

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
Katedra organické chemie



Klára Piskořová

Adice Grignardových činidel na triterpenoidní oxoderiváty

Bakalářská práce

Studijní obor: Bioorganická chemie B1407

Vedoucí práce: RNDr. Jan Šarek, Ph.D.

Olomouc 2013

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Olomouci, 5. 5. 2013

.....

Podpis

Poděkování:

Můj velký dík patří mému školiteli RNDr. Janu Šarkovi, Ph.D. za jeho odborné vedení při vzniku této práce, za jeho trpělivost, vlídná slova, cenné rady, za čas, který mi věnoval a také za pomoc při interpretaci spekter.

Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Martinu Vlkovi z Katedry jaderné chemie FJFI ČVUT v Praze za změření IČ a NMR spekter, Ing. Miroslavu Lorencovi z Katedry organické a jaderné chemie PřF UK v Praze za měření NMR spekter, Mgr. Bohuně Šperlichové za měření optické otáčivosti, RNDr. Milanu Urbanovi, Ph.D. z Katedry organické chemie PřF UP v Olomouci za změření a pomoc při interpretaci NMR spekter a RNDr. Martinu Štíchovi za změření MS spekter.

Největší dík ale patří mé rodině a všem přátelům, kteří mě během celého studia a během vzniku této podporovali, a bez kterých by nebyl možný vznik této práce.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora: Klára Piskořová

Název práce: Adice Grignardových činidel na triterpenoidní oxoderiváty

Typ práce: Bakalářská práce

Pracoviště: RNDr. Jan Šarek, Ph.D. – Katedra organické chemie, PřF, UP

Školitel: RNDr. Jan Šarek, Ph.D.

Školitel-konzultant: -

Rok obhajoby práce: 2013

Abstrakt:

Cílem této bakalářské práce byla syntéza triterpenoidních derivátů s použitím Grignardových činidel a zhodnocení jejich cytotoxické aktivity. Teoretická část se věnuje terpenům v živých organismech, dále jejich biologickým účinkům a zabývá se především jejich cytotoxickými vlastnostmi. V rámci této práce bylo připraveno 12 nových triterpenoidních terciárních alkoholů (**7-18**) reakcemi karbonylových sloučenin s Grignardovými činidly a 2 nové aldehydy (**3, 4**) a byly zjištěny jejich cytotoxické vlastnosti na nádorové linii CEM. Ve skupině těchto nových derivátů měla sloučenina **17** vyšší aktivitu ($IC_{50} = 11 \mu M$) a zasluhuje další studie.

Klíčová slova: triterpeny, triterpenoidy, Grignardovo činidlo, cytotoxická aktivita

Počet stran: 45

Počet příloh: 0

Jazyk: český

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Klára Piskořová

Title: Study of addition of Grignard reagents to triterpenoids oxoderivates

Type of thesis: Bachelor's

Department: RNDr. Jan Sarek, Ph.D. – Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, Palacky University Olomouc

Advisor: RNDr. Jan Sarek, Ph.D.

Advisor-consultant: -

The year of presentation: 2013

Abstract:

The aim of this bachelor thesis was to synthesize triterpenoid derivatives using Grignard reagents and evaluation of the cytotoxic activity of the products. The theoretical part contains a summary of triterpenes in living organisms and their biological activities, especially cytotoxic. In this work, 12 new triterpenoid tertiary alcohols (**7-18**) were prepared using reactions of carbonyl derivatives with Grignard reagents and 2 new aldehydes were prepared (**3, 4**). The cytotoxic activities on CEM cell line were evaluated, within this group of 14 new compounds, derivative **17** had higher cytotoxicity (IC_{50} 11 μ M) and will be studied in the future.

Keywords: triterpenes, triterpenoids, Grignard reagent, cytotoxic activity

Number of pages: 45

Number of appendixes: 0

Language: Czech

Seznam použitých zkratek

MDR	mnohočetná léková rezistence
r. t.	laboratorní teplota
RVO	rotační vakuová odparka
THF	tetrahydrofuran
Et	ethyl
Me	methyl
Ac	acetyl
Ph	fenyl

Seznam nádorových linií:

P-388	myší lymfocytární leukémie
MEL-1, 2, 4	lidský melanom
A2780	lidský karcinom vaječníku
OVCAR-5	lidský karcinom vaječníku
GROV-1	lidský karcinom vaječníku
H460	lidský nemalobuněčný plicní karcinom
A431	lidský epidermoidní karcinom
Me665/2/21	lidský melanom
Me665/2/60	lidský melanom
POGB	lidský plicní karcinom
POGB/DX	lidský plicní karcinom
A549	lidský adenokarcinom plic
B16-F10	myší melanom – metastazující
SK-MeL2	lidský maligní melanom
K562	lidská chronická myelogenní leukémie
MCF7	lidský karcinom prsu
NSCLC-N6	nemalobuněčný plicní karcinom

Obsah

OBSAH.....	7
ÚVOD	9
CÍLE BAKALÁŘSKÉ PRÁCE:	10
TEORETICKÁ ČÁST	11
1. SOUČASNÝ STAV STUDOVANÉ PROBLEMATIKY	12
1.1 <i>Výskyt terpenů v živých organismech</i>	12
1.1.1 Monoterpeny.....	12
1.1.2 Seskviterpeny	13
1.1.3 Diterpeny	14
1.1.4 Sesterterpeny	15
1.1.5 Triterpeny	16
1.2 <i>Biologické účinky triterpenů</i>	18
1.2.1 Cytotoxické účinky lupanových triterpenoidů	18
1.3 <i>Reakce triterpenických sloučenin s Grignardovými činidly</i>	20
1.3.1 Reakce s triterpenickými laktony	20
1.3.2 Reakce s terpenickými epoxidy.....	20
1.3.3. Reakce s ketosteroidy	21
1.4 <i>Syntetické terciární alkoholy s biologickou aktivitou</i>	22
2. VÝSLEDKY A DISKUZE	24
2. 1. <i>Příprava triterpenoidních oxoderivátů</i>	24
2.1.1 Aldehydy 3, 4	24
2.2. <i>Adice Grignardových činidel na triterpenoidní oxoderiváty</i>	25
2.2.1 Vinylderiváty 7-10	25
2.2.2 Allylderiváty 11-15	26
2.2.3 Ethinylderiváty 16-19	27
3. CYTOTOXICKÁ AKTIVITA PŘIPRAVENÝCH SLOUČENIN	29
4. ZÁVĚR	30
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	31
OBECNÉ POZNÁMKY K EXPERIMENTÁLNÍ ČÁSTI.....	32
<i>Obecný postup adice Grignardových činidel na triterpenoidní oxoderiváty</i>	33
<i>Obecný postup adice acetylidu lithného na triterpenoidní oxoderiváty</i>	33
1. <i>Příprava methoxyaldehydu 3</i>	34
2. <i>Příprava ethoxyaldehydu 4</i>	34
3. <i>Reakce methoxyaldehydu 3 s vinylmagnesiumbromidem</i>	35
4. <i>Reakce ethoxyaldehydu 4 s vinylmagnesiumbromidem</i>	35
5. <i>Reakce allobetulonu 5 s vinylmagnesiumbromidem</i>	36
6. <i>Reakce heptanorketonu 6 s vinylmagnesiumbromidem</i>	36
7. <i>Reakce methoxyaldehydu 3 s allylmagnesiumbromidem</i>	37
8. <i>Reakce ethoxyaldehydu 4 s allylmagnesiumbromidem</i>	37
9. <i>Reakce allobetulonu 5 s allylmagnesiumbromidem</i>	38
10. <i>Reakce heptanorketonu 6 s allylmagnesiumbromidem</i>	38
11. <i>Acetylace allylderivátu 14</i>	39
12. <i>Ethinylace methoxyaldehydu 3</i>	39
13. <i>Ethinylace ethoxyaldehydu 4</i>	40
14. <i>Ethinylace allobetulonu 5</i>	40
15. <i>Ethinylace heptanorketonu 6</i>	41

<i>Číslování skeletů</i>	42
LITERATURA:.....	43

Úvod

Už od nepaměti lidé trpěli nejrůznějšími nemocemi a hledali proto vhodný lék, který by jim ulevil od bolesti a dalších příznaků nemoci. Často hledali pomoc v přírodě, a proto se během staletí staly přírodní zdroje vyhledávaným prostředkem pro zmírnění průběhu nemoci.

Mezi významné přírodní látky patří také isoprenoidy, které jsou odvozeny od isoprenu (2-methylbuta-1,3-dienu). Vyznačují se nejrůznějšími biologickými účinky a nacházejí se v rostlinách i v živočiších. Mezi isoprenoidy patří terpeny, které jsou významné svými biologickými účinky a to hlavně díky své cytotoxické a anti-HIV aktivitě. Naše pracoviště se zabývá především studiem triterpenů a vyvíjí jejich účinné deriváty.

Předkládaná práce se zabývá adicemi Grignardových činidel na isoprenoidní deriváty a následným vyhodnocením jejich cytotoxicity.

Cíle bakalářské práce:

1. Vypracování literární rešerše na téma „Adice Grignardových činidel na isoprenoidy“.
2. Přípravavýchozích oxoderivátů pro adice Grignardových činidel.
3. Reakce oxoderivátů s Grignardovými činidly.
4. Syntéza a vyhodnocení cytotoxické aktivity připravených sloučenin.

Poznámka k textu

Číslování sloučenin v této práci je dvojitý. V kapitole *1. Současný stav studované problematiky* je použito římské číslování sloučenin podle pořadí, v jakém se objevují v textu. V dalších kapitolách včetně experimentální části je použito arabské číslování pro výchozí a připravené lupanové deriváty.

Klasické desetinné čárky jsou v textu nahrazeny desetinnými tečkami, jak je obvyklé v anglosaské literatuře. Tato náhrada má zpřehlednit zejména výpisy spektrálních dat.

TEORETICKÁ ČÁST

1. Současný stav studované problematiky

1.1 Výskyt terpenů v živých organismech

Dodnes bylo izolováno přibližně 30 000 terpenů.¹ Terpeny lze rozdělit podle počtu isoprenových stavebních jednotek na mono-, seskvi-, di-, sester-, tri-, tetra- a polyterpeny.¹

1.1.1 Monoterpeny

Monoterpeny jsou obsaženy jako esenciální látky silic v rostlinách. Jsou obsaženy např. v citrusových plodech, bylinách (např. máta peprná, pelyněk), koření, jehličnanech (cedr, jedle, borovice, jalovec), víně a v nedávné době byla zjištěna jejich produkce mořským fytoplanktonem.² Jsou chuťově výrazné, a proto se používají mimo jiné jako ochucovadla potravin. Můžeme se s nimi setkat v kosmetice, v parfumerii, v přípravcích pro domácnost, insekticidy a herbicidy², při léčbě některých zánětlivých infekcí a antimikrobiálních onemocnění a nejnovější je jejich protinádorová aktivita.^{2,3,5}

Silice i jednotlivé monoterpeny se využívají při léčbě i prevenci fyzických a psychických nemocí a poruch (aromaterapie) a také jako preventivní prostředky proti nachlazení a chřipce. Některé mají i protinádorové účinky, působí proti srdečním chorobám, předcházejí osteoporóze a vyznačují se protiplísňovými a antibakteriálními účinky.²

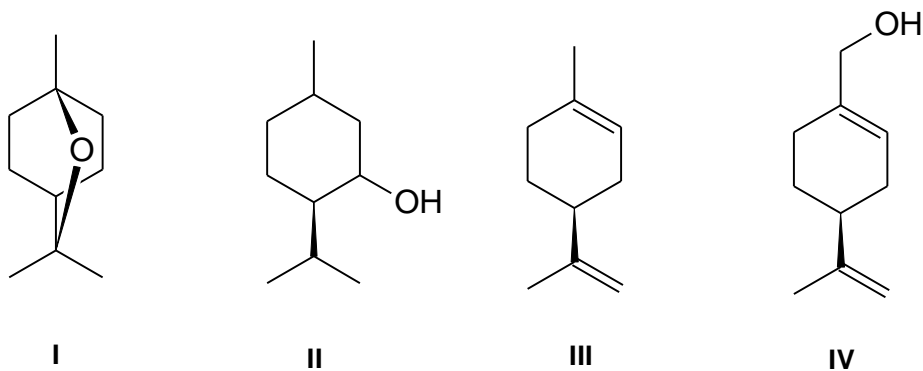
K neznámějším silicím patří olej z kejeputu střídavolistého (tea tree oil). Vyznačuje se fungicidními a antibakteriálními účinky, protože rozpouští bakteriální cytoplazmatické membrány gram-negativní bakterie *E. coli* a gram-pozitivní bakterie *Staphylococcus aureus*.²

1,8 cineol (**I**) je hlavní složkou eukalyptového oleje. Má antioxidační, antibakteriální a protizánětlivé účinky a je inhibátorem lipooxygenasy. V Německu patří mezi registrované léky a používá se např. k léčbě chronické bronchitidy a astmatu.²

(-)-Mentol (**II**) působící při nachlazení, uvolňuje dýchací cesty a tlumí kašel. Jeho aroma a farmakologické účinky jsou využity jako přísada do drogistických výrobků a cigaret. Mátová silice nebo čaj působí proti nadýmání. Má vliv na 3-hydroxy-3-methylglutaryl koenzym A reduktasu (HMGCR). Aktivuje „transient receptor potential melastatin 8“ (TRPM8), což je specifický gen pro nádorové buňky, čímž zvyšuje vnitrobuněčnou koncentraci vápenatých iontů a ovlivňuje tak dělení a apoptózu nádorových buněk.²

Mezi látku s protinádorovými účinky můžeme zařadit (-)-limonen (**III**), který je obsažen v oleji citrusových plodů a (-)-perillylalkohol (**IV**), který se nachází např. v mátě peprné a třešních.^{2,7} (-)-limonen (**III**) i (-)-perillylalkohol (**IV**) inhibují syntézu ubiquinonu a konverzi

lanosterolu na cholesterol, čímž inhibují i nádorové bujení.² Ovlivňují aktivitu HMGR a to tak, že inhibují biosyntézu tohoto enzymu mevalonátového metabolismu a urychlují jeho degradaci.² Zvyšují koncentraci růstového faktoru TGR- β 1, který inhibuje růst buněk rakoviny prsu, a receptoru M6P/IGF II, který aktivuje růstový faktor TGR- β 1.² Selektivně inhibují isoprenylaci malých G proteinů o velikosti 21-26 kDa a to díky kompetitivní inhibici prenyl-protein transferase.² Byly prokázány jejich účinky během počáteční fáze karcinogeneze a zabraňují interakci karcinogenu s DNA.² Indukují přeměnu karcinogenu na méně toxické látky. Mají vliv na podněcující fázi rakoviny a zabraňují dělení nádorových buněk.² (-)-limonen (**III**) zvyšuje aktivitu enzymů v játrech, které slouží k detoxikaci organismu, např. glutation-S-transferasy.² U zvířat bylo prokázáno, že (-)- perillylalkohol (**IV**) potlačuje nádory slinivky břišní, prsu a jater a vykazuje možné uplatnění pro své chemopreventivní účinky při léčbě rakoviny tlustého střeva, kůže, plic a prostaty.⁷



