

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA ORGANICKÉ CHEMIE

Bakalářský studijní obor: Klinická a toxikologická analýza



**Syntéza steroidních karboxylových kyselin
s předpokládanou biologickou aktivitou**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Alena SLAVÍČKOVÁ

školitel: RNDr. Hana Chodounská, CSc.

interní školitel: Doc. Ing. Stanislav Smrček, CSc.

Praha 2008

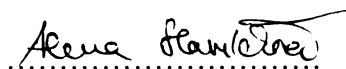
Přírodovědecká fakulta UK
KNIHOVNA CHEMIE



3233218510

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod odborným vedením RNDr. Hany Chodounské, CSc., a že řádně cituji všechna převzatá data a skutečnosti.

V Praze dne 26. května 2008

Handwritten signature of Alena Slavičková in black ink, written over a dotted line.

Alena Slavičková

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat všem, kteří mě podporovali a pomáhali mi s vypracováním této práce. Především bych chtěla poděkovat paní RNDr. Haně Chodounské, CSc. za cenné rady a laskavé odborné vedení, Mgr. Evě Šťastné za předané vědomosti, odbornou pomoc a velkou trpělivost. Mgr. Jiřině Borovské za odbornou i psychickou podporu a celému týmu steroidní chemie za vřelé přijetí, pomoc a přátelskou pracovní atmosféru.

Seznam zkratek a symbolů

BF ₃ .Et ₂ O	etherát fluoridu boritého
Bz	benzyl
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EtOH	ethanol
EtOAc	ethyl-acetát
GABA	γ-amino-máselná kyselina
GABA _A receptor	receptor pro kyselinu γ-aminomáselnou typu A
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography)
Me	methyl
MeOH	methanol
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
NMDA	N-methyl-D-aspartát
NMR	jaderná magnetická rezonance
PCC na Al ₂ O ₃	pyridiniumchlorochromát na oxidu hlinitém
PTLC	preparativní tenkovrstvá chromatografie
RI	refraktometrický detektor
THF	tetrahydrofuran
TLC	tenkovrstvá chromatografie
UV	ultrafialový

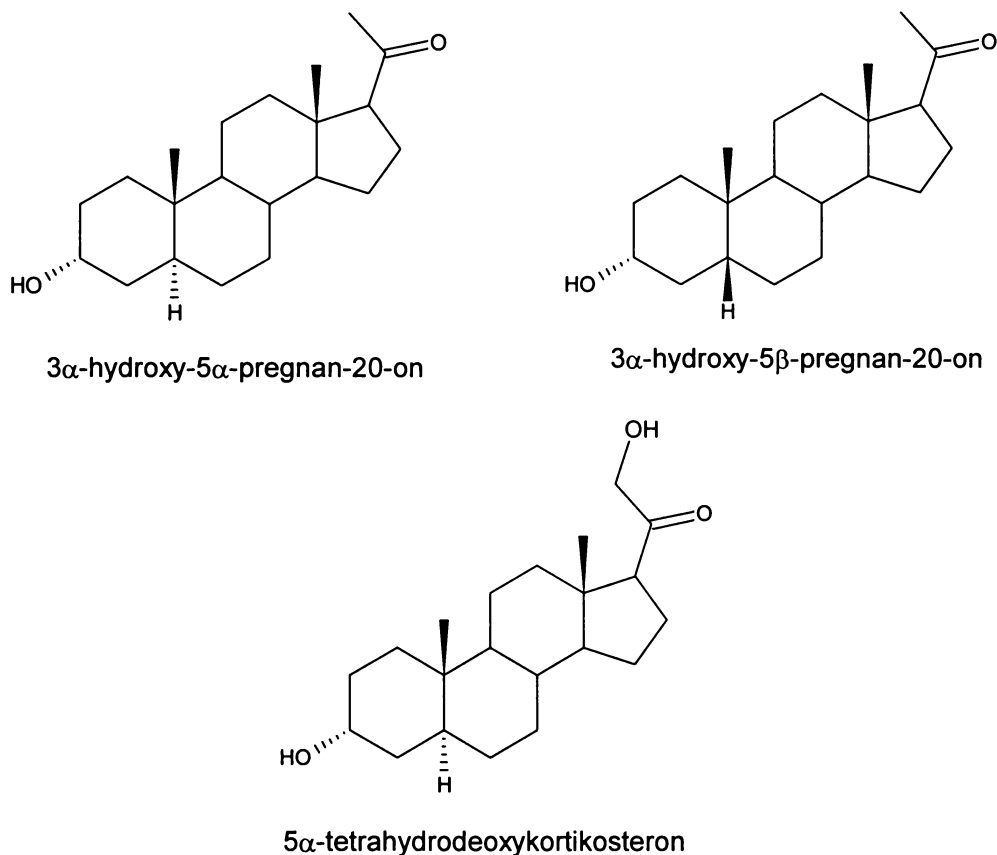
Práce byla provedena v rámci výzkumného záměru Z4 005 905 a za podpory grantu GA AV
ČR 203/08/1498.

