

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA  
Katedra organické chemie



Klára Piskořová

**Studium nukleofilních adicí na triterpenoidní oxoderiváty**

*Diplomová práce*

Studijní obor: Bioorganická chemie a chemická biologie B1407

Vedoucí práce: doc. RNDr. Milan Urban, Ph.D.

Olomouc 2016

## **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.

Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry organické chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci, 11. 5. 2016

.....

Podpis

## **Poděkování:**

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

Dále bych chtěla poděkovat Janu Šarkovi, Ph.D. za jeho vedení a rady během práce v laboratoři Betulinines. RNDr. Martinu Vlkovi, Ph.D z Katedry jaderné chemie FJFI ČVUT v Praze za změření části IČ, Mgr. Igoru Popovi, CSc. za měření NMR spekter a Mgr. Lucce Borkové za cenné rady při práci v laboratoři nejen s HPLC a pomoc při měření IČ.

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: Studium nukleofilních adicí na triterpenoidní oxoderiváty

Typ práce: Diplomová práce

Pracoviště: Ústav molekulární a translační medicíny LF UP

Školitel: RNDr. Milan Urban, Ph.D.

Školitel-konzultant: RNDr. Jan Šarek, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2016

Abstrakt: Hlavním cílem této práce je připravit triterpenoidní oxoderiváty a prostudovat možnost adicí Grignardových solí a organolithných sloučenin na tyto deriváty. Nové sloučeniny budou charakterizovány pomocí fyzikálních a spektrálních dat a budou zaslány na testování *in vitro* cytotoxické aktivity na nádorových i nenádorových buněčných liniích.

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

Počet stran: 38

Počet příloh: 0

Jazyk: český

## **Bibliographical identification**

Author's first name and surname: Klára Piskořová

Title: Study of nucleophilic additions to the triterpenoid oxoderivatives

Type of thesis: Master's

Department: Institute of Molecular and Translational Medicine, LF UP

Advisor: RNDr. Milan Urban, Ph.D.

Advisor-consultant: RNDr. Jan Šarek, Ph.D.

The year of presentation: 2016

Abstract: The main aim of this work is to prepare triterpenoid oxoderivatives and to study a possibility of addition of Grignard reagents and organo-lithium salts on them. New compounds will be characterized by physical and spectral data and will be sent for testing of their *in vitro* cytotoxic activity on multiple cancer cell lines and normal cell lines.

Keywords: triterpenes, triterpenoids, Grignard reagent, cytotoxic activity

Number of pages: 38

Number of appendixes: 0

Language: Czech

## Seznam použitých zkratek

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-2	lidském melanomu
A549	karcinomu plic
OVCAR-3	karcinomu vaječníků
HCT-15	karcinomu tlustého střeva
XF488	karcinomu centrálního nervového systému
518A2	melanomu
A431	rakovině děložního čípku
A253	rakovině hlavy
FADU	rakovina krku
A2780	rakovině vaječníků
DLD-1	rakovina tlustého střeva
HCT-8	rakovina tlustého střeva
HCT-116	rakovina tlustého střeva
HT-29	rakovina tlustého střeva
SW-480	rakovině tlustého střeva
8505c	anaplastický karcinom štítné žlázy
SW-1736	anaplastický karcinom štítné žlázy
MCF-7	mamma karcinomu
L1210	myší leukemické buňky
CEM	lidské T-lymfoblastické buňky
HeLa	rakovina děložního čípku
Walker 256	myší karcinosarkomu

## **Cíle diplomové práce:**

1. Vypracování literární rešerše na téma „Nukleofilní adice na triterpenoidní oxoderiváty.“
2. Příprava výchozích oxoderivátů pro adice Grignardových činidel a acetylidu lithného.
3. Reakce oxoderivátů s Grignardovými činidly a acetylidem lithným.
4. Syntéza a vyhodnocení cytotoxické aktivity připravených sloučenin.

## **Poznámka k textu**

Číslování sloučenin v této práci je dvojitý. V kapitole *I. Úvod do 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.

## Úvod

Triterpeny tvoří rozsáhlou skupinu přírodních látek, jejichž skelet je formálně vystaven z molekul isoprenu (2-methylbuta-1,3-dienu). Jsou odvozeny od více než 40 skeletálních typů. Triterpeny, jež bývají též označovány jako sekundární metabolity, se nacházejí převážně v rostlinách, ale i suchozemských a vodních organismech. Vyznačují se rozmanitými biologickými účinky, jako jsou např. protizánětlivé, antimikrobiální, antimykotické, protinádorové, hepatoprotektivní, anti HIV a další.

Jedna z významných oblastí současného výzkumu v biomedicinální chemii je také testování cytotoxické aktivity nových sloučenin a následné vyhodnocení spojené s určováním konkrétního mechanismu účinku jednotlivých látek a zkoumání jejich dalšího využití v praxi. Zájem o studium triterpenů roste díky jejich dostupnosti z přírodních zdrojů, biologickým účinkům a nízké toxicitě. Během minulých let bylo prokázáno, že některé triterpeny mají vhodné cytotoxické vlastnosti ( $IC_{50} < 10 \mu\text{mol/l}$ ) a proto se naše pracoviště snaží vyvinout řadu nových derivátů, jako jsou např. deriváty betulinu, kyseliny betulinové s lepšími vlastnostmi než sloučeniny známé.

Jednotlivé skupiny triterpenů, např. lupanové a oleanolové deriváty, vykazují cytotoxickou aktivitu proti mnoha buněčným liniím různého histogenetického původu včetně kmenů rezistentních vůči dostupným chemoterapeutikům (např. taxolu a daunorubicinu). Díky těmto výsledkům vykazují triterpeny slibné výsledky i v léčbě rakoviny.

Předkládaná práce se zabývá studiem nukleofilních adicí na triterpenoidní oxoderiváty. Hlavní část tvoří adice Grignardových činidel (vinylmagnesiumbromid, allylmagnesiumbromid, ethynylmagnesiumbromid) na nové deriváty betulinu a reakce acetylidu lithného s heptanorke-tonem.

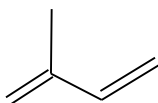


## ***TEORETICKÁ ČÁST***

# 1. Úvod do studované problematiky

## Terpeny

Terpeny jsou organické sloučeniny, lze je dělit na acyklické a cyklické. Terpeny lze také rozdělit podle počtu strukturních molekul izoprenu na monoterpeny, které se formálně skládají z dvou molekul izoprenu, dále seskviterpeny, které jsou složeny ze tří molekul izoprenu, diterpeny obsahují čtyři molekuly izoprenu. Triterpeny jsou složeny z šesti molekul izoprenu, tetraterpeny obsahují osm molekul izoprenu a polyterpeny se skládají z většího počtu molekul izoprenu než již bylo zmíněno.<sup>1,2</sup>



I

## Triterpeny

Triterpeny představují důležitou skupinu přírodních látek.<sup>3</sup> Každým rokem jsou z přírodních zdrojů izolovány stovky nových triterpenů, o čemž svědčí přehledové články Conolyho & Hilla publikované každým rokem, poslední z roku 2015.<sup>4</sup> Během několika posledních let přichází do popředí zájmu vzhledem ke svým různým biologickým účinkům.<sup>5</sup> Tvoří rozsáhlou skupinu sloučenin, obsahující více než 4000 různých sloučenin – volné triterpeny, triterpenické glykosidy (saponiny), fytoosteroly a/nebo jejich prekurzory.<sup>5</sup> Další skupina rostlinných triterpenických saponinů je strukturně příbuzná s cholesterolem a steroidními hormony, ale bez hormonálního účinku.<sup>5</sup>

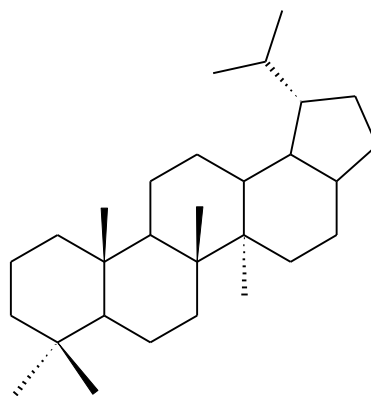
Triterpenoidy mají celou řadu jedinečných a potenciálně využitelných biologických účinků.<sup>5</sup> Zmínky o triterpenech je možno nalézt již v prvním psaném herbáři, kde je možno nalézt záznamy o použití rostlin s vysokým obsahem triterpenů (ženšen pravý- *Panax ginseng*, lesklá korka lesklá- *Ganoderma lucidum*, boubelka velkokvětá- *Platycodon Grandiflorum* a také indické kadidlo ze stromu *Boswellia serrata* ).<sup>5</sup> Tyto rostliny byly používány jako všelék díky svým rozsáhlým terapeutickým účinkům.<sup>5</sup> Triterpenoidy je také možné nalézt v různých evropských rostlinách a ovoci.<sup>5</sup>

Z biologického hlediska, nejdůležitější triterpenoidní struktury jsou oleanan, ursan, lupan, dammaran a euphan.<sup>5</sup> Triterpenoidy jsou studovány pro jejich protizánětlivé, hepatoprotektivní, analgetické, antimikrobiální, antimykotické, virostatické, imunomodulační a tonické

účinky.<sup>5</sup> Jsou používány v prevenci a při léčbě hepatitidy, parazitárních a protozoárních infekcí a především pro své cytostatické účinky.<sup>5</sup> Nevýhodou těchto sloučenin je jejich nízká rozpustnost ve vodě a s tím spojená nízká biodostupnost z trávicího traktu. Ruku v ruce s pokračující exploatací přírodního materiálu a izolací nových terpenoidních struktur tudíž je vývoj syntetických derivátů s vyšším účinkem a rozpustností a tedy s vyšším terapeutickým potenciálem.<sup>5</sup>

### Lupanové deriváty

Protinádorové vlastnosti lupanu **II** a jeho derivátů byly objeveny před více než dvaceti lety.<sup>6</sup>



II

### Betulin (**IIIa**) a kyselina betulinová (**IIIb**)

Betulin (**IIIa**) je součástí skupiny pentacyklických triterpenoidních alkoholů.<sup>7</sup> Nachází se především v kůře břízy (*Betula sp.*), od které je odvozen i jeho název.<sup>7</sup>

Deriváty betulinu (**IIIa**) vykazaly protinádorové účinky na 15 různých lidských nádorových buněčných liniích, kde byly zkoumány pomocí kolorimetrického testu založeném na použití B-rhodaminu.<sup>3</sup>

Kyselina betulinová (**IIIb**) byla poprvé objevena v roce 1902, ale až v roce 1976 Trumbull a jeho vědecký tým objevil, že jako součást extraktu z *Vauquelinia corymbosa* zodpovídá za cytotoxickou aktivitu tohoto extraktu na nádorové linii melanomu a leukemie.<sup>8,9</sup> Sloučeninu **IIIb** je možné také získat z keře *Ziziphus mauritiana* a z kůry platanu (*Platanus hispanica*).<sup>8,9</sup>

Postupy popsané v práci<sup>7</sup> vedly k izolaci jednoho nejznámějšího pentacyklického triterpenů a to kyselině betulinové (**IIIb**).<sup>7</sup> Kyselina betulinová (**IIIb**) má antiproliferační vlastnosti.<sup>7</sup>

Dřívější protinádorové aktivita *in vitro* a *in vivo* zůstává nicméně kontroverzní.<sup>7</sup> Například původní pozorování účinnosti kyseliny betulinové (**IIIb**) u Walker 256 na modelu myšního karcinosarkomu není možné reprodukovat na podobném systému.<sup>10,11</sup>

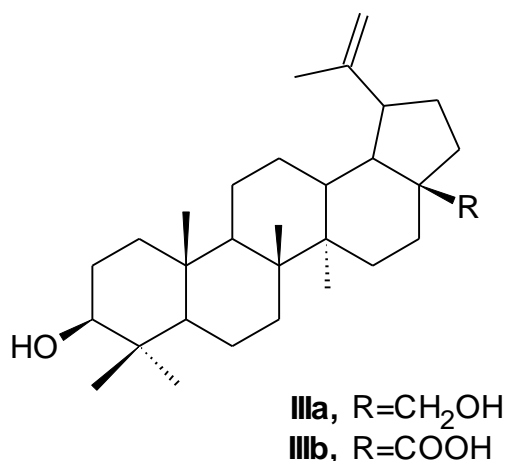
Kromě cytotoxické aktivity na melanomu vykazuje kyselina betulinová (**IIIb**) cytotoxické a protinádorové vlastnosti na dalších nádorových liniích a bylo také prokázáno, že má anti-HIV vlastnosti.<sup>12,13</sup> Z protinádorových účinků byla prokázána cytotoxická aktivita proti lidskému melanomu (MEL-2) a karcinomu plic (A549) a na leukocytární leukémii buněčné linie P-388.<sup>7</sup>