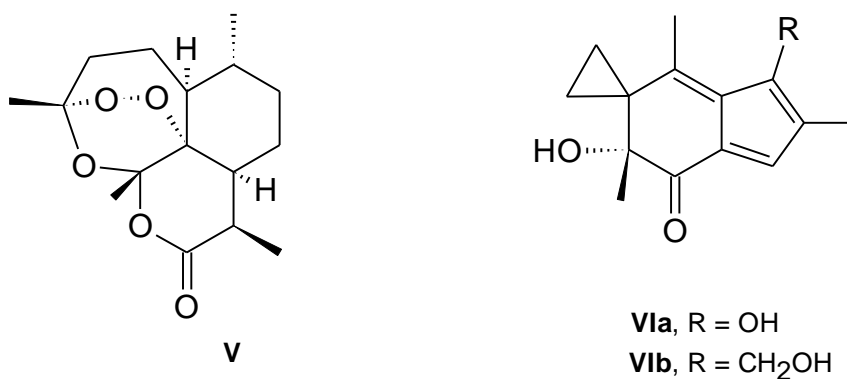
1.1.2 Seskviterpeny

Seskviterpeny jsou typické zejména pro rostliny z čeledi hvězdnicovitých, miříkovitých a šácholanovitých, ale nacházejí se také v dalších bylinách, živočiších a ve stopkovýtrusých houbách.⁸⁻¹⁰

Velmi důležitou třídou jsou seskviterpenické laktony, které vykazují široké spektrum biologické aktivity.¹¹ Jejich senzibilizující schopnost byla prokázána u řady léčivých rostlin jako např. u heřmánku pravého, čekanky obecné, slunečnice roční, řimbaby obecné a pampe-lišky lékařské.¹² Artemisin (**V**), který se pro své účinky využívá klinicky a je používán při léčbě malárie.¹³ Artemisin (**V**) se nachází v čínském pelyňku *Artemisia annua*.¹³

Dále mezi látky patřící mezi seskviterpeny můžeme zařadit illudiny, které se vyznačují cytotoxicitou proti lidským nádorovým buňkám. Byly izolovány z hlív, z druhu *Omphalotus illudnes* a příbuzných druhů.¹⁴ Za nejvýznamnější je považován Illudin S (**VIa**), který vykazu-

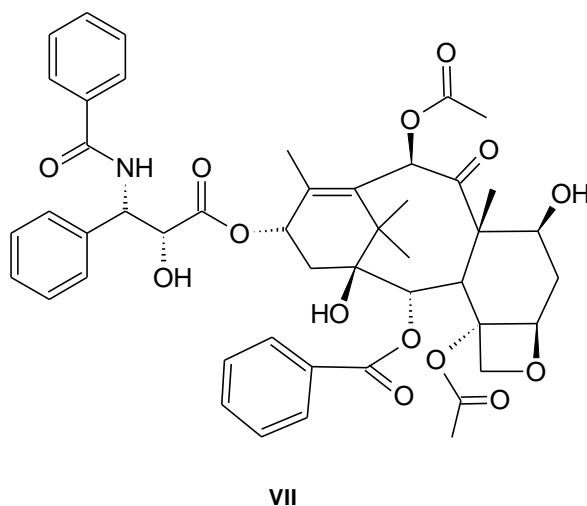
je na šesti nádorových liniích aktivitu IC_{50} v rozsahu 8 - 363 nmol/l.¹⁵ Dodnes byly syntetizovány i deriváty illudinů, které se vyznačují příznivými farmakologickými vlastnostmi.¹⁶ Mezi tyto látky patří např. Irofulven (**VIb**), který se nyní nachází ve fázi II. klinických testů v Americe, Evropě a Asii proti různým druhům karcinomů a ve III. fázi klinického testování proti rakovině slinivky břišní v USA.¹⁷



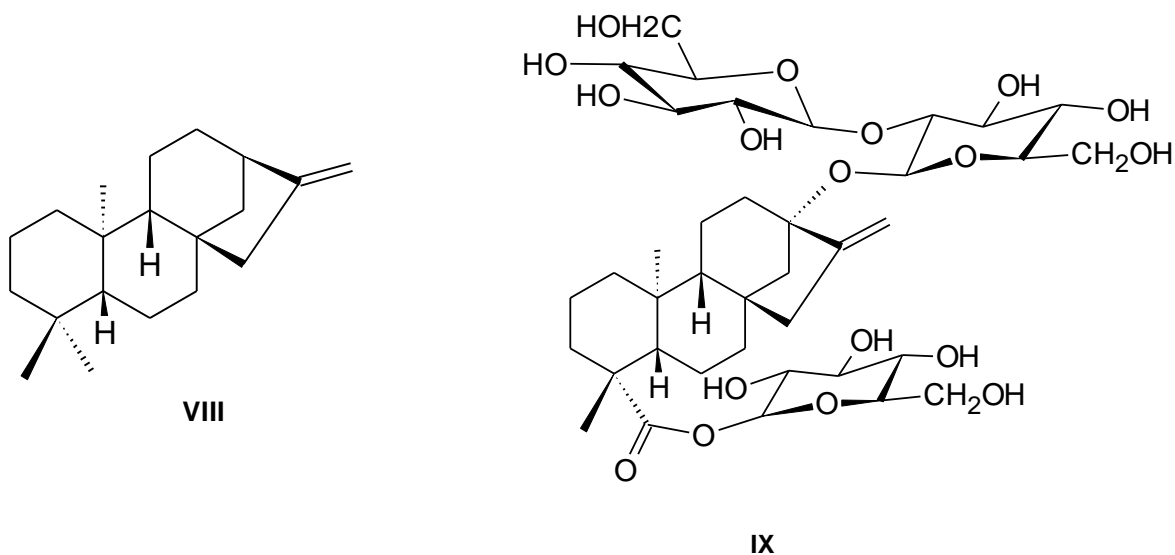
1.1.3 Diterpeny

Diterpeny, které tvoří rozsáhlou skupinu terpenů, je možno nalézt nejen v rostlinách, ale i v suchozemských a vodních živočiších.¹⁸ Vyznačují se širokým spektrem biologických účinků a to zejména účinky protinádorovými¹⁸ a antimikrobiálními.¹⁹

Již od šedesátých let byla zkoumána významná skupina diterpenů – taxany²⁰, které se vyznačují svou protinádorovou aktivitou. Nejdůležitější z nich je paclitaxel (**VII**) způsobující apoptózu nádorových buněk již při submikromolární koncentraci ($IC_{50} = 5 - 50$ nmol/l).²¹ Ačkoliv byl schválen teprve před jednadvaceti lety²², do dnešních dnů se stal jedním z klinicky významných cytostatik. Využívá se zejména při léčbě rakoviny vaječníku a rakovině prsu, proti bronchogenním karcinomům, karcinomům ezofágu, karcinomu obličeje a krku.²³



Kaurany jsou diterpeny s rigidní tetracyklickou strukturou. V přírodě se většina kauranových derivátů nachází ve formě derivátů kaurenu (-)-kaur-16-enu(**VIII**).¹² Kauren (**VIII**) je intermediátem biosyntézy řady rostlinných a houbových metabolitů, včetně giberelinů a diterpenových alkaloidů. Kaurany vykazují významnou biologickou aktivitu včetně toxicity.¹²

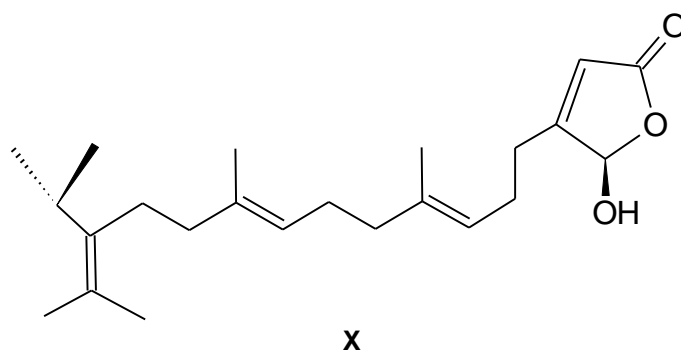


Steviosid (**IX**) obsažený ve stévii se široce využívá jako náhražka sacharosu v diabetických a anorektických dietách.¹² Vyznačuje se až 300× větší sladivostí než sacharóza.¹² Jeho využití jako potravního aditiva předcházely široké farmakologické a toxikologické studie, které zjistily jeho limitované použití v dávce 8 mg/kg/den.²⁴

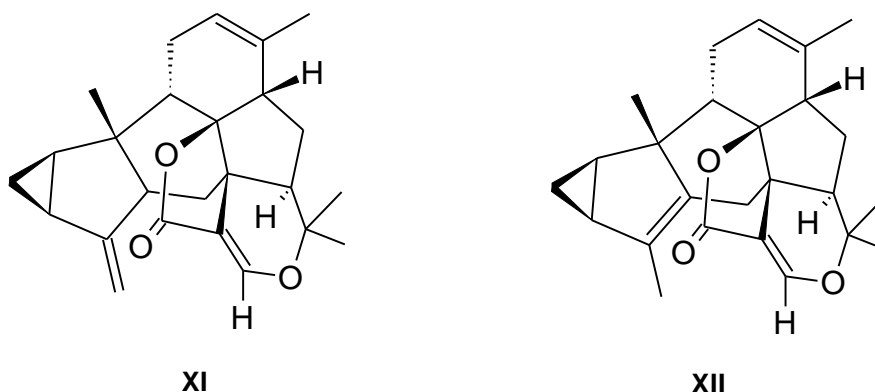
1.1.4 Sesterterpeny

Sesterterpeny, patří mezi méně početnou skupinu terpenů. Byly nalezeny převážně v houbách, mořských organismech a vyšších rostlinách.^{31,32}

Manoalid (**X**), který se nachází v mořské houbě *Luffariela variabilis* se vyznačuje silnou protizánětlivou a analgetickou aktivitou.³³



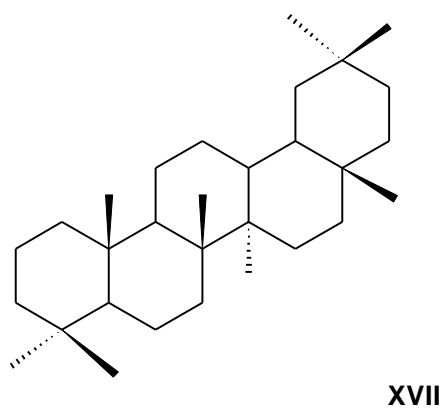
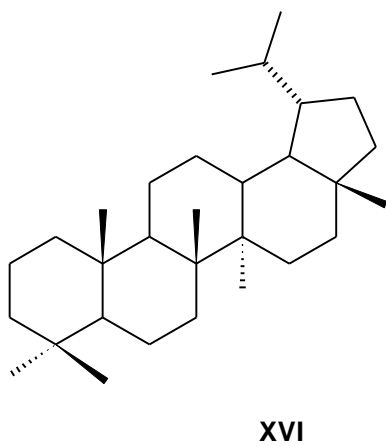
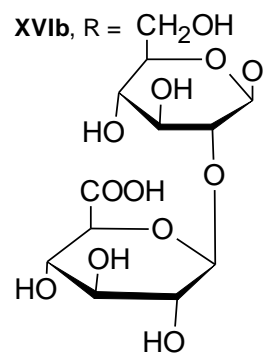
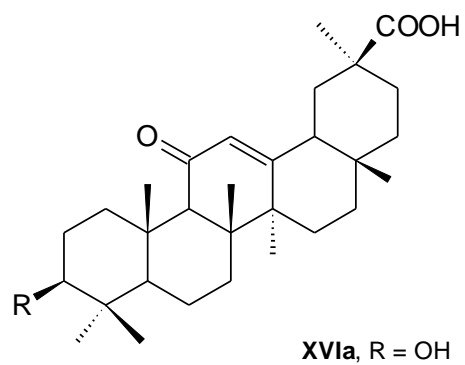
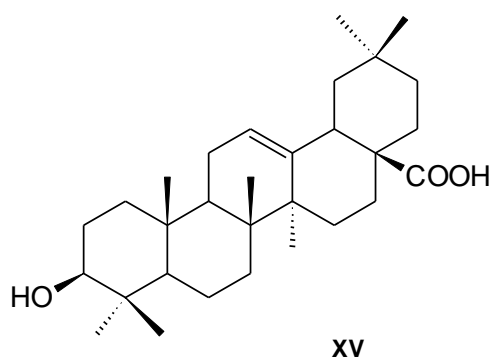
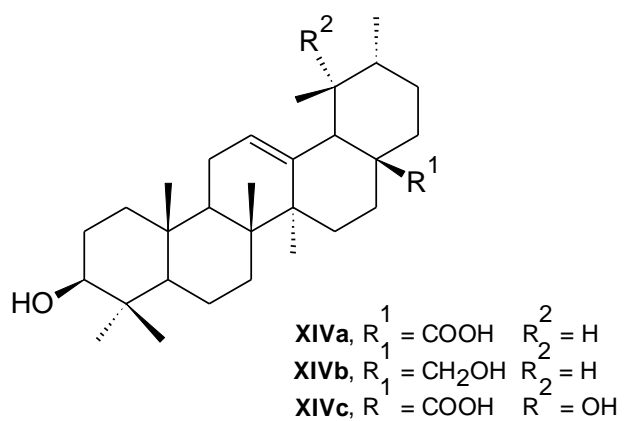
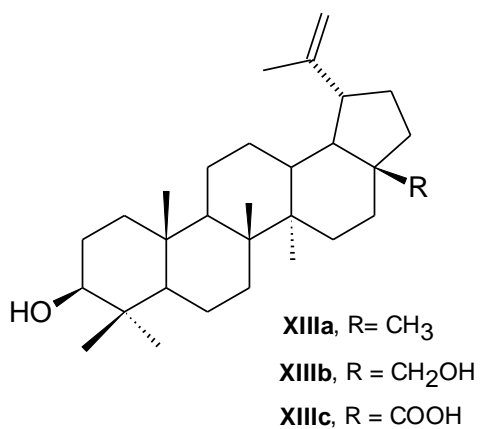
Bolivianin (**XI**) a isobolivianin (**XII**), které patří mezi nově objevené sesterpeny, byly izolovány z kůry *Hedyosmum angustifolium*.³⁴ Ani jedna ze sloučenin však nevykazovala významné aktivity proti *Plasmodium falciparum*, ani buněčné linii MCF7, jak bylo předpokládáno.³⁴

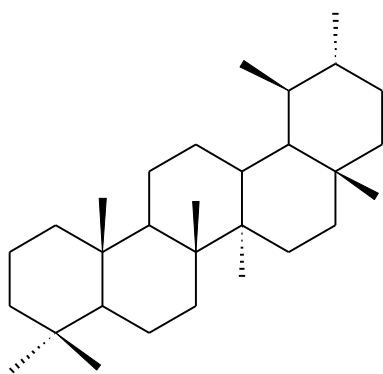


1.1.5 Triterpeny

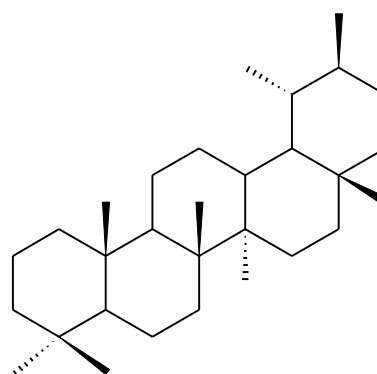
Triterpenům, které tvoří velmi rozsáhlou skupinu cyklických terpenů, se v posledních deseti letech dostalo velkého zájmu díky jejich různým biologickým účinkům. Triterpeny zahrnují více než 5 000 identifikovaných sloučenin a to volné triterpeny, glykosidy, estery, fytosteroly, anebo jejich prekurzory.¹ Cyklické triterpenoidy jsou odvozeny od více než 40 skeletálních typů a právě díky svým biologickým účinkům se staly významné pro vědecko-významné instituce a farmaceutické firmy.³⁵

