

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

**KATEDRA ORGANICKÉ CHEMIE**

**Studium metatezí na triterpenoidech s exoskeletálními  
dvojnými vazbami**



**Diplomová práce**

Autor:	Bc. Marek Šebrle
Studijní program:	Chemie
Studijní obor:	Bioorganická chemie
Typ studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Milan Urban, Ph.D.

Rád bych poděkoval vedoucímu své diplomové práce doc. RNDr. Milanovi Urbanovi, Ph.D. za ochotu, se kterou se mi věnoval a za možnost vypracovat diplomovou práci ve výzkumném ústavu molekulární a translační medicíny a dále pak celému týmu za kolegiální a vytvoření přátelského prostředí.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně pod odborným dohledem doc. RNDr. Milana Urbana, Ph.D. Veškerou použitou literaturu jsem uvedl v seznamu použité literatury na konci práce.

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

V Olomouci dne .....

.....

Marek Šebrle

## **Bibliografická identifikace**

Jméno a příjmení:	Marek Šebrle
Název práce:	Studium metatezí na triterpenoidech s exoskeletálními dvojnými vazbami
Typ práce:	Diplomová
Pracoviště:	UMTM
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Milan Urban, Ph.D
Rok obhajoby práce:	2016

## **Abstrakt v českém jazyce:**

Tato diplomová práce je členěna do dvou stěžejních částí a to 1) Teoretická část, ve které je věnovaná pozornost biologickým aktivitám triterpenoidů, zejména kyselině betulinové a betulinu a dále pak metatezním reakcím se zaměřením na reaktivitu Grubbsových katalyzátorů. 2) Praktická část, ta se zaměřuje na syntézu výchozích triterpenoidních olefinů a jejich následných metatezí a nakonec metatezním reakcím v mikrovlnném reaktoru. Touto metodou byla připravena jedna nová sloučenina.

Klíčová slova:	metateze, Grubbs, Hoveyda-Grubss, triterpeny, betulin, kyselina betulinová
Počet stran:	56
Jazyk:	Čeština

**Bibliographical identification:**

Author's first name and surname: Marek Šebrle  
Title: Study of metathesis reactions on triterpenoids with exoskeletal double bonds.  
Type of thesis: Diploma thesis  
Department: UMTM  
Supervisor: doc. RNDr. Milan Urban, Ph.D  
The year of presentation: 2016

**Abstrakt v anglickém jazyce:**

This diploma thesis is divided into two main parts namely 1) The theoretical part, which is devoted to biological activities of triterpenoids, mainly betulinic acid and betulin, and then metathesis reactions focused on the reactivity Grubbs catalysts. 2) Practical part, that focuses on the synthesis of the starting olefins and their triterpenoid subsequent metathesis reactions. Furthermore metathesis reaction in a microwave reactor. By this method was prepared one new compound.

Keywords: metathesis, metathesis reaction, Grubbs, Hoveyda-Grubbs, triterpens, betulin, betulinic acid  
Number of pages: 56  
Language: Czech

# Obsah

Seznam zkratek .....	8
Úvod.....	10
Cíle diplomové práce .....	11
Teoretická část .....	12
<b>Současný stav studované problematiky</b> .....	12
Terpeny .....	12
Triterpeny .....	13
Betulin a kyselina betulinová .....	15
Betulin .....	15
Kyselina betulinová .....	16
Metateze .....	17
Grubbsovy katalyzátory.....	20
Cross-metateze .....	21
Cross-metateze na steroidních a triterpenoidních skeletech .....	23
Metateze vedoucí k dimerům .....	23
Příprava perfluoralkylovaných derivátů pomocí cross metatezí .....	28
Příprava inhibitorů typu 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenázy 1.....	31
Další zajímavé cross-metateze .....	33
Výsledky a diskuse .....	34
Příprava výchozích olefinů .....	34
Pokusy o metatezi na vazbě 20(29).....	36
Pokusy o metatezi na allylu a oktenylu.....	39
Pokusy o metateze při aktivaci mikrovlnným zářením. ....	42
Závěr .....	44
Experimentální část.....	46

Příprava výchozích látek .....	47
Příprava acetylované kyseliny betulinové ( <b>69</b> ) .....	47
Příprava allylesteru acetylované kyseliny betulinové ( <b>71</b> ).....	48
Příprava oktenylesteru kyseliny betulinové ( <b>73</b> ).....	49
Příprava výchozí diallylovaného betulinu ( <b>74</b> ) .....	50
Jednotlivé metatezní reakce – obecné postupy.....	51
Konkrétní postup pro přípravu derivátu <b>93</b> .....	52
Metatezní reakce v mikrovlnném reaktoru.....	52
Citace .....	54

# Seznam zkratek

Ac	acetyl
ADMP	acyklická dienová metatezní polymerace
BA	kyselina betulinová
cat.	katalyzátor
CM	cross-metateze
DCM	dichlormethan
DMF	N,N-dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
EC <sub>50</sub>	medián efektivní koncentrace
Eqv.	ekvivalent
Et	ethanol
EtOAc	ethylacetát
Gr	generace
H-G	Hoveyda-Grubbs
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti
IC <sub>50</sub>	nejnižší koncentrace, která usmrtí 50 % buněk
MAPK	mitogen-aktivované proteinové kinasy
Me	methyl
MW	mikrovlonné záření
NHC	N-heterocyklický karbenový ligand
NMR	nukleární magnetická rezonance



Pcy <sub>3</sub>	tricyklohexylfosfin
Ph	fenyl
RCM	kruh uzavírající metateze
ROM	kruh otevírající metateze
r.t.	laboratorní teplota
TNF	tumor nekrozový factor
TRAIL	transmembránový protein typu II z rodiny TNF
t.t.	teplota tání

# Úvod

Triterpeny se těší veliké oblibě výzkumníků po celém světě a to díky jejich neobyčejně bohatým biologickým účinkům, stabilitě a nízké toxicitě. První zmínky o používání přírodních zdrojů s velkým obsahem triterpenů se objevují již od pradávna, kdy se využívaly především v orientální a lidové medicíně.<sup>1</sup> Používala se celá řada exotických rostlin, či jejich částí. K prvním aplikacím docházelo náhodně bez znalostí složení a struktur jednotlivých molekul v extraktech, nebylo tedy známé, která sloučenina odpovídá za jakou biologickou aktivitu. To umožnil až rozvoj analytických metod.<sup>2,3</sup> Triterpeny můžeme nalézt i v pro nás běžných rostlinách nebo ovoci, například ve slupkách jablek, hrušek nebo třeba v brusinkách.<sup>4</sup> V současné době se do této rodiny sloučenin řadí tisíce nejruznějších látek.

Tato práce se skládá z teoretické části, ve které bude věnována pozornost triterpenům, jejich základnímu rozdělení, fyzikálním a biologickým vlastnostem s důrazem na deriváty lupanu (**1**) a to konkrétně betulinu (*lup-20(29)-en-3 $\beta$ ,28-diolu*) (**2**) a kyseliny betulinové (*3 $\beta$ -hydroxylup-20(29)-en-28-ové kyseliny*) (**3**). Poté bude rozebrána metodika metatezí, jako zajímavý způsob vzniku nové vazby C-C ze dvou výchozích alkenů, a katalyzátorů umožňujících tuto reakci. Nakonec budou rozebrány a komentovány experimenty provedené v rámci této práce, jejich výsledky a potvrzení struktur nově připravených derivátů pomocí spektrálních dat.

Druhou částí je experimentální část, ve které budou popsány jednotlivé experimenty a naměřená data.

# Cíle diplomové práce

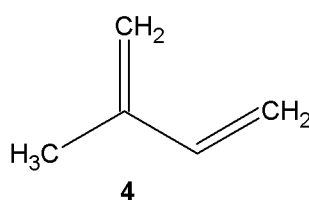
- 1) Provést literární rešerši na téma „metateze a možnosti jejího využití na isoprenoidech“ a na související téma „biologické aktivity terpenů.“
- 2) Experimentálně zjistit možný rozsah využití metatezních reakcí u terpenů s ohledem na sterickou náročnost terpenů.
- 3) Na jednoduchých molekulách provést optimalizaci reakčních podmínek, využít literární analogie dobře probíhajících metatezí.
- 4) Převést tyto podmínky na složitější reakční systémy.
- 5) Sloučeniny nově připravené v rámci této práce charakterizovat pomocí fyzikálních a spektrálních dat a připravit vzorky na testování jejich *in vitro* cytotoxicity.

# Teoretická část

## Současný stav studované problematiky

### Terpeny

Terpeny jsou přírodní organické sloučeniny, které se formálně skládají z jednotek odvozených od molekuly isoprenu (*2-methyl-1,3-butadienu*) (**4**) **Obrázek 1**, vzájemně se od sebe liší počtem a uspořádáním těchto stavebních jednotek. Spolu se steroidy, steroidními alkoholy a cholovými kyselinami tvoří rozsáhlou skupinu isoprenoidů.



**Obrázek 1**

Tyto sloučeniny dělíme na cyklické a acyklické a podle počtu isoprenoidních jednotek dále pak na:

- monoterpeny: dvě molekuly izoprenu (**4**)
- seskviterpeny: tři molekuly izoprenu (**4**)
- diterpeny: čtyři molekuly izoprenu (**4**)
- triterpeny: šest molekul izoprenu (**4**)
- tetraterpeny: osm molekul izoprenu (**4**)
- polyterpeny: vyšší počet molekul izoprenu (**4**)

Monoterpeny, např. kafr, menthol, limonen, pinen, citronelol, jasmon a i některé seskviterpeny, např. iron, farnesol, cedrol, jsou původci přírodních vůní, jsou to hlavní

složky silic a pryskyřic.<sup>5</sup> Sester-, tetra- a triterpeny jsou většinou tuhé látky, které se v přírodě vyskytují především volně nebo vázané ve formě glykosidů.

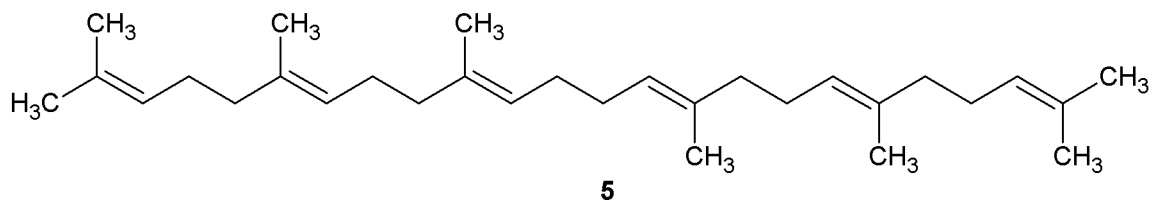
## Triterpeny

Triterpeny patří do skupiny sloučenin, které se skládají ze šesti izoprenoidních jednotek a jejich základní skelet tak obsahuje 30 atomů uhlíku. Jsou to poměrně stabilní, hydrofobní sloučeniny nerozpustné ve vodě a alkoholech, v nepolárních organických rozpouštědlech se rozpouští poměrně dobře.

Triterpenoidy se v přírodě běžně vyskytují jako látky obsažené v řadě vyšších rostlinách, houbách, dále pak jsou metabolizovány některými bakteriemi a také syntetizovány některými zvířaty.<sup>6,7,8</sup> Jsou to sekundární metabolity, což znamená, že nejsou součástí hlavních metabolických drah.<sup>9</sup>

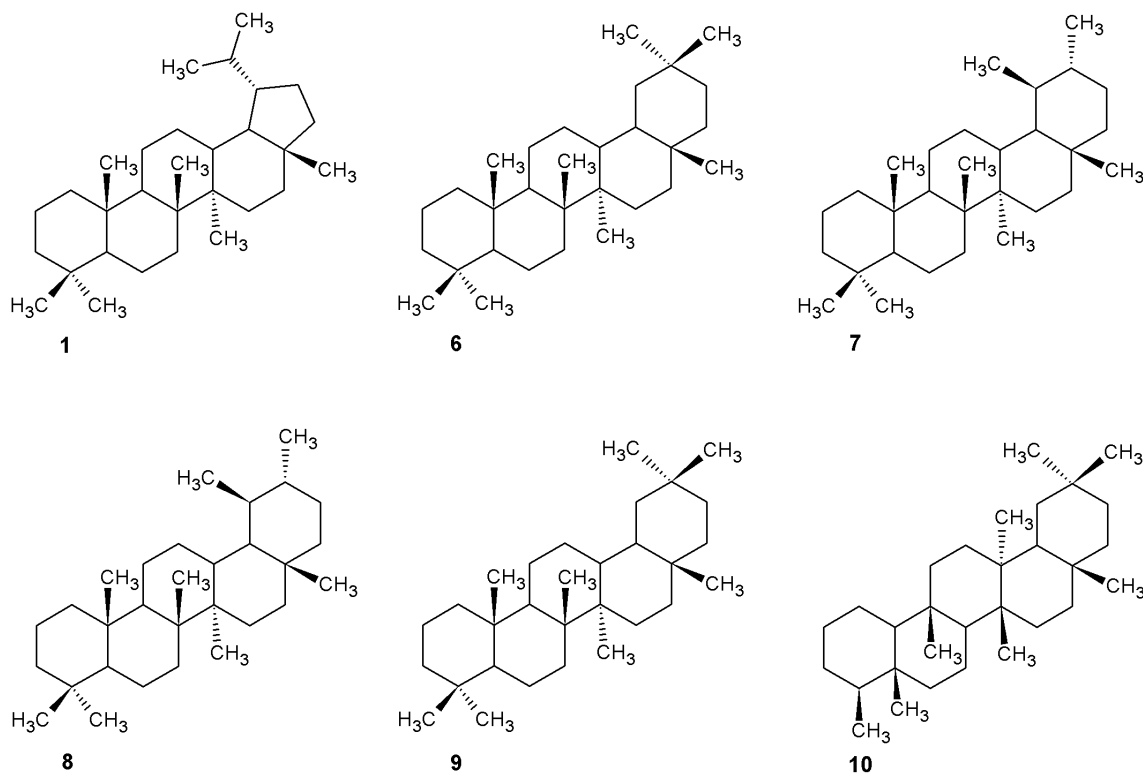
Polycyklické triterpeny se vyskytují ve volné formě, dále pak ve formě glykosydů (saponiny) nebo třeba ve formě fytoesterů. U této skupiny sloučenin je zajímavé, že se řadí do třídy steroidních hormonů, nicméně hormonální aktivita není zachována.<sup>10</sup> Triterpenoidy jsou, jak již bylo naznačeno, hojně studovanou skupinou látek především pro jejich obsáhlou biologickou aktivitu. Za zmínku stojí například aktivity: protizánětlivé,<sup>11,12</sup> antivirotické a anti HIV,<sup>13</sup> cytotoxické,<sup>10</sup> antimikrobiální,<sup>14</sup> antifungální,<sup>15</sup> antimalarické,<sup>16</sup> hepatoprotektivní a kardioprotektivní aktivity.<sup>10,17</sup>

Biologickým prekursorem triterpenoidů je nenasycený uhlovodík skvalen (**5**) **Obrázek 2.** Jeho enzymatickou cyklizací, která může vést k několika různým produktům, vzniká několik základních triterpenoidních skeletů. Následnými přesmyky těchto prvotních struktur pak může dojít ke vzniku asi čtyřiceti triterpenoidních skeletů. Je to umožněno bohatou konformační pestrostí přechodových stavů jednotlivých forem.<sup>18,19</sup>



Obrázek 2

Mezi, po biologické stránce, nejzajímavější triterpenoidní látky patří sloučeniny odvozené od následujících šesti struktur: lupan (1), oleanan (6) ursan (7) taraxastan (8) taraxeran (9) a friedelan (10) (obrázek 3).