Analýza buněčného cyklu melanomových buněk odhalila blokování expozice G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> po 32 hodinách a indukce apoptózy byla pozorována po 56-72 hodinách.<sup>7</sup> Navíc specifita byla prokázána nejen proti tomuto melanomu, ale také proti neuroektodermálním nádorům.<sup>7</sup> Cytotoxická aktivita kyseliny betulinové (**IIIb**) je nezávislá na buněčné genu p53 a aktivaci CD95.<sup>14</sup> Je zajímavé, že apoptóza je zprostředkována přes přímé účinky na mitochondrie, protože indukce mitochondriální propustnosti přechodu kyseliny betulinové (**IIIa**) sama postačuje k úplné progresi apoptózy.<sup>15</sup>

Následující výzkum ukázal, že amidy kyseliny betulinové (**IIIb**) vykazují vyšší aktivitu než volná kyselina a to nejen na lidském melanomu (MEL-2)<sup>16</sup> a karcinomu plic (A549)<sup>17</sup>, ale také na neuroblastomu<sup>18</sup>, meduloblastomu<sup>18</sup>, glioblastomu<sup>18</sup>, karcinomu vaječníků (OVCAR-3)<sup>19</sup>, karcinomu tlustého střeva (HCT-15)<sup>19</sup> a karcinomu centrálního nervového systému (XF498).<sup>19</sup> Byla také pozorována vysoká *in vivo* aktivita na MEL-2, výše uvedených neuroektodermálních nádorů a také u Evingsova sarkomu.<sup>20,21</sup>

Antivirové účinky derivátů kyseliny betulinové (**IIIb**) se vyznačují konkrétní inhibicí buněčného virového cyklu na rozhraní gp41-gp120 nebo změnou procesu buněčného zrání zásahem na CA-SP1 uzlu během štěpení polyproteinu Gag na jednotlivé virové proteiny.<sup>3</sup>

Na zvířecích modelech byla prokázána selektivní cytotoxicita kyseliny betulinové (**IIIb**) na melanomových buňkách.<sup>3</sup> Kyselina betulinová (**IIIb**) nevykazovala akutní nebo chronické nežádoucí účinky na zdravých buňkách ani při dávkách 500 mg/kg.<sup>3</sup> Přímá interakce mezi kyselinou betulinovou (**IIIb**) a mitochondrií vede ke zvýšení propustnosti a uvolnění cytochromu c a AIF do cytosolu.<sup>3</sup> Díky tomuto procesu dojde ke kaspázové kaskádě a jaderné fragmentaci.<sup>3</sup> Kromě těchto procesů byla zjištěna tvorba reaktivních forem kyslíku (ROS), který je spojován s up-regulací p38 a SAP/JNK kinázou.<sup>3</sup>



Screening různých lupanových derivátů odvozených od triterpenů syntetizovaných v našich laboratořích vedl k řadě nových potenciálně aktivních protinádorových sloučenin.<sup>7</sup> V práci<sup>7</sup> je popsána syntéza a vztahy mezi strukturou a aktivitou derivátů kyseliny betulinové (**IIIb**), ve kterých je kruh E modifikován nejrůznějšími kyslíkatými funkčními skupinami, je modifikován např. na ketony, diketony, seco-anhydrid, případně je celý kruh E degradován na des-E-lupanové deriváty.<sup>7</sup> Izolované sloučeniny byly pojmenovány betuliny.<sup>7</sup> Je známo z literatury,<sup>22</sup> že cytotoxická aktivita derivátů isoprenoidních karboxylových kyselin často souvisí s přítomností volné karboxylové skupiny v molekule, zatímco aktivita odpovídajících alkylesterů je často mnohem menší.<sup>22</sup> Tato skutečnost se vysvětluje tak, že volný karboxyl je součástí farmakoforu a jednoduché alkylestery je nemožné hydrolyzovat esterázami za fyziologických podmínek, zejména kvůli sterickým důvodům. Pivaloyloxymethylester (POM) a acetoxymethylestery (ACM), které jsou výrazně labilnější, jsou naopak snadno hydrolyzovány různými nespecifickými esterázami.<sup>23</sup> Tyto estery mohou být použity jako vhodné prodrugs, i když je to spíše hypotéza, neboť metabolismus těchto esterů nebyl zatím zkoumán.<sup>7</sup> Díky jejich lipofilnímu charakteru, jsou propustné membránami a jejich čištění je mnohem jednodušší než u volných karboxylových sloučenin.<sup>7</sup> Ve studii<sup>7</sup> jsou popsány 3β-acetoxylupanové deriváty s oxidativní modifikací na E-kruhu a různé způsoby acetoxymethylkarbonylu, methoxykarbonylu (Pivaloyloxy)methoxykarbonyl a acetoxymethylkarbonyl skupiny na uhlíku C17, které byly připraveny a testovány.<sup>7</sup> Jejich cytotoxická aktivita byla hodnocena za použití lidských nádorových buněčných linií.<sup>7</sup>

Výchozím materiálem pro přípravu popsáných sloučenin v publikaci<sup>7</sup> je 21-oxolup-18-en-3a, 28-diyl diacetát **IVa** (schéma č. 1).<sup>7</sup> Tyto nenasycené ketony (**IVa-IVf**) jsou získány z betulinu (**IIIa**) acetylací, kyselé katalyzovanou izomerací z 20(29)-dien<sup>24</sup> a allylovou oxidací

výsledného 18,19-nenasyceného produktu.<sup>25</sup> Selektivní saponifikace na uhlíku 28 u esteru kyseliny octové a pak převedeny na hydroxyketon, jehož funkční skupina karbinol, byla oxidována pomocí RuO<sub>4</sub> na karboxylovou skupinu **IVc** ve vysokém výtěžku.<sup>7</sup> Methylester **IVd**, byl také charakterizován. Reakcí ketokyseliny **IVc** s chlormethylpivalátem nebo brommethylacetátem za katalýzy 1,8-diazabicyklo [5.4.0] undec-7-en (DBU) v dichlormethanu a acetonitrilu se získá příslušný Pom nebo ACM ester **IVe**, respektive **IVf**.<sup>7</sup> Oxid seleničitý oxiduje látky **IVa** a **IVd-IVf**, které obsahují ketony v poloze 21, ve směsi dioxanu/kyseliny octové na odpovídající 21, 22-diketony **Va-Vd**.<sup>7</sup> Za použití analýzy <sup>1</sup>H NMR bylo zjištěno, že α-diketony **Vb-Vd** reagují velmi snadno s jednoduchými alkoholy, produkují složité směsi poloacetalů a ketalů. Toto zjištění vyloučilo použití alkoholů jako krystalizačního rozpouštědla.<sup>7</sup>

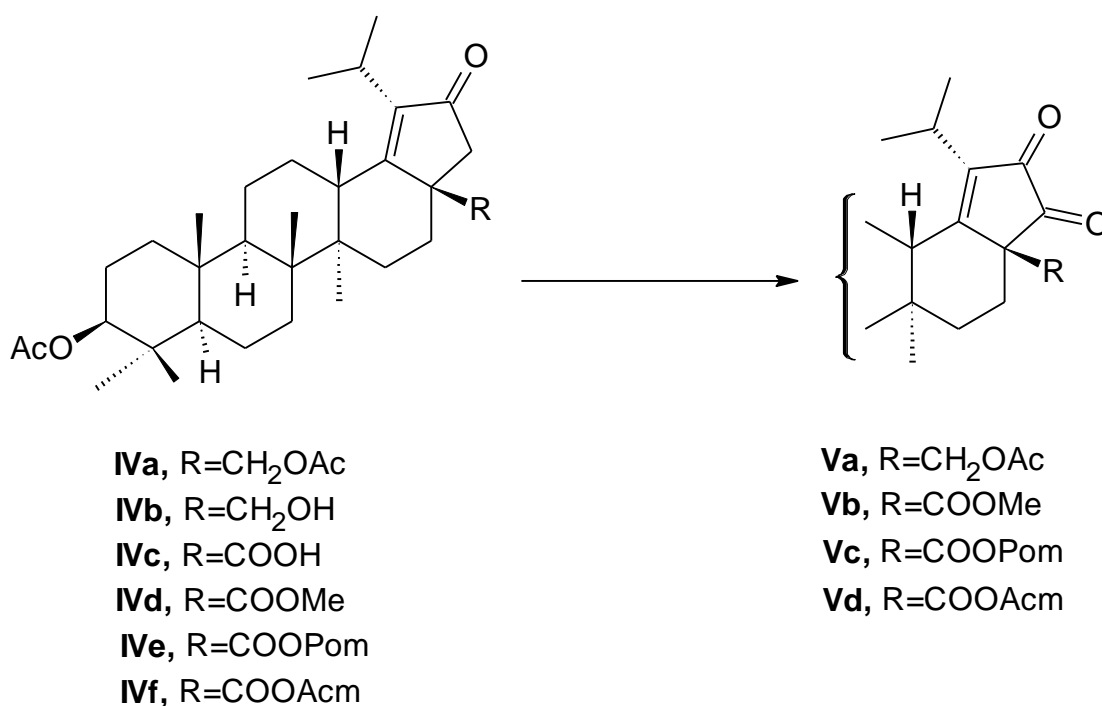


Schéma č. 1: Reakce se sloučeninami **IVa-IVf** vedoucí ke sloučeninám **Va-Vd**

Relativní stabilita keto kyseliny **VIa**, u které by se dala očekávat spontánní dekarboxylace, pravděpodobně v důsledku sterického bránění indukované skupiny 17β-acetoxymethyl, nedochází k tvorbě požadovaného šestičlenného kruhu meziprojektu nezbytného v cyklickém mechanismu dekarboxylace mezi 18C-oxo a 17R-karboxylátových skupin.<sup>7</sup> Je známo,<sup>26</sup> že v případě, že karboxylová skupina je v poloze 17β, dochází ke spontánní dekarboxylaci.

β-keto kyselina **VIa**, byla použita pro přípravu dalších vysoce odbouratelných lupanových a des-E lupanových deivátů (schéma č. 2). Zahřívání β-keto kyseliny **VIa**, ve vroucím diglymu vedlo ke vzniku komplikované směsi produktů díky tepelnému rozkladu.<sup>7</sup> Dvě ze tří hlavních sloučenin byly identifikovány, je známo, že heptanor acetát **VIIIb**<sup>27</sup> a methylen keton

**VIII**, což je nestabilní sloučenina, byla izolována lyofilizací z benzenu.<sup>7</sup> Třetí sloučenina je velmi nestabilní a nebylo ji možné identifikovat.<sup>7</sup>

Velmi neobvyklá je reakce  $\beta$ -keto kyseliny **VIa** s hydroxidem draselným.<sup>7</sup> Pokud se tato reakce provádí v ethanolu, ether **IX** se objeví ve směsi produktu spolu s běžným produktem retro aldolové reakce, která pak podstoupí dekarboxylaci na heptanorketon **VIIa**.<sup>7</sup> Jedním z možných vysvětlení vzniku methoxy derivátu **IX** je Michaelova adice ethanolu k methylenovému ketonu **VIII** za použitých bazických podmínek.<sup>7</sup> V případě použití dioxanu namísto ethanolu, které se používá jak rozpouštědlo, by mohly být izolovány vysoké výtěžky čistého heptanorketonu **VIIa**.<sup>7</sup>

