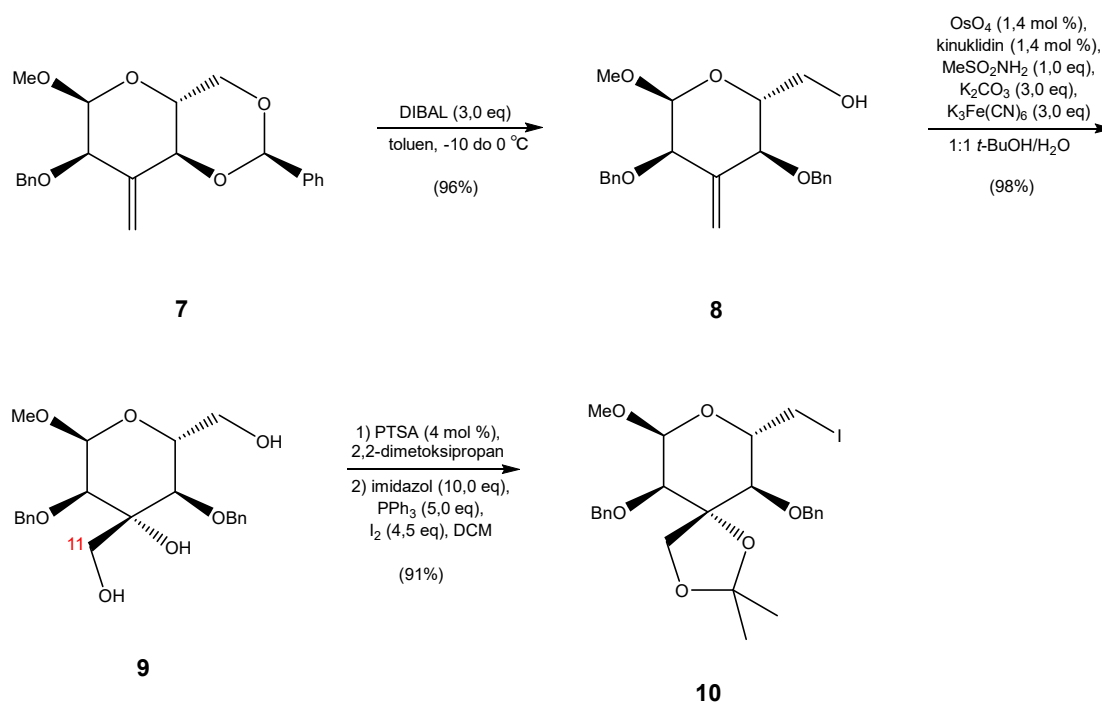
Sinteza (-)-TTX započinje pripravom spoja **7** iz komercijalno dostupnog derivata glukoze **4** u tri koraka prema poznatoj proceduri. Prvi korak obuhvaća zaštitu hidroksilne skupine na C7 spoja **4** benziliranjem pomoću dibutilkositrovog oksida i benzil-bromida.  $\text{Bu}_2\text{SnO}$  je reagens koji se i obično koristi za regioselektivnu zaštitu hidroksilnih skupina ugljikohidrata koje su slične po reaktivnosti. Izravno benziliranje ugljikohidrata zahtjeva korištenje jake baze te se pritom ne ostvaruje visoka regioselektivnost. Korištenjem  $\text{Bu}_2\text{SnO}$  problem regioselektivnosti je riješen tako da kisikovi atomi dviju susjednih hidroksilnih ili alkoksidnih skupina u *cis*-odnosu keliraju kositar, uz povećanje nukleofilnosti tih kisikovih atoma te alkilaciju kisika na kojem je bio vezan proton.<sup>13,14</sup> Slijedi dobivanje ketona **6** iz sekundarnog alkohola **5** varijantom Swernove oksidacije koja za aktivaciju DMSO koristi anhidrid trifluoroctene kiseline umjesto

oksalil-klorida. Keton **6** potom se Petersonovom olefinacijom prevede u *egzo*-metilenski građevni blok **7**.<sup>15</sup> (Slika 4.)



Slika 4. Dobivanje *egzo*-metilenskog građevnog bloka.

U sljedećem koraku, benzilidenski acetal spoja **7** podvrgne se regioselektivnom reduktivnom cijepanju diizobutilaluminijevim hidridom (DIBAL) u toluenu, pri čemu se na C5 instalira benzil-eterska zaštitna skupina. Tanaka i suradnici pokazali su da regioselektivnost otvaranja prstena benzilidenskog acetala značajno ovisi o reakcijskim uvjetima, a posebno o izboru otapala u kojem će se provoditi reakcija i otapala u kojem dolazi DIBAL kao reagens. Tako otopina DIBAL u toluenu usmjerava reakciju prema nastanku **8**, a u diklormetanu prema nastanku njegovog regioizomera.<sup>16</sup> Nadalje, **8** se enantioselektivno dihidroksilira u reakciji sličnoj Sharplessovoj asimetričnoj dihidroksilaciji. Nastali vicinalni diol **9** posjeduje ispravnu apsolutnu konfiguraciju atoma C6. Zaštitom vicinalnog diola **9** u obliku acetonida te njegovim jodiranjem na poziciji C6 Appelovom reakcijom dobiva se primarni alkil-jodid **10**.<sup>8</sup> (Slika 5.) Klasična Appelova reakcija je metoda prevođenja alkohola u alkil-kloride koristeći trifenilfosfin i tetraklorougljik.<sup>17</sup> Naknadno se pokazalo da se korištenjem tetrabromougljika, tetrajodougljika, metil-jodida te elementarnog joda uz dodatak imidazola kao baze ovom reakcijom iz alkohola mogu prirediti i odgovarajući alkil-bromidi odnosno jodidi.