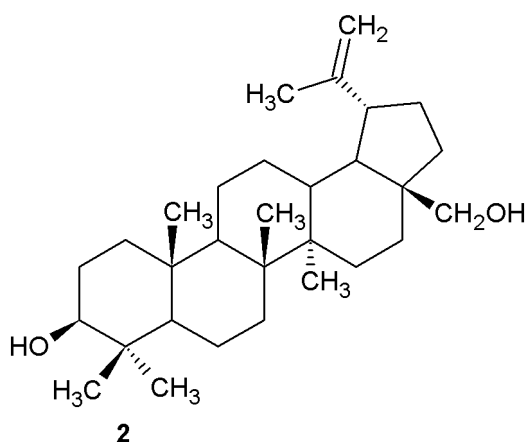


Obrázek 3

# Betulin a kyselina betulinová

## Betulin

Betulin, systematickým názvem (*lup-20(29)-en-3 $\beta$ ,28-diol*) (**9**) je přírodní pentacyklický triterpenoidní alkohol, ve vodě nerozpustná krystalická látka. Hlavním zdrojem betulinu (**9**) je kůra břízy, z jejichž latinského názvu dostala tato sloučenina také svůj název (*Betula sp.*). Již v roce 1788 byl betulin izolován v čisté formě Lovitsem, který kůru břízy zahříval a docházelo tak k jeho sublimaci. Kůra břízy má dvě zřetelně odlišné vrstvy: vnitřní – šedou a vnější – bílou, právě za toto bílé zbarvení jsou zodpovědné molekuly betulinu (**2**). Vnější vrstva kůry je obzvláště bohatá na betulin až 10-20 %.<sup>20,21</sup> My konkrétně máme betulin izolovaný z kůry břízy bělokoré (*betula pendula*). Jako zajímavost můžeme uvést, že kůra břízy nehnije, neplesniví. Již tento fakt poukazoval na možné biologické účinky.



Obrázek 4

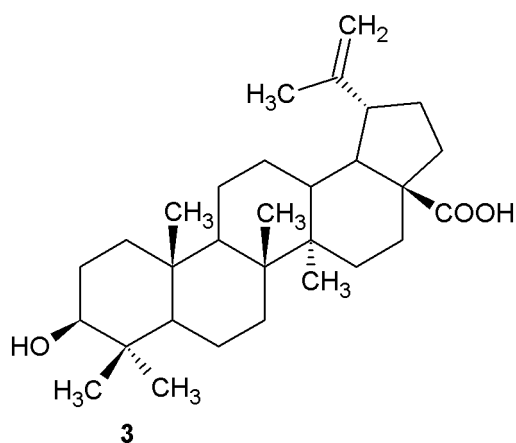
Na konci 19. století Wiler upozornil na antiseptické vlastnosti betulinu, díky kterým se tato sloučenina začala používat v náplastech pro sterilizaci řezných ran. Dále pak bylo prokázáno, že betulin napomáhá při snižování hladiny cholesterolu v krvi a také vykazuje hepatoprotektivní, antimalární, protivirovou, protinádorovou a anti – HIV aktivitu a mnohé další.<sup>10,22</sup>

Některé výzkumné týmy se zabývaly dokonce antiparazitárními aktivitami, ty byly založeny na inhibici topoizomeráz.<sup>23</sup>

## Kyselina betulinová

Kyselina betulinová, systematickým názvem (*3 $\beta$ -hydroxylup-20(29)-en-28-ová kyselina*) (**3**) (**obrázek 5**) je v přírodě hojně zastoupená pentacyklická triterpenoidní kyselina. Taktéž je to bílá krystalická látka, nerozpustná ve vodě, špatně rozpustná v alkoholech, zato dobře rozpustná v pyridinu, dichlormetanu nebo třeba kyselině octové.

Kyselina betulinová (**3**) byla poprvé izolována roku 1905. Vyskytuje se převážně v kůrách stromů, v malém množství v kůře břízy bělokoré (*betula pendula*) spolu s betulinem (**2**).<sup>20</sup> Bohatým a v podstatě neomezeným přírodním zdrojem je také kůra platanu (*platanus hispanica*), výhodou je, že svrchní část kůry tohoto stromu každoročně opadává. Na našem pracovišti pracujeme s kyselinou betulinovou izolovanou z již zmiňovaného platanu (*platanus hispanica*) a dále pak připravenou z betulinu (**2**).



Obrázek 5

Kyselina betulinová (**3**) v porovnání s betulinem (**2**) vykazuje větší množství biologických aktivit. Vyznačuje se poměrně vysokou protinádorovou biologickou aktivitou, ta byla prokázána jak na *in vitro*, tak *in vivo* modelech nádorů, ale stejně tak i v klinických zkouškách přímo na lidech. Pisha et al.<sup>24</sup> zjistili, že je kyselina betulinová (**3**) specifické cytotoxické činidlo účinné na melanomové linie buněk a inhibuje růst



lidských melanomů implantovaných podkožně do myši bez jakékoliv vedlejší toxicity.<sup>24</sup> Následné studie s kyselinou betulinovou (**3**) prokázaly selektivní cytotoxicitu na různých dalších buněčných nádorových liniích.<sup>25</sup> Vyvolává také apoptózu v neuroblastomech a glioblastomech prostřednictvím aktivace mitochondriálních drah. V tomto případě bylo zjištěno, že hodnoty IC<sub>50</sub> kyseliny betulinové jsou nižší než u některých běžně používaných protinádorových léčiv, například cis platiny.<sup>26,27</sup> Dochází tomu tak aktivací MAPK kinázovou cestou bez zapojení aktivovaných kaspáz.<sup>28</sup> Jedny z posledních výzkumů naznačují, že protinádorová aktivita kyseliny betulinové (**3**) může být mnohem vyšší v případě, že je používána v kombinaci s běžnou chemoterapií, ionizující radiací nebo cytokin TRAIL (tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand).<sup>29</sup>

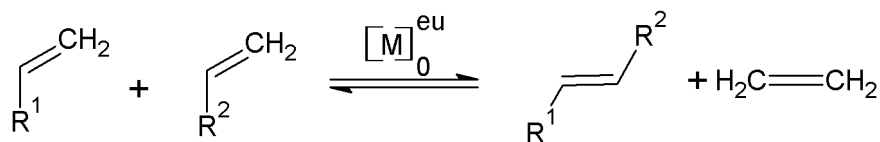
Pro většinu nádorových buněk je typické, že se dobře rozmnožují v prostředí s nižším pH, pod hodnotu 6.8, pravděpodobně kvůli výrazně zvýšené glykolýze. Právě tato jejich vlastnost hraje velkou roli při použití kyseliny betulinové (**3**) jako selektivního protinádorového léčiva.<sup>30</sup>

Kyselina betulinová (**3**) je zajímavá také pro její antivirotické účinky, především anti – HIV. Kyselina betulinová (**3**) potlačuje množení viru HIV-1 v buněčných kulturách H9 lymfocytů s EC<sub>50</sub> = 1.4 mM. Některé její syntetické analogy však vykazují i nízko nanomolární aktivitu.<sup>20</sup>

Za zmínku stojí také její antibakteriální, antimalarické a protizánětlivé účinky.<sup>10</sup>

## Metateze

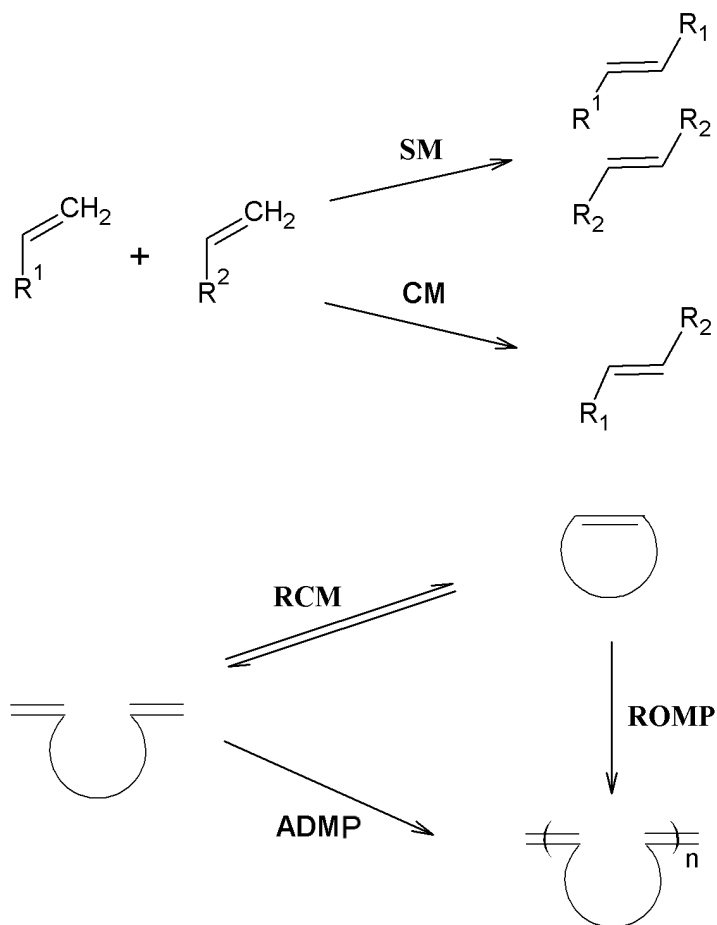
V posledních letech jsou chemické reakce označované jako tzv. metateze jednou z nejmodernějších a nejstudovanějších částí organické syntézy. Tento název vychází z latinského *meta* (změna) a *thesis* (místo). Je to energeticky zakázaná, vratná reakce, pro jejíž průběh je nutná přítomnost prekatalyzátorů. Při metatezích dochází k přeskupení atomů uhlíku mezi dvojnými vazbami dvou molekul olefinů. Jedná se o skutečně pozoruhodné reakce, které umožňují rozbití pevných dvojných vazeb a jejich následnou reorganizaci, je pro to nutná přítomnost katalyzátorů. Bez nich reakce neprobíhají, protože aktivační bariéra štěpení dvojných vazeb je příliš vysoká, olefiny jsou příliš stabilní. Charakter vazby je při tom nezměněný<sup>31</sup> (**Obrázek 6**).



Obrázek 6

Metateze můžeme dělit podle typu vstupujících alkenů na následujících pět skupin<sup>32</sup> (Obrázek 7).

- Homometateze = **SM** – k metatezím dochází mezi dvěma stejnými molekulami
- Cross-metateze = **CM** – do reakce vstupují dva různé olefiny
- Ring opening metateze = **ROM** – metateze u kterých dochází k otevírání cyklu
- Ring opening metatezní polymerace = **RCM** – polymerace založená na otevírání cyklu
- Acyclic dien metathesis polymerization = **ADMP** – polymerizace acyklických olefinu



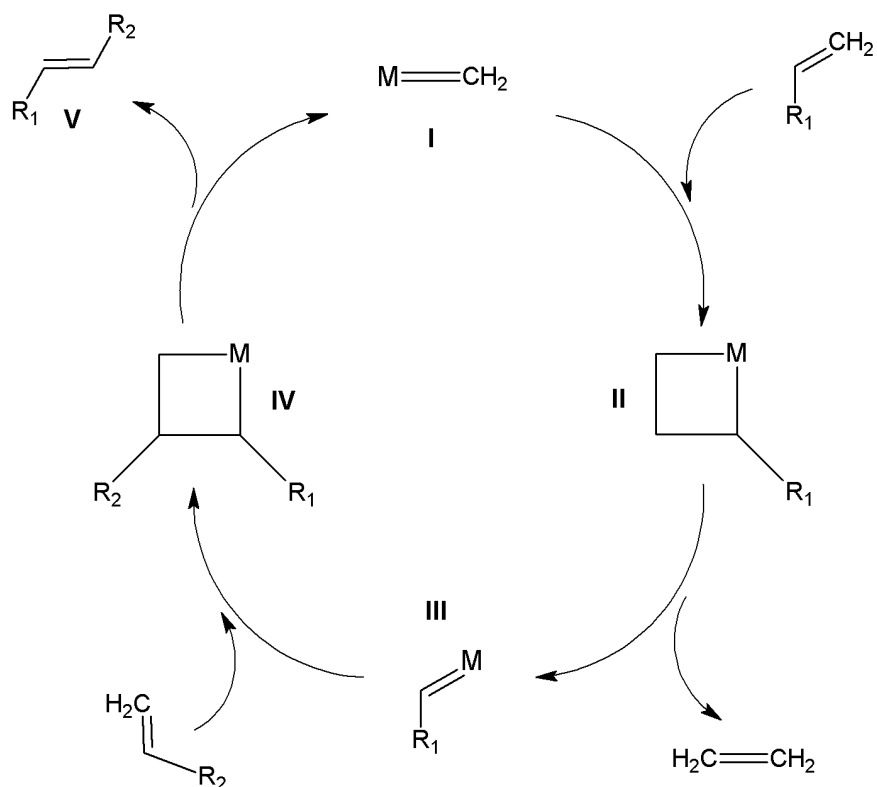
Obrázek 7

Crossmetateze jsou ze zmíněných metatezí nejstudovanější, mohou probíhat intermolekulárně i intramolekulárně. Podle charakteru substrátu probíhají v plynné i kaplné fázi.

V roce 2005 byla za tuto chemii dokonce udělena Nobelova cena za chemii (Yves Chauvin, Robert H. Grubbs a Richard R. Schrock)<sup>33</sup>

Zmínky o prvních reakcích metatezního typu se začaly objevovat zhruba od 50. let dvacátého století. Nicméně průběh a mechanismus reakcí byl ještě dlouhou dobu nejasný, první katalyzátory nebyly moc účinné. Roku 1970 byl publikován návrh prvního mechanismu metateze a později, roku 1975 se potvrdila jeho správnost.<sup>34,35</sup>

Cross-metateze probíhá takzvaným metalokarbenovým mechanismem (**Obrázek 8**). V prvním kroku dochází k reakci metalokarbenového komplexu (**I**), takové látky, která obsahuje dvojnou vazbu vázající se na kov ( $M=C$ ). Ta je schopná reagovat s další molekulou alkenů, dochází ke vzniku metalocyklobutanového intermediátu (**II**). Metalocyklobutanový meziprodukt (**II**) je ale nestabilní a rozkládá se na nový metalokarbenový komplex a ethen, ten uniká z reakční směsi a posouvá tak reakci ve směru metalokarbenů. Následně vstupuje do reakce další olefin, dochází ke vzniku nového metalocyklického intermediátu (**IV**). Tento intermediát je opět nestabilní a rozpadá se na výsledný produkt (**V**) a metalokarben (**I**), který může vstoupit do dalšího cyklu.<sup>35</sup>



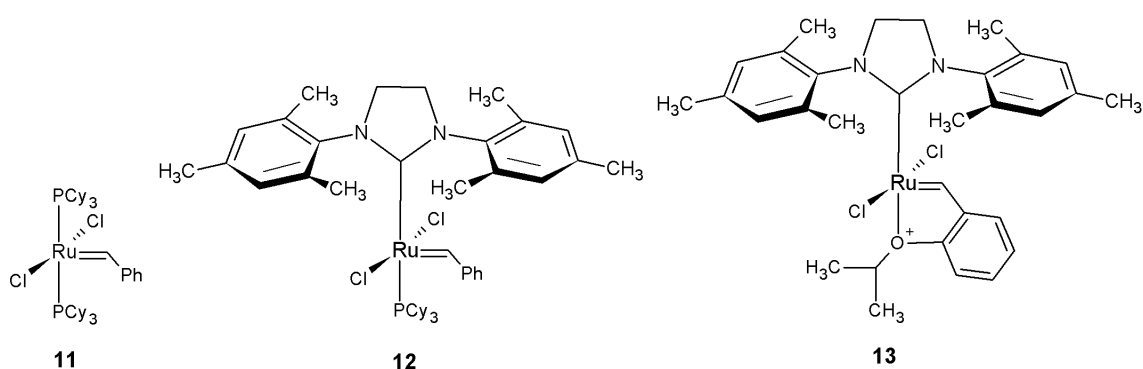
Obrázek 8

V počátcích výzkumu metatezních reakcí se používaly jednoduché katalyzátory s nízkou účinností. Kolem roku 1980, se začaly studovat katalyzátory, u kterých byl použit jako centrální atom atom titanu, molybdenu nebo wolframu. Tyto katalyzátory byly příliš citlivé na vzduch a vodné prostředí a nebyly kompatibilní s alkeny obsahujícími kyslíkaté funkční skupiny. Z toho důvodu byly vyvinuty další katalyzátory, tentokrát komplexy ruthenia.

## Grubbsovy katalyzátory

Grubbs objevil v roce 1988 první katalyzátor na bázi Ru, se kterým bylo možné provádět reakce i v méně striktních podmínkách. Tato výhoda vedla k velkému zájmu o studium této skupiny katalyzátorů. Jako první rutheniový katalyzátor, který byl obecně aplikovatelný, je dnes označován jako Grubbsův katalyzátor první generace (**11**). Charakterizoval se stabilitou na vzduchu, větší tolerancí k funkčním skupinám a stal se i

komerčně dostupný. Grubbsovy podrobné mechanistické studie poskytují důkaz o tom, že pro reakci s alkeny je nezbytná disociace fosfinu, kterým se získá reaktivní 14-elektronový meziprodukt ruthenia. Ve snaze zvýšit tento disociační krok byl zaveden silně dotující N-heterocyklický karbenový (NHC) ligand, tím se docílilo stonásobně vyšší aktivity. Tento katalyzátor je pojmenován jako Grubbsův katalyzátor druhé generace (**12**), nejčastěji je využíván ke cross-metatezím. Dalším a posledním typem je Hoveyda-Grubbsův katalyzátor druhé generace (**13**), ten by měl být nejúčinnější.<sup>36,37,38</sup>



Obrázek 9

Poslední dva zmiňované katalyzátory jsou sice reaktivnější, ale zato jsou citlivější na olefiny obsahující kyslíkaté funkční skupiny a funkční skupiny obsahující kyselé vodíky.