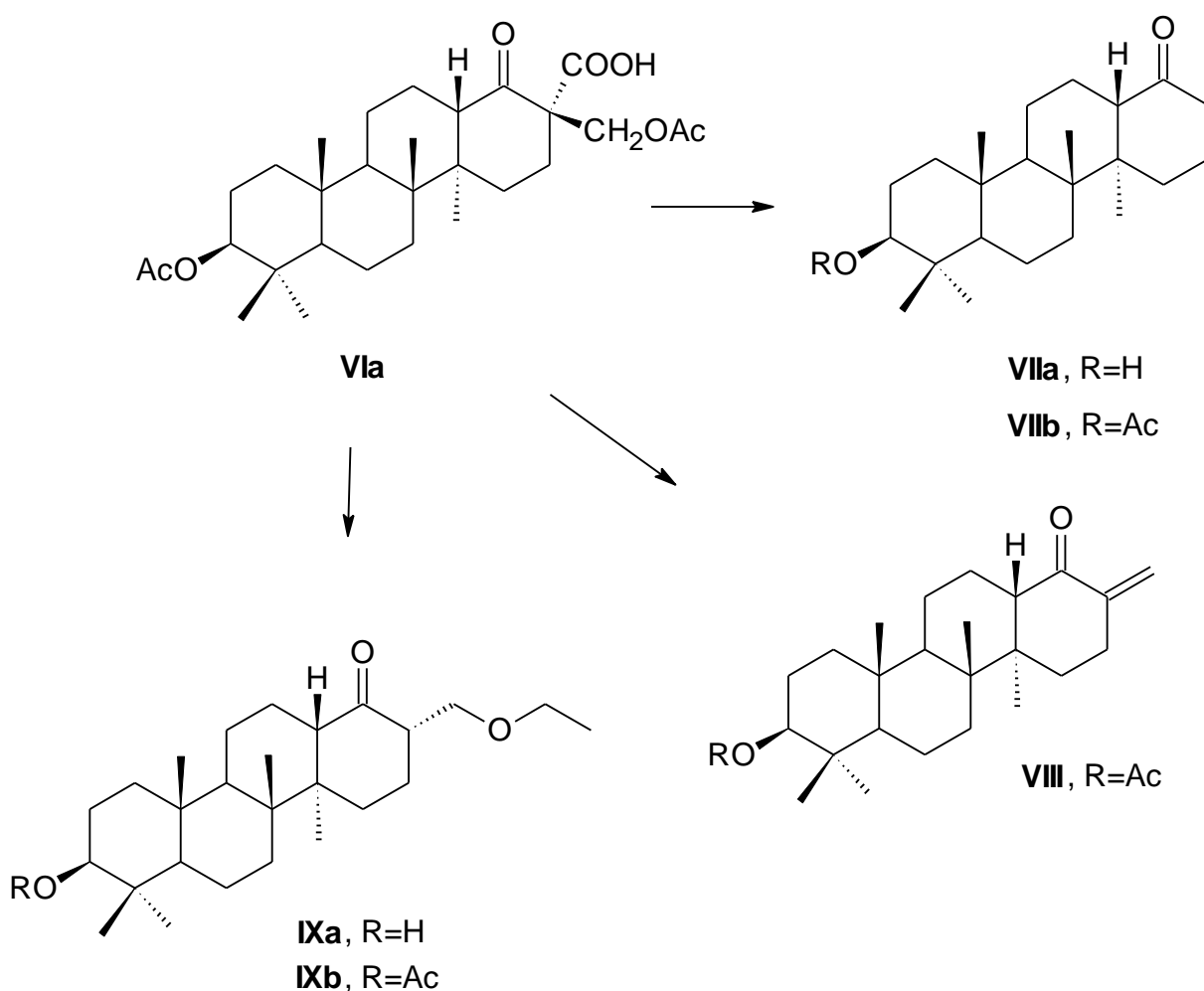


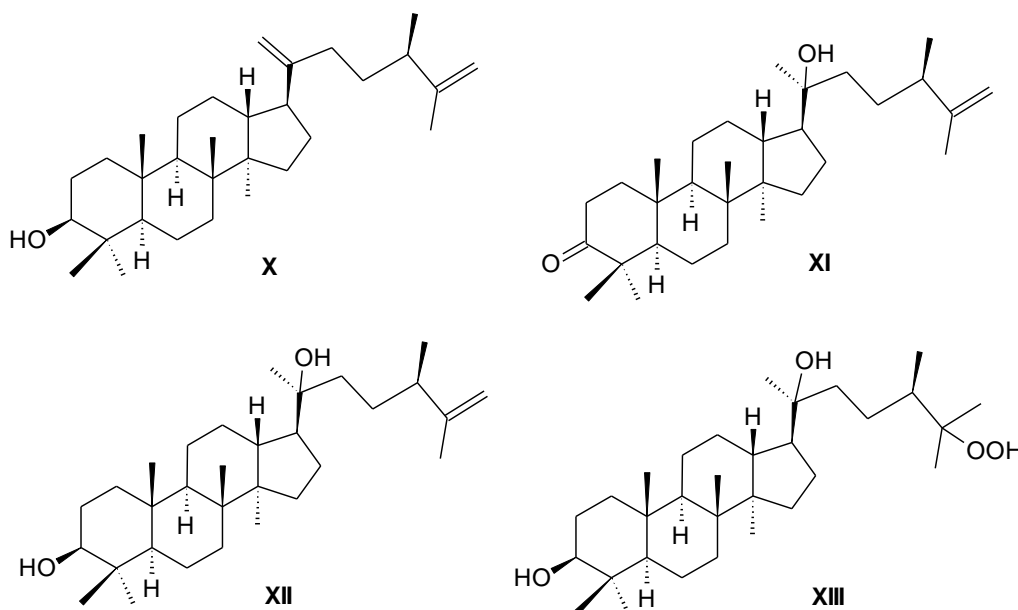
Schéma č. 2: Příprava sloučenin **VIIa-IXb**

### Triterpeny s dammaranovým skeletem

*Copernicia cerifera* (syn. *C. prunifera*) známá jako „karnauba“ je endemický palmový strom v severovýchodní Brazílii.<sup>28</sup> Tato rostlina produkuje specifický vosk, který pokrývá povrch listu. Vosk je součástí ochranného systému rostliny a zabraňuje nadměrnému odpařování vody. Vosk izolovaný z tohoto stromu je široce používán ve výrobě některých průmyslových výrobků včetně léčiv, kosmetice, emulzích, barvách, lacích, nachází se také v plastových a fotografických filmech, v mazadlech, počítačových čípech, čárových kódech a atd. Olej z „karnauby“ je také zkoumán chemicky. Podle výzkumu v literatuře<sup>29-32</sup> je karnaubský vosk tvořen komplexem směsi uhlovodíků, volných mastných kyselin, hydro-máselných kyselin, dlouhými řetězci alkoholů a diolů, estery a deriváty kyseliny skořicové. Kromě tohoto také obsahuje triterpen, který se nazývá karnaubský diol, který se také podařilo izolovat.<sup>31</sup>

V práci<sup>33</sup> byly plně přiřazeny  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR spektra čtyř triterpenoidů s dammaranovým skeletem, které se podařilo izolovat z vosku listů *C. cerifery*.

Surový karnaubský vosk byl extrahován hexanem, dále čištěn pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu a byly získány čtyři triterpeny **X-XIII** se strukturou vycházející z dammaranu.<sup>33</sup> Spektrální data byla v souladu se strukturou karnaubského diolu (24R-methyl dammar-25-en-3, 20-diol) s neobvyklým řetězcem obsahujícím také postranní methylovou skupinu.<sup>33</sup> Tato látka byla izolována z karnaubského vosku a struktura těchto látek v je popsána  $^1\text{H}$  NMR a  $^{13}\text{C}$  NMR v práci<sup>33</sup>, protože tyto informace nebyla dostupné v literatuře. Relativní konfigurace byla podpořena analýzou NOESY spektra ve srovnání s NMR daty analogických triterpenů.<sup>33</sup>





### Ethynylace derivátů betulinu

V literatuře je popsáno několik případů zavedení ethynylu do triterpenoidních molekul. První je syntéza acetylenových sloučenin **XVI** – **XX**, která vychází z 3-O-acetoxy-28-oxolup-20(29)enu (**XIV**) a 3-O-methyl-28-oxolup-20(29)enu derivátu betulinu (**XV**), které mají na uhlíku 28 reaktivní aldehydovou skupinu.<sup>3</sup> Reakcí derivátů **XIV** a **XV** s ethynylmagnesiumbromidem vzniká neoddělitelná směs dvou diastereomerů, které následnou Jonesovou oxidací přecházejí na deriváty **XVIII** a **XIX**.<sup>3</sup> Reakcí derivátu **XIV** s komplexem acetylidu lithného s ethylendiaminem dochází k odštěpení acetylové skupiny a vzniká derivát **XVI**, z kterého následnou acetylací vzniká 3-O-acetylderivát **XVII**. Oxidací sloučeniny **XVII** vzniká sloučenina **XX**.<sup>3</sup>

Připravené látky byly testovány za použití SRB-testu proti melanomu (518A2), rakovině děložního čípku (A431), rakovině hlavy a krku (A253, FADU), karcinomu plic (A549), rakovině vaječníků (A2780), rakovině tlustého střeva (DLD-1, HCT-8, HCT-116, HT-29, SW-480), anaplastickému karcinomu štítné žlázy (8505c, SW-1736), karcinomu prsu (MCF-7) a liposarkomu.<sup>3</sup> Výsledky testů byly odvozeny z křivek závislosti odpovědi na dávce podané látky.<sup>3</sup> Sloučeniny byly také testovány na protinádorovou aktivitu v panelu patnácti lidských nádorových buněčných liniích za použití kolorimetrického SRB testu se sulforhodaminem B.<sup>3</sup> Ethynylderiváty **XVIII**, **XIX** a **XX** vykazaly vyšší cytotoxicitu ve srovnání s výchozí kyselinou betulinovou (**IIIb**).<sup>3</sup>

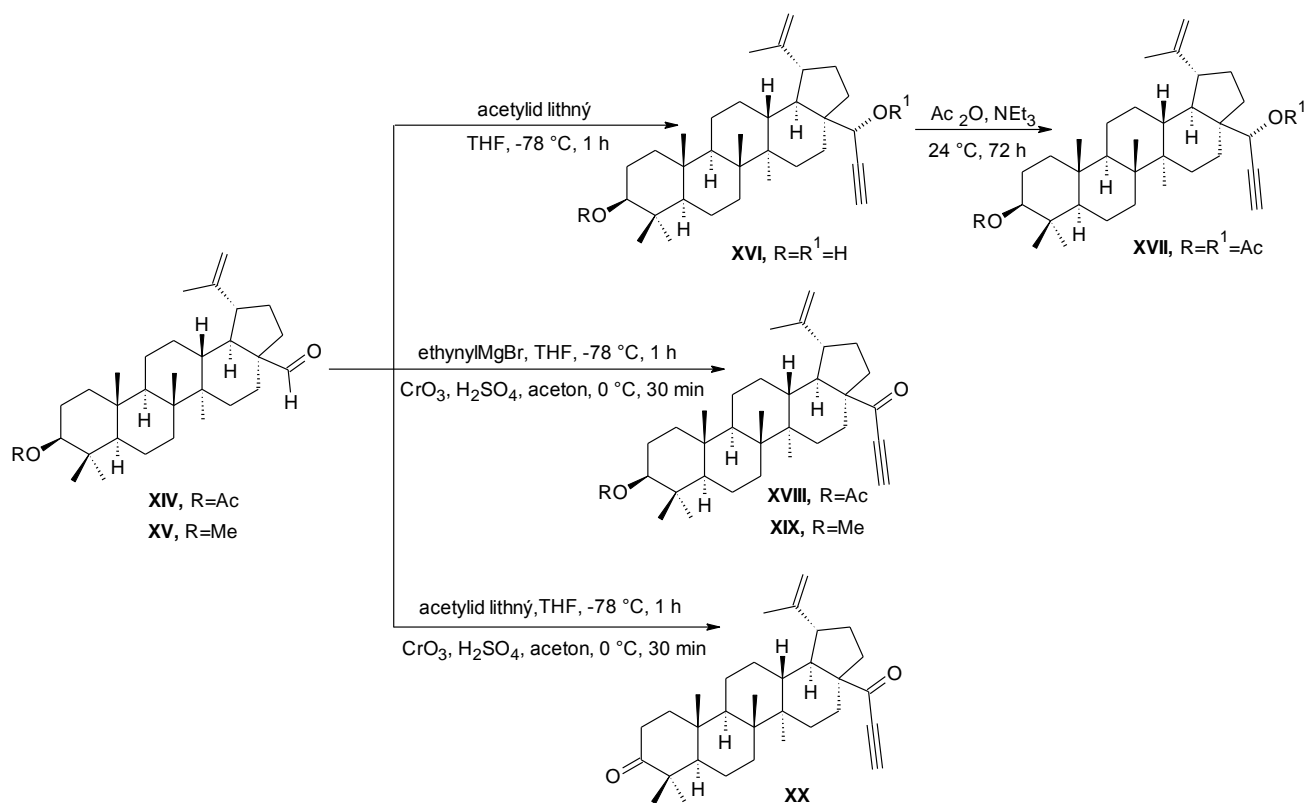


Schéma č. 3: Syntéza ethynylderivátů betulinu **XVI** - **XX**

Dále byla popsána syntéza derivátů betulinu **XXII-XXIV** s acetylenovým řetězcem na uhlíku 28, která vycházela z 3-O-acetoxy-28-oxolup-20(29)-enu **III**.<sup>34</sup> Reakce methylpropionátu nebo 2-propyn-1-olu v LDA probíhala snadno.<sup>34</sup> Reakce s fenylethynyllithiem měla vyšší výtěžek ve srovnání při použití LDA.<sup>34</sup> Popsané adice probíhaly stereoselektivně, kdy byly izolovány pouze izomery 28S.<sup>34</sup>