Zmínky o triterpenech je možno nalézt již v prvním psaném herbáři, kde najdeme záznamy o použití rostlin s vysokým obsahem triterpenů (ženšen pravý, lesklokorka lesklá, boubelka velkokvětá a kadidlovník pilovitý), které byly opravdu používány jako všelék díky svým rozsáhlým terapeutickým účinkům.¹ V běžných rostlinách a ovoci lze možno triterpeny také nalézt, jde např. o lupeol (**XIIIa**) v mangu či jablku. Jejich výskyt je ale nejvyšší ve vyšších rostlinách: kyseliny ursolová (**XIVa**) v rozmarýně lékařské a popenci obecném, kyseliny oleanolová (**XV**) v bezu čínském, kyselina glycyrrhetová (**XVIa**) a glycyrrhizin (**XVIb**) v žen-šenu. Můžeme je také nalézt v mozkových organismech, plisních, bakteriích nebo ojediněle i houbách.^{1,36} Lupan (**XVI**), oleanan (**XVII**), ursan (**XVIII**) a taraxastan (**XIX**) jsou strukturální nejdůležitější typy biologicky aktivních derivátů.¹





XVIII



XIX

1.2 Biologické účinky triterpenů

Triterpeny jsou významné pro řadu svých biologických účinků. Mezi tyto účinky patří zejména účinky protizánětlivé, kterými se vyznačuje kyselina ursolová (**XIVa**) a kyselina oleanolová (**XV**). Protivředové a hepatoprotektivní účinky mají kyselina ursolová (**XIVa**), uvaol (**XIVb**), kyselina oleanolová (**XV**) a kyselina glycyrrhetová (**XVIa**). Kyselina betulinová (**XIIIc**) a její deriváty se vyznačují protivirovými, protinádorovými a anti-HIV účinky. Kyselina oleanolová (**XV**) je významná pro své protinádorové anti-HIV účinky. Triterpeny jsou významné také pro antibakteriální, antikariogenní, tonizující a imunomodulační účinky. Hlavní zájem jejich studia však patří jejím cytotoxickým účinkům, o kterých bude napsáno v kapitole 1.2.1^{1,35, 37,38}

1.2.1 Cytotoxické účinky lupanových triterpenoidů

Betulin (**XIIIb**), který patří mezi pentacyklické triterpenoidní alkoholy, se nachází zejména v kůře břízy (*Betula sp.*)³⁹, od které získal i svůj název. Betulin (**XIIIb**) byl poprvé izolován Lowitzem již v roce 1788.⁴⁰

Obsah betulinu (**XIIIb**) v březové kůře způsobuje její bílou barvu a díky němu má březová kůra své specifické vlastnosti. Betulin (**XIIIb**) má protiplísňové a antibakteriální vlastnosti, ale také protizánětlivé, protivirové, anti-HIV a hepatoprotektivní účinky.¹ Vyznačuje se *in vivo* protinádorovou aktivitou na nádorovém modelu Walker 256.⁴¹ a také *in vitro* antitrypanosomální aktivitou ($IC_{50} = 8.9 \mu\text{mol/l}$).⁴²

Kyselina betulinová (**XIIIc**) byla poprvé nalezena 1976 Trumbullem v *Vauquelinia corymbosa*. Trumbull a jeho spolupracovníci popsali její cytotoxickou aktivitu na leukocytár-

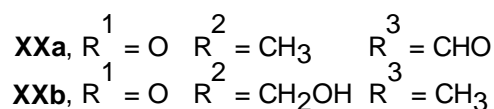
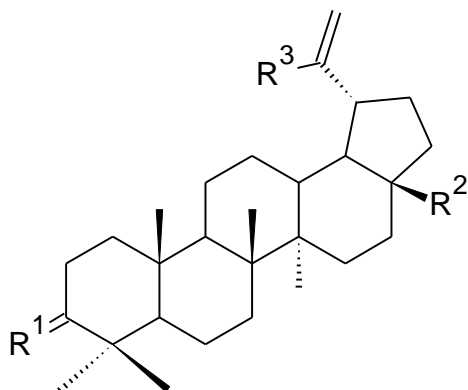
ní leukémii buněčné linie P-388.⁴³ Domnívali se, že kromě kyseliny betulinové (**XIIIc**), jsou efektivními sloučeninami také kyselina ursolová (**XIVa**) a uvaol (**XIVb**).¹ Kyselinu betulinovou (**XIIIc**) je kromě uvedeného také možno izolovat také z keře *Ziziphus mauritiana*,⁴⁴ případně z kůry platanu (*Platanus hispanica*).⁴⁵

Kyselina betulinová (**XIIIc**) získala mnohem více zájmu a to hlavně kvůli její selektivní protinádorové aktivitě vůči buňkám lidského melanomu. Některé její deriváty se vyznačují výbornými anti-HIV a dalšími protivirovými účinky.¹

Cytotoxické účinky kyseliny betulinové (**XIIIc**) byly však prokázány.⁴³ Byla popsána její cytotoxická aktivita na buněčné linii lidského melanomu MEL-1, 2 a 4 s IC₅₀ v rozmezí 1.1 - 7.9 μmol/l.⁴⁶ V následujících letech se také zjistilo, že kyselina betulinová (**XIIIc**) má také účinky vůči nádorové linii neuroblastu, ovariálnímu karcinomu (A2780, OVCAR-5, GROV-1), nemalobuněčnému plicnímu karcinomu (H460), epidermoidnímu karcinomu (A431), melanomu (Me665/2/21, Me665/2/60) a malobuněčnému plicnímu karcinomu (POGB a POGB/DX).⁴⁷

Díky tomu, že jsou pentacyklické triterpeny betulin (**XIIIb**) a kyseliny betulinové (**XIIIc**) snadno dostupné v přírodě, se obě tyto látky staly výhodné z ekologického i ekonomického hlediska a jsou využívány k biologickému testování nebo syntéze derivátů (triterpenoidů).³⁷ Průmyslově výhodnějším postupem, při kterém je kyselina betulinová (**XIIIc**) syntetizována z betulinu (**XIIIb**), jehož obsah je v březové kůře až 30%, nenastává žádný výrazný problém v produkci kyseliny betulinové (**XIIIc**) v několika tunovém měřítku.³⁷ Na pokračující extrakci a izolaci přírodních materiálů navazuje také vývoj triterpenů, syntetických derivátů triterpenoidů, které mají nižší toxicitu a vyšší terapeutický účinek než její přírodní analoga.¹ Oxidativními reakcemi betulinu (**XIIIb**) a kyseliny betulinové (**XIIIc**), lze získat jejich semi-syntetické deriváty, které se nazývají Betulininy.³⁹ Některé z těchto látek (**XIIIc**, **X**) se vyznačují značným protinádorovým účinkem proti řadě linií různého histologického původu, které zahrnují buněčné typy s MDR.³⁸

Lupeol (**XIIIa**) se nachází v ovoci, např. v mangu⁴⁸ a v léčivých rostlinách⁴⁹. Má chemoterapeutické účinky proti benzoylperoxidu (BPO), který vyvolává kožní problémy prostřednictvím řady antioxidantních enzymů.¹ Vyznačuje se také antiangiogenním účinkem a to dokonce v dávce nižší než 30 μm ml⁻¹.¹ Deriváty lupeolu (**XIIIa**): aldehyd **XXa** a keton **XXb** mají cytotoxické účinky proti nádorové linii NSCLC-N6.¹



1.3 Reakce triterpenických sloučenin s Grignardovými činidly

1.3.1 Reakce s triterpenickými laktony

V práci⁵⁰ byla zkoumána reakce laktonu **XXI** s fenylmagnesiumbromidem vedena v anisolu za reflexu (schéma 1). Touto reakcí byla získána oleanolová kyselina **XV**, která byla rovněž charakterizována také jako acetát **XVa**.

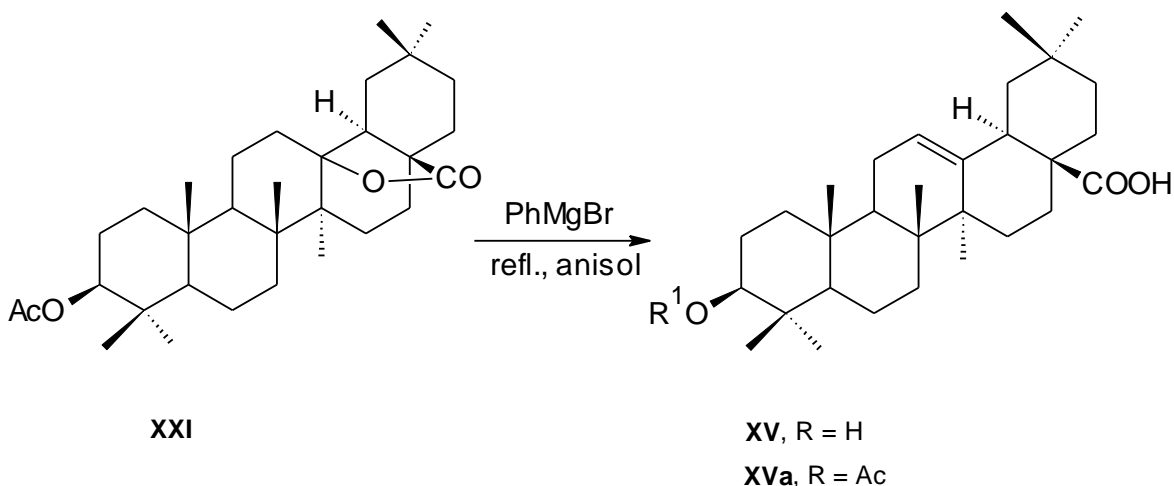


Schéma 1: Reakce s terpenickými laktony

1.3.2 Reakce s terpenickými epoxidy

Reakcí 2 β ,3 β -epoxidu **XXII** s methylmagnesiumiodidem vzniká 2 α -(1' ξ -hydroxyethyl) derivát **XXIII** (schéma 2).⁵¹

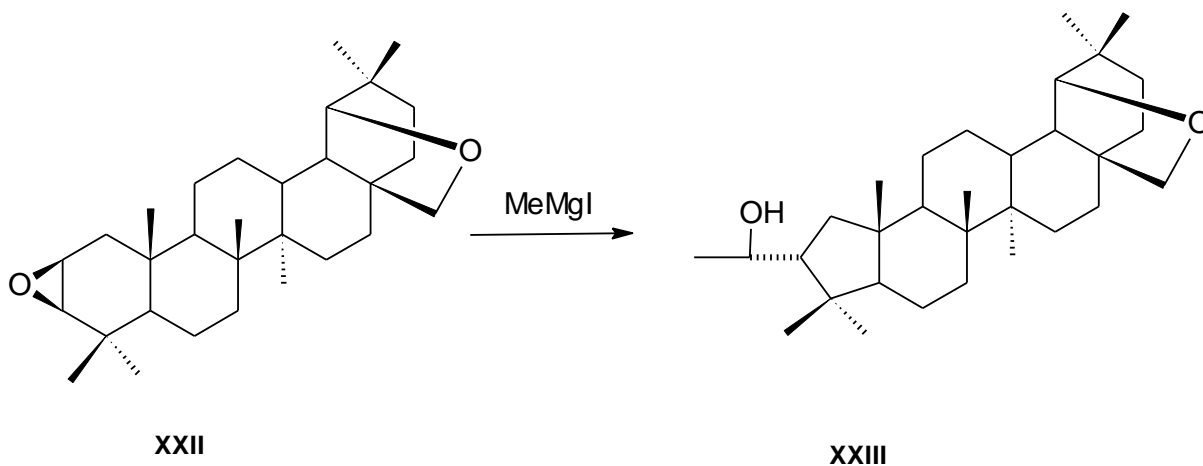


Schéma 2: Reakce s terpenickými epoxidy

1.3.3. Reakce s ketosteroidy

Adice Grignardových činidel na stéricky bráněné 17-ketosteroidy byla významně podpořena v přítomnosti CeCl_3 s výrazným potlačením dalších produktů a produkty **XXVa** a **XXVb** měly velmi vysoké výtěžky (96 %, 95%) (schéma 3).⁵²

5 α -dihydrotestosteron (DHT) je nejúčinnější přírodní androgen, který patří mezi 17-ketosteroidy.⁵² DHT způsobuje patogenezi benigní prostatické hyperplazie, rakovinu prostaty, androgenní alopecie, cystického akné, hirsutismu, a protože inhibuje androgenní odpovědi pomocí antagonisty androgenního receptoru na lokálních místech, byly tyto látky vybrány jako velmi významné pro tuto studii.⁵²

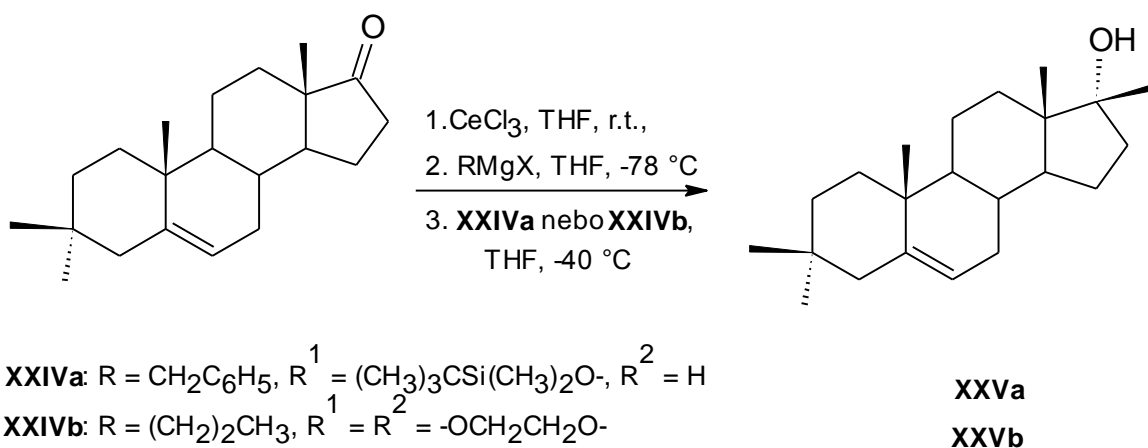


Schéma 3: Reakce s ketosteroidy 1

Reakce pregnenolonu 3-acetátu **XXVI** s isohexylmagnesiumbromidem⁵³ popisuje vznik terciárního alkoholu **XXVIII** a reakci 21-isohexylpregnenolonu 3-acetátu **XXVII** s methylmagnesiumbromidem, kdy vzniká druhý epimer terciárního alkoholu **XXVIII** (schéma 4).⁵³