## Cross-metateze

Metateze tohoto druhu patří mezi nejlepší možné způsoby přípravy substituovaných alkenů vznikajících ze dvou odlišných terminálních olefinů a to za mírných podmínek. Díky těmto přednostem se staly široce užívanými metodami organické syntézy. Nicméně podmínky CM není úplně snadné paušalizovat, často jsou omezeny nemožností předvídat selektivitu reakce a stereoselektivitu. Na základě kategorizace reaktivity jednotlivých olefinů byl navržen obecný empirický model, pro produkty metatezí. Tento model dovoluje předpovídat průběh jak selektivních, tak neselektivních cross-metatezních reakcí pro velký počet komerčně dostupných katalyzátorů s velkým rozpětím aktivit. Nejsnazší způsob jak rozdělit reaktivitu olefinů

byl založen na porovnávání jejich schopnosti tvorby homodimerů s důrazem na jejich následné reaktivity.

Výsledkem byl model, který rozděluje alkeny na základní čtyři typy (**Tabulka 1**). Typ I podstupuje homodimerizacím velice snadno a vzniklé homodimery mohou reagovat s dalšími alkeny. Do této skupiny látek patří stericky nebráněné a elektronově bohaté alkeny. Typ II podstupuje homodimerizacím podstatně pomaleji, rovněž jejich reaktivita s dalšími alkeny je omezená. Třetí typ alkenů je v podstatě neschopný tvořit homodimery, ale podléhá reakcím s dimery vzniklými z olefinů prvního a druhého typu. Poslední, čtvrtý typ olefinů, je úplně odolný k reakcím s katalyzátory, ale neinhibuje reaktivitu katalyzátorů k předešlým typům olefinů. Obecně lze shrnout, že reaktivita olefinů klesá od neaktivnějšího typu I po nejméně aktivní typ IV spolu se vzrůstající sterickou bráněností a elektronovou deficitou jednotlivých alkenů.<sup>39</sup>

		Použitý katalyzátor	
Typ olefinu	11	12	
Typ I	terminální olefiny, primární allyl alkoholy, estery, ethry, allyl silany, allyl halogenidy	terminální olefiny, allyl alkoholy, allyl estery, příliš o-substituované styreny, allyl fosfonáty, allyl sulfidy	
Typ II	styreny, sekundární allyl alkoholy, vinil dioxolany	styreny (objemné substituenty), akrylamidy, vinyl ketony,	
Typ III	Vinyl siloxany	1,1-disubstituované olefiny, vinyl terciální allylové alkoholy	fosfonáty,
Typ IV	1,1-disubstituované olefiny, disubstituované $\alpha,\beta$ -nenasycené karbonyly, nitroolefiny, terciální allyl aminy	Trisubstituované allyl alkoholy (chráněné), vinyl nitro olefiny	

Tabulka 1<sup>39</sup>

Klíč k selektivě cross-metatezí spočívá v minimalizaci počtu nežádoucích vedlejších produktů, jako jsou například homodimery vstupujících alkenů, zamezením jejich počáteční tvorby nebo zajištěním jejich kvantitativního spotřebování v druhé části reakce. Alken vzniklý ze skupiny prvního typu tvoří homodimery velice rychle a snadno, ale ty jsou schopny rozpadat se a podléhat dalším reakcím za vzniku požadovaného produktu. V případě, že dojde k reakci homodimeru (vzniklého reakcí olefinů druhého typu) s terminálním alkenem, nedochází již ke vzniku požadovaných produktů. Tyto homodimery jsou příliš stabilní. Z toho důvodu může být výhodné zvýšit sterickou bráněnost olefinů druhého typu a převést je tak na typ třetí, například zavedením chránící skupiny.

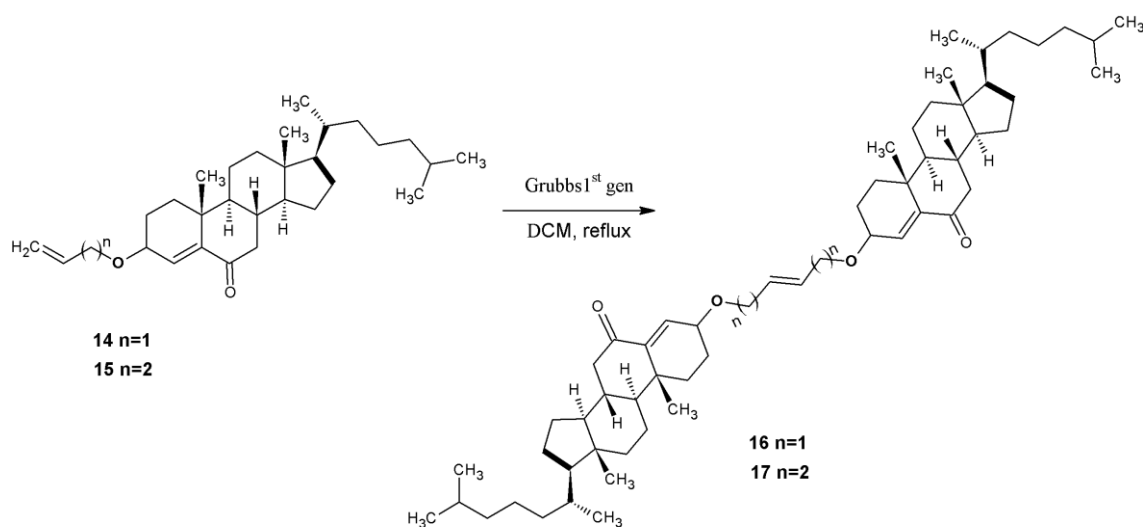
## Cross-metateze na steroidních a triterpenoidních skeletech

### Metateze vedoucí k dimerům

Syntézou symetrických molekul, vzniklých spojením dvou identických zbytků, může docházet ke vzniku nových typů ligandů pro proteiny. Některé z nich mohou aktivovat buněčné procesy<sup>40</sup> nebo zvyšovat afinitu ligandů k jejich vazebným místům tím, že poskytují možnost pro další ukotvení na aktivních místech určitých domén.<sup>41</sup> Obzvláště dimerní steroidy představují třídu látek, které přitahují pozornost díky své rigidní a asymetrické struktuře. Z farmaceutického hlediska jsou důležité některé z těchto dimerů, které vykazují biologické aktivity, jako cytotoxicitu, protinádorovou a antimalarickou aktivitu.<sup>42,43</sup>

Na základě těchto četných biologických cílů byla pro přípravu C-C spojených dimerů sterolů zvolena také metoda metateze. Přestože se jedná o reakce, probíhající za velmi mírných podmínek a umožňující toleranci široké škály funkčních skupin, jejich použití v chemii steroidů značně limitované.

Jako první syntéza steroidních dimerů byla pomocí Cross-metatezi reakce (*3β*-(2-Propenyloxy)-4-cholesten-6-onu) (**14**), kdy docházelo ke vzniku dimeru (*1,4-Bis*(4-cholesten-6-one-3β-oxy)-2-butenu) (**16**) a dále pak reakce (*3β*-(3-Butenyloxy)-4-cholesten-6-onu) (**15**) se vznikem dimeru (*1,6-Bis*(4-cholesten-6-one-3β-oxy)-3-hexenu) (**17**). V obou případech docházelo ke vzniku vazby prostřednictvím etherových skupin v poloze C-3. Tyto reakce probíhaly v DCM za přítomnosti 8% Grubbsova katalyzátoru I typu, při teplotě varu s výtěžky kolem 80 %.<sup>45</sup> (Schéma 1)



Schema 1

Hlavní omezení při syntéze steroidních struktur hraje sterická náročnost objemné, rigidní a asymetrické molekuly steroidu spolu s požadavky na prostorové nároky metatezních katalyzátorů, není tak jednoduché předpovědět, zda a jestli vůbec bude k reakcím docházet a to ani při použití nejreaktivnějších terminálních olefinů.

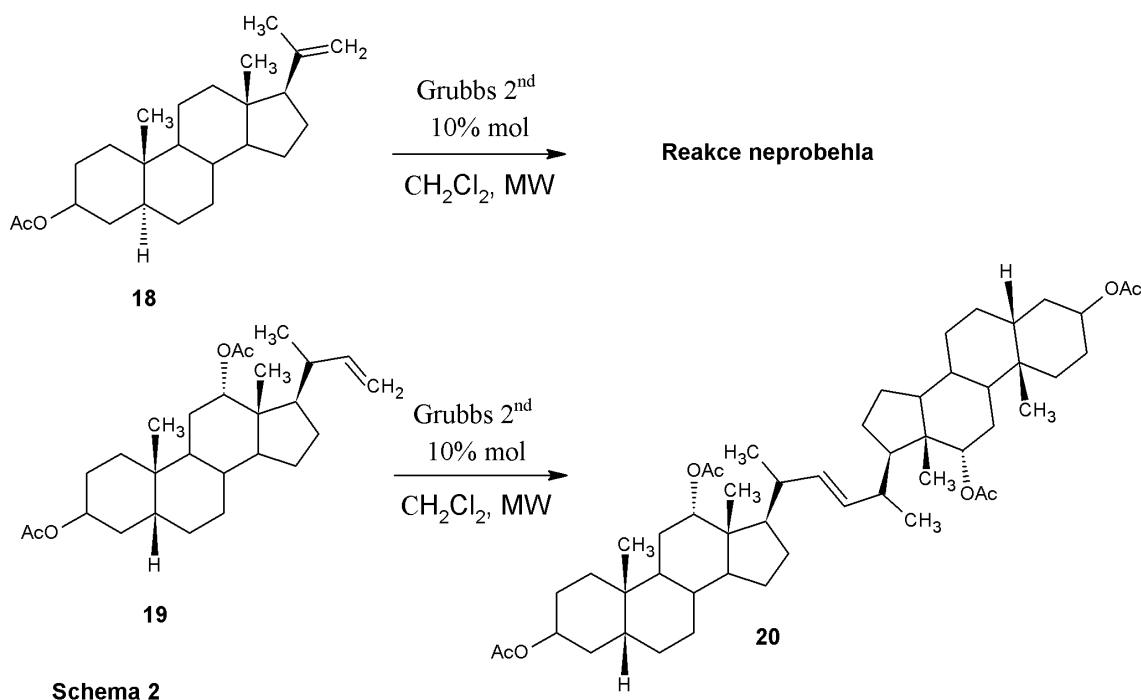
Další dimery byly syntetizovány v polohách C-20 (kruh D), C-19 a C-6 (kruh B) steroidního skeletu pomocí cross-metatezi za použití Grubbsova katalyzátoru druhé generace s terminálními olefiny různých délek a za účasti mikrovlnného záření (MW)<sup>46</sup>

- Homodimerizace na postranních řetězcích v poloze C-20.

Homodimerizace derivátu (**18**) neposkytovala výsledky, kvůli sterické zábraně objemné molekuly. Reakce neprobíhala v přítomnosti Grubbsova katalyzátoru prvního, ani druhého typu a ani za působení mikrovlnného záření, které se osvědčilo jako účinný

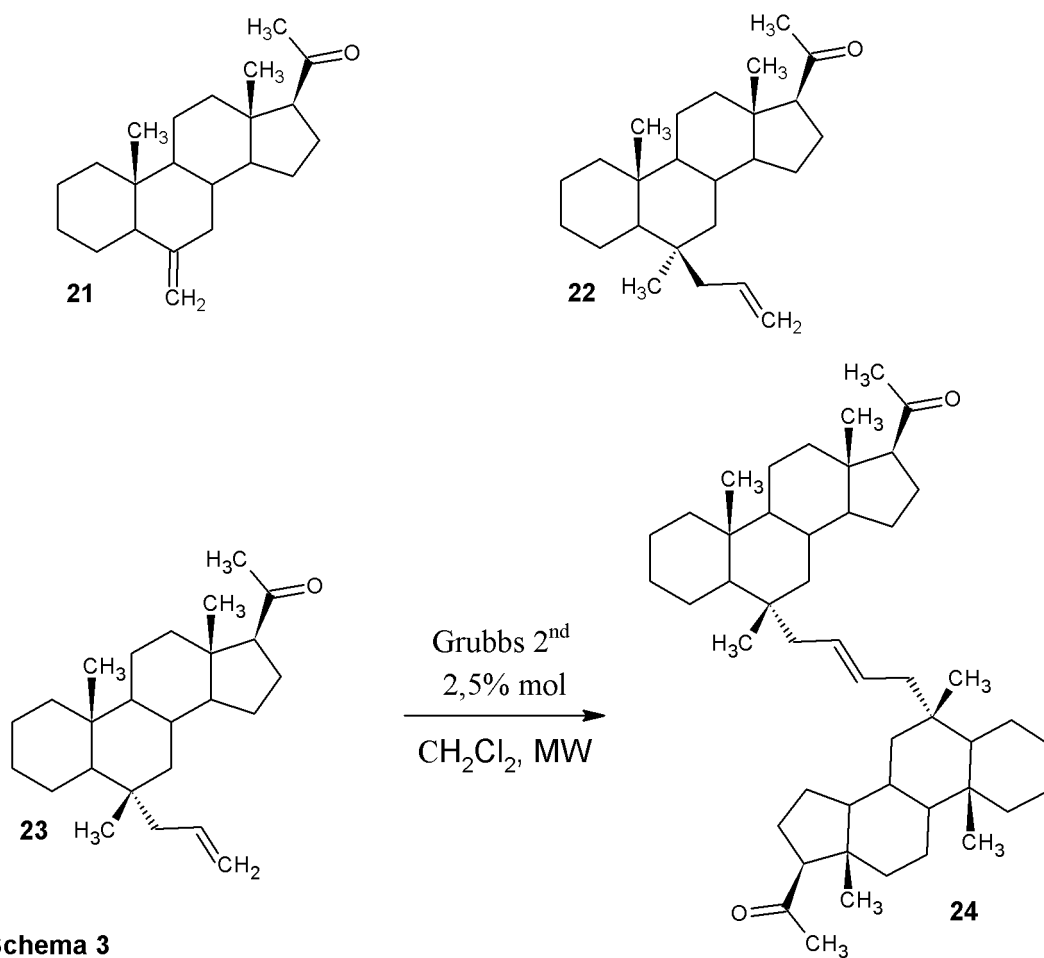


urychlovač cross-metatezí mezi deaktivovanými a terminálními olefiny.<sup>47</sup> Reakce s derivátem (**19**) poskytovala produkt s Grubbovým katalyzátorem druhé generace (10%) a v mikrovlnném reaktoru s výtěžek 97 % (**Schéma2**). Při reakci za přítomnosti Grubbova katalyzátoru prvního typu k reakci nedocházelo vůbec.



- Homodimerizace na postranních řetězcích, kruhu B v poloze C-6.