Sloučeniny **XXII-XXIV** byly testovány na cytotoxickou aktivitu v sérii patnácti lidských nádorových buněčných linií za použití SRB protokolu a výsledky byly získány z odpovídajících křivek závislosti odpovědi na dávce.<sup>34</sup> Sloučeniny **XXII** vykazala hodnoty  $\text{IC}_{50}$  podstatně nižší než standardní hodnoty kyseliny betulinové (**IIIb**).<sup>34</sup> Záměna karboxymethylové skupiny za hydroxymethylovou skupinu vedla ke snížení aktivity, jak bylo pozorováno u sloučeniny **XXIII**.<sup>34</sup> Přítomnost fenylacetyleny ve sloučenině **XXIV** měla nepříznivý vliv na aktivitu této sloučeniny.<sup>34</sup> Přítomnost fenylacetyleny ve sloučenině **XII** měla příznivý vliv na aktivitu této sloučeniny.<sup>34</sup>

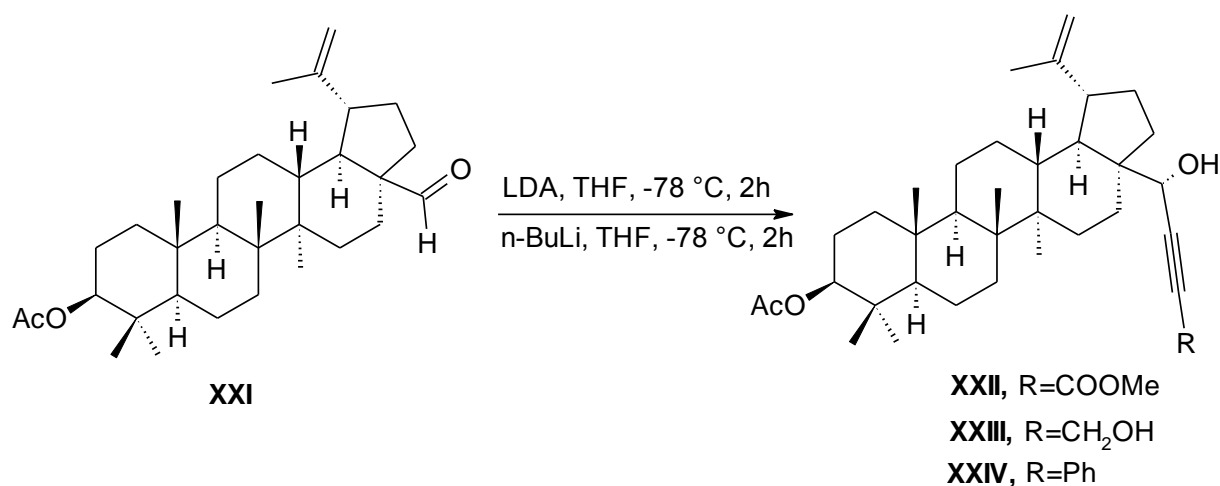


Schéma č. 4: Syntéza ethynylderivátů **XXII-XXIV**.

### Reakce triterpenů s Grignardovými činidly

Další možností, jak zavést ethynylový substituent do terpenické molekuly je Grignardova reakce. Bylo popsáno, že reakcí 2-oxoallobetulinu **XXV** s ethynylmagnesium bromidem v THF vzniká derivát **XXVI** s výtěžkem 66 %.<sup>35</sup> Struktura tohoto derivátu **XXVI** byla potvrzena pomocí NMR spektroskopie a rentgenové krystalografie.<sup>35</sup>

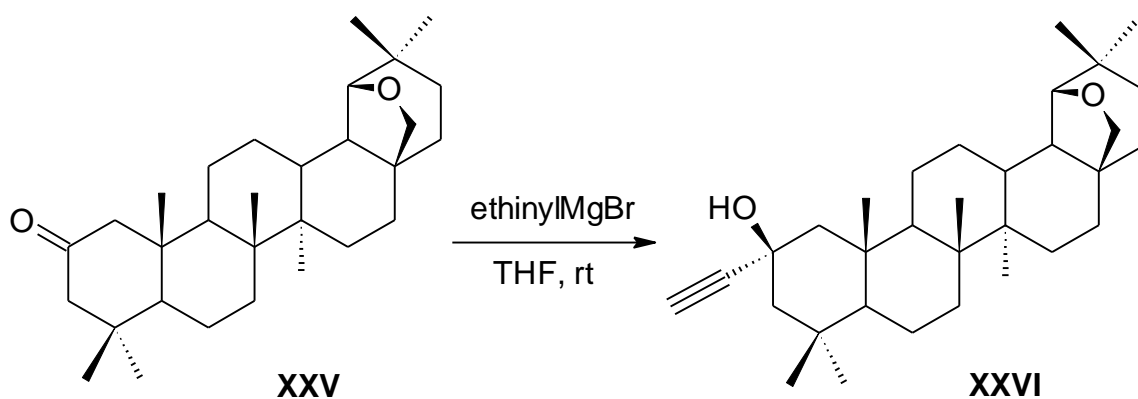


Schéma 5: Příprava derivátu **XXVI**

Reakcí 2-oxoallobetulinu (**XXV**) s vinylmagnesium bromidem v THF byl připraven vinylderivát **XXVII** s vysokým výtěžkem 75 %.<sup>35</sup> Struktura tohoto derivátu **XXVII** byla potvrzena pomocí rentgenové krystalografie.<sup>35</sup>

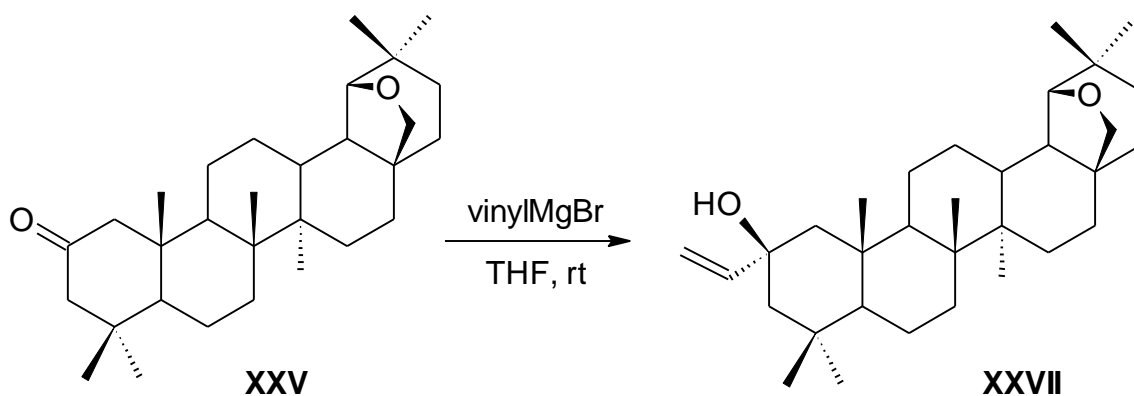


Schéma č. 6: Příprava derivátu **XXVII**.

Reakcí allobetulinu **XXVIII** s ethynylmagnesium bromidem v THF vznikl 2-hydroxy-2-ethynylallobetulin **XXIX**.<sup>35</sup> Výtěžek této reakce byl 65 %.<sup>35</sup>

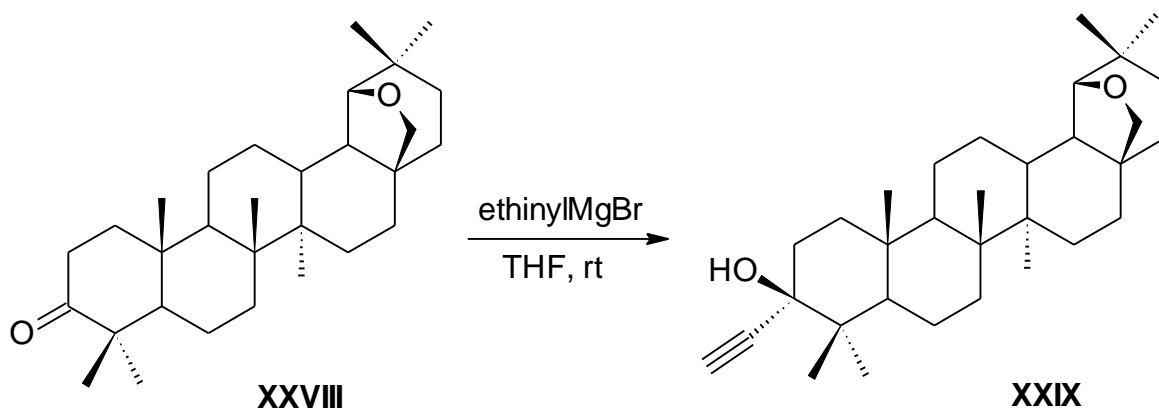


Schéma č. 7: Příprava derivátu **XXIX**

Všechny výše zmíněné deriváty triterpenů **XXVI**, **XXVII** a **XXIX** byly testovány na cytotoxickou aktivitu a to na inhibiční účinky na proliferaci myších leukemických buněk (L1210), lidských T-lymfoblastických buněk (CEM) a proti rakovině děložního čípku (HeLa).<sup>35</sup> Sloučeniny **XXVI** a **XXIX** byly aktivní ve středním mikromolárním rozsahu (18-28  $\mu\text{M}$ ).<sup>35</sup> Sloučenina **XXVI** obsahující ethynylovou skupinu vykazovala vyšší aktivitu než sloučenina **XXVII** obsahující vinylovou skupinu.<sup>35</sup>

## Výsledky a diskuze

### Příprava výchozích látek

Pro přípravu diethylbetulinu **2** byl alkylován výchozí betulin **1** ethyl jodidem v dioxanu s nadbytkem NaH. Alkylace proběhla kvantitativně a vzniklý diethylbetulin **2** byl dále použit pro příprava aldehydu **3**, jak je popsáno ve schématu č. 7. Výchozí aldehyd **3** byl získán s výtěžkem 30 % allylovou oxidací 3,28-diethylbetulinu **2** oxidem seleničitým v methoxyethanolu. Reakce byla prováděna jiným způsobem než v práci<sup>36</sup> z důvodu odstranění stop selenu, který nebylo možné odstranit chromatografií nebo krystalizací. Odstranění stop selenu se podařilo až tím, že připravený aldehyd **3** byl redukován NaBH<sub>4</sub> na alkohol **4** a následně reoxidován zpět na aldehyd **3** reakcí s oxidem manganičitým a chromatografován. Stopy selenu přitom byly odstraněny nejspíše po redukcí ve formě H<sub>2</sub>Se. Složitý proces separace a čištění pak vedl k celkovému nízkému výtěžku.

Struktura aldehydu **3** byla jednoznačně potvrzena pomocí spektrálních dat. V <sup>1</sup>H spektrech aldehydu **3** byl nalezen kromě obvyklých signálů singlet aldehydického vodíku H-30 při δ 9.51 ppm a v souladu s tím je přítomen v <sup>13</sup>C NMR spektru karbonylový uhlík C-30 při δ 195 ppm. V IČ spektru aldehydu **3** přibyl karbonylový pás při 1690 cm<sup>-1</sup>. V MS EI spektru aldehydu **3** byl nalezen molekulový iont a dále iont odpovídající typickým ztrátám.