Obsah

1. ÚVOD	2
2. ÚVOD DO PROBLEMATIKY SYNTÉZY	5
3. CÍLE BAKALÁŘSKÉ PRÁCE	9
4. DISKUZE A VÝSLEDKY	10
5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	14
5.1. PŘÍPRAVA 5 α -PREGNAN-3-KARBOXYLOVÝCH KYSELIN	15
20-Oxo-5 α -pregnan-3 β -yl acetát (2)	15
20,20-(Ethyldioxy)-5 α -pregnan-3 β -yl acetát (3)	15
20, 20-(Ethyldioxy)-5 α -pregnan-3 β -ol (4)	16
20, 20-(Ethyldioxy)-5 α -pregnan-3-on (5)	16
3-Methylen-20, 20-(ethyldioxy)-5 α -pregnan (6)	17
3 α -Hydroxymethyl-5 α -pregnan-20-on (7a) a 3 β -hydroxymethyl-5 α -pregnan-20-on (7b)	17
20-Oxo-5 α -pregnan-3 α -karboxylová kyselina (8a).....	18
20-Oxo-5 α -pregnan-3 β -karboxylová kyselina (8b).....	19
5.2. PŘÍPRAVA 5 β -PREGNAN-3-KARBOXYLOVÝCH KYSELIN.....	20
3-Methylen-5 β -pregnan-20-on (12)	20
3-Methylen-20, 20-(ethyldioxy)-5 β -pregnan (13)	20
3 β -Hydroxymethyl-5 β -pregnan-20-on (14a) a 3 α -hydroxymethyl-5 β -pregnan-20-on (14b).....	21
20-Oxo-5 β -pregnan-3 β -karboxylová kyselina (15a)	22
20-Oxo-5 β -pregnan-3 α -karboxylová kyselina (15b).....	22
6. ZÁVĚR.....	23
7. LITERATURA	24

1. Úvod

Steroidy v organismech plní mnoho důležitých funkcí. Nejznámější jsou steroidní hormony. Kromě toho se steroidy účastní stavby membrán a významnou signální úlohu mají neurosteroidy. Neurosteroidy patří do skupiny látek přirozeně se vyskytujících v tkáních centrální nervové soustavy¹. Vznikají v neuronech a gliových buňkách biosyntézou z cholesterolu nebo z cirkulujících steroidních prekurzorů. Zároveň jsou v nervové tkáni přítomny enzymové systémy, které se podílejí kromě tvorby neurosteroidů také na jejich rychlé degradaci². Příklady struktur některých přirozeně se vyskytujících neurosteroidů jsou na **Obr.1**. Pro látky, které působí obdobně, avšak nevznikají v nervové tkáni, jako např. testosteron nebo alfaxalon, se užívá termínu neuroaktivní steroidy¹.



Obr.1

Steroidní hormony, které jsou produkovány endokrinními žlázami (androgeny, gestageny, kortikoidy) účinkují klasickým mechanismem. To znamená, že jsou transportovány krví až k receptorům cílových tkání, kde se specifickým způsobem vážou a vytváří tak komplex steroidní hormon-receptor. Po přemístění vazebného páru steroidní

hormon-receptor do jádra dochází k ovlivnění genové transkripce, vazebný komplex vazbou na bílkovinný represor uvolní blokovanou DNA (deoxyribonukleová kyselina), čímž dojde k tvorbě mRNA (mediátorová ribonukleová kyselina) a následně enzymů na ribozomech. Pro klasické působení steroidních hormonů je charakteristická relativně dlouhá doba potřebná k vyvolání účinku (hodiny až dny)¹.

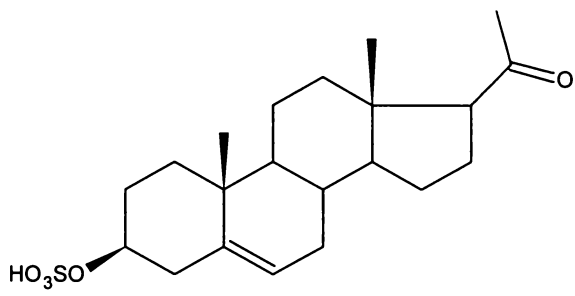
Naopak neurosteroidy účinkují v centrální nervové soustavě velmi rychle, mají schopnost ovlivnit neuronální dráždivost během sekund až milisekund¹. Tato vlastnost je známá již od 40. let 20. století, kdy byl také rozpoznán anestetický vliv steroidů (anestetikum alphaxalon). Steroidy mají schopnost procházet hematoencefalickou bariérou, působí tedy i v mozku a jejich působením dochází ke změnám v náladě a chování.

Přesto však byly molekulární mechanismy takového působení dlouho neznámé, až v 70. letech byl při zkoumání mechanismu působení alphaxolonu rozpoznán vliv neurosteroidů na receptory pro neurotransmitery³. Tyto mechanismy jsou odlišné od klasického mechanismu působení steroidních hormonů. Důvodem této odlišnosti je skutečnost, že neurosteroidy ovlivňují neuronální dráždivost membránových receptorů nervových buněk a zároveň jsou produkovány neurony, tedy blízko místa svého působení^{1,2}.