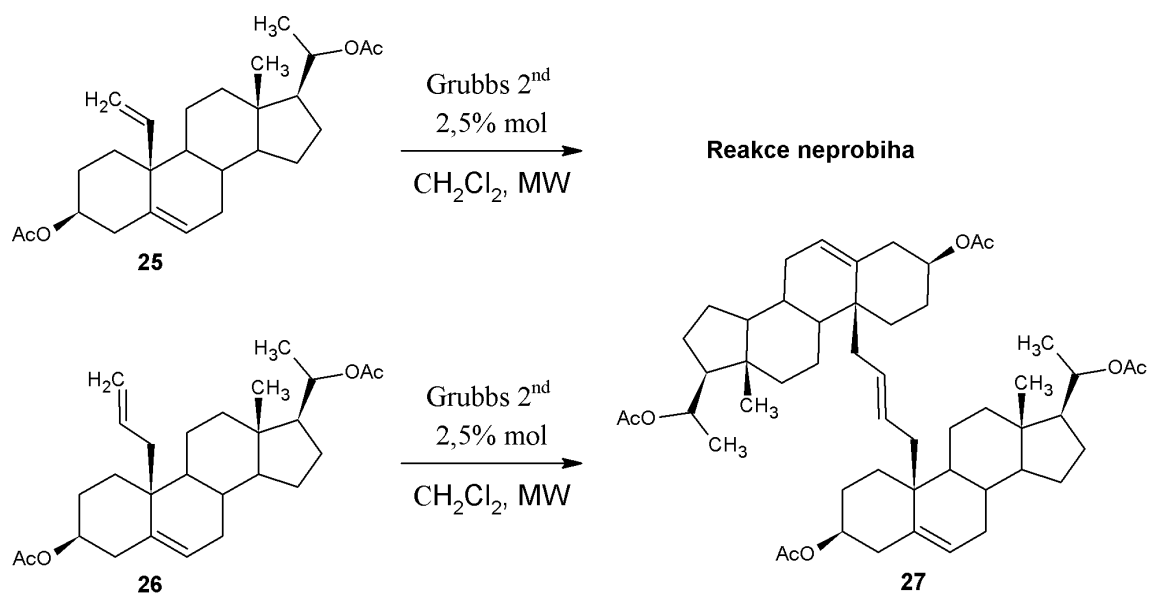
Této reakci byly podrobeny deriváty (**21-23**). Metateze probíhala v DCM, za použití Grubbova katalyzátoru druhé generace (2,5% mol) v mikrovlnném reaktoru. U 1,1- disubstituovaného alkenu **21** nedocházelo ke vzniku produktu, stejně tak u sloučeniny **22** s allylovou skupinou orientovanou do axiální roviny. Zato steroid **23** poskytl produkt za vzniku dimeru **24** (**Schéma 3**). Podle analýzy NMR docházelo z 95 % ke vzniku E-izomeru. Směs izomerů nebyla separována na sloupcové chromatografii, ale přečištěná rekrystalizací z 2-propanolu.



**Schema 3**

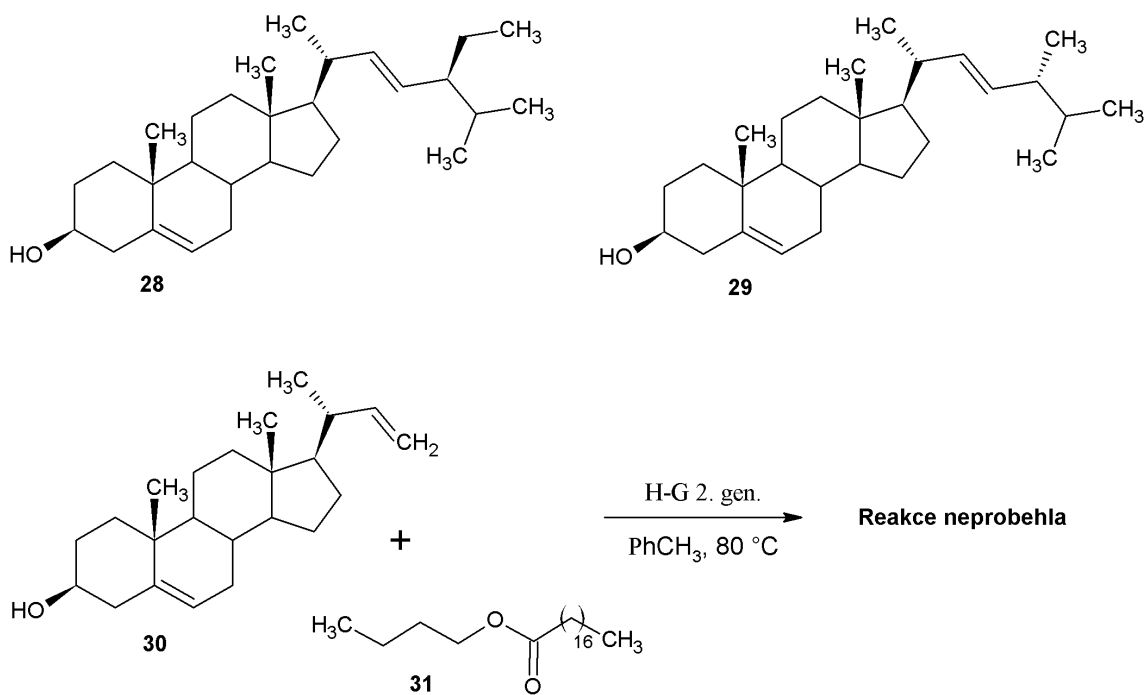
- Homodimerizace na postranních řetězcích v poloze C-19

Stejným způsobem byly podrobeny metatezím deriváty **25** a **26**. Zatím co olefin **25** nedimerizoval, jeho prodloužený a tedy méně prostorově bráněný derivát **26** ano, ve formě *E*-izomeru (**27**) v 64% výtěžku (**Schéma 4**).



**Schema 4**

Steroidy obsahující C22-C23 dvojnou vazbu v postranním řetězci, například stigmasterol (**28**) a ergosterol (**29**), byly často používány pro syntézu různých, lékařsky důležitých sloučenin, například derivátů vitamínu D hydroxylovaných na postranních řetězcích. Za tímto účelem byly provedeny cross-metateze. Nicméně předběžná studie naznačila, že steroidy s C22-C23 dvojnými vazbami jsou špatně dostupné i pro moderní metatezní katalyzátory a to navzdory tomu, že je známo, že ty umožňují provedení různě náročných metatezí včetně tvorby tetrasubstituovaných dvojných vazeb. Ukázalo se tedy, že k reakcím na takto stericky blokovaných allylových dvojných vazbách nedochází a to ani s jednoduchými koncovými olefiny (například ethylenem). Tyto reakce byly prováděny při 80 °C v suchém toluenu ( $c = 9-12 \text{ mmol/L}$ ), do kterého byl přidán roztok steroidu (**30**) za přítomnosti 10 mol% Hoveyda-Grubbsova katalyzátoru druhé generace a 2 ekvivalenty olefinu, například 3-butenyl stearátu (**31**). Během 24 h bylo dvakrát přidáno dalších 5 mol% katalyzátoru<sup>48</sup> (**Schéma 5**).



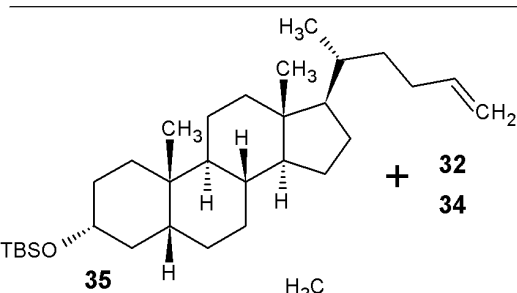
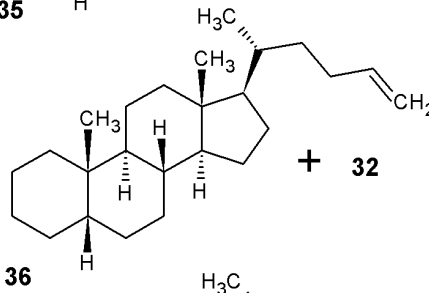
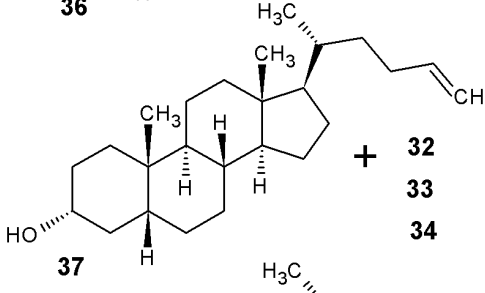
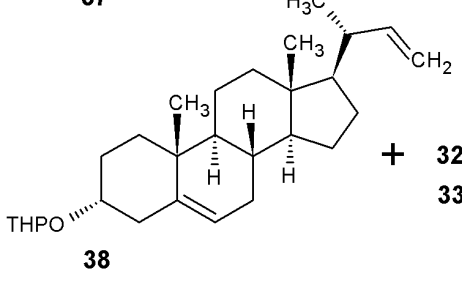
Schema 5

## Příprava perfluoralkylovaných derivátů pomocí cross metatezí

Na bázi cross-metatezí byla vyvinuta nová metoda pro přípravu perfluoralkylovaných sloučenin. Pro tento typ reakcí byl použit vysoce účinný a selektivní Hoveyda-Grubbsův katalyzátor druhé generace. Tato metoda, jak již bylo popsáno, umožňuje přípravu široké škály produktů za velice příznivých podmínek. Například vinylových aromatických uhlovodíků, isoprenoidů a sacharidů.

Již dříve byly známé cross-metatezní reakce (perfluoralkyl) ethenů, bylo však nutné použití alespoň desetinásobného nadbytku fluorovaných alkenů vůči nefluorovaným reaktantům. Nicméně se vzrůstající vzdáleností perfluorovaných skupin od reakčního centra rychle klesá síla jejich indukčních efektů, z toho důvodu byly použity (3- perfluoralkyl)propeny, konkrétně: 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,9-tridekafluoronon-1-en [(perfluorohexyl)propen (32), 4,4,5,5,6,6,6-heptafluorohex-1-en [(perfluoropropyl)propen (33) a 4-(trifluoromethyl)-4,5,5,5-tetrafluoropent-1-en [(perfluoroisopropyl)propen (34).

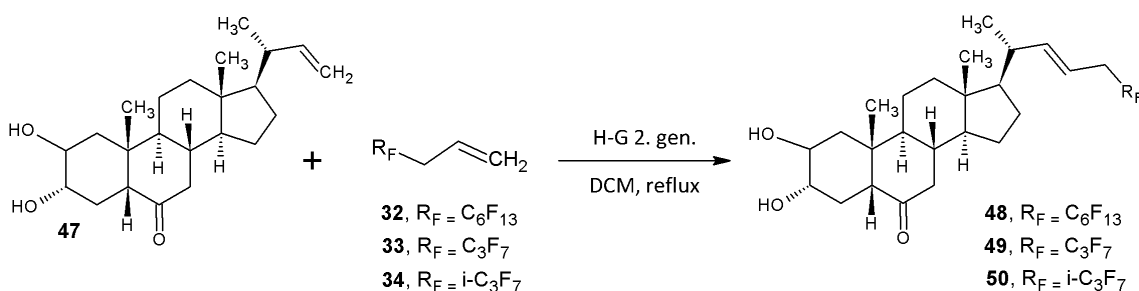
U těchto cross-metatezí bylo zjištěno, že je vhodné provádět tyto reakce v dichlormetanu za varu pod zpětným chladičem a za přítomnosti 10 mol % Hoveyda-Grubbsova katalyzátoru. V tomto případě je dostačující poměr (perfluoralkyl) propen : substrát 2 : 1, aby bylo dosaženo požadujících produktů v přiměřených výtěžcích. Při studiu reakcí s ohledem na odlišnost jednotlivých substrátů byly testovány cross-metatezní reakce s rozmanitou řadou alkenů. Všechny reakce byly prováděny až do zmizení výchozích látek nebo dokud již nebyl delší dobu pozorovatelný progres reakcí (**Tabulka 2**). Na základě těchto zkušeností bylo konstatováno, že se tyto perfluoralkyny chovají jako olefiny druhého typu dle Grubbsovy kategorizace olefinů.<sup>49</sup>

$\text{R}_F\text{-CH}_2\text{-CH=CH}_2$			
	<b>32</b> , $\text{R}_F = \text{C}_6\text{F}_{13}$		
	<b>33</b> , $\text{R}_F = \text{C}_3\text{F}_7$		
	<b>34</b> , $\text{R}_F = i\text{-C}_3\text{F}_7$		
Alken a	Alken b	Produkt ( <b>39-46</b> )	[%]
 <b>35</b>	+ <b>32</b>	<b>39</b>	<b>75</b>
	+ <b>34</b>	<b>40</b>	<b>63</b>
 <b>36</b>	+ <b>32</b>	<b>41</b>	<b>64</b>
 <b>37</b>	+ <b>32</b>	<b>42</b>	<b>70</b>
	+ <b>33</b>	<b>43</b>	<b>71</b>
	+ <b>34</b>	<b>44</b>	<b>75</b>
 <b>38</b>	+ <b>32</b>	<b>45</b>	<b>79</b>
	+ <b>33</b>	<b>46</b>	<b>81</b>

**Tabulka 2**

V další práci byly popsány tři typy brassinosteroidních analogů s různými perfluoroalkylovanými postranními řetězci syntetizovány pomocí cross-metatezních reakcí. Brassinosteroidy jsou důležité rostlinné hormony s potenciálními aplikacemi v agrochemii vzhledem k jejich schopnosti stimulovat růst i za nepříznivých podmínek.

Olefin (**47**) byl podroben reakcím s dvěma ekvivalenty perfluorohexyl- (**32**); perfluoropropyl- (**33**) a perfluoroisopropylpropenem (**34**).<sup>50</sup> Na základě předchozích zkušeností byl použit 10 mol% Hoveyda-Grubbsův katalyzátor druhé generace v dichlormethanu za refluxu po dobu čtyř hodin.<sup>49</sup> Ve všech případech docházelo k hladkému průběhu reakcí za vzniku perfluoroalkylovaných derivátů (**48-50**) v obstojných výtěžcích 59 – 71 %. Podle NMR analýzy docházelo ke vzniku geometricky čistých produktů, kdy byly získány u sloučeniny (**48**) a (**49**) čisté E izomery, pouze v případě (**50**) docházelo ke vzniku směsi izomeru E : Z v poměru 19:1 (**Schéma 6**).



**Schema 6**

Syntéza zajímavých derivátů, u kterých byla použita cross-metateze jako klíčový krok, byla použita pro syntézu výstavby spironolaktonové části antagonistů aldosteronu – drospirenonu. Ten vykazuje antimineralokortikoidní a antiandrogenní biologickou aktivitu, obdobnou jako přirozený hormon progesteron. Používá se jako perorální antikoncepce v kombinaci s ethinylestradiolem.<sup>51</sup> U metatezí se vycházelo z  $6\beta,7\beta;15\beta,16\beta$ -Dimethylen- $5\beta,17\alpha$ -pregn-20-en- $3\beta,5,17$ -triolu (**51**), který reagoval s pětinasobným nadbytkem methylakrylátu (**52**). V případě, že reakce probíhala v přítomnosti Grubbsova katalyzátoru první generace, k reakci nedocházelo. Pokud byl použit Grubbsův katalyzátor druhé generace, tak reakce probíhala, ale bylo potřeba velké množství katalyzátoru (12 mol%) a výtěžky byly poměrně nízké (55 %). Z toho důvodu

byl vyzkoušen Hoveyda-Grubbsův katalyzátor druhé generace (6 mol%), čímž byl získán požadovaný produkt (**53**) v 80% výtěžku.<sup>52</sup> (Schéma 7)

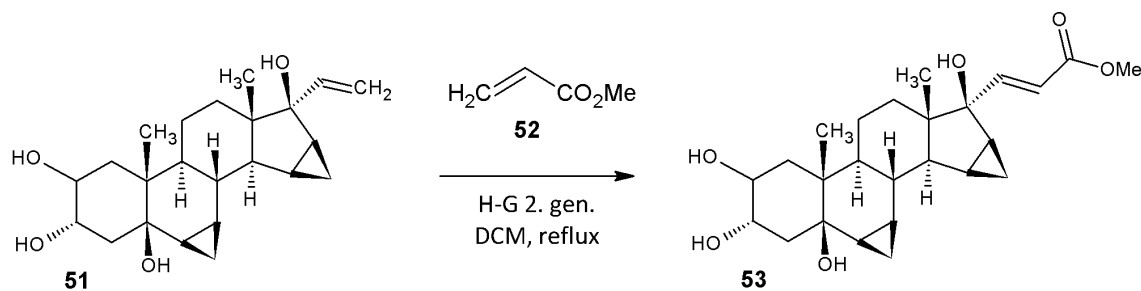


Schéma 7

## Příprava inhibitorů typu 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenázy 1

Cross-metateze byla použita také jako jeden mezikrok při přípravě několika hybridních inhibitorů typu 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenázy 1. Vycházelo se z allylestradiolu (**54**) a lineárního terminálního olefinu (**55**), za účelem prodloužení postranního řetězce na C-16. Reakce probíhala v dichlormethanu za použití Grubbsova katalyzátoru při refluxu po dobu 16 h s výtěžkem 55 % (**56**) (Schéma 8).<sup>44</sup>