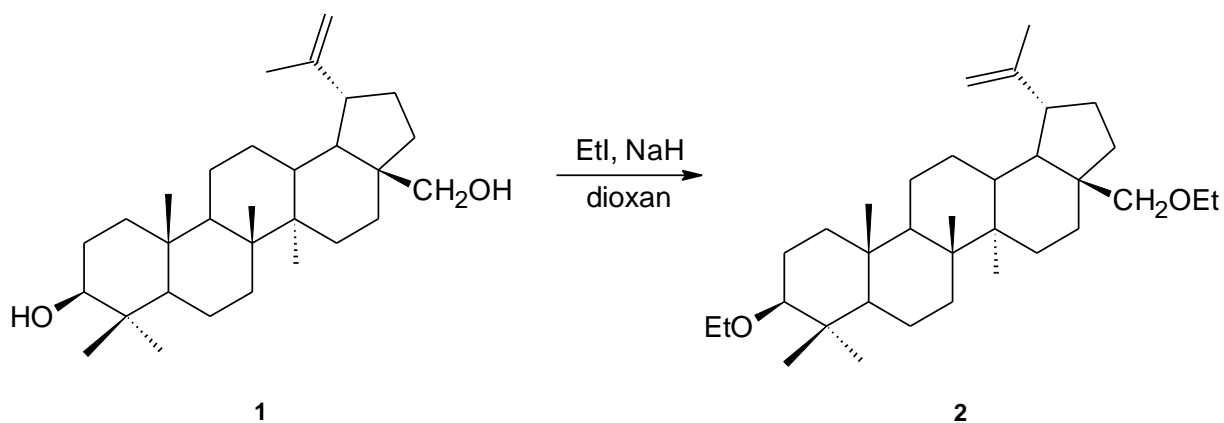


Schéma č. 6: Příprava diethylbetulinu

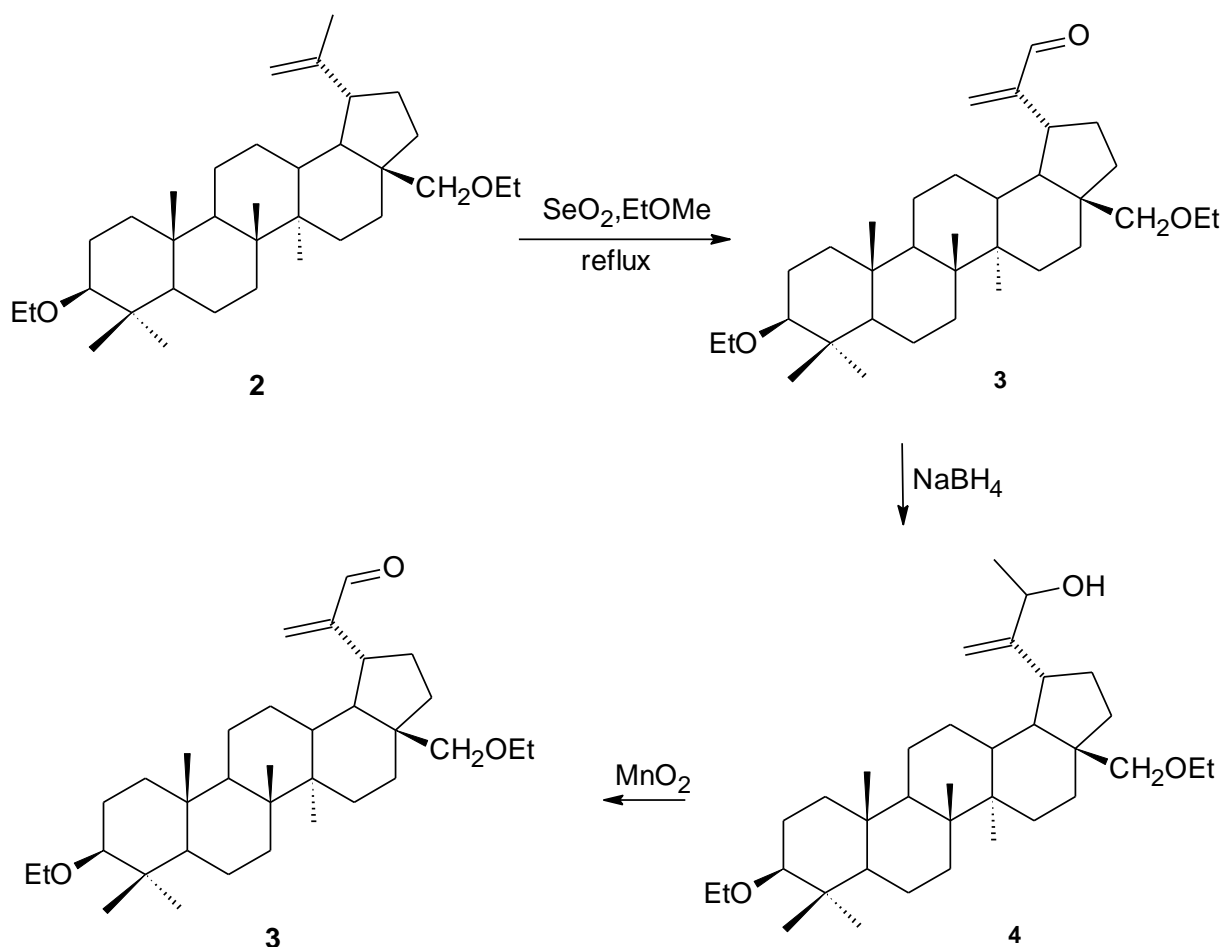


Schéma č. 7: Příprava diethylaldehydu **3**

#### *Ozonolýza derivátů betulinu*

Ozonolýzou 3,28-dimethylbetulinu **3**, respektive 3,28-diethylbetulinu, **2** v chloroformu byly připraveny ketoderiváty **5** a **6** ve výtěžku 53 % a 61 %.

Struktura ketoderivátů **5** a **6** byla jednoznačně potvrzena pomocí spektrálních dat. V <sup>1</sup>H spektrech sloučenin **5** a **6** byl nalezen kromě obvyklých signálů singlet (3H) methylu H-29 v sousedství oxoskupiny při δ 2.15 ppm a v souladu s tím je přítomen v <sup>13</sup>C NMR spektru ketonický uhlík C-29 při δ 212.40 ppm. V IČ spektru ketoderivátů **5** a **6** přibyl ketonický pás při 212.40 cm<sup>-1</sup>. V MS EI spektru ketonů **5** a **6** byly nalezeny molekulový ionty a dále ionty odpovídající typickým ztrátám. Stejně tak elementární analýza odpovídá složení produktu.

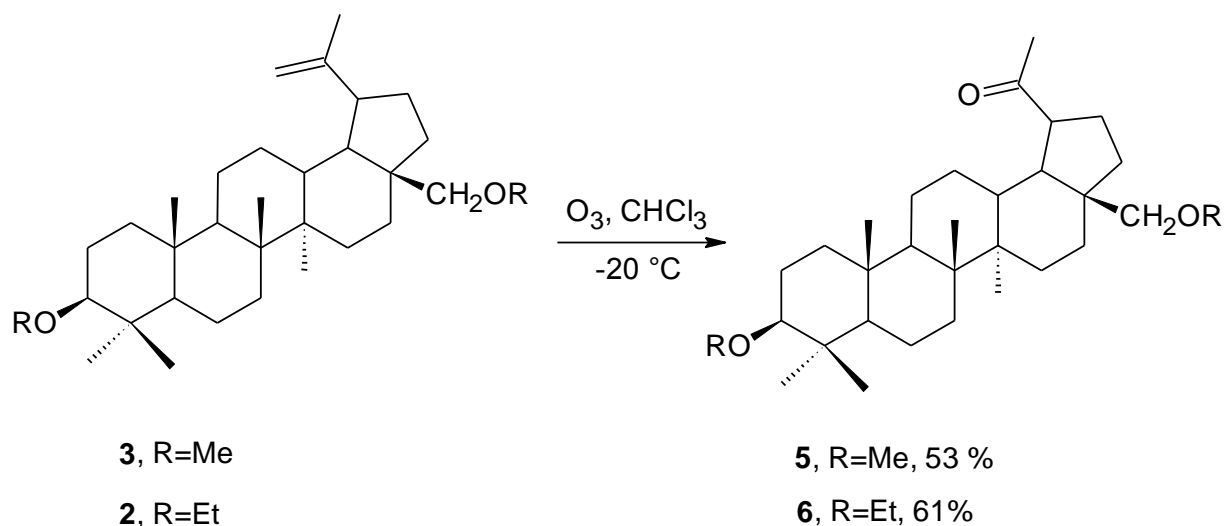


Schéma č. 8: Příprava výchozích ketoderivátů **5** a **6**.

### Adice Grignardových sloučenin na triterpenoidní oxoderiváty

#### Vinylderiváty **7** a **8**

Vinylderiváty **7** a **8** byly získány reakcí aldehydu **5** a **6** s komerčním roztokem vinylmagnesiumbromidu v THF pod argonovou atmosférou za refluxu ve výtěžcích po čištění 34 % a 28 %. V  $^1\text{H}$  NMR spektrech vinylderivátů **7** a **8** byly nalezeny signály vodíku nové dvojně vazby při  $\delta$  okolo 3.95 ppm a 4.47 ppm. V  $^{13}\text{C}$  NMR spektrech vinylderivátů **7** a **8** již není signál C=O skupiny. V IČ spektrech vinylderivátů **7** a **8** byly oproti výchozím látkám **5** a **6** nalezeny pásy odpovídající vibraci OH skupiny při 3450 - 3510  $\text{cm}^{-1}$ . V hmotnostních spektrech EI vinylderivátů **7** a **8** byly nalezeny molekulové ionty a dále ionty odpovídající typickým ztrátám. Strukturu obou derivátů potvrzuje i elementární analýza.

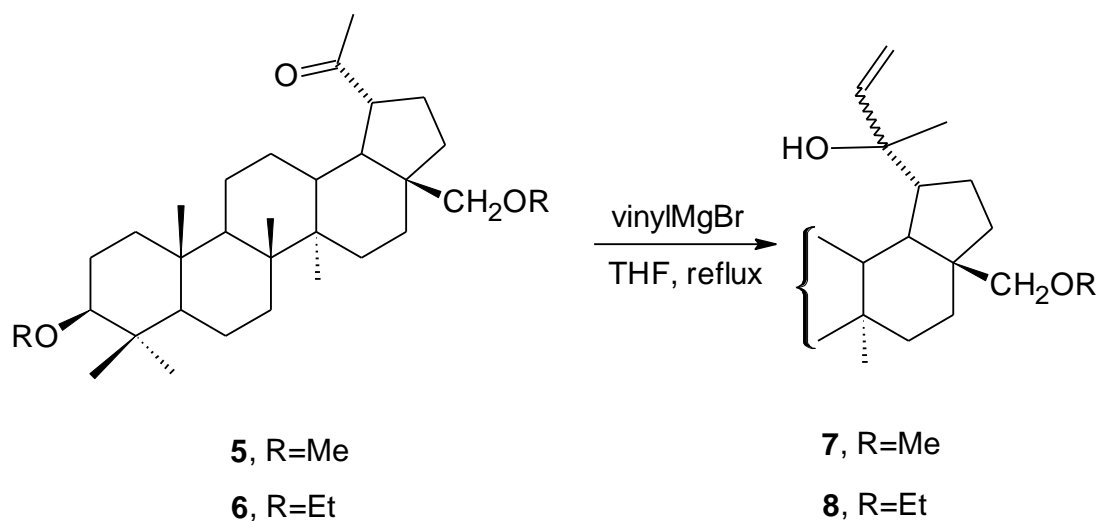


Schéma č. 9: Příprava vinylderivátů **7** a **8**

### Allylderiváty **9** a **10**

Allylderiváty **9** a **10** byly získány reakcí ketoderivátů **5**, **6** s komerčním roztokem allylmagnesiumbromidu v THF pod argonovou atmosférou za refluxu ve výtěžcích po čištění % (schéma 9). V  $^1\text{H}$  NMR spektrech allylderivátů **9** a **10** byly nalezeny signály vodíku dvojně vazby při  $\delta$  5.13 ppm (2H) a 5.92 ppm (1H). V  $^{13}\text{C}$  NMR spektrech allylderivátů **9** a **10** byly nalezeny 2 signály dvou uhlíků druhé dvojně vazby při  $\delta$  118.9 a 134.27 ppm. V IČ spektrech allylderivátů **9** a **10** byly oproti výchozím látkám **5** a **6** nalezeny pásy odpovídající vibraci OH skupiny při  $\sim 3500\text{ cm}^{-1}$ . V hmotnostních spektrech EI allylderivátů **9** a **10** byly nalezeny molekulové ionty a dále ionty odpovídající typickým ztrátám. Strukturu také potvrzuje elementární analýza.