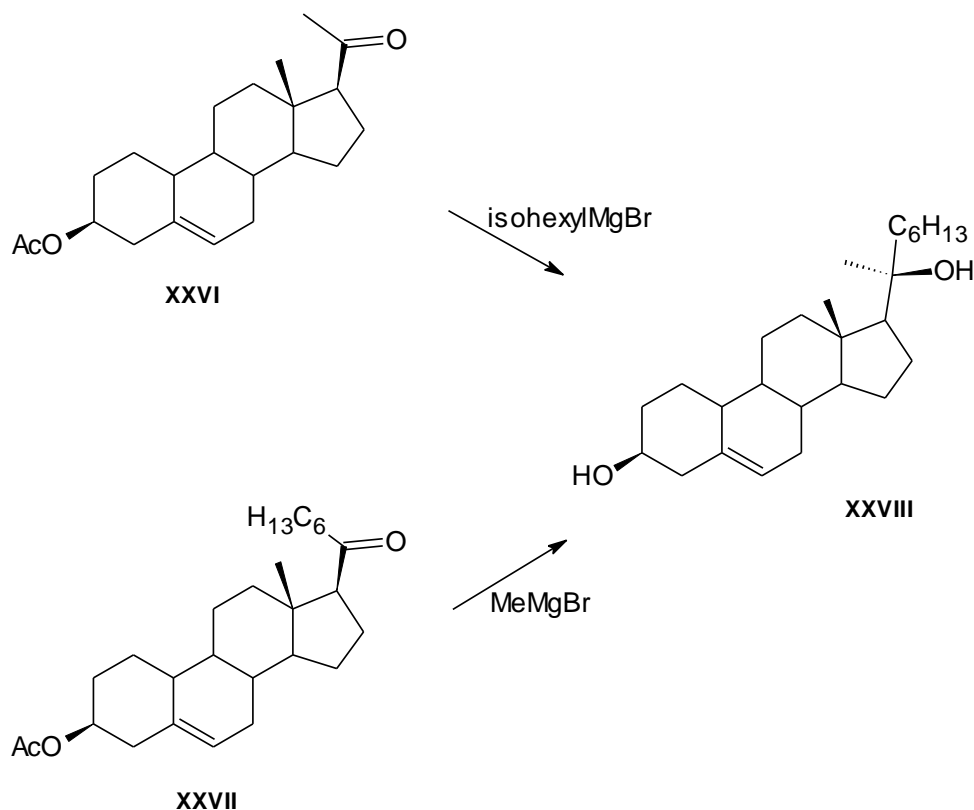
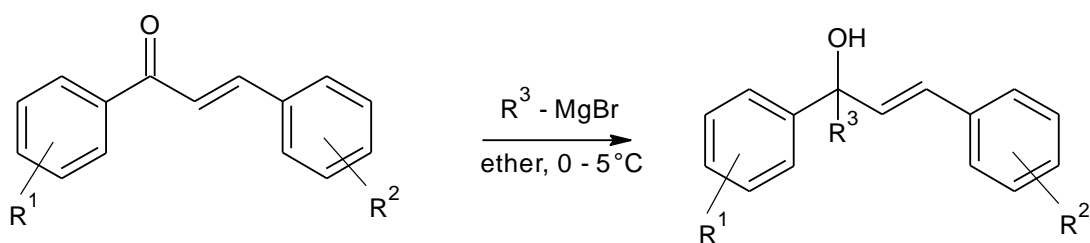


Schéma 4. Reakce ketosteroidy 2

1.4 Syntetické terciární alkoholy s biologickou aktivitou

Nová skupina sloučenin chráněných terciárních alkoholů **XXIXa – XXIXf** popsaných v publikaci⁵⁴ vykazuje vysokou inhibiční aktivitu při průchodu buněčnou membránou Caco-2 (schéma 5). Některé tyto terciární alkoholy jsou inhibitory HIV, vykazují také inhibiční aktivitu proti thromboxanu A₂ a prostaglandinu H₂ a používají se k léčbě řady onemocnění jako je koronární vasospasma, astma a žaludeční vředy.⁵⁴ Jsou využívány k přípravě hydrofobního komplexu hydroxypropyl β-cyklodextrinu v ketoprofenu a nitrendipinu a zvyšují rozpustnost těchto léků v simulovaných žaludečních šťávách a střevních tekutinách, které zlepšují vstřebávání a farmakodynamické vlastnosti obou léčiv.⁵⁴

Nové terciární alkoholy **XXIXa** – **XXIXf** se vyznačují *in vitro* protizánětlivou, antibakteriální a antimykotickou aktivitou.⁵⁴ Protizánětlivé účinky byly srovnány s ibuprofenem, který byl účinnější a nejvýraznější protizánětlivou aktivitu prokázaly alkoholy **XXIXc** a **XXIXe**.⁵⁴ U testů s antibakteriálními účinky proti gram negativním bakteriálním kmenům – *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri* a *Klebsiella pneumoniae* a proti gram pozitivním kmenům – *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* a *Micrococcus luteus* byl jako standard použit levofloxacin.⁵⁴ Nitroderivát **XXIXc** měl vynikající účinky proti *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas putida*, *Shigella flexneri* a dobré výsledky se ukázal i u fenylderivátu **XXIXd**.⁵⁴ Antimykotické účinky terciárních alkoholů proti *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* a *Aspergillus terreus* byly srovnány s 2% roztokem flukonazolu a butylderivát **XXIXa** vykazovala lepší výsledky než flukonazol.⁵⁴ Látky **XXIXb** a **XXIXd** se také vyznačují protimykotickou aktivitou.⁵⁴



	R ¹	R ²	R ³
XXIXa	3 - OH	4 - Cl	n - C ₄ H ₉
XXIXb	2 - OH	4 - F	allyl
XXIXc	2 - OH	4 - Cl	3 - NO ₂ , 4 - MePh
XXIXd	2 - OH	H	Ph
XXIXe	2 - OH	4 - Cl	n - C ₆ H ₁₃
XXIXf	2 - OH	4 - Cl	4 - OMePh

Schéma 5: Příprava terciárních alkoholů

2. Výsledky a diskuze

2. 1. Příprava triterpenoidních oxoderivátů

2.1.1 Aldehydy **3**, **4**

Jako aldehydickévýchozí komponenty pro adice Grignardových činidel byly zvoleny aldehydy **3** a **4**, které jsou chráněné v polohách 3 a 28 stabilní alkoxy skupinou (schéma 6). Protože se jedná o prvotní studii, záměrně jsme zvolili stabilní chránící skupiny, aby vlastní transformace byl jednoznačné a abychom se vyhnuli případným deprotekcím při adici, které by nastaly např. v případě acetátů.

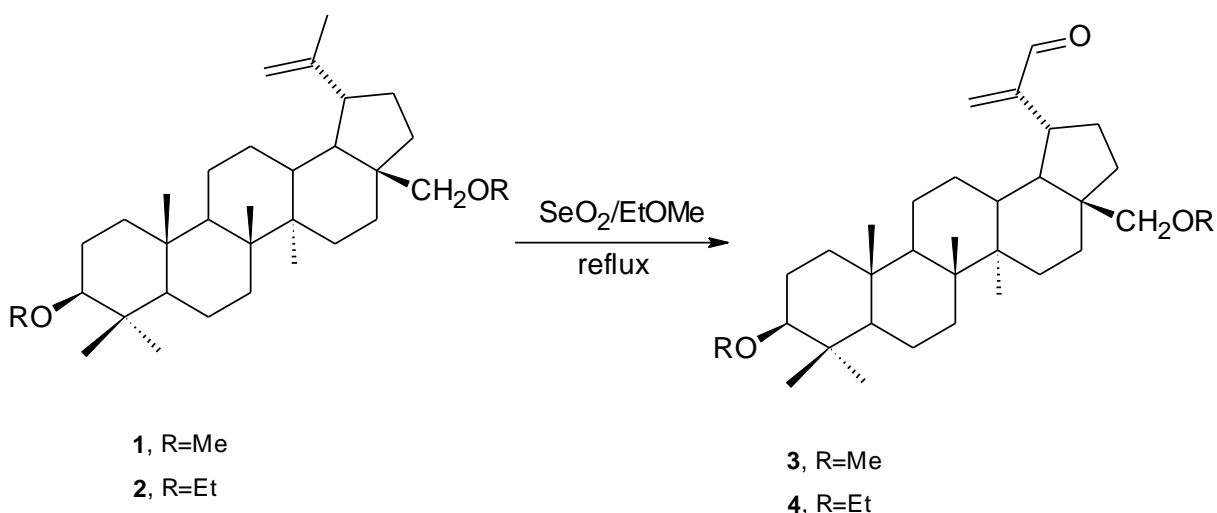


Schéma 6: Příprava výchozích aldehydů

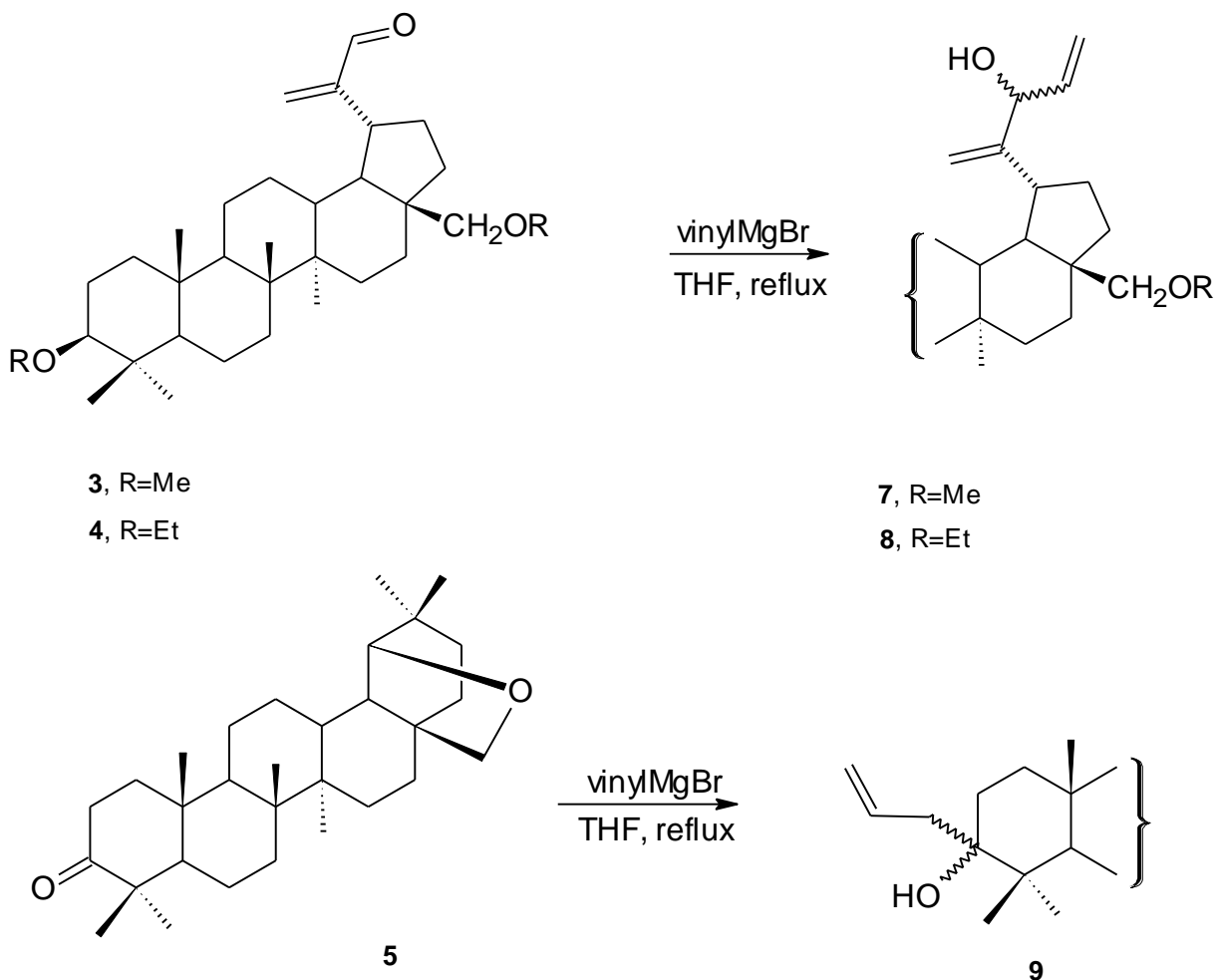
Výchozí aldehydy **3** a **4** byly získány ve vysokých výtěžcích (70 – 75 %) allylovou oxidací 3,28-dimethyl (**1**) resp. 3,28-diethylbetulinu (**2**) oxidem seleničitým v methoxyethanolu, který se osvědčil více než dříve používaný ethanol. Reakce v methoxyaldehydu jsou rychlejší a čistější, rovněž v množství amorfního červeného selenu v produktech je oproti ethanolu minimální. Ačkoli se jedná u obou aldehydů **3** a **4** o relativně jednoduché sloučeniny, přesto nebyly do současné doby popsány. Struktury obou aldehydů **3**, **4** byly jednoznačně potvrzeny pomocí spektrálních dat. V ^1H NMR spektrech aldehydů **3**, **4** byl nalezen kromě obvyklých signálů singlet aldehydického vodíku H-30 při δ 9.51 ppm a v souladu s tím je přítomen v ^{13}C NMR spektrech karbonylový uhlík C-30 při δ 195 ppm. V IČ spektrech obou aldehydů **3**, **4** přibyl karbonylový pás při 1690 cm^{-1} . V MS EI spektrech

obou aldehydů **3**, **4** byly nalezeny molekulové ionty a dále ionty odpovídající typickým ztrátám.

2.2. Adice Grignardových činidel na triterpenoidní oxoderiváty

2.2.1 Vinylderiváty 7-10

Vinylderiváty **7-10** byly získány reakcí aldehydů **3**, **4** a ketonů **5**, **6** s komerčním roztokem vinylmagnesiumbromidu v THF pod argonovou atmosférou za refluxu ve výtěžcích po čištění 62 – 70 % (schéma 7). V ^1H NMR spektrech vinylderivátů **7-10** byly nalezeny signály druhé dvojné vazby při δ 4.91-5.15 ppm, 4.97-5.24 ppm a 5.75-6.08 ppm. V ^{13}C NMR spektrech vinylderivátů **7-10** byly nalezeny 2 signály dvou uhlíků druhé dvojné vazby při δ 115-118 ppm pro sloučeniny **7**, **8**, kdežto v případě derivátů **9**, **10** byly nalezeny tyto signály δ 111-112 ppm a 143-147 ppm. V IČ spektrech vinylderivátů **7-10** byly oproti výchozím látkám **3-6** nalezeny pásy odpovídající vibraci OH skupiny při $\sim 3450\text{ cm}^{-1}$. V hmotnostních spektrech EI vinylderivátů **7-10** byly nalezeny molekulové ionty a dále ionty odpovídající typickým ztrátám.