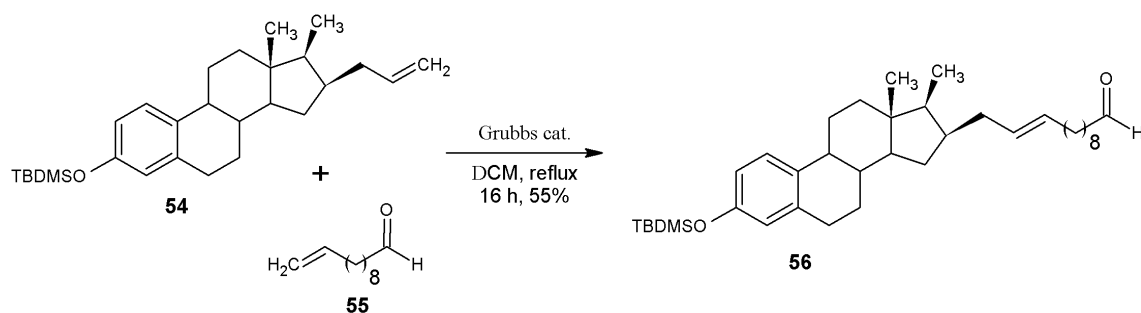
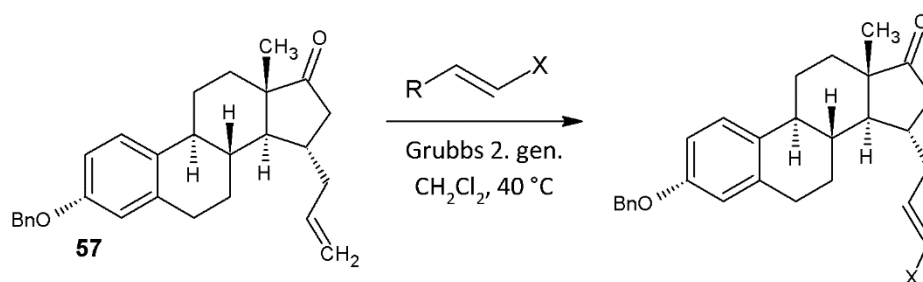


Schéma 8

Pro syntézu nového inhibitoru 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenázy typu 1 byla použita metateze 15-propenyl estronu (**57**) s rozličnými alkeny za použití homogenní a heterogenní katalýzy komplexů ruthenia, docházelo tak ke vzniku ochráněných nenasycených klíčových meziproduktů (**58-65**) tohoto inhibitoru (Schéma 9). Reakce probíhala za použití Grubbsova katalyzátoru druhé generace v dichlormetanu při teplotě 40 °C po dobu dvou a půl hodin, ve výtěžku 97 %. Při provedení reakce v mikrovlnném

reaktoru při 80 °C po dobu 10 minut došlo ke snížení výtěžku na 79 %. Reakce byla prováděna také v 1,2-dichlorethanu při 80 °C se získáním taktéž uspokojivých výtěžků, pohybujících se kolem 60 %. Za účelem optimalizace byla vyzkoušena i další rozpouštědla, která se ale ukázala být nevýhodná. V toluenu, chlorbenzenu, dichlorbenzenu a ethylacetátu docházelo k výtěžkům reakcí pohybujícím se pouze mezi 25 % až 30 %, v dioxanu, tetrahydrofuranu, chloroformu, acetonu, dimethylformamidu a dimethylsulfoxidu nedocházelo k reakcím vůbec nebo maximálně do 10 %.<sup>53</sup>



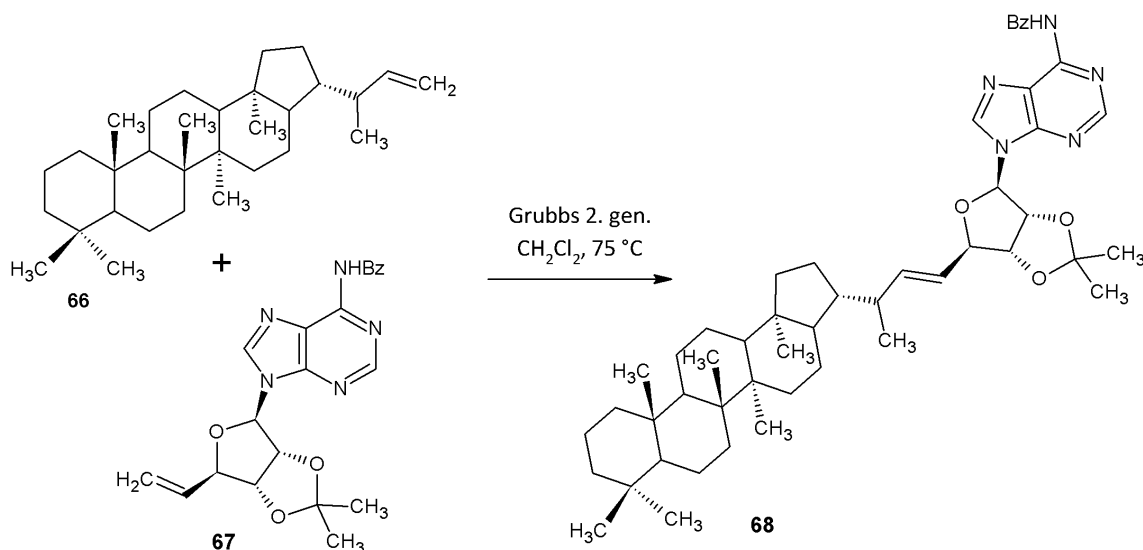
X	R	Produkt (54-61)	[%]
-CO <sub>2</sub> Me	H	<b>58</b>	97
-CO <sub>2</sub> Me	Me	<b>59</b>	94
-CO <sub>2</sub> H	H	<b>60</b>	88
-CONH <sub>2</sub>	H	<b>61</b>	61
	H	<b>62</b>	51
	H	<b>63</b>	62
-OAc	H	<b>64</b>	86
-Ph	H	<b>65</b>	76

**Schema 9**



## Další zajímavé cross-metateze

Cross-metateze se ukázala být také jako vysoce efektivní metoda pro syntézu adenosylhopanu a jeho deuterovaného analoga. U této metody se vycházelo z (2*S*)-Homohop-30-enu (**66**) a 5'-deoxy-5'-metylenadenosinového derivátu (**67**), bylo zjištěno, že tento přístup byl jako jediný schopný spojovat dva vysoce bráněné protějšky, což zajistilo možnost celkové kontroly všech stereogenních center. Reakční směs byla připravována v dichlormethanu za použití Hoveyda-Grubbsova katalyzátoru druhé generace pod inertní atmosférou argonu a laboratorní teploty (**Schéma 10**). Výsledný roztok byl přes noc zahříván na teplotu 75 °C v tlakové trubici (Ace sklo). Reakce dávala vzniku pouze 13 % požadovaného produktu (**68**), v případě provádění reakce za účasti mikrovlnného záření došlo ke zvýšení výtěžnosti reakce na 59 %.<sup>54</sup>



Schema 10

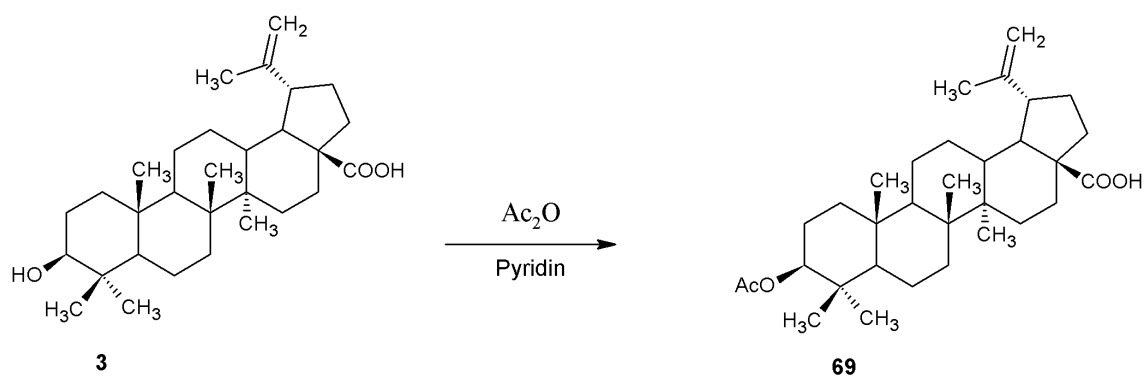
# Výsledky a diskuse

Na úvod kapitoly Výsledky a diskuse bych chtěl podotknout, že jsou schémata v této části diplomové práce očíslována římsky, na rozdíl od kapitoly Teoretická část, kde bylo zvoleno číslování arabské, a to pro lepší čtenářovu orientaci. Byla tím oddělena vlastní práce autora.

## Příprava výchozích olefinů

V rámci této práce bylo studováno několik typů dvojných vazeb v různé vzdálenosti od stericky náročného lupanového skeletu. Nejprve byla krátce studována reaktivita dvojně vazby v poloze 20(29). U této vazby jsme dle precedentů ze steroidní chemie<sup>47,48</sup> nepředpokládali vznik produktů metateze, bylo ale nutné to ověřit, protože tato vazba se vyskytuje ve většině lupanových derivátů a její reaktivita by mohla vést ke vzniku řady vedlejších produktů a v případě její vhodnosti pro metateze by sama mohla sloužit pro přípravu nových derivátů. Během výzkumu se potvrdilo, že dvojná vazba 20(29) betulinu (**2**) či kyseliny betulinové (**3**) nebyla pro metatezní reakce přístupná. Aby bylo možné provést studium těchto reakcí, bylo potřeba do těchto molekul zavést reaktivnější dvojnou vazbu a to do větší vzdálenosti od stericky bráněných polycyklických triterpenoidních skeletů. Za tímto účelem bylo připraveno několik výchozích látek.

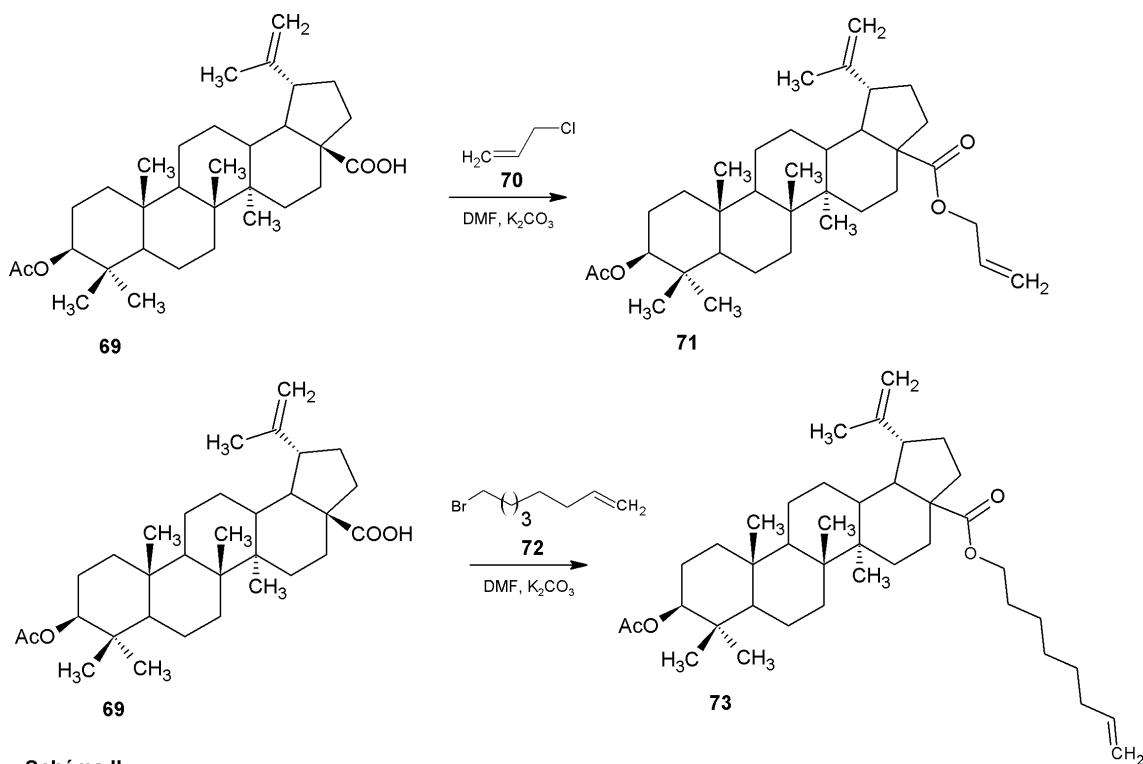
Vzhledem k tomu, že není možné vyloučit citlivost grubbsových katalyzátorů na řadu funkčních skupin, byla nejprve provedena acylace volné hydroxylové skupiny kyseliny betulinové (**3**). Ta byla prováděna dvou molárním nadbytkem acetanhydridu v pyridinu, čímž docházelo ke vzniku produktu (**69**) ve výtěžku 86 %. (**Schéma I**)



**Schema I**

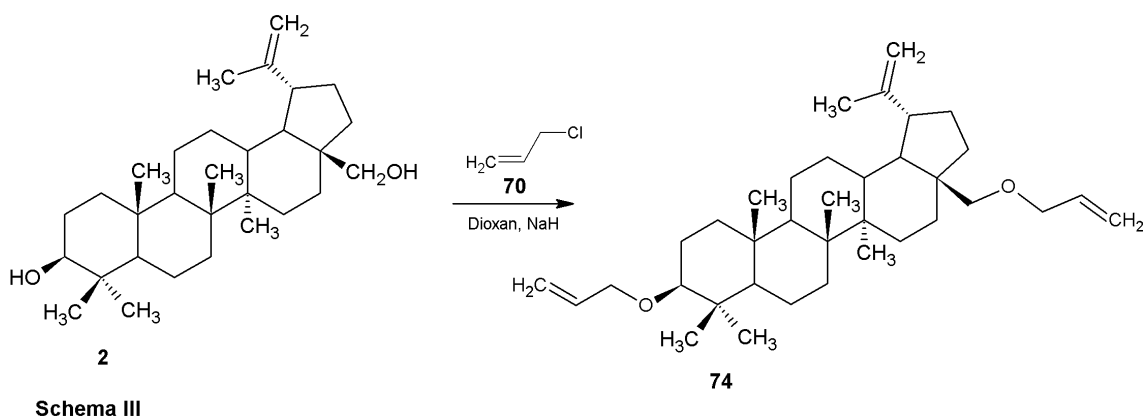
V dalším kroku reagovala monoacetylovaná kyselina betulínová (**69**) s 3-molárním nadbytkem allylchloridu (**70**) v DMF (dimethylformamidu) za přítomnosti uhličitanu draselného jako báze, výtěžek produktu (**71**) se pohyboval kolem 79 %. Stejným způsobem bylo dosaženo monoacetylovaného oktenyl esteru kyseliny betulínové (**72**), ke kterému vedla reakce s 8-bromo-okta-1-enem (**73**) produkt byl získán ve výtěžku 73 %.