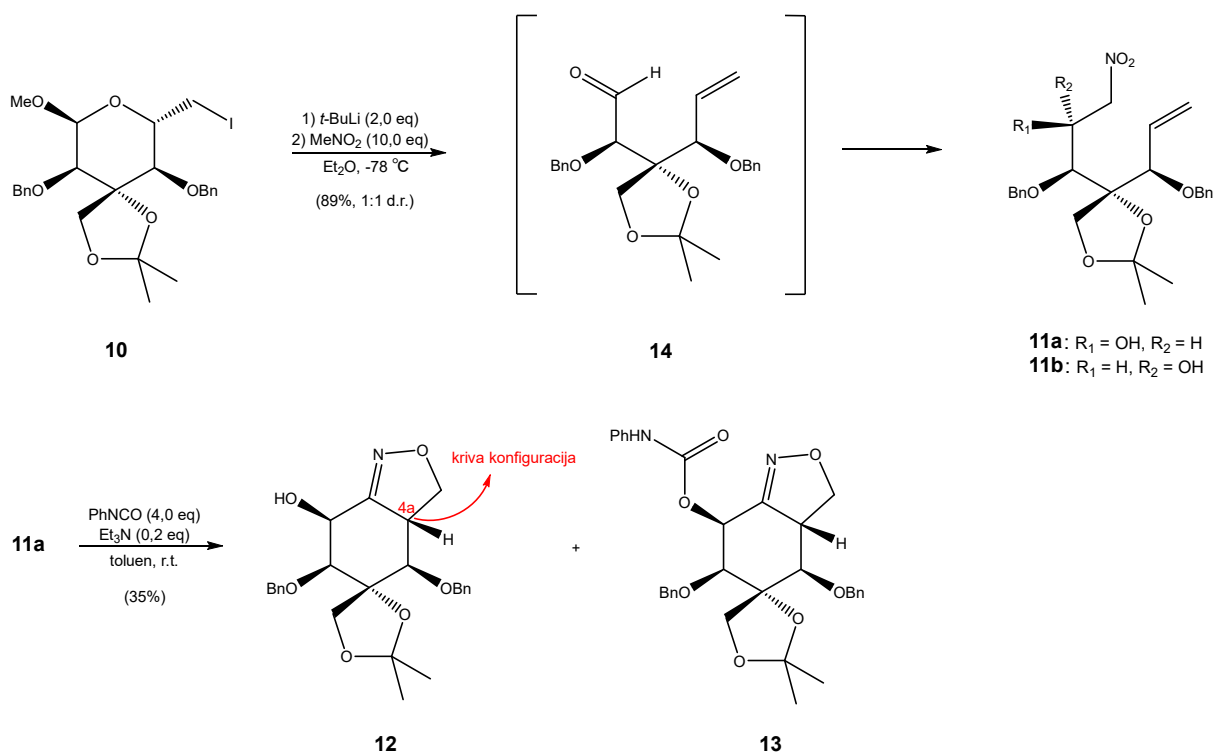


Slika 5. Priprava alkil-jodidnog perkursora za izoksazolinski građevni blok

U ovom se koraku priprava izoksazolinskog građevnog bloka **12** grana u dva pristupa. Prvi je prikazan na slici 6. Tretiranjem primarnog alkil-jodida **10** *tert*-butillitijem pri sniženoj temperaturi nastane nezasićeni aldehyd **14**, koji *in situ* reagira s nitrometanom u Henryjevoj reakciji, dajući 1:1 smjesu dijastereomera **11a** i **11b**. Henryjeva reakcija je bazno katalizirana reakcija nastajanja veze ugljik-ugljik između nitroalkana i aldehida odnosno ketona. Mehanistički je analogna aldolnoj reakciji, pa se često naziva i nitroaldolnom reakcijom.<sup>18</sup> Budući da produkti ove reakcije,  $\beta$ -hidroksinitro spojevi, često posjeduju kiseli  $\alpha$ -proton, sklone su eliminaciji vode. Stoga, ako je u cilju izolirati  $\beta$ -hidroksinitro spoj, valja pripaziti da se ne koristi preveliki suvišak baze u reakciji. Komputacijska istraživanja pokazala su da stereokemija ove reakcije značajno ovisi o veličini alkilnih skupina nitroalkana i aldehida odnosno ketona.<sup>19,20</sup> Budući da se u ovoj reakciji kao nitroalkan koristi nitrometan koji ne sadrži sterički zahtjevne alkilne skupine, reakcija nije stereoselektivna. Sljedeći cilj autora bila je sinteza cikloheksanske jezgre tetrodotoksina intramolekulskom 1,3-dipolarnom cikloadicijom. U tu je svrhu **11a** tretiran fenil-izotiocijanatom uz dodatak katalitičke količine trietilamina (TEA). S obzirom na to da je razlika između polaznog nitroalkana i ciljanog nitril-oksida u samo jednoj molekuli vode, fenil-izotiocijanat se dodaje kao dehidrationsko sredstvo.<sup>21</sup> *In situ* generirani nitril-oxid trenutačno stupa u dijastereoselektivnu intramolekulsku cikloadicijku