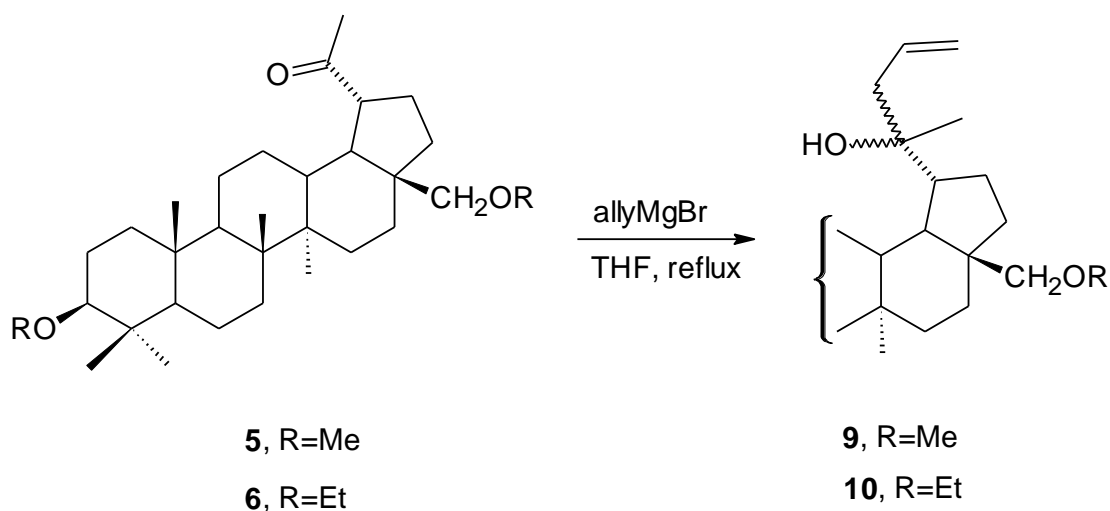


Schéma č. 9: Příprava allylderivátů **9** a **10**

### Ethynylderiváty **11** a **12**

Ethynylderiváty **11** a **12** byly získány reakcí ketoderivátů **5** a **6** s komerčním roztokem ethynylmagnesiumbromidu v THF pod argonovou atmosférou za refluxu ve výtěžcích po čištění chromatograficky i pomocí HPLC % (schéma 8). Během několika pokusů, při kterých byly měněny reakční podmínky i rozpouštědlo, se nepodařilo získat v izolovatelném výtěžku ethynylderivát. V  $^1\text{H}$  NMR spektrech ethynylderivátů **11** a **12** byly nalezeny singlety ethynylového vodíku při  $\delta$  2.16 ppm. V  $^{13}\text{C}$  NMR spektrech ethynylderivátů **11** a **12** byly nalezeny 2 signály dvou uhlíků trojně vazby při  $\delta$  okolo 170 ppm. V IČ spektrech ethynylderivátů **11** a **12** byly oproti výchozím látkám **5** a **6** nalezeny pásy odpovídající vibraci OH skupiny při  $\sim 3450 - 3520\text{ cm}^{-1}$ . V hmotnostních spektrech EI ethynylderivátů **11** a **12** byly nalezeny molekulové





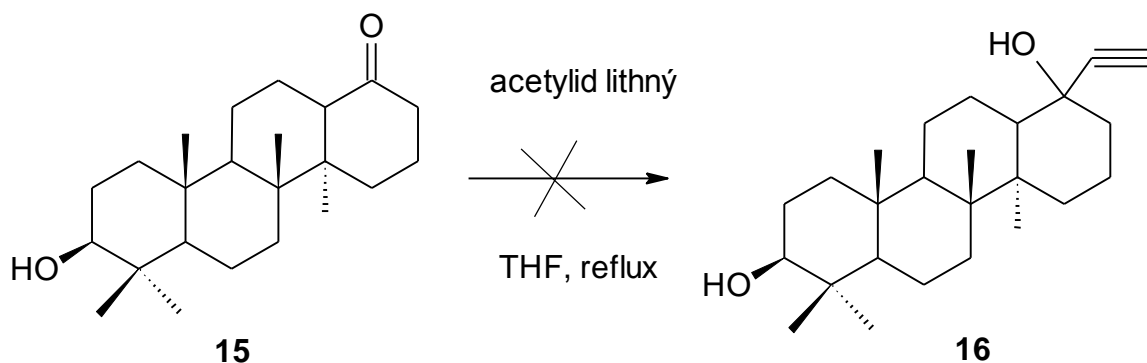


Schéma č. 12: Příprava ethynylderivátu **14**, **16**

#### *Diacetylovaný heptanorketon 17*

Diacetylovaný derivát byl získán reakcí acetylovaného heptanorketonu **13** redukcí s  $\text{NaBH}_4$ . Těto reakci předcházela adice s acetylidem lithným, kdy jsme předpokládali vznik ethynylderivátu **14**. Ke vzniku tohoto derivátu ale nedošlo, byl připraven již popsáný diacetylovaný derivát **17** heptanorketonu **15** pravděpodobně z důvodu malé rozpustnosti heptanorketonu **15** a s tím související malé nereaktivitě s acetylidem lithným z důvodu vzniku komplexu s touto látkou nebo celkové nereaktivitě s touto látkou.

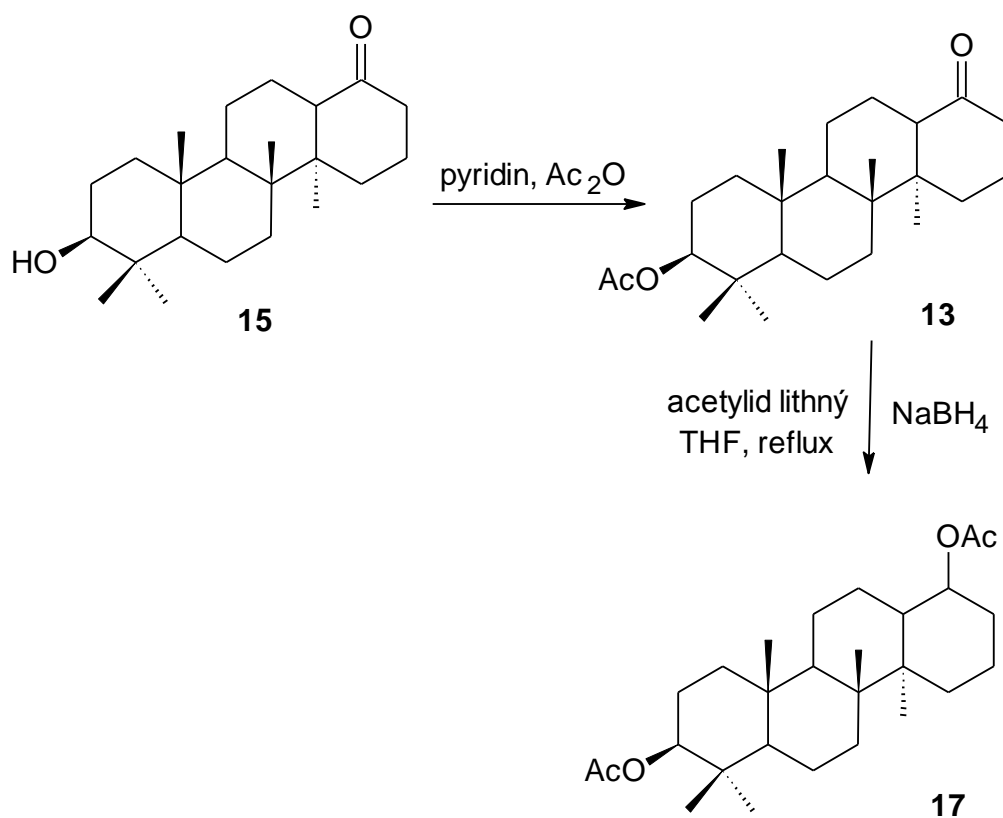


Schéma č. 13: Příprava diacetylovaného heptanorketonu **17**

## Závěr

1. Byla provedena literární rešerše na téma „Nukleofilní adice na triterpenoidní oxoderiváty“.
2. Byly připraven aldehyd **3**, který nebyl dosud popsán.
3. Adicí Grignardových činidel na oxoderiváty **5** a **6** byly připraveny nové terciární alkoholy **7-12** a **14**.
4. Celkově bylo připraveno a spektrálními daty potvrzeno 10 doposud nepopsaných sloučenin **3**, **5-12** a **14**.
5. Všechny sloučeniny připravené v rámci této práce byly testovány na *in vitro* cytotoxickou aktivitu na lidské T-lymfoblastické leukémii CEM.

## ***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  $2 \text{ cm}^{-1}$ ) a byla zpracována v programu OMNIC 7.1. Vzorky byly měřeny technikou DRIFTS v matrici KBr.

NMR spektra byla měřena na přístroji Bruker 300 Avance II ( $^1\text{H}$  při 300 MHz,  $^{13}\text{C}$  při 75.45 MHz) v roztoku  $\text{CDCl}_3$ . Pro  $^1\text{H}$  NMR spektra byl použit jako vnitřní standard tetramethylsilan. Chemické posuny  $^{13}\text{C}$  NMR spekter byly referencovány vůči  $\delta (\text{CDCl}_3) = 77.00 \text{ ppm}$ . Multiplicita signálů v  $^{13}\text{C}$  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 vyhříváném 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 postřikem 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 cyklohexan/ethylacetát (8:1)

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-difenyl-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 - IC<sub>50</sub>.

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

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

Dimethylbetulin, a heptanorketon 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 zahřívána k varu za stálého míchání 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 NH<sub>4</sub>Cl a poté jednou H<sub>2</sub>O. Spojené organické podíly byly odpařeny na RVO a krystalizovány.

### **Obecný postup ozonolýzy derivátů betulinu**

Reakce byly prováděny v roztoku derivátu betulinu (**1**, **2**) v CHCl<sub>3</sub>, který byl ochlazen na - 20 °C. Následně byl do roztoku zaváděn O<sub>3</sub> za stálého míchání. Ke směsi byl přidán roztok dimethylsulfidu. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (mobilní fáze B). Ketoderivát (**3**, **4**) byl odpařen na RVO a čištěn pomocí kolonové chromatografie (mobilní fáze B). Spojené organické podíly ketoderivátu (**3**, **4**) byly odpařeny na RVO.

## 1. Příprava ethoxyaldehydu **3**

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 zahřívána k varu pod zpětným chladičem po dobu 3 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 nažloutlé žluté jehličky aldehydu **3** byly odsáty a filtrát byl zahuštěn ke krystalizaci a poté ochlazen. Vzniklý aldehyd **3** byl rozpuštěn ve směsi THF a MeOH, roztok byl ochlazen a byl k němu přidán NaBH<sub>4</sub> (4g, 0.11 mol). Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (mobilní fáze A), po třiceti minutách již v reakční směsi nebyl přítomen aldehyd **3**, ale pouze hydroxyderivát **4**. Následně byla reakční směs okyselena HCl, zředěna H<sub>2</sub>O a třikrát vytřepána ethylacetátem. Organické podíly byly spojeny a k roztoku byl přidán aktivovaný MnO<sub>2</sub> (6g, 69.01 mmol) a reakce byla monitorována pomocí TLC, dokud nevznikla opětovně sloučenina **3**. Následně byl MnO<sub>2</sub> odstraněn filtrací a vzniklý aldehyd **3** byl vysušen na RVO. Byl získán ve formě nažloutlých krystalků o t. t. 184 - 187 °C (0.79 g, 30 %). <sup>1</sup>H NMR spektrum: 0.75 (s, 3H); 0.81 (s, 3H); 0.94 (s, 3H); 0.94 (s, 3H); 1.01 (s, 3H, 5 × CH<sub>3</sub>); 1.15 - 1.21 (m, 6H, 2 × OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 1.97-2.02 (m, 2H); 2.13-2.23 (m, 1H); 2.71 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 11.6 Hz, *J*<sub>2</sub> = 11.8 Hz, H-3α); 2.75-2.82 (m, 1H); 3.11 (d, 1H, *J* = 9.0 Hz, H-28a); 3.30-3.38 (m, 1H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 3.42-3.52 (m, 3H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> a H-28b); 3.61-3.69 (m, 1H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 5.92 (s, 1H, H-29 *pro E*); 6.28 (s, 1H, H-29 *pro Z*); 9.51 (s, 1H, C[O]H). <sup>13</sup>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: 1690 cm<sup>-1</sup>. MS, m/z (%): [pro C<sub>34</sub>H<sub>56</sub>O<sub>3</sub>, M<sup>+</sup> 512], 512 (M<sup>+</sup>, 28).

## 2. Příprava ketoderivátu **5**

Podle obecného postupu ozonolýzy byl z dimethylbetulinu **1** (3.00 g; 6.38 mmol) získán ketoderivát (**5**) (1.61 g; 53 %) ve formě bílých krystalků o t. t. 159-162 °C (CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H NMR spektrum: 0.74 (s, 3H); 0.82 (s, 3H); 0.95 (s, 3H); 0.99 (s, 3H); 1.02 (s, 3H, 5 × CH<sub>3</sub>); 2.15 (s, 3H, H-29); 2.63 (m, 1H,  $\Sigma J = 29.6$  Hz, H-3α); 2.99 (d, *J* = 8.8 Hz, H-28a); 3.34 (s, 3H); 3.35 (s, 3H, 2 × O-CH<sub>3</sub>); 3.43 (d, *J* = 8.9 Hz, H-28b). <sup>13</sup>C spektrum: 14.67; 14.70; 15.90; 16.01; 16.10; 18.14; 20.84; 22.16; 27.14; 27.26; 27.96; 29.34; 34.11; 34.72; 36.35; 37.15; 38.77; 40.81; 42.50; 47.17; 49.65; 50.21; 52.30; 55.76; 57.50; 59.65; 71.49; 71.52; 71.57; 88.51; 212.40. IČ spektrum: 1709.89 (C=O). MS, m/z (%): [pro C<sub>33</sub>H<sub>56</sub>O<sub>3</sub>, M<sup>+</sup> 499.416], nalezeno

499.416 ( $M^+$ , 14.4), 523.413 ( $M+Na^+$ , 39.8), 1023.835 (dimer, 100). Elementární analýza: vypočteno C 78.76 %, H 11.09 %, O 10.15 %; nalezeno C 78.70 %, H 11.11 %, O 10.15 %.