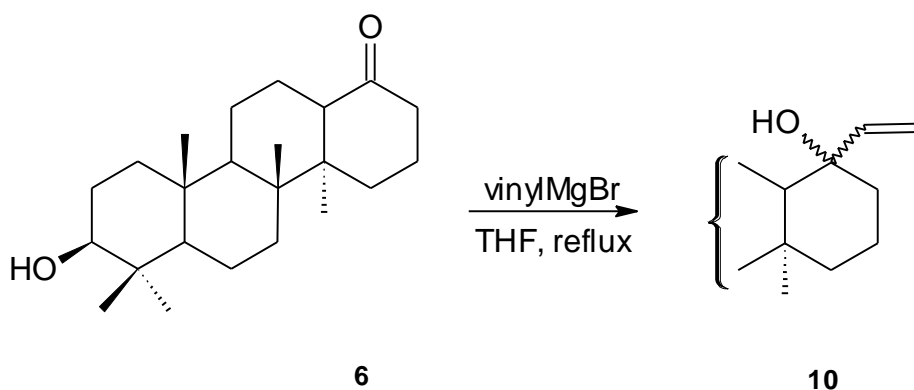
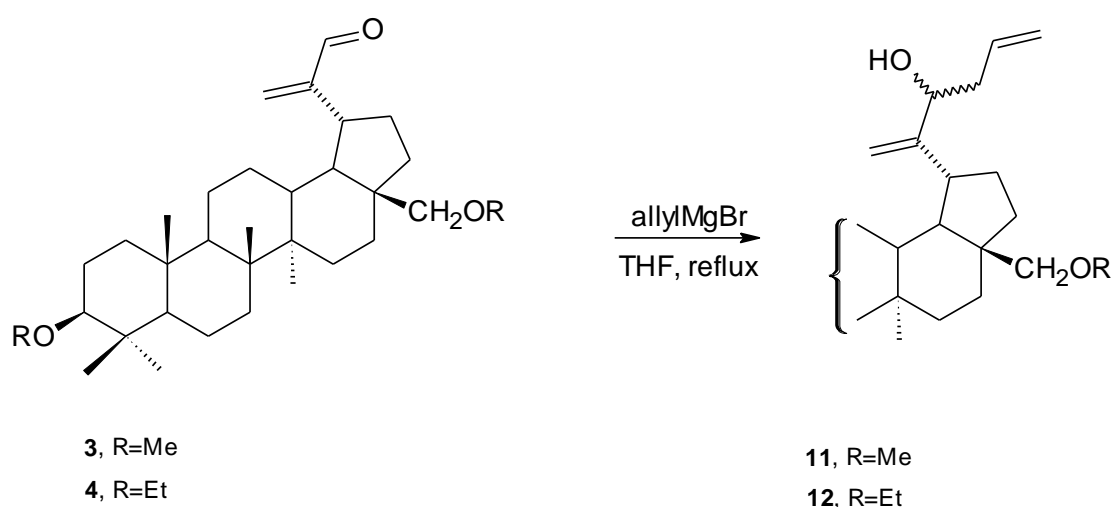


Schéma 7: Reakce oxoderivátů s vinylmagnesiumbromidem

2.2.2 Allylderiváty **11-15**

Allylderiváty **11-15** byly získány reakcí aldehydů **3, 4** a ketonů **5, 6** s komerčním roztokem allylmagnesiumbromidu v THF pod argonovou atmosférou za refluxu ve výtěžcích po čištění 62 – 69 % (schéma 8). V ^1H NMR spektrech allylderivátů **11-15** byly nalezeny signály druhé dvojné vazby při δ 4.91-5.02 ppm, 4.95-5.20 ppm a 5.74-5.85 ppm. V ^{13}C NMR spektrech allylderivátů **11-15** byly nalezeny 2 signály dvou uhlíků druhé dvojné vazby při δ 118 ppm pro sloučeniny **11, 12**, kdežto v případě derivátů **13-15** byly nalezeny tyto signály δ 118 ppm a 134-135 ppm. V IČ spektrech allylderivátů **11-15** byly oproti výchozím látkám **3-6** nalezeny pásy odpovídající vibraci OH skupiny při $\sim 3470\text{ cm}^{-1}$. V hmotnostních spektrech EI allylderivátů **11-15** byly nalezeny molekulové ionty a dále ionty odpovídající typickým ztrátám.



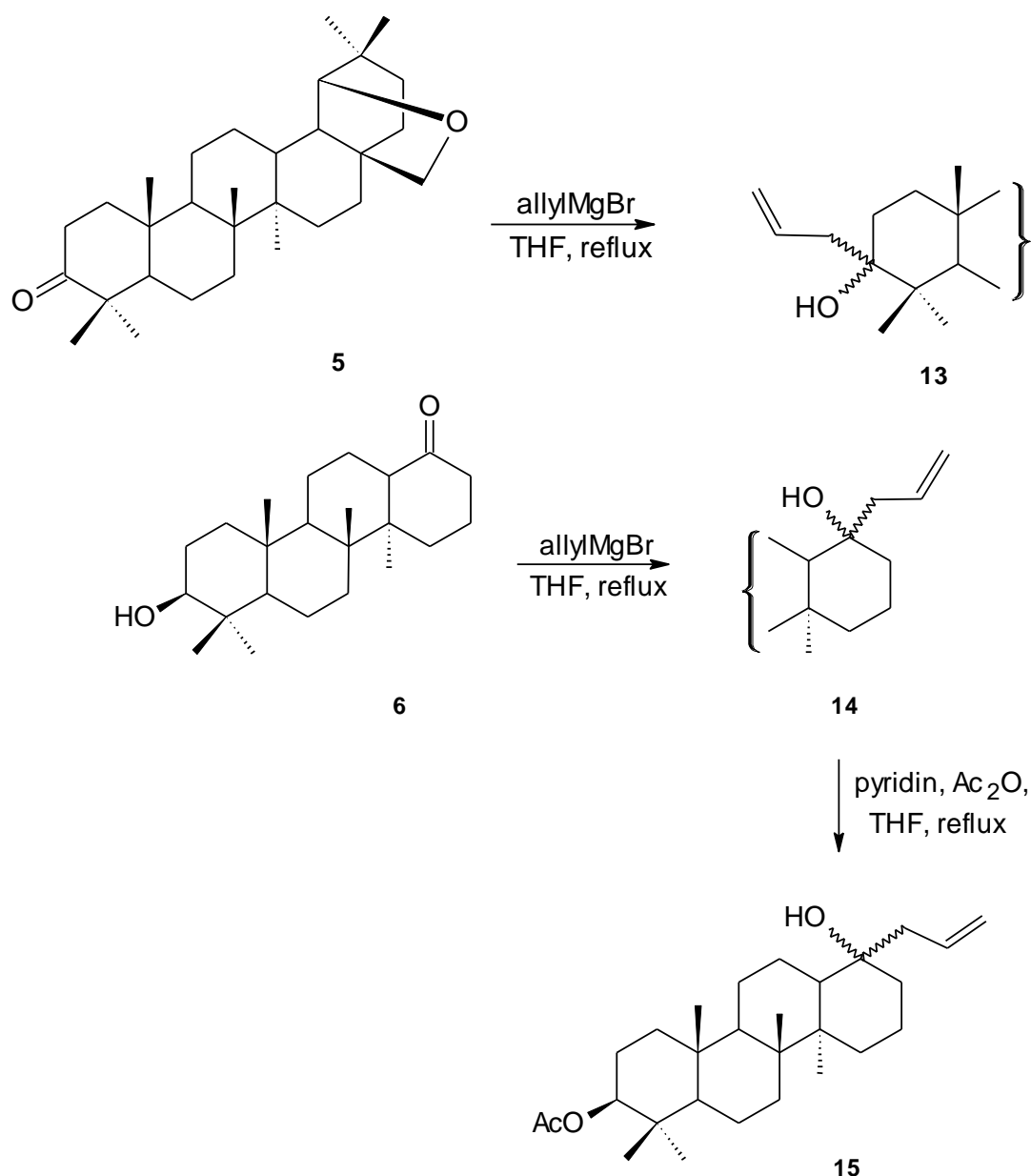


Schéma 8: Reakce oxoderivátů s allylmagnesiumbromidem

2.2.3 Ethynylderiváty **16-19**

Ethynylderiváty **16-19** byly získány reakcí aldehydů **3, 4** ketonů **5, 6** s komplexem acetylidu lithného s ethylendiaminem pod argonovou atmosférou za refluxu ve výtěžcích po čištění 17-23 % (schéma 9). Během několika pokusů, při kterých byly měněny reakční podmínky i rozpouštědlo, se nepodařilo získat v izolovatelném výtěžku ethynylderivát **19**. Pravděpodobně je to způsobeno nízkou reaktivitou ketonu **6**. V ^1H NMR spektrech ethynylderivátů **16-19** byly nalezeny signály trojné vazby při δ 4.81 ppm, 5.02-5.03 ppm a 5.27-5.28 ppm. V ^{13}C NMR spektrech ethynylderivátů **16-19** byly nalezeny 2 signály dvou uhlíků trojné vazby při δ 108-109 ppm pro sloučeniny **16, 17**, kdežto v případě derivátů **18, 19** byly nalezeny tyto

signály δ 108 ppm a 154ppm. V IČ spektrech ethynylderivátů **15-19** byly oproti výchozím látkám **3-6** nalezeny pásy odpovídající vibraci OH skupiny při $\sim 3440\text{ cm}^{-1}$. V hmotnostních spektrech EI ethynylderivátů **16-19** byly nalezeny molekulové ionty a dále ionty odpovídající typickým ztrátám.

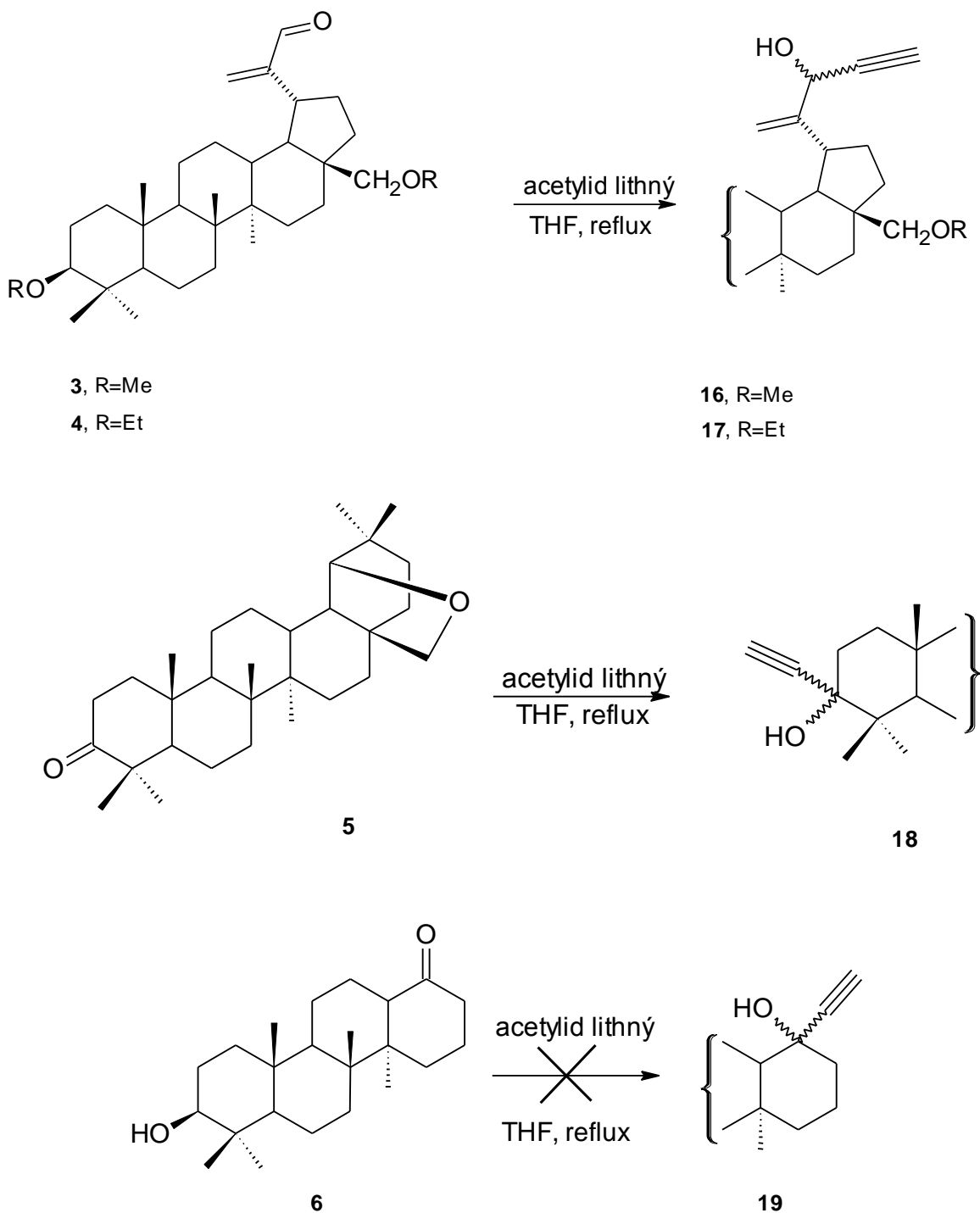


Schéma 9: Reakce oxoderivátů s acetylidem lithným

3. Cytotoxická aktivita připravených sloučenin

Cytotoxická aktivita připravených sloučenin byla testována na pracovišti doc. MUDr. M. Hajdúcha Ph.D., v LEM Dětské kliniky FN v Olomouci, metodou MTT testu. Na nádorové linii CEM bylo testováno *in vitro* 8 připravených sloučenin. Deriváty s hodnotou $IC_{50} \geq 250 \mu\text{mol/l}$ jsou považovány za zcela neúčinné. Výsledky jsou shrnuty v Tab. 1.

Sloučenina **17** vynikala se svou aktivitou mezi ostatními látkami (na buněčné linii CEM $IC_{50} = 11$). Aktivita ostatních látek **4, 7, 8-18** nebyla nijak významná. Všechny látky by však mohly poskytnout pozitivní výsledky při testování další biologické aktivity v budoucnu.

Sloučenina	IC ₅₀ (μmol/l)
	CEM
4	15
7	19
8	25
9	250
10	95
11	19
12	61
13	33
14	115
15	116
16	16
17	11
18	250

Tab. 1: Cytotoxická aktivita všech sloučenin připravených v rámci této práce

4. Závěr

1. Byla provedena literární rešerše na téma „Adice Grignardových činidel na isoprenoidy.
2. Byly připraveny výchozí aldehydy **3, 4**, které nebyly dosud popsány.
3. Adicí Grignardových činidel a acetylidu lithného na oxoderiváty **3-6** byly připraveny nové terciární alkoholy **7-18**.
4. Celkově bylo připraveno a spektrálními daty potvrzeno 14 doposud nepopsaných sloučenin **3, 4, 7-18**.
5. Všechny sloučeniny připravené v rámci této práce byly testovány na *in vitro* cytotoxickou aktivitu na lidské T-lymfoblastické leukémii CEM, přičemž sloučenina **17** vykazala cytotoxicitu 11 $\mu\text{mol/L}$.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

OBECNÉ POZNÁMKY K EXPERIMENTÁLNÍ ČÁSTI

Teploty tání byly vymezeny na bodotávku Büchi B-545 a jsou korigovány.

Specifické optické otáčivosti byly měřeny v chloroformu na polarimetru AUTOMATIC POLARIMETER, Autopol III (Rudolph research, Flanders, New Jersey) a jsou uváděny v jednotce $10^{-1} \text{ deg.cm}^2/\text{g}$, za každou hodnotou specifické optické otáčivosti je uvedena koncentrace v jednotce $\text{g}/100\text{ml}$.

Infračervená spektra byla měřena na FTIR spektrometru Impact Nicolet 400D (střední oblast v rozsahu vlnočtů $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ s rozlišením 2 cm^{-1}) a byla zpracována v programu OMNIC 7.1. Vzorky byly měřeny technikou DRIFTS v matici KBr.