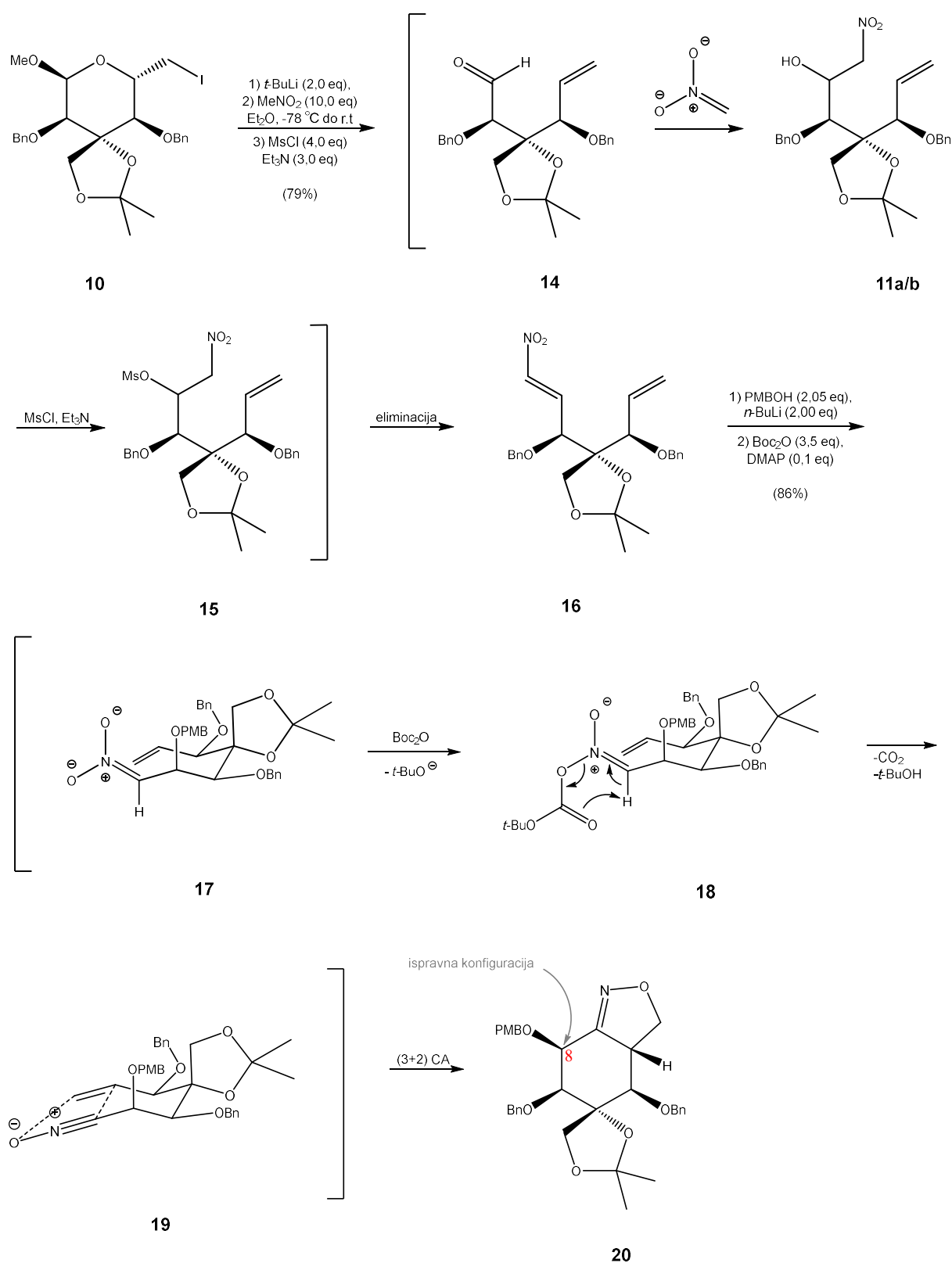
reakciju s alkenilnom skupinom dajući izoksazolin **12** u umjerenom iskorištenju, uz **13** kao nusprodukt. Iako je rendgenskom difrakcijom utvrđeno je da je konfiguracija atoma C4a invertirana u odnosu na TTX, autori su procijenili da će taj diastereomer izoksazolina biti dostupniji za napad nukleofila u koraku sinteze  $\alpha$ -tercijarnog amina. Podvrgavanje diastereomera **11b** istim reakcijskim uvjetima dovelo je samo do raspada spoja.



Slika 6. Prvi pristup pripravi izoksazolinuskog građevnog bloka

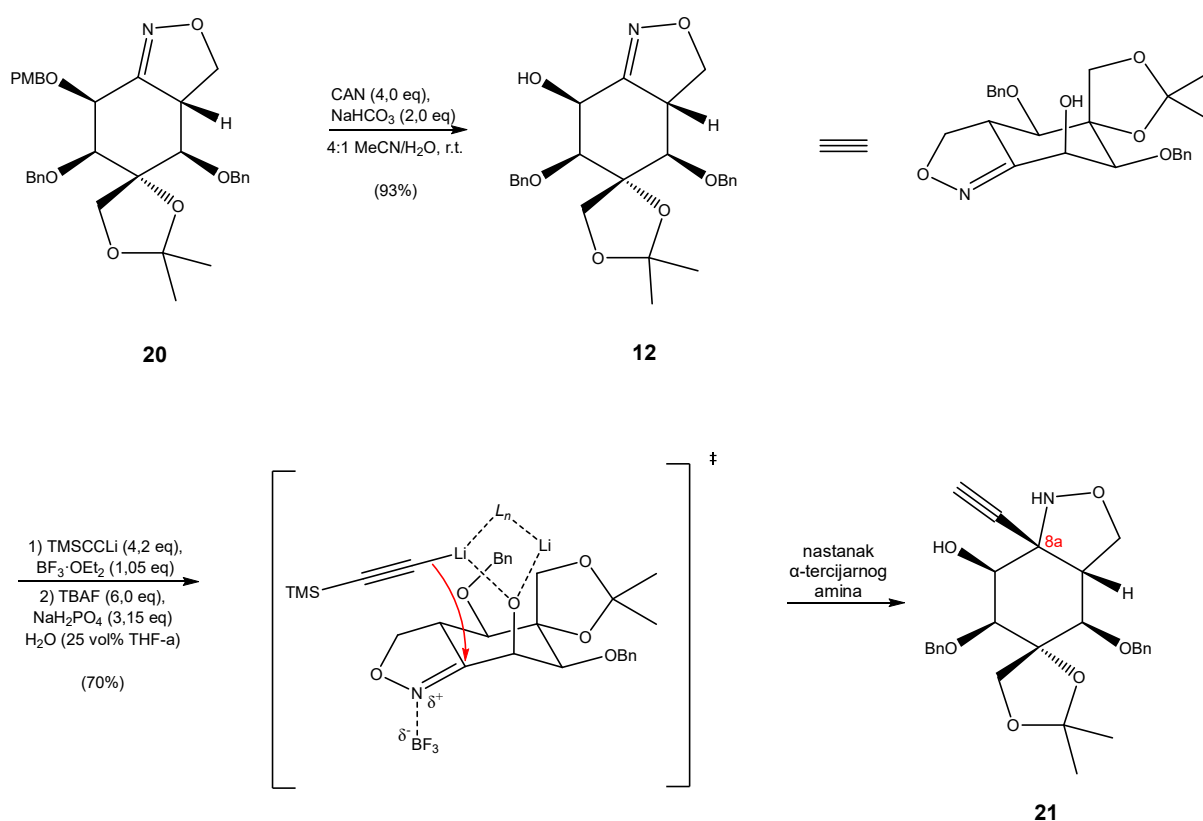
Nedijastereoselektivnost Henryjeve reakcije te relativno nisko iskorištenje cikloadicijske reakcije potaknuli su autore da pronađu metodu kojom bi selektivno instalirali stereocentar na C8. U svrhu postizanja toga, produkte Henryjeve reakcije **11a** i **11b** ovoga su puta podvrgnuli dehidrataciji *in situ*, a nastali nitroalken **16** tretirali litijevim alkoksidom 4-metoksibenzilnog alkohola pa anhidridom Boc<sub>2</sub>O uz 4-dimetilaminopiridin (DMAP) kao bazu. (Slika 7.) U prvom koraku ove reakcije alkoksid 4-metoksibenzilnog alkohola reagira oksa-Michaelovom adicijom s nitroalkenom **16**, dajući nitronat **17** kao međuprodukt. **17** reagira s anhidridom Boc<sub>2</sub>O uz privremenu ugradnju Boc-zaštitne skupine, koja se u idućem koraku eliminira u obliku Boc-OH uz nastanak nitril-oksidnog međuprodukta **19**. Konačno, intramolekulskom 1,3-dipolarnom cikloadicijom zatvara se cikloheksanski prsten uz postizanje ispravne konfiguracije

na C8 te invertirane konfiguracije na C4a u odnosu na TTX. Mehanizam reakcije predložen je na temelju rezultata provedenih kvantno-mehaničkih proračuna.<sup>15</sup>