**(Schéma II)**



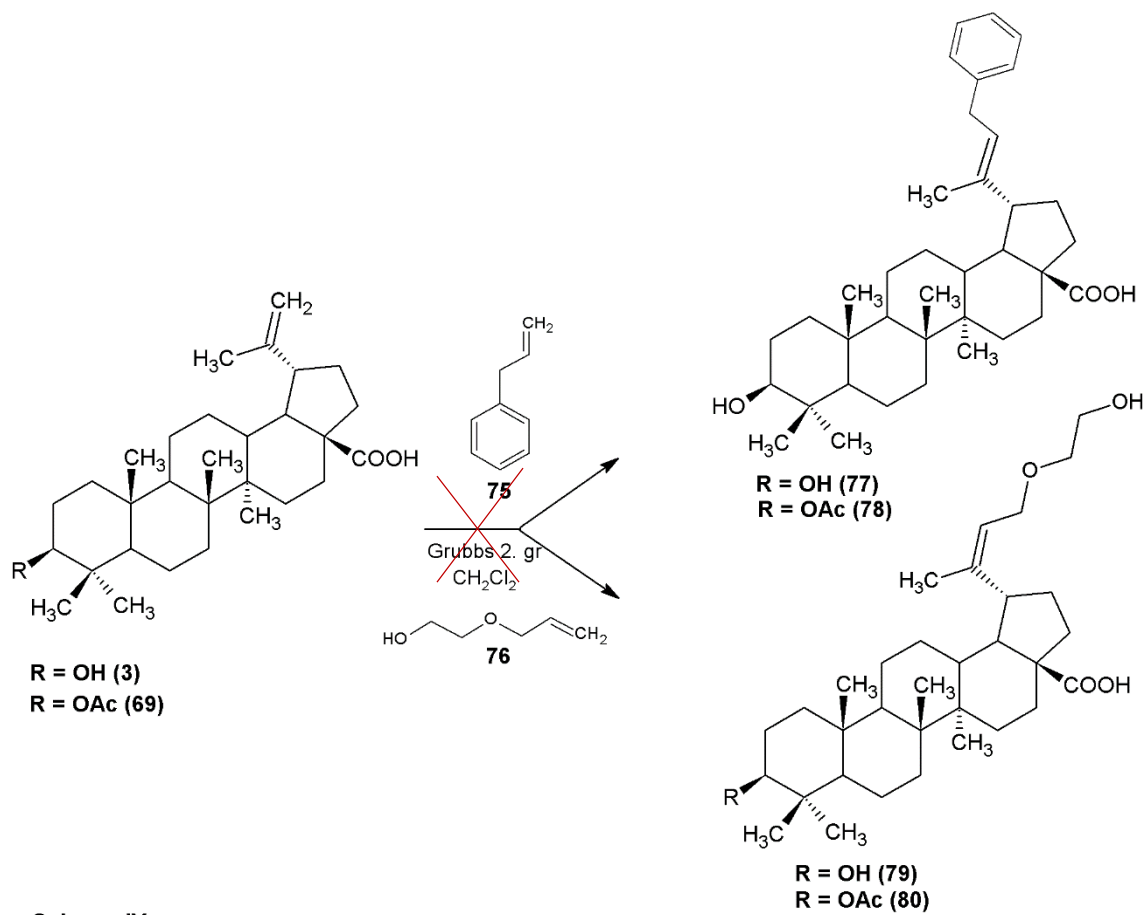
**Schéma II**

Diallylovaný derivát betulinu (**74**) vznikl reakcí betulinu (**2**) s tří molárním nadbytkem allylchloridu (**70**) v dioxanu a za použití hydridu sodného jako báze, výtěžek reakce se pohyboval kolem 75 %. (**Schéma III**)



## Pokusy o metatezi na vazbě 20(29)

Metateze byly prováděny nejprve na kyselině betulinové (**3**) a acylované kyselině betulinové (**69**). Jako terminální olefiny, byly pro počáteční studium metatezních reakcí vybrány allylbenzen (**75**) a allyloxy ethanol (**76**). Reakce probíhaly za katalýzy Grubbsova katalyzátoru první a druhé generace v dichlormethanu při 42 °C. Ani v jednom případě nedocházelo ke vzniku produktů, viz **Schéma IV**.



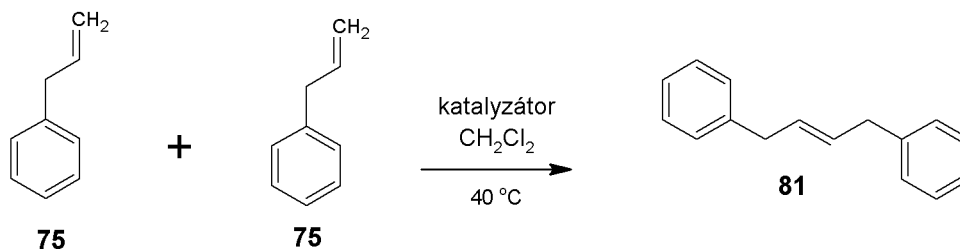
Schema IV

Byla provedena řada experimentů, při kterých byly různě obměňovány reakční podmínky, katalyzátory, molární poměry reagentů, a reakční časy viz **Tabulka 3**. Ani jeden experiment nevedl ke vzniku požadovaného produktu. Reakce neprobíhaly pravděpodobně ze sterických důvodů a tím byla potvrzena nereaktivita dvojné vazby v poloze 20(29) vůči metatezím. V následujících experimentech jsme se tak neobávali vzniku neočekávaných vedlejších produktů se substituentem v poloze 20.

Kys. betulínová (ekv.)	Allylbenzen (ekv.)	katalyzátor	teplota	Čas (h)	produkt
1	1	Grubbs. 2. gr. 10%	42 °C	6	-
1	1	Grubbs. 2. gr. 10%	42°C	24	-
1	1	Grubbs. 2. gr. 10%	42°C	72	-
1	1	Grubbs. 2. gr. 10%	40 °C	měsíc	-
1	1	Grubbs. 2. gr. 15%	42 °C	72	-
1	2	Grubbs. 2. gr. 15%	42°C	72	-
1	1	H-G 2. gr 10%	42°C	6	-
1	1	H-G 2. gr 10%	42°C	24	-
1	1	H-G 2. gr 15%	42°C	24	-
1	1	H-G 2. gr 15%	42°C	měsíc	-
1	2	H-G 2. gr 15%	42°C	72	-

**Tabulka 3**

U reakcí s allylbenzenem (**75**) docházelo ke vzniku pouze jednoho produktu a to dimeru (**81**) vstupujících, prostorově nenáročných olefinů, jak naznačuje **Schéma V**.



**Schema V**

Jeden z faktorů, který mohl být odpovědný za nereaktivitu triterpenoidních struktur, mohla být také přítomnost hydroxylových a karboxylových funkčních skupin.

Aby byla tato možnost vyvrácena, byly provedeny metateze s betulinem diacetátem (**82**). V tomto případě byly jako terminální alekny zvoleny allylbenzen (**75**) a 8- bromookta- 1- en (**72**). Ani tyto reakce nevedly k požadovaným výsledkům a tak byla tato reakční centra označena za nereaktivní a dál jim nebyla věnována pozornost. (Schéma VI).

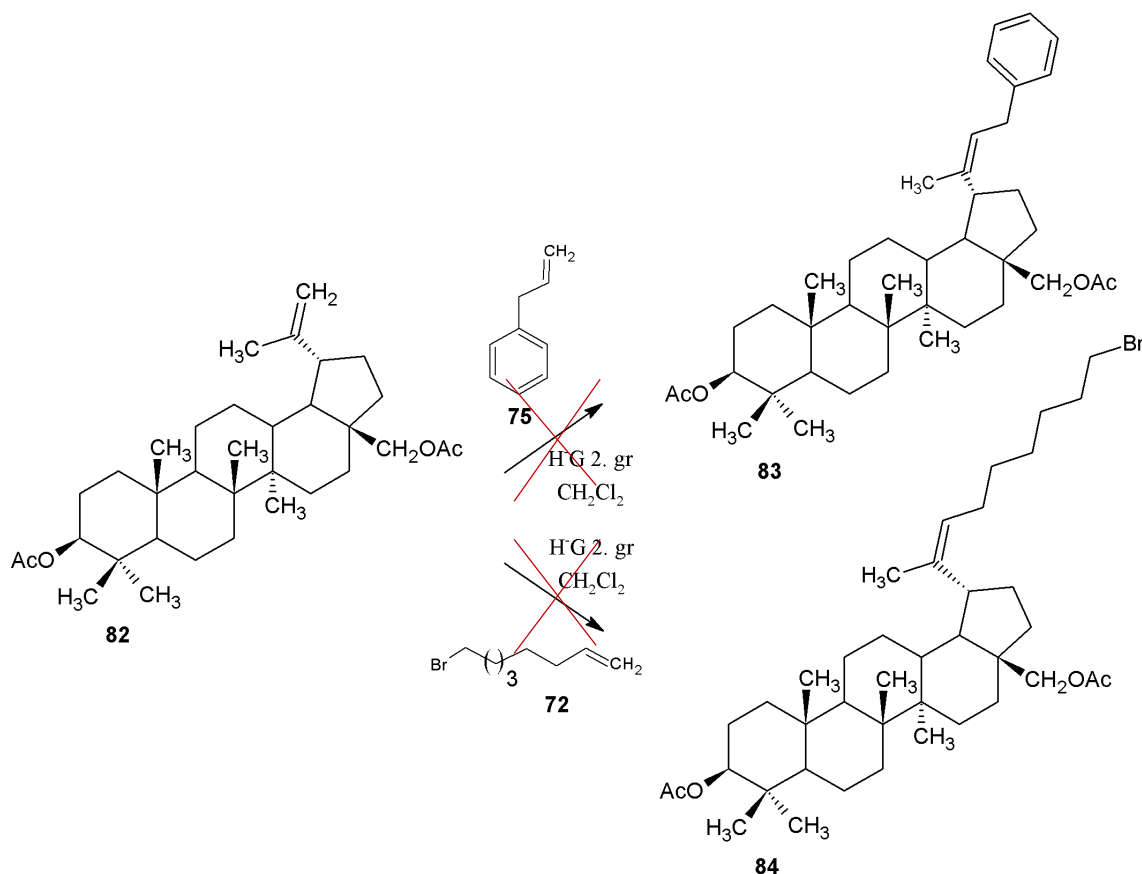


Schéma VI

## Pokusy o metatezi na allylu a oktenylu

Vzhledem k popsané nereaktivitě dvojné vazby 20(29) v molekulách betulinu (**2**) a kyseliny betulinové (**3**) jsem se pokusil oddálit olefinickou skupinu zavedením allylové a oktenylové skupiny a tak ji pro metateze více zpřístupnit. I v tomto případě byla nejprve snaha o provedení metatezí s allylbenzenem (**75**), allyloxy ethanolem (**76**) a

8-bromookta-1-enem (**72**), ale ani tentokrát nedocházelo ke vzniku požadovaných výsledků, navzdory tomu, že jsou tyto reagenty olefiny prvního typu (reaktivní, málo objemné alkeny u kterých dochází rychle ke vzniku homodimerů, ty jsou však nestabilní, rozpadající se na výchozí olefiny a jsou tak ochotny dále reagovat se stericky náročnějšími olefiny).

Z toho důvodu byla snaha také o metateze s olefiny druhého a třetího typu, tedy takovými olefiny, u kterých v prvním případě dochází ke vzniku homodimerů pomalu, ale nevratně a v druhém případě k nim nedochází vůbec. Může tak dojít, pokud jsou vhodné stericke podmínky druhého terminálního alkenu, k selektivním cross-metatezím.

Jako zástupce olefinů druhého typu byl zvolen but-3-en-2-on (**85**) a olefin třetího typu 3,3-dimethylbut-1-en (**86**) a 2-methylbut-3-en-2-ol (**87**). Všechny reakce byly prováděny v dichlormetanu při 42 °C. Ani v těchto případech nedocházelo k dostatečné reaktivitě. (Schéma VII)

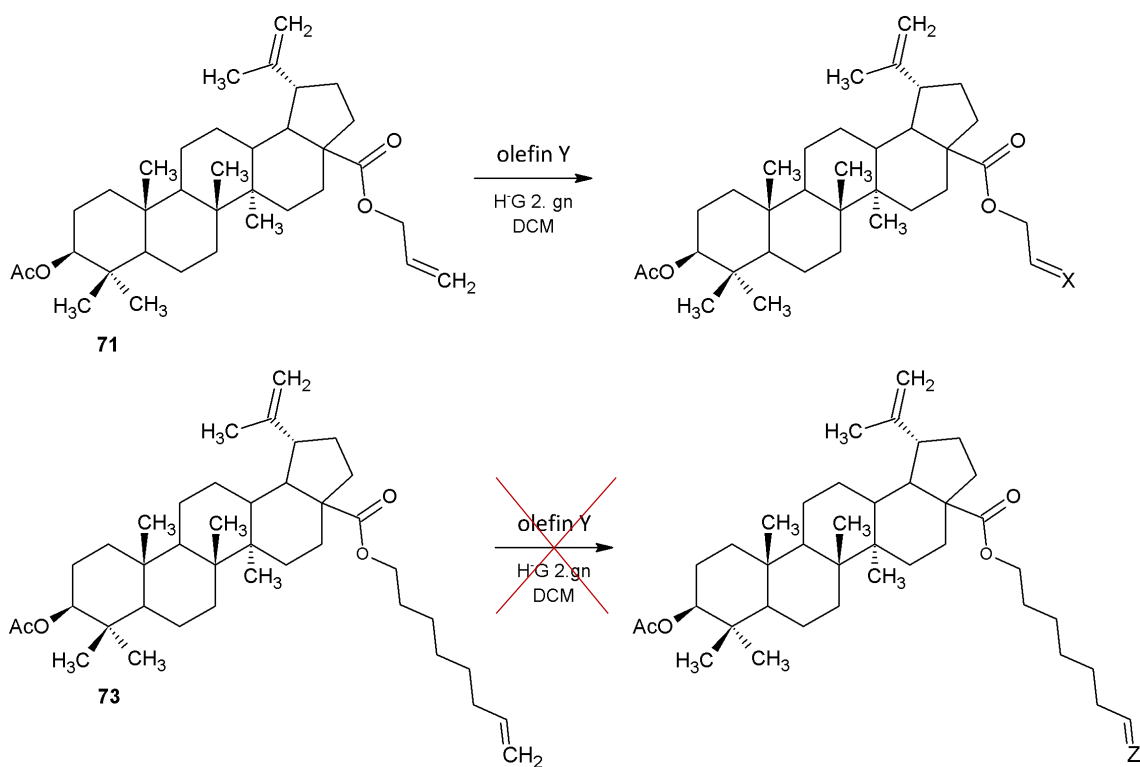
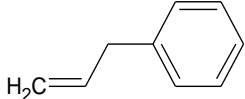
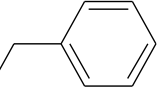
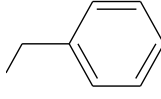
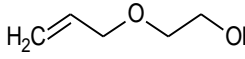
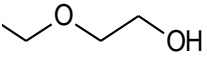
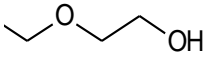
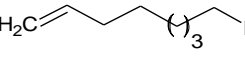
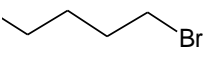
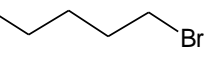
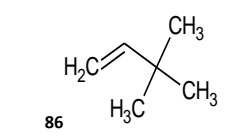
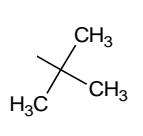
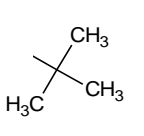
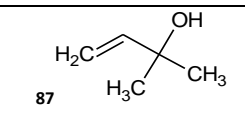
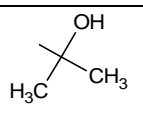
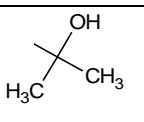
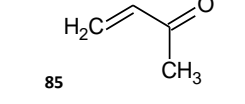
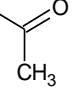
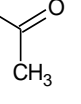


Schéma VII



I v případě metatezí na těchto derivátech byla prováděna řada optimalizací. Pokoušel jsem se upravovat reakční doby, množství katalyzátorů, či reagentů, ale i přidávat katalyzátory v průběhu reakce. Dle TLC destiček sice docházelo ke vzniku několika produktů, měly ale blízké R<sub>f</sub> a z velké části nedocházelo k odreagování výchozí látky. Byla vynaložena snaha o separaci vedlejších produktů, nicméně neúspěšná. Podařilo se izolovat pouze produkt (**93**) viz **Tabulka 4**, ale byl o nízké čistotě a to po třech sloupcových chromatografiích, při čtvrté sloupcové chromatografii nebylo získáno dostatečné množství produktu na NMR analýzu. Reakce byla provedena také v toluenu za refluxu, ale žádné výhody to nepřineslo.

Olefin Y	BETULIN		Kyselina BETULINOVÁ	
	Číslo produktu	X =	Číslo produktu	Z =
	<b>88</b>		<b>94</b>	
	<b>89</b>		<b>95</b>	
	<b>90</b>		<b>96</b>	
	<b>91</b>		<b>97</b>	
	<b>92</b>		<b>98</b>	
	<b>93</b>		<b>99</b>	

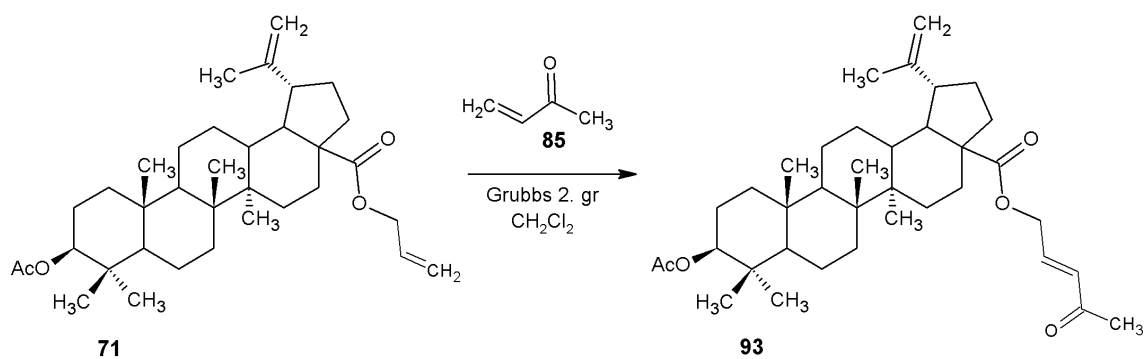
**Tabulka 4**

## Pokusy o metateze při aktivaci mikrovlnným zářením.

Vzhledem k tomu, že jednou z možností, jak provést neochotně probíhající metateze, je využití mikrovlnného záření, byla poslední fáze výzkumu v rámci této diplomové práce orientována metatezím derivátů kyseliny betulinové (**71**) a derivátu (**73**) probíhajícím v mikrovlnné troubě. Metateze derivátu (**73**) byly provedeny s but-3-en-2-onem (**85**) a 2-methylbut-3-en-2-olem (**87**) nejprve v dichlormethanu při 100 °C, byl to však příliš velký rozdíl oproti teplotě varu tohoto rozpouštědla (39 °C), docházelo k přehřátí reakční směsi a explozivnímu vzkypění ze zkumavky ven a tak byl zvolen jako rozpouštědlo dichlorethan a posunuta reakční teplota na 110 °C. V tomto případě nedocházelo k úplnému doreagování výchozí látky a vzhledem ke sterické jednoduchosti olefinické terminální dvojně vazby výchozí látky (**73**) docházelo ke vzniku směsi látek, které se nepodařilo separovat.