NMR spektra byla měřena na přístroji Bruker 300 Avance II (^1H při 300 MHz, ^{13}C při 75.45 MHz) v roztoku CDCl_3 . Pro ^1H NMR spektra byl použit jako vnitřní standard tetramethylsilan. Chemické posuny ^{13}C NMR spekter byly referencovány vůči $\delta(\text{CDCl}_3) = 77.00 \text{ ppm}$. Multiplicita signálů v ^{13}C NMR spekter byla určena z DEPT spekter. Hodnoty chemických posunů a interakčních konstant byly určeny pomocí analýzy prvního řádu. Hodnoty chemických posunů byly zaokrouhleny na dvě desetinná místa, interakční konstanty na jedno desetinné místo (uvedeny v jednotkách Hz).

Hmotnostní spektra EI-MS byla měřena na přístroji Shimadzu QP 2010, teplota iontového zdroje byla $150 \text{ }^\circ\text{C}$, zavedení vzorku bylo provedeno přímým vstupem na rheniovém drátku vyhřívaném elektrickým proudem (proud narůstal od 0 mA do 380 mA rychlostí 10 mA/s), energie ionizujících elektronů byla 75 eV. Relativní intenzity jsou vztaženy na nejintenzivnější ion v oblasti $m/z > 50$.

Průběh reakcí a čistota vzorků byly sledovány pomocí TLC na fóliích Kieselgel 60 F254 (Merck). Detekce TLC fólií byla prováděna nejprve UV zářením (254 nm), a poté postříkem 10% kyselinou sírovou a zahřáním na $110 - 200 \text{ }^\circ\text{C}$.

Eluční soustavy pro vyvíjení TLC fólií (vždy uvedeny u experimentu):

- A hexan/ethylacetát (5:1)
- B toluen/ether (6:1)
- C hexan/ethylacetát (2:1)

Pro sloupcovou chromatografii byl používán Kieselgel 60 ($63 - 200 \mu\text{m}$; Merck 7734). Mobilní fáze pro sloupcovou chromatografii jsou uvedeny vždy u experimentu.

K odpařování rozpouštědel byla použita RVO (Büchi Rotovapor R-200).

Veškerá rozpouštědla používaná pro reakce, krystalizace a chromatografie byla předem destilována.

THF byl destilován ve smyčce se slitinou Na/K a benzofenonu těsně před použitím.

Cytotoxická aktivita byla testována na pracovišti doc. MUDr. M. Hajdúcha, Ph.D. v Laboratoři experimentální medicíny Dětské kliniky FN v Olomouci následujícím způsobem:

Testovaná sloučenina byla v šesti různých koncentracích přidána ke tkáňové kultuře buněk T-lymfoblastické leukémie CEM v jamkách kultivačního panelu. Každá koncentrace sloučeniny byla testována v dubletu. Inkubační doba buněčné suspenze v prostředí s analyzovanou sloučeninou trvala 72 hodin při 37 °C, v 5% atmosféře oxidu uhličitého a 100% vlhkosti. Následně byl do každé jamky panelu přidán MTT-[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difeny]-2H-tetrazolium bromid] a inkubace pokračovala další 4 hodiny. Její ukončení nastalo přidáním dodekansulfonátu sodného a procento přežívajících buněk bylo stanoveno spektrofotometricky při 540 nm. Z křivek dávkové závislosti byla vypočítána koncentrace usmrcující 50 % nádorových buněk - IC₅₀.

Toluen, ethanol, methanol, ethylacetát, chloroform, dichlormethan byly zakoupeny u firmy Eurošarm, s.r.o.

Vinylmagnesiumbromid, allylmagnesiumbromid, 1-propynylmagnesiumbromid a acetylid lithný (komplex acetylidu lithného s ethylendiaminem) byly zakoupeny u firmy Acros.

Dimethylbetulin (1), diethylbetulin (2), heptanorketon 6 a allobetulon 8 byly získány z dřívějších přísunů provedených v laboratořích Betulinines.

Obecný postup adice Grignardových činidel na triterpenoidní oxoderiváty

Všechny reakce byly prováděny v bezvodém THF pod argonovou atmosférou. Oxoderivát (1 mol) byl rozpuštěn v THF dle jednotlivého experimentu a ke směsi byl přidán roztok příslušného Grignardova činidla v THF (dle experimentu). Směs byla za stálého míchání refluxována za vyloučení vzdušné vlhkosti. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC. Pokud není napsáno jinak, byla použita mobilní fáze A. Reakční směs byla po ochlazení zředěna etherem a poté vytřepána třikrát roztokem NH₄Cl a poté jednou H₂O. Spojené organické podíly byly odpařeny na RVO a krystalizovány.

Obecný postup adice acetylidu lithného na triterpenoidní oxoderiváty

Ethynylace byla prováděna v bezvodém THF (5 ml) pod ochrannou argonovou atmosférou. Výchozí látka byla rozpuštěna v THF a ke směsi byl přidán acetylid lithný (komplex acetylidu lithného s ethylendiaminem). Směs byla za stálého míchání refluxována. Průběh

reakce byl sledován pomocí TLC (mobilní fáze B). Po ochlazení byla reakční směs zředěna etherem a následně vytřepána třikrát v roztoku NH_4Cl a poté třikrát H_2O . Spojené organické podíly byly odpařeny na RVO a krystalizovány.

1. Příprava methoxyaldehydu 3

Do roztoku dimethylbetulinu (**1**) (3.00 g; 6.00 mmol) v methoxyethanolu (50 ml) byl přidán oxid seleničitý (2.2 g; 19.82 mmol) a reakční směs byla refluxována 2 h. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (mobilní fáze A). Po uvedené době již v reakční směsi dle TLC nebyl přítomen výchozí diethylbetulin (**1**), vyloučený selen byl za horka odfiltrován a filtrát byl ochlazen. Vyloučené žluté jehličky methoxyaldehydu **3** byly odsáty a filtrát byl zahuštěn ke krystalizaci a poté ochlazen. Vyloučený druhý podíl methoxyaldehydu **3** byl odsát a promyt ethanolem. Poté byl první i druhý podíl methoxyaldehydu **3** spojen a vysušen ve vakuové sušárně při 85 °C. Byl získán methoxyaldehyd **3** (2.21 g; 72 %) ve formě bílých krystalků o t. t. 231-233 °C, $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ 7 (c 0.51). ^1H NMR spektrum: 0.74 s, 0.81 s, 0.94 s, 0.95 s, 1.01 s, 5×3H (5× CH_3); 3.35 s, 3H (OCH_3); 3.35 s, 3H (OCH_3); 5.93 s, 1H (H-29a); 6.28 s, 1H (H-29b); 9.51 s, 1H (COH). ^{13}C NMR spektrum: 14.56, 15.90, 15.91, 15.99, 16.10, 18.13, 20.83, 22.14, 27.04, 27.96, 29.83, 34.15, 34.59, 37.04, 37.10, 38.51, 38.74, 40.63, 42.46, 47.35, 50.14, 55.76, 57.50, 59.65, 70.91, 88.54, 132.65, 157.45, 194.98. IČ spektrum: 1097, 1689. MS, m/z (%): [pro $\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{O}_3$, M^+ 484], 484 (M^+ , 12), 466 (3), 452 (17), 439 (46), 421 (14), 407 (42), 389 (10), 351 (2), 349 (3), 325 (1), 311 (1), 297 (1), 285 (3), 271 (8), 253 (6), 241 (6), 233 (14), 217 (32), 203 (100).

2. Příprava ethoxyaldehydu 4

Do roztoku diethylbetulinu (**2**) (3.00 g; 6.00 mmol) v methoxyethanolu (60 ml) byl přidán oxid seleničitý (2.20 g; 19.82 mmol) a reakční směs byla refluxována 2 h. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (mobilní fáze A). Po uvedené době již v reakční směsi dle TLC nebyl přítomen výchozí diethylbetulin (**2**), vyloučený selen byl za horka odfiltrován a filtrát byl ochlazen. Vyloučené žluté jehličky ethoxyaldehydu **4** byly odsáty a filtrát byl zahuštěn ke krystalizaci a poté ochlazen. Vyloučený druhý podíl ethoxyaldehydu **4** byl odsát a promyt ethanolem. Poté byl první i druhý podíl ethoxyaldehydu **4** spojen a vysušen ve vakuové sušárně při 85 °C. Byl získán ethoxyaldehyd **4** (2.21 g; 72 %) ve formě žlutých jehliček o t. t. 184-187 °C, $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ 9 (c 0.54). ^1H NMR spektrum: 0.75 s, 0.81 s, 0.94 s, 0.94 s, 1.01 s, 5×3H (5× CH_3); 1.15 – 1.21 m, 6H (OCH_2CH_3); 1.97-2.02 m, 2H; 2.13-2.23 m, 1H; 2.71 dd,

^1H ($J_1=11.6$, $J_2=11.75$, H-3 α), 2.75-2.82 m, 1H; 3.11 d, 1H ($J=9.01$, H-28a), 3.30-3.38 m, 1H (OCH_2CH_3); 3.42-3.52 m, 3H (OCH_2CH_3 a H-28b); 3.61-3.69 m, 1H (OCH_2CH_3); 5.92 s, 1H (H-29a); 6.28 s, 1H (H-29b); 9.51 s, 1H (COH). ^{13}C NMR spektrum: 14.68, 15.14, 15.66, 16.02, 16.06, 16.28, 18.35, 21.01, 23.44, 27.27, 27.80, 28.12, 30.17, 32.88, 34.41, 34.85, 37.23, 37.26, 38.86, 41.06, 42.62, 47.49, 50.41, 51.83, 56.01, 65.09, 66.98, 68.43, 86.71, 132.62, 157.40, 194.77. IČ spektrum: 1080, 1892. MS, m/z (%): [pro $\text{C}_{34}\text{H}_{56}\text{O}_3$, M^+ 512], 512 (M^+ , 28), 494 (7), 466 (40), 453 (100), 435 (8), 420 (5), 407 (57), 397 (15), 389 (57), 381 (20), 363 (14), 349 (24), 337 (5), 323 (14), 311 (16), 299 (10), 287 (20), 276 (19), 271 (41), 262 (20), 243 (3), 235 (23), 229 (5), 217 (20), 203 (32), 189 (60).

3. Reakce methoxyaldehydu 3 s vinylmagnesiumbromidem

Podle obecného postupu adice byl z methoxyaldehydu **3** (500 mg; 1.0 mmol) a vinylmagnesiumbromidu (8 ml, 1.0 M; 8 mmol) získán vinylderivát **7** (343 mg; 65%). Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (mobilní fáze B). Byl získán vinylderivát **7** ve formě nažloutlých krystalků o t. t. 125-127 °C (methanol); $[\alpha]_{\text{D}} -15$ (c 0.37). ^1H NMR spektrum: 0.72 s, 0.80 s, 0.93 s, 0.96 s, 1.01 s, 5 \times 3H (5 \times CH₃); 2.61 dd, 1H($J_1=12$, $J_2=12$, H-3 α); 3.00 dd, 1H ($J_1=9$, $J_2=9$, H-28a); 3.33 s, 6H(2 \times OCH₃); 3.46 d, 1H ($J=9$, H-28b); 4.51 t, 1H ($J=12$, H-30); 4.91 d, 1H ($J=12$, H-29a); 5.03 t, 1H ($J=9$, H-29b); 5.14 t, 1H ($J=9$, H-32a); 5.30 d, 1H ($J=15$, H-32b); 5.76-5.87 m, 1H (H-31). ^{13}C NMR spektrum: 14.92; 14.99; 16.24; 16.28; 16.35; 18.35; 18.40; 21.28; 21.30; 22.44; 27.40; 27.84; 28.22; 30.24; 34.50; 34.62; 37.39; 41.18; 41.21; 42.85; 47.29; 49.91; 50.52; 50.54; 56.03; 57.74; 59.89; 71.38; 88.84; 115.43; 115.90; 139.96; 156.85; 157.61; IČ spektrum: 1638 (C=C), 2871, 2940, 3466 (OH). MS, m/z (%): [pro $\text{C}_{34}\text{H}_{56}\text{O}_3$, M^+ 512], 512 (M^+ , 1), 494 (11), 480 (3), 462 (6), 449 (100), 435 (6), 425 (7), 417 (22), 221 (28), 203 (11), 189 (31). Elementární analýza: vypočteno C 79.68 %, H 10.95 %, O 9.37 %; nalezeno C 79.63 %, H 11.01 %, O 9.36 %.

4. Reakce ethoxyaldehydu 4 s vinylmagnesiumbromidem

Podle obecného postupu adice byl z ethoxyaldehydu **4** (500 mg; 0.97 mmol) a vinylmagnesiumbromidu (5 ml, 1.0 M; 5 mmol) získán vinylderivát **8** (344 mg; 65%) ve formě narůžovělých krystalků o t. t. 155-157 °C (isopropylalkohol); $[\alpha]_{\text{D}} -11$ (c 0.40). ^1H NMR spektrum: 0.76 s, 0.82 s, 0.94 s, 0.96 s, 1.03 s, 5 \times 3H (5 \times CH₃); 1.79 dd, 1H ($J_1=6.9$, $J_2=6.9$); 1.40 s, 1H; 1.68 d, 1H ($J=4.2$); 2.72 dd, 1H ($J_1=11.7$, $J_2=11.7$, H-3 α); 3.06 t, 1H ($J=17.1$, H-28a); 3.30-3.40 m, 1H (OCH₂); 3.34-3.53 m, 3H (2 \times OCH₂, H-28a); 3.61-3.71 m, 1H (OCH₂); 4.08

m, 1H (H-30); 4.91 d, 1H (J=12, H-29a); 5.03 t, 1H (J=9, H-29b); 5.14 t, 1H (J=9, H-32a); 5.30 d, 1H (J=15, H-32b); 5.76-5.87 m, 1H (H-31). ¹³C NMR spektrum: 14.67; 14.77; 15.17; 15.65; 16.00; 16.09; 16.25; 18.27; 21.06; 23.36; 27.19; 27.66; 27.84; 28.03; 30.12; 34.29; 34.49; 34.81; 37.11; 37.31; 38.71; 38.78; 40.63; 41.01; 42.61; 46.99; 47.04; 49.71; 50.28; 50.34; 55.82; 65.14; 66.94; 68.40; 68.49; 74.19. IČ spektrum: 1637 (C=C), 2869, 2940, 3464 (OH). MS, m/z (%): [pro C₃₆H₆₀O₃, M⁺ 540], 540 (M⁺, 1), 522 (15), 508 (1), 494 (3), 476 (9), 463 (100), 456 (5), 435 (7), 432 (3), 417 (28), 397 (11), 227 (29), 213 (19), 203 (11), 191 (39). Elementární analýza: vypočteno C 80.01 %, H 11.10 %, O 8.89 %; nalezeno C 79.94 %, H 11.18 %, O 8.87 %.