Slika 7. Efikasniji pristup dobivanju izoksazolinskog građevnog bloka

Izoksazolinu **20** u sljedećem se koraku skine PMB-zaštitna skupina pomoću cerijevog amonijevog nitrata (CAN), uz nastanak **12**. CAN svoju uporabu u organskoj kemiji pronalazi kao oksidans sposoban oksidirati niz alkohola, fenola i etera. Kada se koristi za skidanje PMB-zaštite potrebno ga je dodati najmanje 2 ekvivalenta jer se PMB-zaštitna skupina skida u obliku *p*-metoksibenzilnog alkohola kojeg CAN dalje oksidira do odgovarajućeg aldehida.<sup>22</sup> Nadalje, **12** se tretira litijevim trimetilsililacetilidom uz dodatak borovog trifluorida eterata, pri čemu dolazi do adicije nukleofila s konveksne strane izoksazolina **12**. Ispostavilo se da je prisutnost hidroksilne skupine u **12** ključna za uspješnost ove reakcije jer kada je ista reakcija ponovljena sa zaštićenim **20** konverzija reaktanta u produkt bila je znatno niža. Pretpostavlja se da deprotonirana hidroksilna skupina koordinira nukleofil i na taj način usmjeruje njegov napad.<sup>23</sup> U drugoj fazi ove reakcije, dodatkom tetra-*n*-butilamonijevog fluorida (TBAF) uklanja se TMS-zaštitna skupina. Dobiveni  $\alpha$ -tercijarni amin **21** posjeduje sve atome ugljikovog skeleta tetrotoksina te pet od ukupno devet njegovih stereocentara s ispravnom konfiguracijom. (Slika 8.)

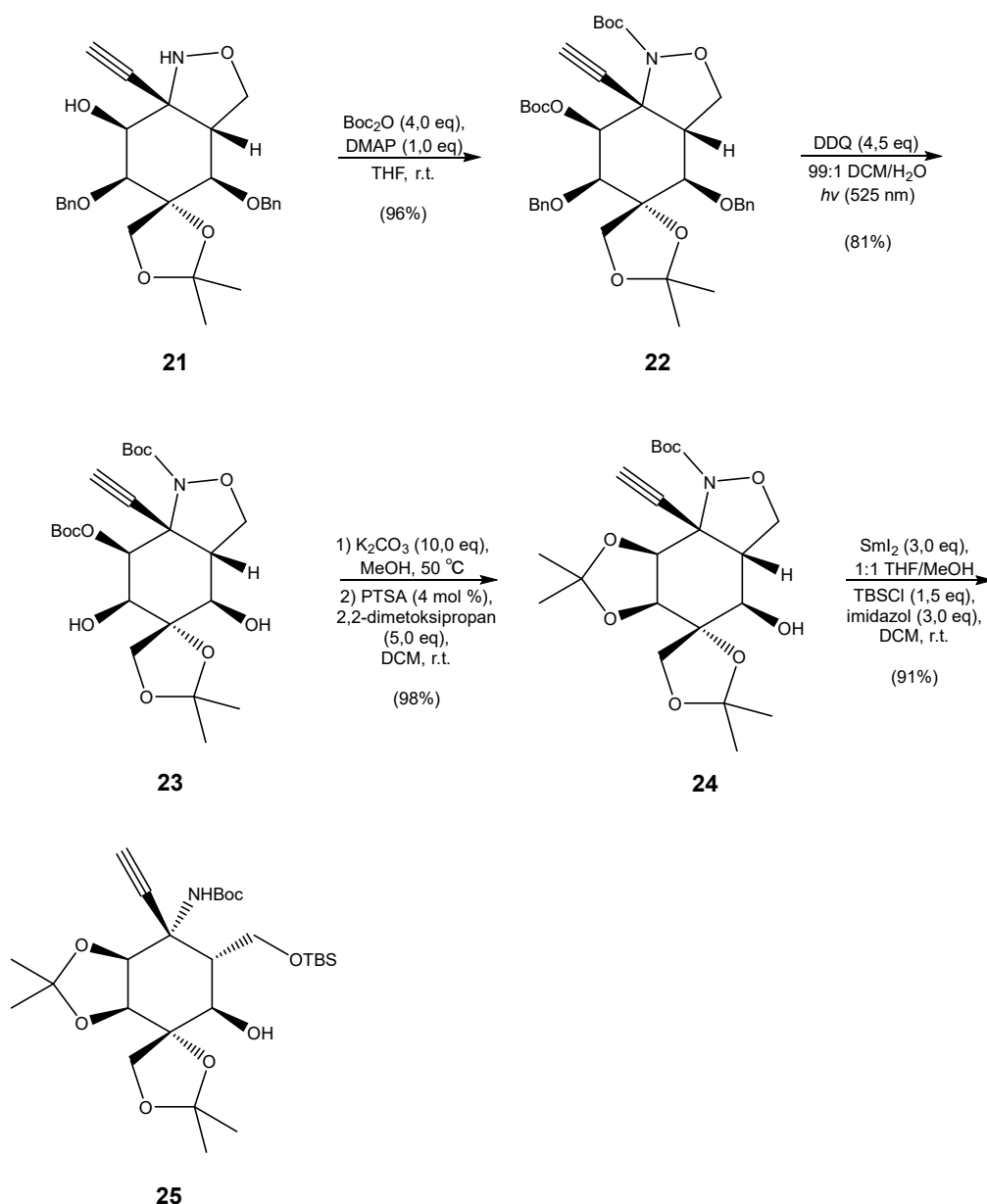


Slika 8. Prevođenje izoksazolinog u alkinil-izoksazolidinski građevni blok.