Metateze allyl esteru (**71**) byly prováděny s but-3-en-2-onem (**85**) v dichlorethanu za použití Hoveyda-Grubbsova katalyzátoru při 110 °C. V tomto případě docházelo ke 100 % konverzi výchozí látky a to převážně na produkt (**93**) viz **Schéma IX**. Tato reakce byla velmi rychlá. Nejprve jsem ji nechal reagovat 40 minut v mikrovlnném reaktoru, ale výchozí látka nebyla zcela odreagovaná, do reakční směsi bylo přidáno další 5% mol katalyzátoru. Bylo nutné provedení sloupcové chromatografie, spolu s produktem (**93**) docházelo ke vzniku jednoho minoritního vedlejšího produktu, který se podařilo izolovat nicméně nebyl dostatečně čistý na NMR analýzu. Hlavním izolovaným produktem však byla sloučenina **93**, a tak se poprvé v rámci této práce podařilo úspěšně provést metatezi na triterpenoidním derivátu. Struktura molekuly **93** byla potvrzena na základě spektrálních dat. V <sup>1</sup>H NMR spektru je zejména patrná přítomnost obvyklých signálů lupanového skeletu, konkrétně pět singletů při  $\delta$  0.97 odpovídající pěti methylovým skupinám a jednomu singletu při  $\delta$  1.70 odpovídající methylové skupině CH<sub>3</sub>-30. Dále je přítomen triplet dubletů při  $\delta$  3.00, který odpovídá jádru H-19 $\beta$ , a dva signály při  $\delta$  4.62 a 4.74 charakteristické pro vodíky na dvojně vazbě (H-29 *pro E* a H-29 *pro Z*). O zachování acetátu svědčí přítomnost singletu 3H při  $\delta$  2.04. Ve spektru jsou také signály 31-CH<sub>2</sub> skupiny při  $\delta$  4.76, signály H na dvojně vazbě při  $\delta$  6.29 a 6.79 ppm, jejichž

interakční konstanty svědčí pro *trans* uspořádání. Důležitým důkazem, který potvrzuje strukturu molekuly **93** a úspěšné provedení metateze je také přítomnost singletu 3H při  $\delta$  2.29, který odpovídá methylové skupině v sousedství ketonu. V  $^{13}\text{C}$  NMR spektru jsou kromě charakteristických signálů uhlíků dvojné vazby 20(29) při  $\delta$  110 a 150 ppm také signály nové dvojné vazby při  $\delta$  131 a 140 ppm.



Schema IX

Další metateze nebyly z časového hlediska již provedeny, ale jak se ukázalo, toto je správná cesta pro vývoj těchto reakcí.

# Závěr

Cílem této diplomové práce bylo provedení rešerše na téma „Studium metatezí na triterpenoidech s exoskeletálními dvojnými vazbami“ a dále pak převedení těchto reakcí do laboratorní praxe a to nejprve na betulinu (**2**) a kyselině betulinové (**3**), tedy na dvojně vazbě 20(29). Tyto reakce byly prováděny s allylbenzenem (**75**), allyloxyethanolem (**76**) a 8-bromookta-1-enem (**69**). Během počátečního zkoumání těchto reakcí byla zkoušena řada reakčních podmínek, byla vyzkoušena reaktivita Grubbsova katalyzátoru druhé generace a Hoveyda-Grubbsova katalyzátoru druhé generace, přičemž mezi nimi nebyly pozorovány výraznější rozdíly. Dále pak byly upravovány reakční doby jednotlivých reakcí a molární poměry jednotlivých reagentů. Ani v jednom případě nedocházelo ke vzniku žádného metatezního produktu, což mohlo být kvůli nestabilitě katalyzátorů vlivem funkčních skupin (OH nebo COOH) triterpenů a tak byly vyzkoušeny tyto metateze na betulinu diacetátu. Ukázalo se však, že k metatezím ani tak nedochází a tak bylo shledáno toto reakční centrum za nereaktivní při podmínkách obvyklých pro metatezní reakce.

Domnívali jsme se, že důležitý faktor, který hraje klíčovou roli při metatezních reakcích na triterpenoidech je vzdálenost terminální olefinické skupiny od stericky bráněného pentacyklického skeletu. Proto jsem se snažil oddálit dvojnou vazbu od molekuly kyseliny betulinové zavedením allylové a oktenylové skupiny. Dále tak byla věnovaná pozornost derivátům (**71**) a (**73**). I v tomto případě byla zavedena řada optimalizací, dle analýz TLC k reakcím sice docházelo, ale pokaždé zreagovala jen malá část výchozích látek a produkty byly identifikovány jen v malých množstvích a nedařilo se je izolovat, protože měly blízké retenční faktory při chromatografii, proto se nakonec podařilo izolovat pouze sloučeninu (**93**), v ne příliš čisté formě.

Posledním pokusem o provedení metatezí na terpenech bylo použití mikrovlnného reaktoru. I v tomto případě se reakce prováděly na allyl (**71**) a oktenyl (**73**) esteru kyseliny betulinové. Tento způsob se ukázal být jako průlomový, kdy došlo porvé zcela k odreagování výchozí latky a to konkrétně při reakci allyl esteru (**71**) s (**85**). Oktenyl ester (**73**) se ukázal být jako příliš reaktivní a podléhal metatezím za vzniku řady produktů, které se nepodařily separovat. Na druhou stranu allylester (**71**) poskytl jako

hlavní produkt očekávaný derivát **(93)** a tato reakce se tak stala prvním případem, kdy se podařilo provést metatezi na substituovaném terpenu. Z časového hlediska nebylo analogických reakcí provedeno více, ale do budoucna byl vytyčen směr, který by si zasloužil více pozornosti.

V neposlední řadě je nutno zdůraznit, že kromě prvního úspěšného provedení metateze na triterpenoidu bylo v rámci této diplomové práce připraveny a charakterizovány čtyři další nové sloučeniny **(71)**, **(73)**, **(74)** a **(93)**. Tyto deriváty jsou zde použity jako reaktanty metatezí. Všechny nové deriváty byly zaslány na testování jejich *in vitro* cytotoxické aktivity.

# Experimentální část

Měření teplot tání bylo provedeno na bodotávku PHMK 78/1586 (VEB Analytik Dresden) bez provedení korekce. TLC byla sledována na silikagelových deskách Polygram Sil G/UV254 s detekcí UV zářením. Měření spekter  $^1\text{H}$  bylo prováděno na přístroji JEOL s frekvencí 500 Hz v roztoku  $\text{CDCl}_3$  za laboratorní teploty. Jako vnitřní standard byl pro  $^1\text{H}$  spektra použit TMS a nebo byly referencovány na signály zbytkových rozpouštědel. Chemické posuny  $^{13}\text{C}$  NMR spekter byly referencovány vůči  $\delta(\text{CDCl}_3) = 77.00$  ppm. Hodnoty naměřených interakčních konstant a posunů byly stanoveny dle analýzy prvního řádu. Hodnoty  $\delta$  byly zaokrouhleny na dvě desetinná místa a hodnoty interakčních konstant na jedno desetinné místo, jak je zvykem v literatuře... Zpracování dat spekter bylo provedeno v programu JEOL Delta v 5.0.2. IR spektra byla měřena na FTIR spektrometru Nicolet iZ10 (Thermo Scientific) a zpracování dat ze střední oblasti ( $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ ), bylo provedeno v programu OMNIC 8.3.

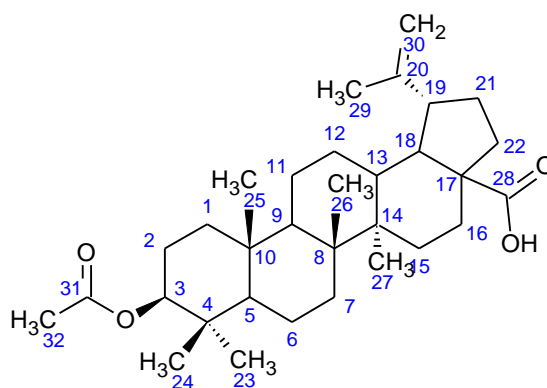
## *Chromatografické soustavy na TLC:*

S1	toluen	:	ethylacetát	7 : 3
S2	toluen	:	ethylacetát	10 : 1
S3	toluen	:	n-hexan	5 : 1
S4	toluen	:	n-hexan	1 : 1

# Příprava výchozích látek

## Příprava acetylované kyseliny betulinové (**69**)

Do roztoku kyseliny betulinové (**3**) (10 g; 1 ekv) v pyridinu (60 ml) byl přidán acetanhydrid (2 ekv.; 4,1 ml). Po 24 h míchání při r.t. byla reakce ukončena přidáním vody (10 ml) do reakční směsi, ta se nechala míchat další 3 h. Během toho došlo k částečnému vysrážení produktu, což bylo nežádoucí, protože se tak nestihl rozložit směsný anhydrid a tak byl produkt vyextrahován do ethylacetátu, odpařen na vakuové odparce a rekrystalizován. V roztoku methanol : chloroform 20 : 4. Bylo získáno 8,4 g (76,9 %) bílých krystalků acetylované kyseliny betulinové (**65**), t.t. 290-273 °C. Látka byla identifikovaná pomocí NMR. <sup>1</sup>H NMR spektrum bylo shodné se spektrem autentické sloučeniny z naší laboratoře



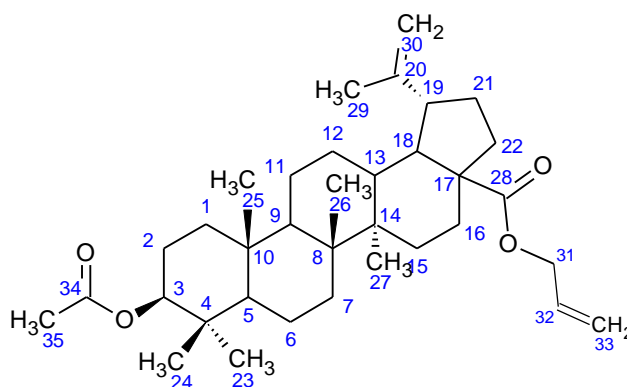
**Obrázek** acetylované kyseliny betulinové

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): 0.84 (s, 3H); 0.85 (s, 3H); 0.86 (s, 3H); 0.94 (s, 3H); 0.98 (s, 3H); 1.70 (s, 3H, 6 × Me); 2.05 (s, 3H, Ac); 3.01 (m, 1H, H-19β); 4.47 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 10.7 Hz, *J*<sub>2</sub> = 5.6 Hz, H-3α); 4.62 (dd, 1H, *J*<sub>1</sub> = 2.0 Hz, *J*<sub>2</sub> = 1.4 Hz, H-29 *pro E*); 4.75 (d, 1H, *J* = 2.3, H-29 *pro Z*)

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): 14.75, 16.12, 16.26, 16.55, 18.25, 19.44, 20.94, 21.40, 23.79, 25.53, 28.03, 29.78, 30.65, 23.24, 34.33, 37.12, 37.21, 37.89, 38.47, 38.51, 40.79, 42.51, 47.02, 49.36, 50.49, 55.51, 56.47, 81.04, 109.84, 150.46, 171.14, 181.72

## Příprava allylesteru acetylované kyseliny betulinové (**71**)

Kyselina betulinová (5g, 1 ekv.) (**3**) byla rozpuštěna v DMF, poté byly přidány 2 ekv. (3 g)  $K_2CO_3$  a reakční směs byla míchána po dobu 10 min, poté byly přidány 2 ekv. (1,78 ml) allylchloridu a reakční směs se nechala refluxovat po dobu 24 h. Produkt byl extrahován do ethylacetátu, vysušen a poté přečištěn na sloupcové chromatografii s fází S1. Bylo získáno 3,9 g (66,1 %) produktu ve formě bílé krystalické látky. t.t. 186-187 °C. Látka byla identifikovaná pomocí NMR.



**Obrázek** allylesteru acetylované kyseliny betulinové

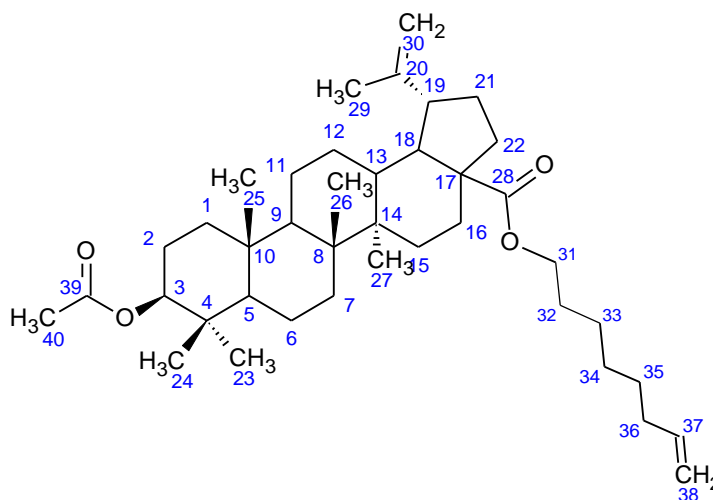
$^1H$  NMR ( $CDCl_3$ ): 0.84 (s, 3H); 0.85 (d,  $J = 0.9$ , 6H); 0.92 (s, 3H); 0.97 (s, 3H); 1.69 (s, 3H, 6 × Me); 2.05 (s, 3H, Ac); 2.24 (m, 2H); 3.01 (m, 1H, H-19 $\beta$ ); 4.48 (m, 1H, H-3 $\alpha$ ); 4.59 (m, 4H, H-32, 2 × H-33 a H-29 *pro Z*); 4.74 (d, 1H,  $J = 2.3$ , H-29 *pro Z*).

$^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ ): 14.75, 16.06, 16.57, 18.27, 19.44, 21.00, 21.40, 23.79, 25.59, 28.02, 29.72, 30.68, 32.22, 34.35, 37.09, 37.20, 37.89, 38.32, 38.50, 40.85, 42.49, 47.05, 49.56, 50.57, 55.53, 56.66, 64.66, 81.03, 109.71, 118.18, 132.66, 150.65, 171.09, 175.82.



## Příprava oktenylesteru kyseliny betulinové (**73**)

Kyselina betulinová (**3**) (5g, 1 ekv.) byla rozpuštěna v DMF, poté byly přidány 2 ekv. (3 g)  $K_2CO_3$  a reakční směs byla míchána po dobu 10 min, poté byly přidány 2 ekv. (3,8 ml) 8-bromookta1-enu a reakční směs se nechala refluxovat po dobu 24 h. Produkt byl extrahován do ethylacetátu, vysušen a poté přečištěn na sloupcové chromatografii s fází S1. Bylo získáno 3,3 g (49,5 %) produktu ve formě čiré, husté, viskozní látky, který počase vykrytalizoval do podoby bílých krystalků. t.t. 82-84 °C. Látka byla identifikovaná pomocí NMR.