5. Reakce allobetulonů 5 s vinylmagnesiumbromidem

Podle obecného postupu adice byl z allobetulonů **5** (500 mg; 1.0 mmol) a vinylmagnesiumbromidu (5 ml, 1.0M; 5 mmol) získán vinylderivát **9** (343 mg; 62%). Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (mobilní fáze B). Byl získán vinylderivát **9** ve formě nažloutlých krystalků o t. t. 205-210 °C (chloroform/methanol); [α]_D +38 (c 0.32). ¹H NMR spektrum: 0.81 s, 0.82 s, 0.83 s, 0.87 s, 0.93 s, 0.94 s, 0.98 s, 7×3H (7×CH₃); 3.44 d (J=7.78, H-28a); 3.53 s, 1H (H-19α); 3.70 d (J=1.22, H-28b); 5.15 dd, 1H (J₁=10.84, J₂=10.83, H-32a); 5.26 dd, 1H (J₁=17.24, J₂=17.25, H-32b); 5.92-6.09 m, 1H (H-31). ¹³C NMR spektrum: 13.60; 15.68; 16.12; 18.52; 20.80; 21.07; 23.93; 24.54; 26.24; 26.38; 26.45; 28.80; 30.68; 32.70; 33.78; 34.14; 34.78; 36.25; 36.73; 37.32; 40.09; 40.60; 40.75; 41.47; 46.80; 50.59; 50.90; 71.27; 87.94; 112.65; 143.56. IČ spektrum: 1734 (C=C), 2856, 2941. MS, m/z (%): [pro C₃₂H₅₂O₂, M⁺ 468], 468 (M⁺, 1), 450 (2), 435 (2), 424 (18), 409 (7), 393 (2), 385 (89), 367 (5), 355 (13), 247 (72), 229 (8), 215 (19), 203 (22), 189 (30). Elementární analýza: vypočteno C 82.08 %, H 11.08 %, O 6.84 %; nalezeno C 81.99 %, H 11.18 %, O 6,83 %.

6. Reakce heptanorketonů 6 s vinylmagnesiumbromidem

Podle obecného postupu adice byl z heptanorketonů **6** (500 mg; 1.2 mmol) a vinylmagnesiumbromidu (30 ml, 1.0 M; 30 mmol) získán vinylderivát **10** (326 mg; 73%). Průběh reakce byl sledován pomocí HPLC (mobilní fáze B). Vzniklý vinylderivát **10** byl ve formě bílých krystalků s t. t. 219 - 220 °C (methanol); [α]_D 0 (c 0.35). ¹H NMR spektrum: 0.79 s, 0.83 s, 0.97 s, 1.21 s, 1.31 s, 5×3H (5×CH₃); 2.24 dd, 1H (J₁=11.29, J₂=11.29); 3.49 s, 1H; 5.10 d, 1H (J=10.68); 5.17 d, 1H (J=17.09); 5.73-5.78 m. ¹³C NMR spektrum: 15.35; 15.44; 15.92; 16.22; 18.04; 18.26; 20.87; 21.86; 27.31; 27.94; 31.25; 32.81; 37.14; 38.69; 38.82;

39.28; 40.86; 41.24; 42.95; 50.62; 55.21; 75.57; 78.89; 111.07; 147.97. IČ spektrum: 1636 (C=C), 2866, 2939, 3545 (OH), 3609 (OH). MS, m/z (%): [pro C₂₅H₄₂O₂, M⁺ 374], 374 (M⁺, 1), 356 (5), 341 (6), 323 (2), 313 (3), 295 (1), 287 (1), 275 (1), 257 (2), 247 (100), 229 (23), 215 (3), 207 (31), 189 (56). Elementární analýza: vypočteno C 80.29 %, H 11.15 %, O 8.56 %; nalezeno C 80.16 %, H 11.30 %, O 8.54 %.

7. Reakce methoxyaldehydu 3 s allylmagnesiumbromidem

Podle obecného postupu adice byl z methoxyaldehydu **3** (500 mg; 1.0 mmol) a allylmagnesiumbromidu (8 ml, 1.0 M; 8 mmol) získán allylderivát **11** (338 mg; 46%). Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (mobilní fáze B). Výsledný allylderivát **11** byl ve formě bílých krystalků o t. t. 141-143 °C (isopropylalkohol); $[\alpha]_D -20$ (c 0.43). ¹H NMR spektrum: 0.74 s, 0.82 s, 0.95 s, 0.99 s, 1.03 s, 5×3H (5×CH₃); 2.61 dd, 1H (J₁=12, J₂= 12, H-3α); 3.01 d, 1H (J=9.1, H-28a); 3.33 s, 6H(2×OCH₃); 3.46 d, 1H (J=9.0, H-28b); 4.00-4.08 m, 1H (H-30); 4.93 d, 1H (J=20, H-29a); 5.02 d, 1H (J=35, H-29b); 5.14-5.20 m, 2H (H-33); 5.79-5.90 m, 1H (H-32). ¹³C NMR spektrum: 14.92; 15.00; 16.23; 16.28; 16.35; 18.40; 21.29; 22.43; 27.40; 27.40; 27.87; 28.21; 30.24; 30.24; 34.50; 34.61; 34.92; 37.39; 37.57; 38.79; 38.80; 39.01; 41.17; 41.22; 42.85; 42.85; 47.30; 49.99; 50.54; 56.03; 57.74; 59.89; 71.42. IČ spektrum: 1640 (C=C), 2820, 2939, 3455 (OH). MS, m/z (%): [pro C₃₅H₅₈O₃, M⁺ 526], 526 (M⁺, 2), 508 (2), 494 (6), 481 (11), 463 (42), 449 (15), 437 (6), 421 (22), 241 (17), 227 (11), 221 (25), 203 (15), 189 (36). Elementární analýza: vypočteno C 79.92 %, H 10.96 %, O 9.12 %; nalezeno C 79.79 %, H 11.10 %, O 9.11 %.

8. Reakce ethoxyaldehydu 4 s allylmagnesiumbromidem

Podle obecného postupu adice byl z ethoxyaldehydu **4** (500 mg; 0.97 mmol) a allylmagnesiumbromidu (5 ml, 1.0 M; 5 mmol) získán allylderivát **12** (250 mg; 62 %). Výsledný allylderivát **12** byl ve formě bílých krystalků o t. t. 184-186 °C (isopropylalkohol); $[\alpha]_D -17$ (c 0.47). ¹H NMR spektrum: 0.76 s, 0.82 s, 0.94 s, 0.99 s, 1.03 s, 5×3H (5×CH₃); 1.40 s, 1H; 1.68 d, 1H (J=3.3); 2.72 dd, 1H (J₁=11.7, J₂=11.7, H-3α); 3.06 t, 1H (J=17.1, H-28a); 3.32-3.37 m, 1 H (OCH₂); 3.46-3.51 m, 3H (2×OCH₂, H-28b); (3.63-3.68 m, 1H (OCH₂)); 4.02-4.13 m, 1H (H-30); 4.94 d, 1H (J=18, H-29a); 5.00 d, 1H (J=27, H-29b); 5.13-5.20 m, 2H (2×H-33); 5.85 m, 1H (H-32). ¹³C NMR spektrum: 14.77; 15.18; 15.66; 16.00; 16.09; 16.26; 18.27; 21.07; 23.37; 27.20; 27.71; 27.85; 28.03; 30.13; 34.30; 34.50; 34.82; 37.11; 37.31; 38.71; 38.77; 40.79; 41.02; 42.61; 47.00; 47.01; 49.71; 50.25; 50.34; 55.83; 65.15; 66.94;

68.41; 68.45; 74.19. IČ spektrum: 1637 (C=C), 2869, 2940, 3464 (OH). MS, m/z (%): [pro $C_{37}H_{62}O_3$, M^+ 554], 554 (M^+ , 4), 536 (5), 519 (1), 508 (12), 495 (18), 477 (65), 467 (19), 449 (38), 435 (6), 421 (42), 411 (14), 397 (10), 241 (38), 235 (28), 217 (20), 203 (23), 191 (95). Elementární analýza: vypočteno C 80.02 %, H 11.32 %, O 8.66 %; nalezeno C 80.09 %, H 11.26 %, O 8.65 %.

9. Reakce allobetulonů 5 s allylmagnesiumbromidem

Podle obecného postupu adice byl z allobetulonů **5** (500 mg; 1.0 mmol) a allylmagnesiumbromidu (8 ml, 1.0 M; 8 mmol) získán allylderivát **13** (338 mg; 40%). Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (mobilní fáze B). Výsledný allylderivát **13** byl ve formě bílých krystalků o t. t. 211-214 °C (chloroform/methanol) $[\alpha]_D +47$ (c 0.32). 1H NMR spektrum: 0.79 s, 0.79 s, 0.83 s, 0.91 s, 0.92 s, 0.92 s, 0.97 s, 7×3H (7×CH₃); 2.08 dd, 1H ($J_1=8.1$, $J_2=8.4$, H-31); 2.39 dd, 1H ($J_1=8.4$, $J_2=8.4$, H-31); 3.43 d, 1H ($J=4.8$, H-28a); 3.54s, 1H (H-19α); 3.78 d, 1H ($J=4.2$, H-28b); 5.08-5.17 m, 2H (2×H-33); 5.89-5.94 m, 1H (H-32). ^{13}C NMR spektrum: 13.70; 15.81; 16.12; 18.79; 20.64; 20.89; 23.64; 24.65; 26.35; 26.50; 26.58; 28.91; 29.12; 32.82; 33.98; 34.27; 35.00; 36.35; 36.84; 37.29; 40.70; 40.78; 40.85; 41.05; 41.59; 46.92; 51.09; 51.25; 71.43; 75.11; 88.13; 118.95; 134.84. IČ spektrum: A: 1637 (C=C), 2876, 2921, 3495 (OH). MS, m/z (%): [pro $C_{33}H_{54}O_2$, M^+ 482], 482 (M^+ , 31), 464 (8), 449 (2), 441 (100), 423 (45), 411 (9), 405 (2), 385 (100), 369 (13), 355 (8), 341 (8), 323 (6), 315 (9), 287 (3), 273 (3), 257 (3), 247 (47), 221 (11), 203 (18), 191 (17). Elementární analýza: vypočteno C 82.12 %, H 11.24 %, O 6.64 %; nalezeno C 82.10 %, H 11.27 %, O 6.63 %.

10. Reakce heptanorketonů 6 s allylmagnesiumbromidem

Podle obecného postupu adice byl z heptanorketonů **6** (500 mg; 1.0 mmol) a allylmagnesiumbromidu (15 ml, 1.0 M; 15 mmol) získán allylderivát **14** (352 mg; 63%). Vzniklý allylderivát **14** byl ve formě bílých krystalků s t. t. 199-201 °C (chloroform/methanol); $[\alpha]_D +27$ (c 0.34). 1H NMR spektrum: 0.77 s, 0.83 s, 0.94 s, 0.97 s, 1.17 s, 5×3H (5×CH₃); 2.14-2.25 m, 2H (2×H-31); 3.21 dd, 1H ($J_1=4.6$, $J_2=11.1$, H-3α); 5.03-5.11 m, 2H (2× H-33); 5.74-5.84 m, 1H (H-32). ^{13}C NMR spektrum: 15.36; 15.52; 15.90; 16.18; 17.94; 18.29; 20.84; 21.08; 27.32; 27.95; 31.17; 32.94; 37.12; 37.36; 38.71; 38.82; 41.25; 42.23; 47.21; 50.32; 50.87; 55.19; 73.96; 78.97; 118.13; 134.33. IČ spektrum: 1639 (C=C), 2865, 2940, 3476 (OH), 3606 (OH). MS, m/z (%): [pro $C_{26}H_{44}O_2$, M^+ 389], 389 (M^+ , 0.1), 370 (1), 355 (3), 347 (100), 329

(48), 311 (34), 229 (13), 215 (12), 207 (84), 189 (54). Elementární analýza: vypočteno C 80.32 %, H 11.43 %, O 8.25 %; nalezeno C 80.35 %, H 11.41 %, O 8.23 %.

11. Acetylace allylderivátu 14

Allylderivát **14** byl acetylován obvyklým způsobem a byl získán allylderivát **15** (382 mg, 61%). Vzniklý allylderivát **15** byl ve formě bílých krystalků s t. t. 196-199 °C (chloroform/methanol); $[\alpha]_D +34$ (c 0.8). ^1H NMR spektrum: 0.84 s, 0.85 s, 0.86 s, 0.94 s, 1.17 s, 5×3H (5×CH₃); 2.04 s, 3H, (OAc); 2.14-2.25 m, 2H ($J_1=6.0$, $J_2=11.0$, H-31); 4.48 dd ($J_1=11$, $J_2=6$, H-3 α); 5.03-5.11 m, 2H (2×H-32); 5.74-5.84 m, 1H (H-31). ^{13}C NMR spektrum: 15.51; 15.92; 16.25; 16.47; 17.96; 18.19; 20.88; 21.08; 21.30; 23.66; 27.91; 31.20; 32.92; 37.06; 37.40; 38.77; 38.42; 41.28; 41.33; 42.26; 47.25; 50.27; 55.32; 73.89; 80.90; 118.10; 134.36; 170.97. IČ spektrum: 1636 (C=C), 2871, 2943, 3509 (OH). MS, m/z (%): [pro C₂₈H₄₆O₃, M⁺ 389], 389 (M⁺, 55), 371 (14), 355 (2), 337 (1), 329 (23), 311 (54), 301 (1), 289 (2), 269 (2), 255 (2), 249 (16), 229 (11), 215 (10), 201 (15), 189 (63). Elementární analýza: vypočteno C 78.16 %, H 10.71 %, O 11.13 %; nalezeno C 78.09 %, H 10.77 %, O 11.15 %.

12. Ethynylace methoxyaldehydu 3

Podle obecného postupu ethynylace byl z methoxyderivátu **3** (500 mg; 1.0 mmol) a acetylidu lithného (500 mg; 1.0 mmol) získán ethynylderivát **16** (91 mg; 17%). Vzniklý ethynylderivát **16** byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu a mobilní fází byl toluen/ether (6:1). Vzniklý ethynylderivát **16** byl ve formě bílých šupinek o t. t. 164-169 °C (isooktan); $[\alpha]_D -17$ (c 0.36). ^1H NMR spektrum: 0.74 s, 0.83 s, 0.92 s, 0.95 s, 1.04 s 5×3H (5×CH₃); 1.12 d ($J=5.1$); 1.24 s; 1.39 d ($J=2.4$); 2.56 t, 1H ($J=4.8$; HC≡); 2.63 dd, 1H ($J_1=11.7$, $J_2=11.7$, H-3 α); 3.05 d, 1H ($J=9$, H-28a), 3.35 s; 6H (OCH₃); 3.49 d ($J=9$, H-28b); 4.81 s, 1H (H-30); 5.03 m, 1H (H-29a); 5.28 m, 1H (H-29b). ^{13}C NMR spektrum: 14.76; 16.01; 16.07; 16.13; 18.18; 21.03; 22.21; 25.45; 27.18; 27.44; 28.00; 29.99; 30.08; 33.60; 34.27; 34.43; 34.50; 37.17; 37.35; 38.57; 38.79; 40.98; 41.43; 42.63; 47.09; 50.33; 50.57; 55.82; 65.88; 74.21; 74.33; 83.29; 88.62; 109.06; 154.11. IČ spektrum: 1648 (C=C), 2870, 2941, 3450 (OH). MS, m/z (%): [pro C₃₄H₅₄O₃, M⁺ 510], 510 (M⁺, 5), 492 (13), 484 (43), 465 (61), 448 (13), 439 (50), 421 (11), 407 (19), 221 (28), 203 (12), 189 (50). Elementární analýza: vypočteno C 79.92 %, H 10.67 %, O 9.41 %; nalezeno C 79.95 %, H 10.66 %, O 9.40 %.