### 2.2.3. Druga faza totalne sinteze – dobivanje hidroksilaktonskog prekursora

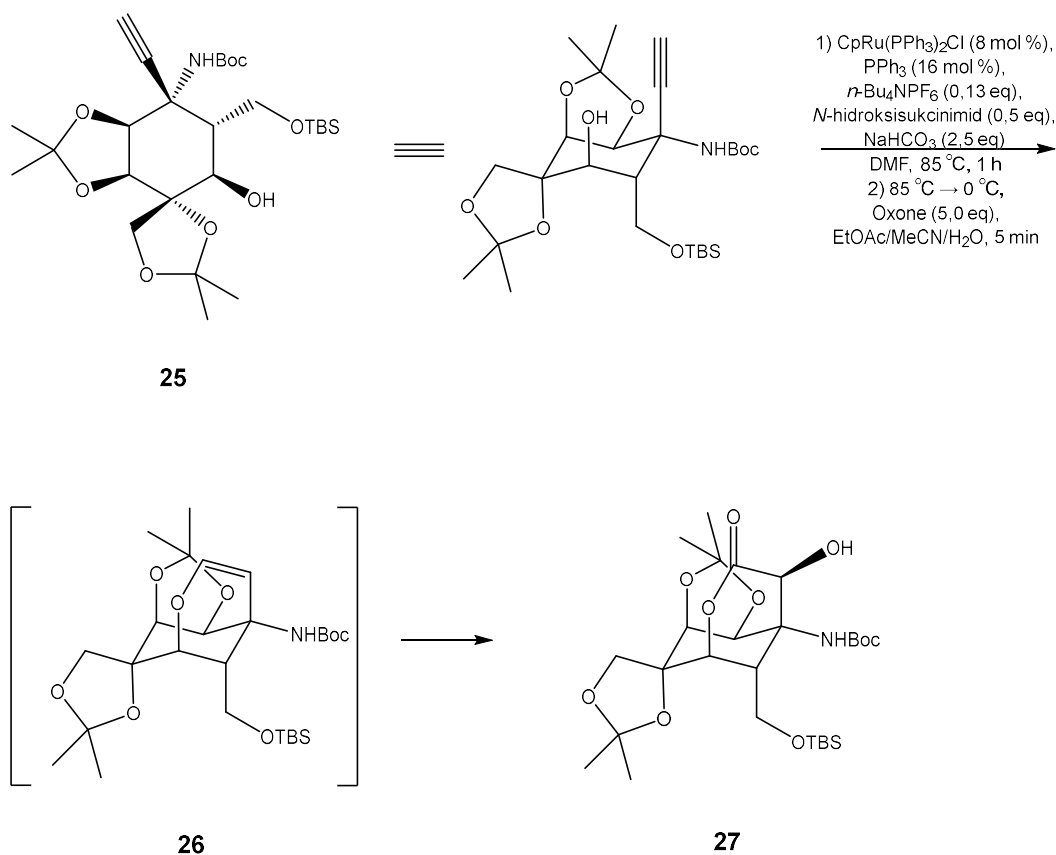
Sljedeći cilj bilo je uvođenje kiralnog centra i hidroksilne skupine na C9 s hidroksilnom te laktona koji bi sudjelovao u nastanku *ortho*-kiselinskog motiva tetradotoksina. Prvobitna strategija uključivala je *5-endo-dig* ciklizaciju između hidroksilne skupine na C8 i terminalnog kraja alkinilne skupine, pri čemu bi se nastali dihidrofuran nizom reakcija preveo u *ortho*-kiselinu. Budući da se takav pristup nije pokazao uspješnim, autori su se okrenuli razvoju nove strategije.

Izlaganjem **21** anhidridu Boc<sub>2</sub>O uz prisutnost baze postiže se zaštita hidroksilne skupine na C8 te dušikovog atoma izoksazolinskog prstena. Prevođenje **22** u **23** predstavljalo je izazov jer je uobičajena metoda za skidanje benzil-eterske zaštite paladijem katalizirano hidrogeniranje ili tretiranje spoja jakim kiselinom. U ovom slučaju niti jedna od tih metoda nije prihvatljiva zbog podložnosti alkinilne skupine hidrogeniranju te osjetljivosti ostalih zaštitnih skupina na kisele uvjete. Autori su ovom problemu doskočili fotokemijskom debenzilacijom pomoću vidljive svjetlosti valne duljine 525 nm uz dodatak DDQ kao fotooksidansa. Riječ je o relativno novoj metodi koja omogućava selektivno uklanjanje benzil-eterske zaštite u prisustvu skupina osjetljivih na katalitičko hidrogeniranje, kao što su azidna, alkenilna i alkinilna skupina.<sup>24</sup> Pokušaj izvođenja ove reakcije na nezaštićenom alkoholu **21** te upotrebe svjetlosti više energije samo je dovela do raspada reaktanta. Produktu debenzilacije **23** u idućem se koraku skida *O*-Boc zaštitna skupina, a nastali triol zaštićuje kao bis-acetonid **24**. On se potom podvrgne redukciji izoksazolidinskog prstena koju je moguće postići korištenjem samarijevog diiodida, snažnog reducensa poznatog i pod nazivom Kaganov reagens. (Slika 9.) Kaganov reagens izabran je umjesto katalitičkog hidrogeniranja zbog prisustva alkinilne skupine. Osim kao jaki reducens, Kaganov reagens svoju primjenu u organskoj kemiji pronalazi i kao reagens u reakcijama nastajanja veze ugljik-ugljik, primjerice u Barbierovoj reakciji.<sup>25,26</sup>