### 3. Příprava ketoderivátu 6

Podle obecného postupu ozonolýzy byl z diethylbetulinu **2** (2.50 g; 5.00 mmol) získán ketoderivát **6** ve formě bílých krystalků o t. t. 167-169 °C ( $CHCl_3$ );  $^1H$  NMR spektrum: 0.76 (s, 3H); 0.83 (s, 3H); 0.95 (s, 3H); 0.99 (s, 3H); 1.01 (s, 3H,  $5 \times CH_3$ ); 1.16-1.21 (m, 6H, O- $CH_2-CH_3$ ); 2.15 (s, 3H, H-29); 2.64 (ddd, 1H,  $J_1 = J_2 = 11.2$  Hz,  $J_3 = 6.0$  Hz, H-3 $\alpha$ ); 2.73 (dd, 1H,  $J_1 = 11.4$  Hz,  $J_2 = 3.9$  Hz, H-3 $\alpha$ ); 3.02 (d, 1H,  $J = 9.4$  Hz, H-28a); 3.32-3.40 (m, 1H, O- $CH_2-CH_3$ ); 3.42-3.50 (m, 3H, H-28b, O- $CH_2-CH_3$ ); 3.62-3.70 (m, 1H, O- $CH_2-CH_3$ ).  $^{13}C$  spektrum: 14.68; 15.14; 15.65; 15.92; 16.06; 16.25; 18.24; 20.86; 23.34; 27.18; 27.23; 27.95; 28.01; 29.28; 29.84; 34.15; 34.87; 36.36; 37.12; 38.66; 38.76; 40.85; 42.50; 47.16; 49.70; 50.25; 52.40; 55.81; 65.14; 66.97; 68.81; 86.55; 212.52. IČ spektrum: 1715.78 (C=O). MS, m/z (%): [pro  $C_{31}H_{52}O_3$ ,  $M^+$  471.735], nalezeno 471.385 ( $M^+$ , 14.4), 496.212 ( $M+Na^+$ , 40.3), 967,776 (dimer, 100). Elementární analýza: vypočteno C 79.14 %, H 11.27 %, O 9.58 %; nalezeno C 79.07 %, H 11.29 %, O 9.59 %;

### 3. Reakce ketoderivátu 5 s vinylmagnesiumbromidem

Podle obecného postupu adice byl z ketoderivátu **5** (0.30 g; 0.64 mmol) a vinylmagnesiumbromidu (8.6 ml, 0.7 M) získán vinylderivát **7** (0.109 g, 34%). Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (mobilní fáze A). Vinylderivát **7** byl čištěn pomocí kolonové chromatografie (mobilní fáze cyklohexan/ethylacetát 10:1) a lyofilizován. Směs diastereoizomerů se nepodařilo separovat, proto jsou některé signály ve spektrech dvakrát (v blízkosti nového diastereomerního centra se liší  $\delta$  analogických atomů H i C).  $^1H$  NMR spektrum: 0.76 (s, 3H); 0.85 (s, 3H); 0.87 (d, 3H,  $J = 9.8$  Hz); 0.94 – 0.99 (m, 9H); 1.05 (s, 3H); 1.14 (d, 3H,  $J = 6.6$  Hz), 1.14 (s, 3H, vše  $CH_3$ , jsou to dva diastereoizomery); 2.05 (s, 1H); 2.39 (s, 1H); 2.65 (dd, 1H,  $J_1 = 4.2$  Hz,  $J_2 = 4.2$ , H-3 $\alpha$ ); 3.00 (d, 1H,  $J = 9.2$  Hz, H-28a); 3.34 (s, 3H); 3.36 (s, 3H, ( $2 \times O-CH_3$ )); 3.47 (d, 1H,  $J = 9.2$  Hz, H-28b); 3.94 (dd, 2H,  $J_1 = 12.6$  Hz,  $J_2 = 4.9$  Hz,  $-CH=CH_2$ ); 4.47 (dd, 1H,  $J_1 = 11.2$  Hz,  $J_2 = 5.2$  Hz,  $-CH=CH_2$ ).  $^{13}C$  spektrum (jedná se o směs dvou diastereoizomerů): 14.78; 15.57; 16.05; 16.09; 16.23; 16.40; 16.56; 17.66; 18.24; 18.27; 20.91; 21.06; 21.39; 21.42; 22.29; 23.06; 23.17; 28.01; 28.07; 29.99; 31.06; 31.31; 32.79; 34.36; 34.67; 36.89; 37.22; 37.87; 38.55; 38.66; 38.88; 40.66; 41.05; 41.25; 41.36; 42.85; 44.86; 46.04; 47.40; 47.43;



50.11; 50.65; 55.46; 55.85; 57.61; 59.75; 68.72; 70.21; 71.07; 71.45; 80.96; 88.69; 89.62; 132.15, 171.08. IČ spektrum: 3505.54 (OH). Elementární analýza: vypočteno C 79.14 %, H 11.27 %, O 9.58 %; nalezeno C 79.07 %, H 11.29 %, O 9.58 %.

#### 4. Reakce ketoderivátu 6 s vinylmagnesiumbromidem

Podle obecného postupu adice byl z ketoderivátu **6** (0.4 g; 0.80 mmol) a vinylmagnesiumbromidu (8.6 ml, 0.7 M;) získán vinylderivát **8** (0.120 g, 28 %). Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (mobilní fáze A). Vinylderivát **8** byl čištěn pomocí kolonové chromatografie (mobilní fáze cyklohexan/ethylacetát 10:1) a lyofilizován. <sup>1</sup>H NMR spektrum: 0.77 (s, 3H); 0.85 (s, 3H); 0.96 (s, 3H); 0.97 (s, 3H); 1.05 (s, 3H, 5×CH<sub>3</sub>); 1.15 (d, 1H, *J* = 6.3 Hz); 1.15-1.20 (m, 6H, OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 2.75 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 4.3 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.0 Hz, H-3α); 3.03 (d, 1H, *J* = 9.2 Hz, H-28a); 3.34 – 3.40 (m, 2H, -CH=CH<sub>2</sub>); 3.42-3.48 (m, 3H, 2 × H-OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, H-28b); 3.64-3.70 (m, 1H, 1 × H-OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 3.96 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 12.9 Hz, *J*<sub>2</sub> = 6.3 Hz, -CH=CH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C spektrum: 14.77; 15.26; 15.75; 16.05; 16.14; 16.36; 18.37; 20.92; 21.43; 23.17; 23.46; 27.16; 27.31; 28.13; 30.09; 31.32; 34.39; 34.79; 36.87; 37.19; 38.80; 38.88; 41.07; 42.84; 46.05; 47.38; 47.43; 50.13; 55.88; 65.27; 67.02; 68.01; 68.76; 86.71; 119.70; 138.3. IČ spektrum: 3446.02 (OH). Elementární analýza: vypočteno C 79.49 %, H 11.44 %, O 9.08 %; nalezeno C 79.48 %, H 11.46 %, O 9.07 %.

#### 5. Reakce ketoderivátu 5 s allylmagnesiumbromidem

Podle obecného postupu adice byl z ketoderivátu **5** (0.25 g; 0.53 mmol) a allylmagnesiumbromidu (1 ml, 0.7 M;) získán allylderivát **9**. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (mobilní fáze A). Allylderivát **9** byl čištěn pomocí kolonové chromatografie (mobilní fáze cyklohexan/ethylacetát 20:1). Byl získán allylderivát **9** ve formě nažloutlých krystalků (0.165 g, 61%). <sup>1</sup>H NMR spektrum: 0.75 (s, 3H); 0.84 (s, 3H); 0.96 (s, 3H); 0.99 (s, 3H); 1.06 (s, 3H); 1.09 (s, 3H, 6 × CH<sub>3</sub>); 2.23 (m, 1H, H-29a); 2.33 (m, 1H, H-29b); 2.65 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 11.7 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.3 Hz, H-3α); 3.05 (d, 1H, *J* = 9.2 Hz, H-28a); 3.34 (s, 3H, -O-CH<sub>3</sub>); 3.36 (s, 3H, -O-CH<sub>3</sub>); 3.52 (d, 1H, *J* = 9.8 Hz, H-28b); 5.13 (m, 2H, -CH=CH<sub>2</sub>); 5.92 (m, 1H, -CH=CH<sub>2</sub>). <sup>13</sup>C spektrum: 15.07; 16.09; 18.19; 21.30; 22.19; 22.29; 27.36; 27.86; 27.97; 28.78; 30.53; 34.05; 34.47; 36.46; 37.06; 37.08; 38.52; 38.76; 41.45; 43.33; 47.70; 47.84; 48.42; 48.53; 50.21; 55.69; 57.50; 59.63; 71.62; 74.33; 74.48; 88.60; 118.90; 134.27. IČ spektrum: 3479.70 (OH). Elementární analýza: nalezeno C 79.38 %, H 11.40 %, O 9.33%; vypočteno C 79.32 %, H 11.36 %, O 9.32 %.

## 6. Reakce ketoderivátu 6 s allylmagnesiumbromidem

Podle obecného postupu adice byl z ketoderivátu **6** (0.4 g; 0.80 mmol) a allylmagnesiumbromidu (4 ml, 0.7 M;) získán allylderivát **10**. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (mobilní fáze A). Allylderivát **10** byl čištěn pomocí kolonové chromatografie (mobilní fáze hexan/ethylacetát 10:1) a byl získán allylderivát **10** ve formě bílých krystalků.  $^1\text{H}$  NMR spektrum: 0.77 (s, 3H); 0.84 (s, 3H); 0.85 (s, 3H); 0.95 (s, 3H); 0.99 (s, 3H); 1.05 (s, 3H); 1.06 (s, 3H); 1.09 (s, 3H, 8  $\times$  CH<sub>3</sub>); 1.19 (m, 6H, 2 $\times$ CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-O-); 2.25 (m, 2H, H-29a, H-29b); 2.74 (dd, 1H,  $J_1 = 11.7$  Hz,  $J_2 = 4.0$  Hz, H-3 $\alpha$ ); 3.07 (t, 1H,  $J=8.9$  Hz, H-28a); 3.36 (m, 1H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-O-); 3.47 (m, 2H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-O-); 3.54 (d, 1H,  $J=9.8$  Hz, H-28b); 3.66 (m, 1H, CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-O-); 5.13 (m, 2H, 2 $\times$ H-32); 5.91 (m, 1H, H-31).  $^{13}\text{C}$  spektrum: 15.07; 15.17; 15.66; 16.12; 16.27; 18.29; 21.31; 22.31; 23.36; 27.40; 28.03; 28.84; 30.64 34.16; 34.50; 36.43; 37.02; 37.04; 38.66; 38.76; 41.48; 43.32; 47.71; 47.85; 48.41; 48.49; 48.51; 50.04; 50.23; 50.31; 55.73; 55.76; 65.15; 66.88; 68.71; 68.83; 74.38; 74.54; 86.63; 86.67; 118.42; 118.83; 118.85; 134.33; 134.64; 134.66. IČ spektrum: 3517.63 (OH). Elementární analýza nalezeno C 79.70 %, 11.55 %, O 8.86 %; vypočteno C 79.65 %, H 11.51 %, O 8.84 %.