13. Ethynylace ethoxyaldehydu 4

Podle obecného postupu ethynylace byl z ethoxyaldehydu **4** (500 mg; 1.0 mmol) a acetylidu lithného (500 mg; 1.0 mmol) získán ethynylderivát **17** (119 mg; 23%). Vzniklý ethynylderivát **17** byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu a mobilní fází byl toluen/ether (6:1). Vzniklý ethynylderivát **17** byl ve formě žlutých krystalků o t. t. 207-210 °C (isooktan); $[\alpha]_D -14$ (c 0.41). ^1H NMR spektrum: 0.76 s, 0.82 s, 0.94 s, 0.98 s, 1.03 s, $5\times 3\text{H}$ ($5\times\text{CH}_3$); 1.18 m, 6H ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{O}$); 2.56 t, 1H ($J=4.5$, $\text{HC}\equiv$); 2.72 dd, 1H, ($J_1=11.7$, $J_2=11.7$, H-3 α); 3.07 d, 1H($J=9.3$, H-28a); 3.35 m, 1H (OCH_2); 3.44-3.53 m, 3H (OCH_2 a H-28b); 3.66 m, 1H (OCH_2); 4.81 bs, 1H (H-30); 5.02 s, 1H (H-29a), 5.27 d, 1H ($J=1.5$, H-29b). ^{13}C NMR spektrum: 14.74; 16.01; 16.11; 16.26; 18.28; 21.03; 23.38; 25.44; 27.20; 27.45; 27.57; 28.04; 30.11; 33.63; 34.29; 34.54; 34.61; 37.12; 37.31; 38.71; 38.77; 40.99; 42.61; 47.06; 50.35; 50.55; 55.85; 65.87; 74.17; 74.29; 83.33; 86.64; 108.99; 154.19. IČ spektrum: 1650 (C=C), 2868, 2939, 3444 (OH). MS, m/z (%): [pro $\text{C}_{36}\text{H}_{58}\text{O}_3$, M^+ 538], 538 (M^+ , 8), 520 (11), 512 (74), 494 (5), 479 (21), 466 (31), 453 (86), 433 (15), 407 (42), 235 (21), 217 (18), 203 (23), 191 (65). Elementární analýza: vypočteno C 80.21 %, H 10.87 %, O 8.92 %; nalezeno C 80.24 %, H 10.84 %, O 8.92 %.

14. Ethynylace allobetulonou 5

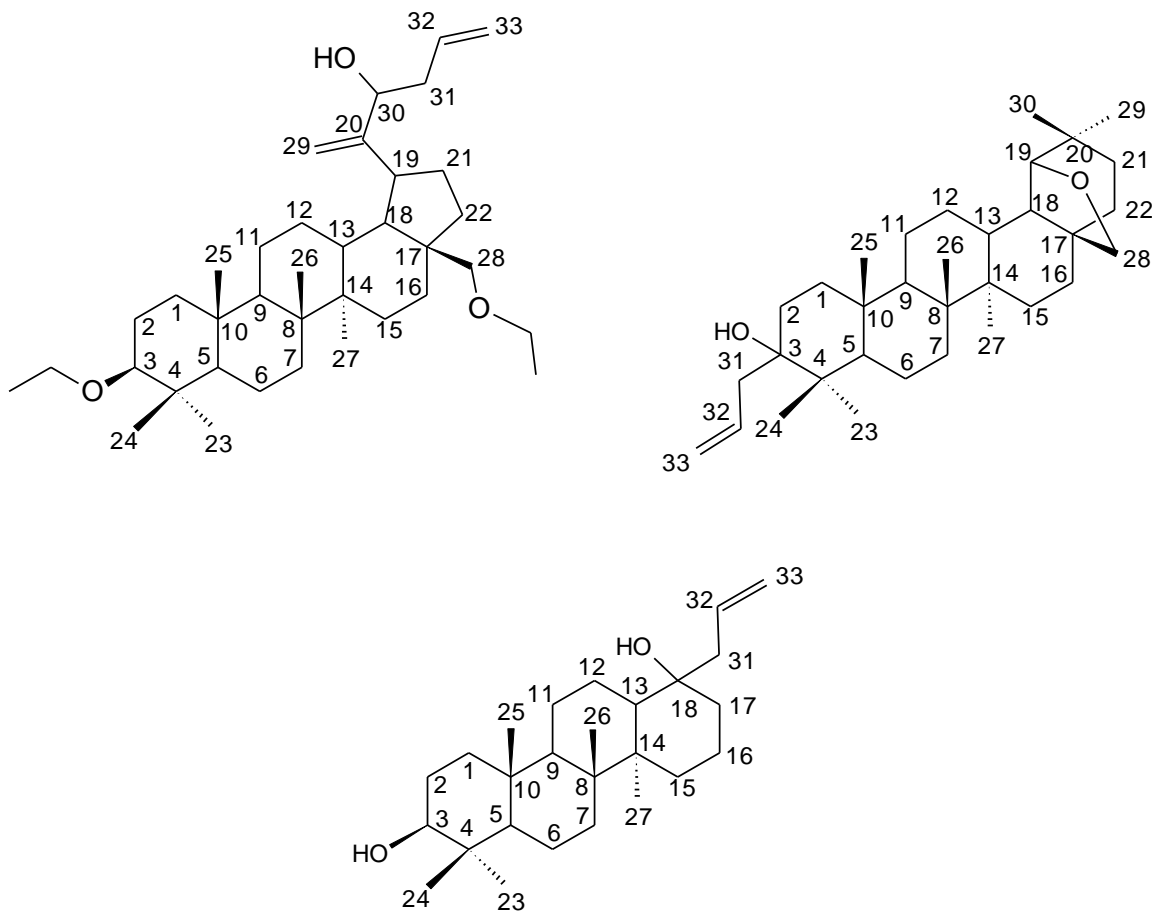
Podle obecného postupu ethynylace byl z allobetulonou **5** (500 mg; 1.0 mmol) a acetylidu lithného (500 mg; 1.0 mmol) získán ethynylderivát **18** (112 mg; 21%). Vzniklý ethynylderivát **18** byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu a mobilní fází byl toluen/ether (6:1). Vzniklý ethynylderivát **18** byl ve formě žlutých krystalků o t. t. 219-222 °C (methanol); $[\alpha]_D +41$ (c 0.32). ^1H NMR spektrum: 0.79 s, 0.85 s, 0.85 s, 0.92 s, 0.92 s, 0.96 s, 1.05 s, $7\times 3\text{H}$ ($7\times\text{CH}_3$); 2.48 s, 1H ($\text{HC}\equiv$); 3.43 d ($J=4.8$, H-28a), 3.52 s, 1H (H-19 α); 3.77 d ($J=4.5$, H-28b). ^{13}C NMR spektrum: 13.74; 15.78; 16.91; 17.58; 18.59; 21.06; 24.62; 24.75; 26.36; 26.51; 26.60; 28.90; 32.74; 32.81; 33.91; 34.25; 36.35; 36.84; 37.35; 38.17; 40.69; 40.81; 41.43; 41.57; 46.95; 51.22; 53.31; 71.36; 73.58; 73.61; 75.85; 87.30; 88.02. IČ spektrum: 1635 (C=C), 2865, 2937, 3418 (OH). MS, m/z (%): [pro $\text{C}_{32}\text{H}_{50}\text{O}_2$, M^+ 466], 466 (M^+ , 15), 448 (2), 433 (5), 409 (2), 395 (9), 385 (100), 247 (89), 231 (39), 213 (48), 203 (25), 191 (20). Elementární analýza: vypočteno C 82.31 %, H 10.82 %, O 6.87 %; nalezeno C 82.35 %, H 10.80 %, O 6.86 %.

15. Ethinylace heptanorketonu **6**

Heptanorketon **6** (500 mg; 1 mmol) byl podroben ethinylaci podle obecného postupu. Po zpracování byl získán výchozí heptanorketon **6** (398 mg, 65%), který byl podle t. t., $[\alpha]_D$ a ^1H NMR spektra identický s výchozí substancí **6**.

Číslování skeletů

Uhlíkové atomy v NMR spektrech byly číslovány takto:



Literatura:

1. Džubák P., Hajduch M., Vydra D., Hustová A, Kvasnica M., Biedermann D., Marková L., Urban M., Šarek J.: *Nat. Prod. Rep.* **23**, 394 (2006).
2. Dvořáková M., Valterová I., Vaněk T.: *Chemické listy***105**, 839-845 (2011).
3. Crowell P. L.: *J. Nutr.*, **1999**, 129, 775S.
4. Rao J., McClements D. J.: *Food Chem.* In press (2012).
5. Trytel M., Paduch R., Fiedurek J., Kaondefer-Szerszen M.: *Biotechnologia* **1**, 135 (2007).
6. <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB03634> (8. července 2012).
7. Morgan-Meadows S., Dubey S., Gould M., Tutsch K., Marnocha R., Arzoomanin R., Alberti D., Binger K., Feierabend C., Volkman J., Ellinge S., Black S., Pomplun M., Wilding G., Bailey H.: *Cancer Chemoter. Pharmacol.*, **2003**, 52, 361.
8. Kuo-Hsiung L., Eng-Shang H., Piantadosi C., Pagano J. S., Geissman T. A.: *Cancer Res.* **31**, 1649 (1971).
9. Evans L., Hedger J., O'Donnell G., Skelton B. W., White A. H., Williamson R. T., Gibbons S.: *Tetrahedron Lett.* **51**, 5493 (2010).
10. Macías F. A., Fernández A., Varela R. M., Molinillo J. M. G., Torres A., Alves P. L. C. A.: *J. Nat. Prod.* **69**, 795 (2006).
11. Fraga B. M.: *Nat. Prod. Rep.*, **2006**, 23, 943.
12. Jahodář L., Klečáková J.: *Chemické listy* **93**, 320-326 (1999).
13. Brossi A., Venugopalan B., Gerpe L. D., Yeh H. J. C., Flippen-Anderson J. L., Buchs P., Luo X. D., Milhous W., Peters W.: *J. Med. Chem.* **31**, 645 (1988).
14. Kelner M. J., McMorris T. C., Montoya M. A., Estes L., Rutherford M., Kyra M., Taetle S, Taetle R.: *Cancer Chemoter. Pharmacol.* **40**, 65 (2006).
15. Anchel M., Hervey A., Robbins W. J.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1950**, 36, 30.
16. Senzer N. S. Arsenau J., Richards D., Berman B., MacDonald J. R., Smith S.: *J. Clin. Oncol.* **28**, 36 (2005).
17. <http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=Irofulven> (8. července 2012).
18. Ovenden S. P. B., Nielson J. L., Liptrot C. H., Willis R. H., Tapiolas D. M., Wright A. D., Motti CH. A.: *Molecules* **17**, 2929 (2012).
19. Koray S. M., Er N., Ercil D., Del Olmo E., San Feliciano A.: *Acta Pharm. Tur.***44**, 213 (2002).

20. Izumi E., Ueda-Nakamura T., Veiga V. F., Pinto A. C., Nakamura C. V.: *J. Med. Chem.* **10**, 1021 (2011).
21. Wang G., Tang W., Bidigare R. R.: *J. Nat. Prod.* **197** (2005).
22. Zahr A. S., Pishko M. V.: *Biomacromolecules* **8**, 2004 (2007).
23. Wani M. C., Taylor H. L., Wall M. E., Coggon P., McPhail A. T.: *J. Am. Chem. Soc.*, **1971**, 93, 2325.
24. Xili L., Chengijany B., Ervi X., Reiming \$., Yuengming W., Haodong S., Zhiyian H.: *Food Chem.. Toxicol.* **30**, 957 (1992).
25. Matsui M., Sofuni T., Nohmi T.: *Mutagenesis* **11**, 565(1996).
26. Procinska E., Bridges B. A., Hanson J. R.: *Mutagenesis* **6**, 165 (1991).
27. Melis M. S.: *J. Ethnopharmacol.* **36**, 213 (1992).
28. Melis M. S.: *J. Nat. Prod.* **55**, 688 (1992).
29. Toskulkao C, Deechakawan W., Leardkamolkan V., Glinsukon T., Buddhasukh D.: *Phytother. Res.* **8**, 281(1994).
30. Toskulkao C, Sutheerawatanananon M.: *Nutr. Res.* **14**, 1711 (1994).
31. Klener P.: *Protinadorová chemoterapie*, **1996**, Galén, Praha.
32. Dewick P. M.: *Nat. Prod. Rep.* **19**, 181 (2002).
33. Wei-Hua J., Hao G., Feng Z., Fei H., Guang-Xiong Z., Xin-Sheng Y.: *Chem. & Biodiversity* **8**, 1163 (2011).
34. Acebey L., Sauvain M., Beck S., Moulis C., Gimenez A., Jullian.: *Organic letters*, **23**, 4693-4696, 2007.
35. Haefner B.: *Drug Discovery Today*, **2003**, 8, 536.
36. <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ol7015725> (10. července 2012).
37. Thibeault D., Gauthier Ch., Legault J., Bouchard J., Dufour P., Pichette A.: *Bioorgan. Med. Chem.* **15**, 6144 (2007).
38. Hajdúch M., Džubák P., Šarek J.: *Klin. Farmakol. Farm.* **18**, 14 (2004).
39. Sarek J., Klinot J, Brazinova S., Dzubak P., Klinotova E., Noskova V., Krecek V., Korinkova G., Thomson J. O., Janostakova A., Wang S., Parsons S., Fischeer P. M., Zhelev N. Z., Hajduch M.: *J. Med. Chem.* **46**, 5402 (2003).
40. Sarek J., Kvasnica M., Vlk M., Biedermann D.: Pentacyclic Triterpenes as Promising Agents in Cancer. Nova Science Publishers, Inc.: *Hauppauge NY* (2010). Chapter 6, pp 159-189.
41. Simonsen J., Ross W. C. J.: *The Terpenes IV*, Cambridge Univ. Press, London 1957.
42. Lowitz: *Crell's annalen*, **1788**, 1, 312.

43. Sheth K., Bianchi E., Wiedhopf R., Cole J. R.: *J. Pharm. Sci.*, **1973**, 62, 139.
44. Hoet S., Pieters L., Muccioli G. G., Habib-Jiwan J., Opperdoes F. R., Quetin-Leclercq J.: *J. Nat. Prod.*, **2007**, 70, 1360.
45. Trumbull E. R., Bianchi E., Eckert D. J., Wiedhopf R. M., Cole J. R.: *Pharm. Sci.* **65**, 1407 (1976).
46. Simonsen J., Ross W. C. J.: *The Terpenes. V*, Cambridge Univ. Press, London 1957.
47. Urban M., Sarek J., Klinot J., Korinkova G., Hajduch M.: *J. Nat. Prod.* **67**, 1100 (2004).
48. Pisha E., Chai H., Lee I. S., Chagwedera T. E., Farnsworth N. R., Cordell G. A., Beecher C. W., Fong H. H., Kinghorn A. D., Brown D. M.: *Nat. Med.* **1**, 1046 (1995).
49. Sarek J., Kvasnica M., Vlk M., Urban M., Dzubak P., Hajduch M.: Research on Melanoma - A Glimpse into Current Direction and Future Trends. Murph M.: *Tech, Rijeka Croatia* (2011). Chapter 6, pp 125-157.
50. Hájková J.: *Diplomová práce*, Univerzita Karlova v Praze, Praha **1967**.
51. Klinot J., Krumpolc M., Vystrčil A.: *Triterpenes.* **IX.**, 3174, 1965.
52. Li X., Singh Shankar M., Labrie F.: *Tetrahedron Lett.* **35**, 1157-1160, 1994.
53. Chaudhuri N. K., Williams J. G., Nickolson R., Gut M.: *The Journal of Organic Chemistry*, **12**, Vol. 34, 1969.
54. Baseer M., Ansari F. L., Ashraf Z., SaeedulHaq R.: *Molecules* **2011**, 16, 10337-10346.