Slika 9. Dobivanje prekursora za pripremu  $\alpha$ -hidroksilaktona

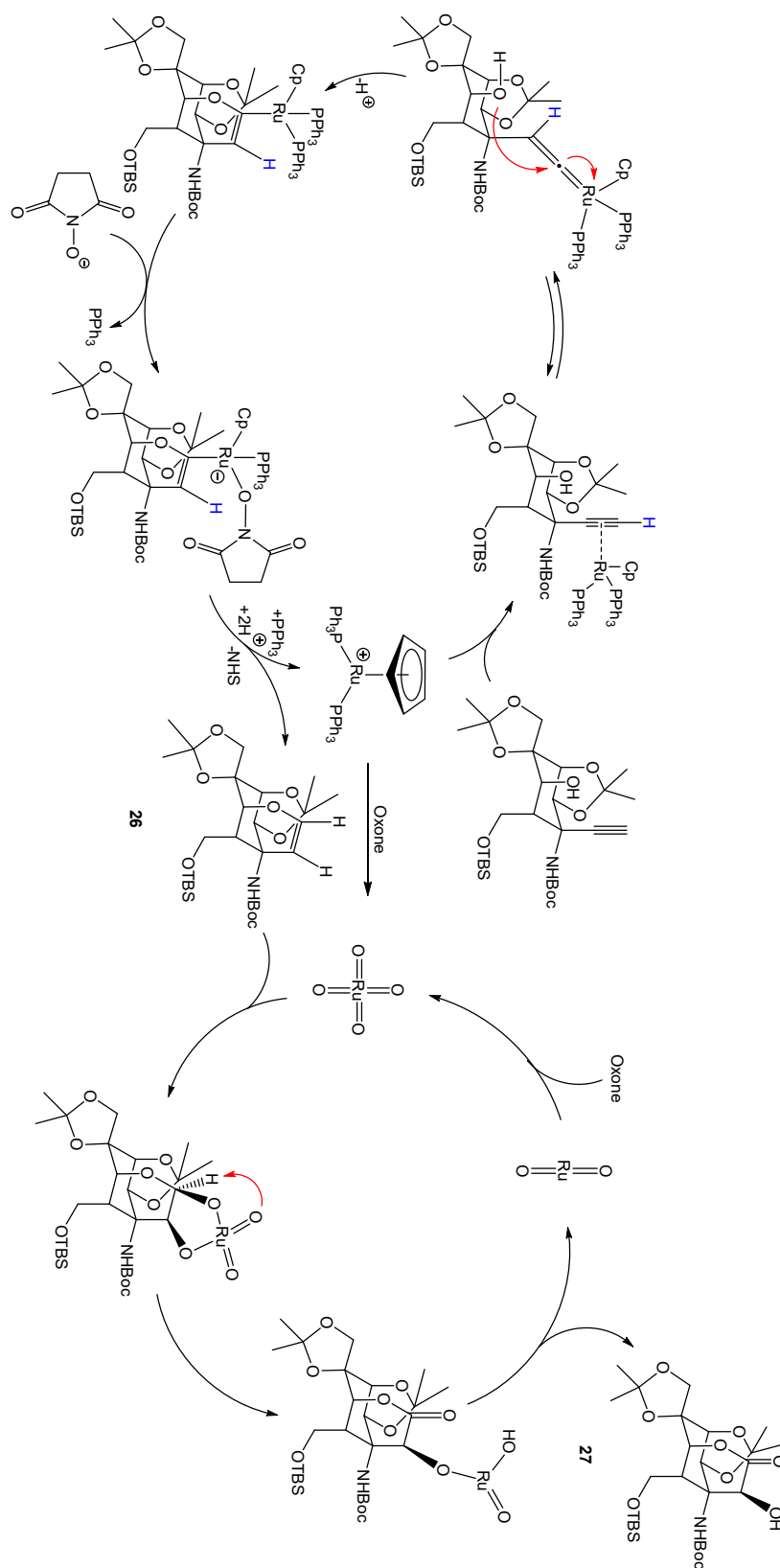
Korak konverzije alkina **25** u hidroksilakton **27** ključan je za uspješnost ove totalne sinteze. Prvobitni pristup ovom problemu uključivao je *6-endo-dig* ciklizaciju između hidroksilne skupine i terminalnog kraja alkinilne skupine, a nastali dihidropiran bi se potom stereoselektivno oksidirao do hidroksilaktona. Međutim, kao i prošli put, ova strategija nije polučila željene rezultate zbog sklonosti supstrata prema *5-egzo-dig* ciklizaciji. Rješenje ovog problema leži u korištenju  $\text{CpRu}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}$  kao cikloizomerizacijskog katalizatora koji alkin **25** prevodi u dihiropiran **26**. Autorima su kao inspiracija za ovu reakciju poslužili radovi Trosta i suradnika<sup>27</sup> te McDonalda i suradnika.<sup>28</sup> Uz to, autori su pretpostavili da je dihidropiran **26**

moguće prevesti u hidroksilakton **27** transformacijom cikloizomerizacijskog katalizatora u oksidans, pazeći da se pritom i sam produkt **27** ne oksidira. To je postignuto korištenjem Oxona (smjese kalijevog peroksimonosulfata, kalijevog hidrogensulfata i kalijevog sulfata u omjeru 2:1:1) kao oksidansa. (Slika 10.)



Slika 10. Reakcija pripreme  $\alpha$ -hidroksilaktonskog prekursora tetrodotoksina

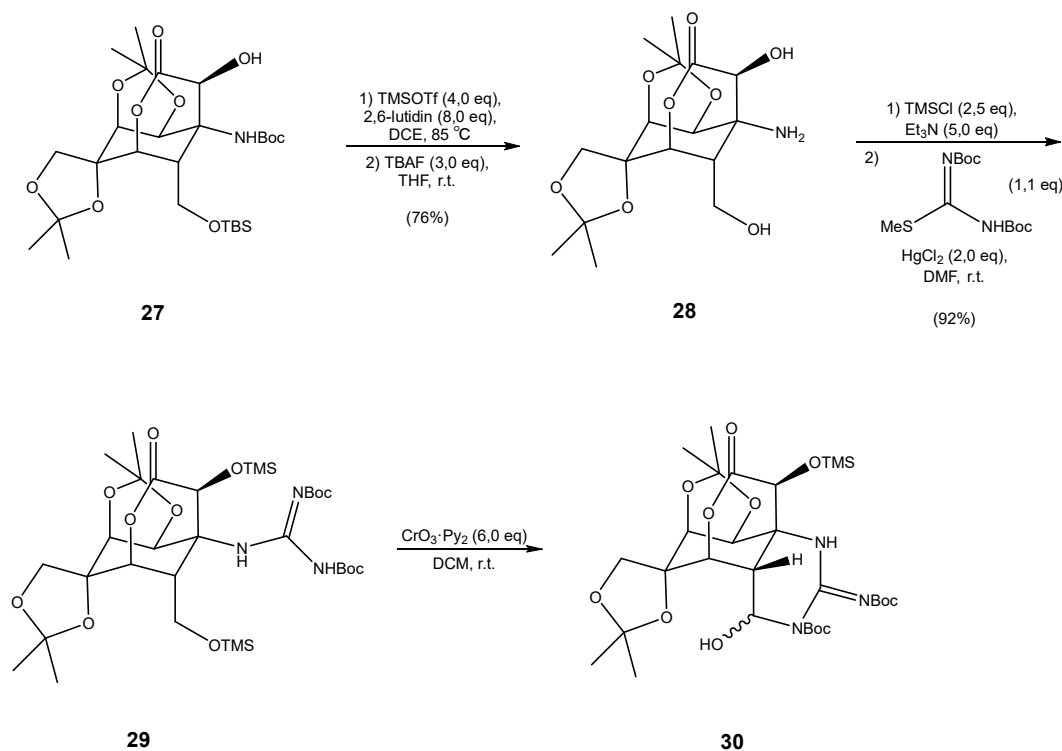
Po pretpostavci, Oxone prevodi cikloizomerizacijski katalizator prevodi u RuO<sub>4</sub>, koji potom oksidira dihidropiran **26** do željenog hidroksilaktona **27** uz gotovo potpunu dijastereoselektivnost. (Slika 11.) Dodatna prednost ove reakcije je i ta što je izbjegnuta izolacija dihidropirana **26** iz reakcijske smjese s kojim je cikloizomerizacijski katalizator kopolaran na silikagelu.