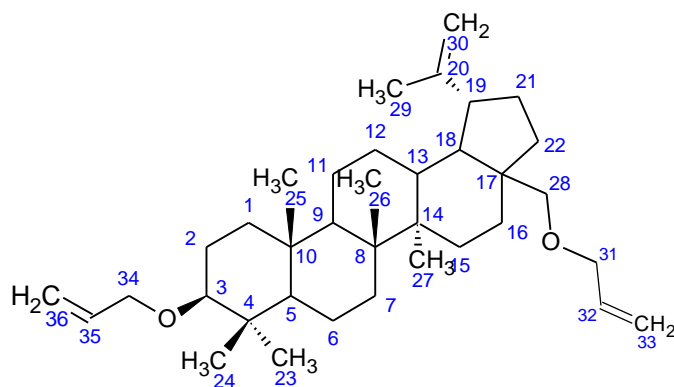
**Obrázek** oktenylesteru acetylované kyseliny betulinové

$^1H$  NMR ( $CDCl_3$ ): 0.84 (s, 3H); 0.85 (s, 6H); 0.92 (s, 3H); 0.97 (s, 3H); 1.70 (s, 3H, 6 × Me); 2.05 (s, 3H, Ac); 3.01 (td, 1H,  $J_1 = 10.9$  Hz,  $J_2 = 4.8$  Hz, H-19 $\beta$ ); 4.03 – 4.12 (m, 2H); 4.48 (dd, 1H,  $J_1 = 10.6$  Hz,  $J_2 = 5.6$  Hz, H-19 $\beta$ ); 4.61 (dd, 1H,  $J_1 = 2.3$  Hz,  $J_2 = 1.4$  Hz, H-29 *pro E*); 4.74 (d, 1H,  $J = 2.0$ , H-29 *pro Z*); 4.97 (m, 2H, H-38); 5.81 (m, 1H, H-37).

$^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ ): 14.17, 16.09, 16.27, 16.56, 18.26, 19.43, 21.02, 21.40, 23.78, 25.59, 26.07, 28.03, 28.77, 28.79, 28.91, 29.71, 30.74, 23.30, 33.75, 34.35, 37.15, 37.19, 37.88, 38.38, 38.49, 40.82, 42.50, 47.16, 49.49, 50.56, 55.52, 56.62, 64.00, 81.02, 109.67, 114.41, 128.30, 129.11, 139.01, 150.72

## Příprava výchozí diallylovaného betulinu (**74**)

Betulin (**2**) 1 ekv. (2,5 g) byl rozpuštěn v dioxanu (20 ml), poté byly přidány 3 ekv. (0,4 g) NaH a reakční směs se nechala míchat po dobu 20 min pod chlorkalciovým uzávěrem. Poté byly přidány 4,5 ekv. (2,1 ml) allyl chloridu a reakční směs se nechala reagovat po dobu 24 h. Reakce nebyla odreagovaná a tak byly do reakční směsi přidány další 2 ekv. (0,9 ml) allylchloridu a reakce se nechala reagovat dalších 5 h. Produkt (**69**) byl extrahován do ethylacetátu a přečištěn na sloupcové chromatografii s fází S2. Bylo získáno 1,9 g (64,4 %) produktu ve formě bílých krystalků, t.t. 131-134 °C. Látka byla identifikovaná pomocí NMR.



Obrázek diallylovaného betulinu

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 0.79 (s, 3H); 0.84 (s, 3H); 0.97 (s,  $J = 2.6$ , 3H); 1.03 (s, 3H); 1.27 (br. s, 3H); 1.69 (s, 3H,  $6 \times \text{Me}$ ); 1.97 (m, 4H); 2.40 (m, 1H); 2.81 (dd, 1H,  $J_1 = 11,7$  Hz,  $J_2 = 4.3$  Hz); 3.10 (d, 1H,  $J = 9,2$  Hz); 3.54 (m, 1H); 3.62 (m, 1H); 3.89 (m, 1H); 3.98 (t, 1H,  $J = 5.98$  Hz, H-19 $\beta$ ); 4.13 (m, 1H); 4.58 (dd, 1H,  $J_1 = 2.3$  Hz,  $J_2 = 1.4$  Hz, H-29 *pro E*); 4.69 (d, 1H,  $J = 2.0$  Hz, H-29 *pro Z*); 4.13 (dq,  $J_1 = 10.3$  Hz, 1H); 5.19 (m, 1H); 5.28 (m, 2H); 5.93 (m, 2H,  $6 \times \text{H allylů}$ ).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 14.20, 14.85, 16.05, 16.19, 16.41, 18.35, 19.20, 20.97, 22.78, 23.23, 25.34, 27.30, 28.18, 29.79, 30.07, 34.33, 34.90, 37.22, 37.57, 38.72, 38.96, 41.08, 42.74, 47.32, 48.07, 48.99, 50.51, 55.94, 68.31, 70.75, 72.56, 86.44, 115.97, 116.70, 135.54, 136.04

## Jednotlivé metatezní reakce – obecné postupy

Látka **Y** ((2)/(3)/(69)/(71)/(73)/(74)) (1 ekv., 0,1 g) byla pod proudem dusíku rozpuštěna v dichlormethanu (3 ml), poté byl přidán terminální alken (**G**) ((72)/(75)/(76)/(85)/(86)/(87))

### 1. 1 ekvivalent G a Hoveyda-Grubbsův katalyzátor druhé generace

- a) 10 mol%, do reakční směsi bylo přidáno několik kuliček molekulového síta a rychle uzavřen uzávěr. Reakce se nechala reagovat přes noc a poté byla extrahovaná do ethylacetátu.
- b) 15 mol%, do reakční směsi bylo přidáno několik kuliček molekulového síta a rychle uzavřen uzávěr. Reakce se nechala reagovat přes noc a poté byla extrahovaná do ethylacetátu.

### 2. 2 ekvivalenty G a Hoveyda-Grubbsův katalyzátor druhé generace

- a) 10 mol%, do reakční směsi bylo přidáno několik kuliček molekulového síta a rychle uzavřen uzávěr. Reakce se nechala reagovat přes noc a poté byla extrahovaná do ethylacetátu.
- b) 15 mol%, do reakční směsi bylo přidáno několik kuliček molekulového síta a rychle uzavřen uzávěr. Reakce se nechala reagovat přes noc a poté byla extrahovaná do ethylacetátu.

### 3. 10 ekvivalentů a Hoveyda-Grubbsův katalyzátor druhé generace

- a) 10 mol%, do reakční směsi bylo přidáno několik kuliček molekulového síta a rychle uzavřen uzávěr. Reakce se nechala reagovat přes noc a poté byla extrahovaná do ethylacetátu.
- b) 15 mol%, do reakční směsi bylo přidáno několik kuliček molekulového síta a rychle uzavřen uzávěr. Reakce se nechala reagovat přes noc a poté byla extrahovaná do ethylacetátu.

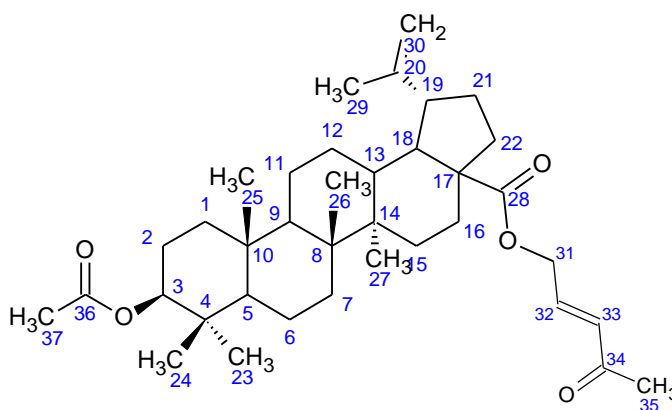
Všechny tyto reakce byly provedeny také s Grubbsovým katalyzátorem první generace.

## Konkrétní postup pro přípravu derivátu **93**

Postupem 3. a) byl získán produkt (**93**). Allyl ester kyseliny betulínové (**71**) (1 ekv., 0,1 g) byl pod proudem dusíku rozpuštěn v dichlormethanu (3 ml), poté byl přidán terminální alken (**85**) a Hoveyda-Grubbsův katalyzátor druhé generace 10 mol% (12 mg). Do reakční směsi bylo přidáno několik kuliček molekulového síta a rychle uzavřen uzávěr, aby bylo co nejvíce zachováno inertní prostředí. Reakce se nechala reagovat přes noc a poté byla extrahovaná do ethylacetátu. Pomocí dvou sloupcových chromatografií prováděných ve fázi S3 bylo vyizolováno 17 mg (15,6 %) produktu ve formě hustého nahnědlého oleje.

## Metatezní reakce v mikrovlnném reaktoru

Postup pro mikrovlnný reaktor byl totožný s postupem 3.a), jen byl použit dichlorethan jako rozpouštědlo a reakce probíhaly bez použití molekulových sít. Pomocí dvou sloupcových chromatografií prováděných ve fázi S3 bylo izolováno 40 mg (37,1 %) produktu (**93**) ve formě hustého nahnědlého oleje.



Obrázek esteru (**93**)

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 0.83 (s, 3H); 0.84 (s, 6H); 0.90 (s, 3H); 0.97 (s, 3H,  $5 \times \text{CH}_3$ ); 1.70 (s, 3H, H-30); 2.04 (s, 3H, Ac); 2.29 (s, 3H, H-35); 3.00 (td, 1H,  $J_1 = 10.9$  Hz,  $J_2 = 4.8$  Hz, H-19 $\beta$ ); 4.47 (dd, 1H,  $J_1 = 6.6$  Hz,  $J_2 = 5.4$  Hz, H-3 $\alpha$ ); 4.62 (dd, 1H,  $J_1 = 2.0$  Hz,  $J_2 = 1.4$  Hz, H-29 *pro E*); 4.74 (d, 1H,  $J = 2.0$  Hz, H-29 *pro Z*); 4.76 (dt, 2H,  $J_1 = 4.9$  Hz,  $J_2 = 1.7$  Hz, H-31); 6.29 (dt, 1H,  $J_1 = 16.3$  Hz,  $J_2 = 1.7$  Hz, H-32); 6.79 (dt, 1H,  $J_1 = 16.0$  Hz,  $J_2 = 4.9$  Hz, H-32).

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ): 14.20, 14.76, 16.07, 16.28, 16.56, 18.26, 19.41, 20.98, 21.39, 22.73, 23.78, 25.54, 27.39, 28.02, 29.79, 30.61, 31.67, 32.14, 34.35, 37.06, 37.19, 37.88, 38.36, 38.49, 40.82, 42.50, 47.02, 49.56, 50.54, 55.51, 56.80, 62.36, 81.00, 109.90, 131.20, 140.35, 150.35

# Citace

1. Kosuge T., Yokota M., Sugiyama K., Mure T., Yamazawa H., Yamamoto T.: *Chem. Pharm. Bull.* **1985**, 33, 5355.
2. Butler M. S., Robertson A. A., Cooper M. A.: *Nat Prod Rep.* **2014**, 61, 1612.
3. Shashi B. M, Sudip K. S., Gurudas P.: *Phytochemistry* **1988**, 27, 3037.
4. Brieskorn C. H., Suss H. P.: *Arch. Pharm.* **1974**, 307, 949.
5. Vonášek F., Trepková E., Novotný L.: Vonášek F., Trepková E., Novotný L.: *Látky vonné a chuťové, SNTL, Praha* **1987**.
6. Hill R. A., Connolly J. D.: *Nat. Prod. Rep.* **2015**, 32, 273.
7. Hill R. A., Connolly J. D.: *Nat. Prod. Rep.* **2005**, 22, 230.
8. Hill R. A., Connolly J. D.: *Nat. Prod. Rep.* **2001**, 18, 131.
9. Shashi B. M., Ashoke K. N., Gita R.: *Phytochemistry.* **1992**, 31, 2199.
10. Dzubak P., Hajduch M., Vydra D., Hustova S., Biedermann D., Markova L., Urban M., Sarek J.: *Nat. Prod. Rep.* **2006**, 23, 394.
11. Wasserman S. I.: *J. Allergy Clin. Immunol.* **1983**, 72, 101.
12. Fu Y., Zhou E., Wei Z., Liang D., Wang W., Wang T., Guo M., Zhang N., Yang Z.: *FEBS J.* **2014**, 281, 2543.
13. Dang Z., Ho P., Zhu L., Qian K., Lee K.-H., Huang L., Chem C.-H.: *J. Med. Chem.* **2013**, 56, 2029.
14. Cantrell C. L., Franzblau S. G., Fischer N. H.: *Planta Med.* **2001**, 67, 685.
15. Innocente B., Casanova B. B., Klein F., Lana A. D., Pereira D., Muniz M. N., Sonnet G. G., Fuentesfria A. M., Gnoatto S. C. B.: *Chem. Biol. Drug Des.* **2014**, 83, 344.
16. Bringmann G., Saeb W., Assi L. A., Francois G., Sankara N. A., Peters, K., Peters, E. M.: *Planta Med.* **1997**, 63, 255.
17. Liu J.: *J. Ethnopharmacol.* **1995**, 49, 57.
18. Ronco A. L., De Stéfani E.: *Funct. Foods Health Dis.* **2013**, 3, 462.
19. Van Tamelen M. M.: *Bioorg. Chem.* **1968**, 1, 111.
20. Tolstikov G. A., Flekhter O. B., Shultz E. E., Baltina L. A., Tolstikov A. G.: *Chem. Sust. Dev.* **2005**, 13, 1.
21. Jääskeläinen, P.: *Paperi ja puu* **1981**, 63, 599.

22. Gao Y., Xu H., Lu Z., Xu Z.: *Se Pu* **2009**, 27, 745.
23. Steele J. C., Warhurst D. C., Kirby G. C., Simmonds M. S.: *Phytother. Res.* **1999**, 13, 115.
24. 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.*, **1995**, 1, 1046.
25. Zuco V., Supino R., Righetti S. C., Cleris L., Marchesi E., Gambacorti-Passerini C.: *Cancer Lett.* **2002**, 175, 17.
26. Rabi T., Shukla S., Gupta S.: *Molecular Carcinogenesis* **2008**, 47, 964.
27. Laszczyk M. N.: *Planta Med.* **2009**, 75, 1549.
28. Chintharlapalli S., Papineni S., Ramaiah S. K., Safe S.: *Cancer Res.* **2007**, 67, 2816.
29. Fulda S., Jeremias I., Debatin K. M.: *Oncogene* **2004**, 23, 7611.
30. Noda Y., Kaiya T., Kohda K.: *Chem. Pharm. Bull.* **1997**, 45, 1665.
31. Calderon N., Chen H. Y., Scott K. W.: *Tetrahedron Lett.* **1967**, 8, 3327.
32. Buchmeiser M. R.: *Chem. Rev.* **2000**, 100, 1565.
33. [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/2005/index.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2005/index.html)
34. Herisson P. J.-L., Chauvin Y.: *Makromol. Chem.* **1970**, 141, 161.
35. Grubbs, R. H.: *Tetrahedron* **2004**, 60, 7117.
36. Schweb P., Grubbs R. H., Ziller J. W.: *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 100.
37. Scholl M., Trnka T. M., Morgan J. P., Grubbs R. H.: *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 2247.
38. Klingsbury J. S., Harrity J. P. A., Bonitatebus P., Hoveyda A. H.: *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 791.
39. Chatterjee A. K., Choi T. L., Sanders D. P., Grubbs, R. H.: *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 11360.
40. Clemons P. A.: *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, 3, 112.
41. Nicolaou K. C., Hughes R., Cho S. Y., Wissinger N., Smethurst C., Enderman R.: *Angew. Chem., Int. Ed.* **2000**, 39, 3823.
42. Nahar L., Turner A. B.: *Curr. Med. Chem.* **2007**, 14, 1349.
43. Lopez-Anto N., Rudy A., Barth N., Schmitz L. M., Pettit G. R., Schulze-Osthoff K., Dirsch V. M., Vollmar A. M.: *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 33078.
44. Berube M., Poirier D.: *Org. Lett.* **2004**, 6, 3127.

45. Rega M., Jimenez C., Rodriguez J.: *Steroids* **2007**, 72, 729.
46. Edelsztein V. C., Chenna P. H., Burton G.: *Tetrahedron* **2009**, 65, 3615.
47. Bargiggia F. C., Murray W. V.: *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 9636.
48. D'herde J. N., De Clercq P. J.: *Molecules* **2006**, 11, 655.
49. Eignerova B., Dracinsky M., Katora M.: *Eur J Org Chem* **2008**, 40, 4493.
50. Eignerova B., Slavikova B., Budesinsky M., Dracinsky M., Klepetarova B., Stastna E., Katora M.: *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 5753.
51. Elger W., Beier S., Pollow K., Garfield R., Shi S. Q., Hillisch A.: *Steroids* **2003**, 68, 891.
52. Umani-Ronchi A., Andriolo E., Montorsib M.: *Synthesis* **2008**, 23, 3801.
53. Kirschning A., Harmrolfs K., Mennecke K., Messinger J., Schön U., Grela K.: *Tetrahedron Lett.* **2008**, 49, 3019.
54. Liu W., Boddleener A., Rohmer M.: *Org. Biomol. Chem.* **2015**, 13, 3393.