## 7. Reakce ketoderivátu 5 s ethynylmagnesiumbromidem

Podle obecného postupu adice byl z ketoderivátu **5** (0.2 g; 0.42 mmol) a ethynylmagnesiumbromidu (11.7 ml, 0.7 M;) získán ethynylderivát **11**. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (mobilní fáze A). Ethynylderivát **11** byl čištěn pomocí kolonové chromatografie (mobilní fáze) a byl získán ethynylderivát **11** ve formě oleje (0,208 g, 48%).  $^1\text{H}$  NMR spektrum: (2 isomery): 0.75 (s, 3H); 0.75 (s, 3H); 0.83 (s, 3H); 0.85 (s, 3H); 0.96 (s, 3H); 0.96 (s, 3H); 0.97 (s, 3H); 1.00 (s, 3H); 1.02 (s, 3H); 1.06 (s, 3H, 10 $\times$ 3H, 5 $\times$ CH<sub>3</sub> pro každý isomer); 1.41 (s, 3H, H-29); 2.16 (s, 1H, H-30a); 2.40 (s, 1H, H-30b); 2.64 (m, 2H, H-3 $\alpha$ ), 2 isomery: 2.99 (d, 1H ( $J = 9.2$  Hz), 2. isomer: 3.05 (d, 1H,  $J = 9.2$  Hz), 1. isomer: 3.34 (s, 3H, -O-CH<sub>3</sub>); 2. isomer: 3.36 (s, 3H, -O-CH<sub>3</sub>); 1. isomer: 3.43 (m, 1H, 1. isomer); 2. isomer 3.51 (m, 1H, 1.isomer).  $^{13}\text{C}$  spektrum: 0.99; 14.54; 14.65; 14.67; 14.91; 15.91; 16.08; 16.13; 18.15; 18.18; 20.85; 21.22; 22.19; 25.40; 27.15; 27.20; 27.26; 27.97; 28.86; 29.36; 29.73; 30.25; 30.44; 33.93; 34.44; 34.73; 36.10; 36.37; 37.08; 37.17; 38.52; 38.56; 38.77; 38.82; 40.82; 41.39; 42.51; 43.26; 47.18; 48.47; 48.78; 48.88; 49.37; 49.67; 50.15; 50.18; 52.30; 55.71; 55.77; 57.50; 59.55; 70.45; 71.50; 71.55; 72.40; 73.89; 88.53; 88.60; 89.90; 128.06; 128.29; 128.48; 212.42. IČ spektrum: 3452.78 (OH). Elementární analýza: vypočteno C 79.52 %, H 10.95 %, O 9.64 %; nalezeno C 79.46 %, H 10.91 %, O 9.62 %.

## 8. Reakce ketoderivátu **6** s ethynylmagnesiumbromidem

Podle obecného postupu adice byl z ketoderivátu **6** (0.4 g; 0.80 mmol) a ethynylmagnesiumbromidu (1 ml, 0.7 M;) získán ethynylderivát **12**. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (mobilní fáze A). Ethynylderivát **12** byl čištěn pomocí kolonové chromatografie (mobilní fáze) a po odpaření byl získán ethynylderivát **12** ve formě oleje (0.208 g, 48%). <sup>1</sup>H NMR spektrum: (2 isomery): 0.77 (s, 3H); 0.85 (s, 3H); 0.95 (s, 3H); 0.97 (s, 3H); 1.06 (s, 3H, 5 × Me); 1.15-1.25 (2 × t, 6H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); 1.41 (s, 3H, 29-CH<sub>3</sub>); 2.40 (s) a 2.41 (s, 1H, H-C≡C z obou isomerů); 2.74 (dd, 1H, J<sub>1</sub>=11.5 Hz, J<sub>2</sub>=3.5 Hz); 3.0 – 3.15 (2 × d, 1 H, J=9.2 Hz); 3.30 – 3.40 (m, 1H); 3.42 – 3.52 (m, 2H); 3.53 – 3.60 (m, 1H); 3.61 – 3.73 (m, 1H, 4 × H – CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C spektrum: 14.91; 15.15; 15.66; 16.12; 16.28; 18.28; 21.24; 21.37; 23.35; 25.40; 27.24; 28.03; 29.40; 30.53; 34.05; 34.48; 36.06; 37.04; 38.71; 38.76; 41.43; 43.25; 48.43; 48.87; 49.39; 50.21; 50.32; 55.75; 65.15; 66.90; 68.72; 70.42; 71.55; 86.63; 89.95. IČ spektrum: 3502.67 (OH). Elementární analýza: vypočteno C 79.85 %, H 11.18 %, O 9.13%; nalezeno C 79.79 %, H 11.10%, O 9.11%.

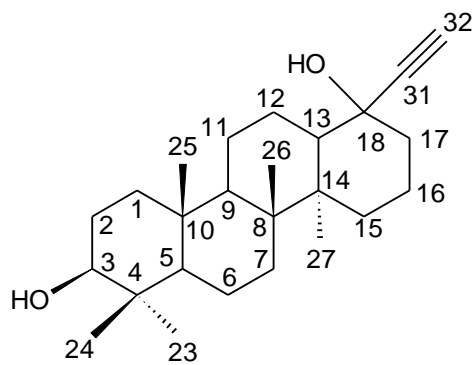
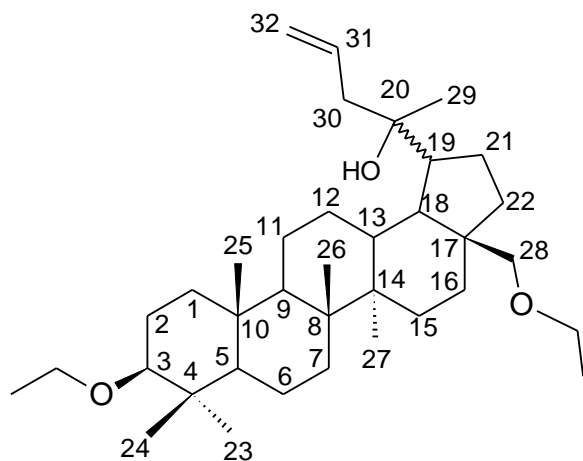
## 9. Reakce heptanorketonu **13** s ethynylmagnesiumbromidem

Podle obecného postupu adice byl z heptanorketonu **13** (0.4 g; 0.80 mmol) a ethynylmagnesiumbromidu (1 ml, 0.7 M;) získán ethynylderivát **14**. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (mobilní fáze A). Ethynylderivát **14** byl čištěn pomocí kolonové chromatografie (mobilní fáze cyklohexan/ethylacetát 10:1), následně od výchozího heptanorketonu **13** čištěn na HPLC (mobilní fáze cyklohexan/ethylacetát 6:1). Byl získán ethynylderivát **14** (10 %) ve formě průhledných krystalků. <sup>1</sup>H NMR spektrum: 0.84 (s, 3H); 0.85 (s, 3H); 0.87 (s, 3H); 0.98 (s, 3H); 1.15 (s, 3H, 15×H, 5×CH<sub>3</sub>); 2.05 (s, 3 H, CH<sub>3</sub>-Ac); 2.39 (s, 1H, -C≡C-H); 4.49 (dd, 1H, J<sub>1</sub> = 10.9 Hz, J<sub>2</sub> = 5.1 Hz, H-3α). <sup>13</sup>C spektrum: 15.49; 15.92; 16.29; 16.45; 17.55; 18.12; 21.30; 22.96; 23.62; 27.90; 30.94; 32.66; 37.10; 37.74; 38.41; 40.53; 41.13; 41.23; 44.73; 50.52; 55.33; 70.05; 70.11; 70.95; 80.87; 89.53; 171.01. IČ spektrum: 3476.04 (OH); 3308.26 (C≡C-H); 1718.72 (C=O) MS, m/z (%) [pro C<sub>27</sub>H<sub>42</sub>O<sub>3</sub>, M+Na<sup>+</sup> 437.610], nalezeno 437.981 (M+Na<sup>+</sup>, 44.48). Elementární analýza: vypočteno C 78.26 %, H 10.25 %, O 11.59 %; nalezeno C 78.21 %, H 10.21%, O 11.58 %.

## Číslování skeletů

Uhlíkové atomy v NMR spektrech byly číslovány dle precedentů z literatury<sup>21,37,38,39</sup>

takto:



## Literatura:

1. Butler M. S., Robertson A. A., Cooper M. A.: *Nat. Prod. Rep.* **2014**, *61*, 1612.
2. Connolly J. D., Hill R. A.: *Nat. Prod. Rep.* **2000**, *17*, 463.
3. Csuk R., Barthel A., Sczepek R., Siewert B., Schwarz S.: *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2011**, *1*, 37.
4. Hill R. A., Connolly J. D.: *Nat. Prod. Rep.* **2015**, *32*, 273.
5. Dzubak P., Hajduch M., Vydra D., Hustova A., Kvasnica M., Biedermann D., Markova L., Urban M., Sarek J.: *Nat. Prod. Rep.* **2006**, *23*, 394.
6. Pisha E., Chai H., Lee I.-S., Chagwedera T. E., Farnsworth N. R., Cordell G. A., Beecher C. W. W., Fong H. H. S., Kinghorn A. D., Brown D. M., Wain M. C., Wall M. E., Hieken T. J., Gupta D. T., Pezzuto K.: *Nat. Med.* **1995**, *1*, 1046.
7. 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.* **2003**, *46*, 5402.
8. Hoet S., Pieters L., Muccioli G. G., Habib-Jiwan J., Opperdoes F. R., Quetin-Leclercq J.: *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 1360.
9. Trumbull E. R., Bianchi E., Eckert D. J., Wiedhopf R. M., Cole J. R.: *Pharm. Sci.* **1976**, *65*, 1407.
10. Sheth K., Jolad S., Wiedhopf R., Cole J. R.: *J. Pharm. Sci.* **1972**, *61*, 1819.
11. Miles D. H., Kokpol U., Zalkow L. H., Steindel S. J., Nabors, J. B.: *J. Pharm. Sci.* **1974**, *63*, 613-615.
12. Evers M., Poujade C., Soler F., Ribeill Y., James, C., Lelicevre, Y., Gueguen J. C., Reisdorf D., Morize I., Pauwels R., De Clercq E., Henin Y., Bousseau A., Mayaux J. F., Le Pecq J. B., Dereu N.: *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 1056-1068.
13. Setzer W. N., Setzer M. C., Bates R. B., Jackes, B. R.: *Planta Med.* **2000**, *66*, 176-177.
14. Fulda S., Friesen C., Los M., Scaffidi C., Mier W., Benedict M., Nunez G., Krammer P. H., Debatin P. M. E.: *Cancer Res.* **1997**, *57*, 4956.
15. Fulda S., Scaffidi C., Susin S. A., Krammer P. H., Kroemer G., Peter M. E.: *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 33942.
16. Jeong H. J., Chai H. B., Park S. Y., Kim D. S. H. L.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 1201-1204.
17. Fulda S., Jeremias I., Pietsch T., Debatin K. M.: *Int. J. Cancer* **1999**, *82*, 435-441.
18. Kim Y. K., Yoon S. K., Ryu S. Y.: *Planta Med.* **2000**, *66*, 485-486.

19. Schmidt M. L., Kuzmanoff K. L., Ling-Indeck L., Pezzuto J. M.: *Eur. J. Cancer* **1997**, 33, 2007-2010.
20. Fulda S., Jeremias I., Pietsch T., Debatin K. M.: *Klin. Pediatr.* **1999**, 211, 319-322.
21. Ryu S. Y., Choi S. U., Lee S. H., Lee Ch. O., No Z., Ahn J. W.: *Arch. Pharm. Res.* **1994**, 17, 375-377.
22. Kim D. S. H. L., Pezzuto J. M., Pisha E.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, 8, 1707.
23. Setti E. L., Mascaretti O. A.: *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1988**, 1, 2059.
24. Suokas E., Hase T.: *Acta Chem. Scand., Ser. B* **1975**, 29, 139.
25. Sejbal J., Klinot J., Budesinsky M., Protiva, J.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1991**, 56, 293
26. Denisenko M. V., Odínokova L. E., Denisenko V. A., Uvarova N. I.: *Zh. Org. Khim.* **1991**, 27, 2174.
27. Odínokova L. E., Denisenko M. V., Denisenko V. A., Uvarova N. I.: *Khim. Prir. Soedin* **1992**, - ,210.
28. Lorenzi H., Souza H. M, Medeiros-Costa J. T., Cerqueira L. S. C.: *Nova Odessa, SP*, **1996**.
29. Wang L., Ando S., Ishida Y., Ohtani H., Tsuge S., Nakayama T. J.: *Anal. Appl. Pyrolysis* **2001**, 58, 525.
30. Asperger A., Engewald W., Fabian G. J.: *Anal. Appl. Pyrolysis* **1999**, 52, 51.
31. Vandenburg L.E., Wilder E. A.: *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1970**, 47, 541.
32. Vandenburg L. E., Wilder E. A.: *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1967**, 44, 659.
33. de Brito Cysne J., Braz-Filho R., Assunção V. M., de Andrade Uchoa D. E. R., Silveira E. R., Pessoa O. D. L.: *Magn. Reson. Chem.* **2006**, 44, 641.
34. Czuk R., Barthel A., Kluge R., Ströhl D.: *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, 18, 7252.
35. Ngoc T. D.; Disertační práce, Katholic University of Leuven, Department of Organic Chemistry, **2014**.
36. Piskořová K.; Bakalářská práce, UP Olomouc, Katedra organické chemie, **2013**.