Slika 11. Predloženi mehanizam reakcije hidroksilaktonizacije

2.2.4. Treća faza totalne sinteze – nastanak *ortho*-kiseline te ugradnja gvanidinskog motiva

Posljednja faza ove totalne sinteze uključuje ugradnju gvanidinskog motiva te nastanak *ortho*-kiseline. Uklanjanjem *N*-Boc zaštitne skupine koristeći TMSOTf i 2,6-lutidin te sililnih zaštitnih skupina pomoću TBAF nastane amino diol **28**. On se potom zaštiti TMS-eterskom zaštitnom skupinom, pa *in situ* gvanilira po Kishijevim uvjetima dajući **29** koji posjeduje sve atome ciljne molekule tetrodotoksina. Bis-trimetilsilil-eter **29** tretira se Collinsovim reagensom koji zbog steričkih smetnji selektivno skine samo jednu TMS-zaštitnu skupinu. Nastali primarni alkohol oksidira se do aldehida, a njega odmah nukleofilno napada jedan od gvanidinskih dušika; nastaje smjesa hemiaminalnih izomera **30**. (Slika 12.)

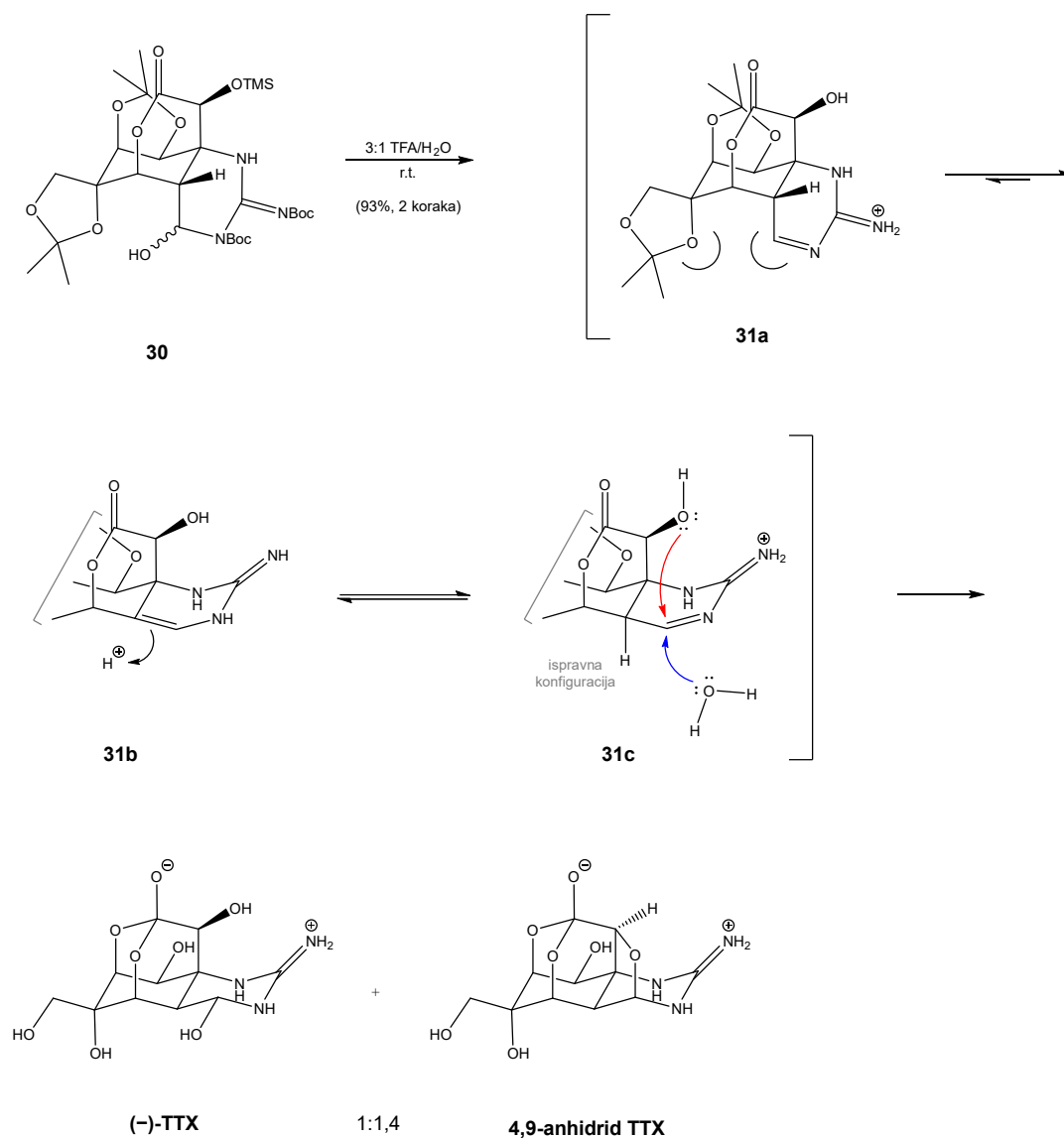


Slika 12. Postupak ugradnje gvanidinskog motiva u strukturu

Kada se sirovi **30** pusti da se miješa u 25% vodenoj otopini TFA preko noći, dogodi se niz transformacija čiji je konačni ishod smjesa (–)-TTX i 4,9-anhidrida TTX. Iako je teško egzaktno definirati slijed reakcijskih događaja u posljednjem koraku, do tautomerizacije **31a** vjerojatno dolazi zbog odbijanja jednog od acetonidnih kisika te C4 ugljika. Ponovnom tautomerizacijom **31b** nastaje **31c**, epimer početnog **31a** s ispravnom konfiguracijom na C4a. Međutim, zbog blizine C9 hidroksilne skupine elektrofilnom C4 atomu, moguća su dva ishoda;



prvi je nukleofilni napad vode, čime nastaje (-)-TTX, a drugi je nukleofilni napad hidroksilne skupine uz nastanak 4,9-anhidrida TTX. U konačnici je dobiveno 9,1 mg sirove smjese za koju je NMR analizom utvrđeno da sadrži (-)-TTX i 4,9-anhidrid TTX u omjeru 1:1,4.<sup>15</sup> (Slika 13.)



Slika 13. Zadnji korak sinteze uz predloženi mehanizam nastajanja (-)-TTX i 4,9-anhidrida TTX

Budući da su TTX i 4,9-anhidrid TTX u kemijskoj ravnoteži u otopini, promjenom uvjeta moguće je manipulirati omjerom njihove koncentracije. Tako su autori zagrijavanjem njihove smjese tri dana u 5% otopini deuterirane octene kiseline u D<sub>2</sub>O pri 60 °C uspjeli dobiti 2,9:1

smjesu TTX i 4,9-anhidrida TTX. Njih je moguće odvojiti metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) uz reverznu fazu.<sup>15,29</sup>

### § 3. ZAKLJUČAK

Razvoj novih reakcija, reagensa i sintetskih metoda značajno je ubrzao i olakšao sintezu tetrodotoksina. Najbolji dokaz tomu su fotokemijska reduktivna debenzilacija u prisustvu Boc-zaštitnih skupina, te rutenijem katalizirana oksidativna laktonizacija alkina. One su u jednom koraku omogućile izravne konverzije koje bi tradicionalnim metodama zahtijevale znatno više koraka te rezultirale puno nižim iskorištenjem. Međutim, kod sinteze strukturno složenih prirodnih spojeva velik značaj ima i pomno planiranje sinteze. Važnost pomnog planiranja sinteze posebno je došla do izražaja kod pripreve alkinil-izoksazolidinskog građevnog bloka s neispravnom konfiguracijom na jednom od ugljikovih atoma radi postizanja reaktivnosti, a koja je u zadnjim koracima reakcije invertirana u ispravnu.

Traunerova totalna sinteza tetrodotoksina broji samo 22 koraka uz ukupni prinos od čak 11%. Usporedbe radi, prva objavljena asimetrična totalna sinteza tetrodotoksina (Isobe 2003.) sastojala se od čak 72 koraka. Zbog svoje izazovne strukture, tetrodotoksin nastavlja zaokupljati maštu sintetskih organskih kemičara, o čemu svjedoči i činjenica da su u posljednjih deset godina objavljene četiri totalne sinteze ovog prirodnog spoja.

## § 4. LITERATURNI IZVORI

1. C. Wentrup, *Eur. J. Org. Chem.* **2022** (2022) e202101492.
2. E. Steingruber, *Ullmann's Encycl. Ind. Chem.* **19** (2004) 55-63.
3. V. Bane, M. Lehane, M. Dikshit, A. O'Riordan, A. Furey, *Toxins* **6** (2014) 693-755.
4. R. B. Woodward, *Pure Appl. Chem.* **9** (1964.) 49-75.
5. A. Furusaki, Y. Tomiie, I. Nitta, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **43**, Issue (1970) 3332–3341.
6. Y. Kishi, T. Fukuyama, M. Aratani, F. Nakatsubo, T. Goto, S. Inoue, H. Tanino, S. Sugiura, H. Kakoi, *J. Am. Chem. Soc.* **94** (1972) 9219–9221.
7. N. Ohyabu, T. Nishikawa, M. Isobe, *J. Am. Chem. Soc.* **125** (2003) 8798-8805.
8. David B. Konrad *et al.*, *Science* **377** (2022) 411-415.
9. T. Narahashi, *J. Toxicol., Toxin Rev* **20** (2001) 67-84.
10. X.-W. Chen *et al.*, *Toxicon* **57** (2011) 938–943.
11. M. Makarova, L. Rycek, J. Hajicek, D. Baidilov, T. Hudlicky, *Angew. Chem. Int. Ed.* **58** (2019) 18338- 18387.
12. D. B. Konrad, B. Kicin, D. Trauner, *Synlett* **30** (2019) 383–386.
13. Y. Zhou, J. Li, Y. Zhan, Z. Pei, H. Dong, *Tetrahedron* **69** (2013) 2693-2700.
14. S. David, S. Hanessian, *Tetrahedron* **41** (1985) 643-663.
15. David B. Konrad *et al.*, *Science* **377** (2022) 411-415. [Supplementary Materials]
16. N. Tanaka, I. Ogawa, S. Yoshigase, J. Nokami, *Carbohydr. Res.* **343** (2008) 2675-2679.
17. R. Appel, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **14** (1975) 801-811.
18. <https://www.organic-chemistry.org/namedreactions/henry-reaction.shtml> (datum pristupa 7. lipnja 2024.)
19. [https://en.wikipedia.org/wiki/Henry\\_reaction](https://en.wikipedia.org/wiki/Henry_reaction) (datum pristupa 7. lipnja 2024.)
20. B. Lecea, A. Arrieta, I. Morao, F. P. Cossío, *Chem. - Eur. J.* **3** (1997) 20-28.
21. J. Clayden, N. Greeves, S. Warren, *Organic chemistry*, Oxford University Press, New York, 2012, str. 902-903.
22. W. S. Trahanovsky, L. Brewster Young, G. L. Brown, *J. Org. Chem.* **32** (1967) 3865–3868.
23. S. Diethelm, E. M. Carreira, *J. Am. Chem. Soc.* **137** (2015) 6084–6096.
24. C. Cavedon *et al.*, *Org. Lett.* **23** (2021) 514–518.
25. [https://en.wikipedia.org/wiki/Samarium\(II\)\\_iodide](https://en.wikipedia.org/wiki/Samarium(II)_iodide) (datum pristupa 10. lipnja 2024.)

26. F. Machrouhi, B. Hamann, J.-L. Namy, H. B. Kagan, *Synlett* **7** (1996) 633–634.
27. B. M. Trost, Y. H. Rhee, *J. Am. Chem. Soc.* **121** (1999) 11680–11683.
28. F. E. McDonald, K. S. Reddy, Y. Díaz, *J. Am. Chem. Soc.* **122** (2000) 4304–4309.
29. K.-i. Sato *et al.*, *J. Org. Chem.* **73** (2008) 1234–1242. [Supplementary Materials]