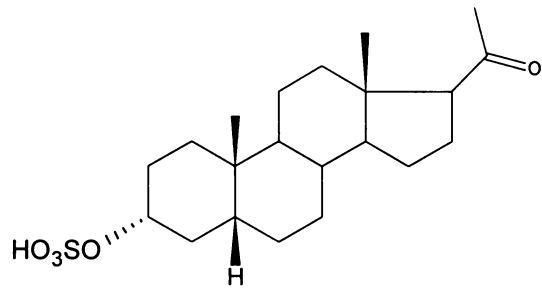
V osmdesátých letech přišly první informace vedoucí k objasnění účinku steroidních látek na funkci GABA_A receptoru (receptor pro kyselinu γ -aminomáselnou typu A) a na další receptory ze skupiny ligandem aktivovaných iontových kanálů. Jedná se například o glutamátové, glycinové a nikotinové acetylcholinové receptory. Tento objev spolu s důkazem tvorby steroidů přímo v nervové tkáni hrál zásadní roli při rozvoji zájmu o zkoumání metabolismu neurosteroidů a o způsobu, jakým ovlivňují nervovou činnost pomocí modulace aktivity iontových kanálů. Toto poznání přináší nové možnosti v psychofarmakologických a terapeutických postupech, neboť mnoho neurologických a psychiatrických onemocnění je zásadně spojeno právě s činností ligandem aktivovaných iontových kanálů¹.

Na iontové kanály má specifický vliv především pregnenolon a dehydroepiandrosteron (**Obr.2**). Pregnenolon v mozku se vyskytuje jako nekonjugovaný steroid, jako ester kyseliny sírové - pregnenolon sulfát a jako estery vyšších mastných kyselin¹ (**Obr.2**).

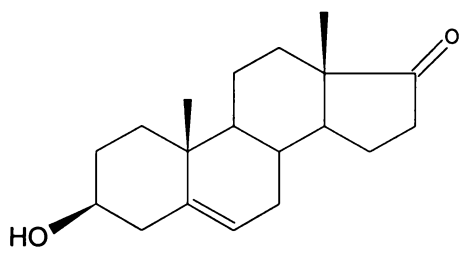
Díky svému působení na ionotropních receptorech mají neurosteroidy potenciál při terapeutickém využití. Výsledky studií potvrdily jejich pozitivní účinky v reakcích na stres, agresivitu, úzkost, paměť, schopnost učení, při léčbě nervových onemocnění jako je epilepsie, schizofrenie, Alzheimerova choroba^{2,4}.



20-oxo-pregn-5-en-3 β -yl sulfát



20-oxo-5 β -pregnan-3 α -yl sulfát



3 β -hydroxyandrost-5-en-17-on

Obr.2

2. Úvod do problematiky syntézy

Cílem této bakalářské práce je příprava pregnanových derivátů s karboxylovou skupinou v poloze 3. Existuje široká škála obecné metodiky pro přípravu karboxylových kyselin, kterou lze nastudovat v základní literatuře organické chemie. Patří mezi ně oxidace alkoholů či aldehydů, oxidativní štěpení olefinů ozonolýzou, bazická hydrolyza nitrilů, esterů či amidů nebo také karbonylace vhodného alkyl magnesiumbromidu. V rámci této práce, která je zaměřena na syntézu steroidních 3-karboxylových kyselin, je klíčovým krokem vytvoření C-C vazby v poloze 3 na vhodné, synteticky snadno dostupné výchozí struktuře. Jelikož výchozí látka jak v 5 α tak 5 β -řadě má v poloze 3 karboxylovou skupinu, možných postupů přípravy již není tolik. Přesto se nabízí několik variant přípravy. Níže uvedená schémata jsou pouze obecná, jejich použití na steroidním skeletu by vyžadovalo zvážení pořadí reakčních kroků a využití vhodných chránících skupin.

Na Schématu A je výchozí 3-keto skupina převedena Wittigovou reakcí⁵ na olefin, který snadno podléhá epoxidaci. V dalším kroku je možno epoxid kyselé či bazicky otevřít na odpovídající alkohol, který poskytne požadovanou karboxylovou kyselinu oxidací⁶. Schéma B zobrazuje použití kyanhydrinové syntézy: v prvním kroku je výchozí 3-ke-ton převeden na kyanhydrin, který eliminací hydroxylové skupiny a hydrogenací dvojně vazby poskytne nitril. Požadovanou karboxylovou kyselinu lze poté získat hydrolyzou. Schéma C zobrazuje Pd-katalyzovanou alkoxykarbonylaci triflátů, případně nonaflátů (**I**, **II**)⁸, které lze připravit z příslušného 3-ke-tonu. Hydrogenací a hydrolyzou nenasyceného esteru získáme karboxylovou kyselinu. Schéma D nabízí variantu hydroborace⁹ 3-exomethylenové skupiny, kterou lze připravit Wittigovou reakcí. Vzniklý alkohol se snadno oxiduje na žádanou karboxylovou skupinu.

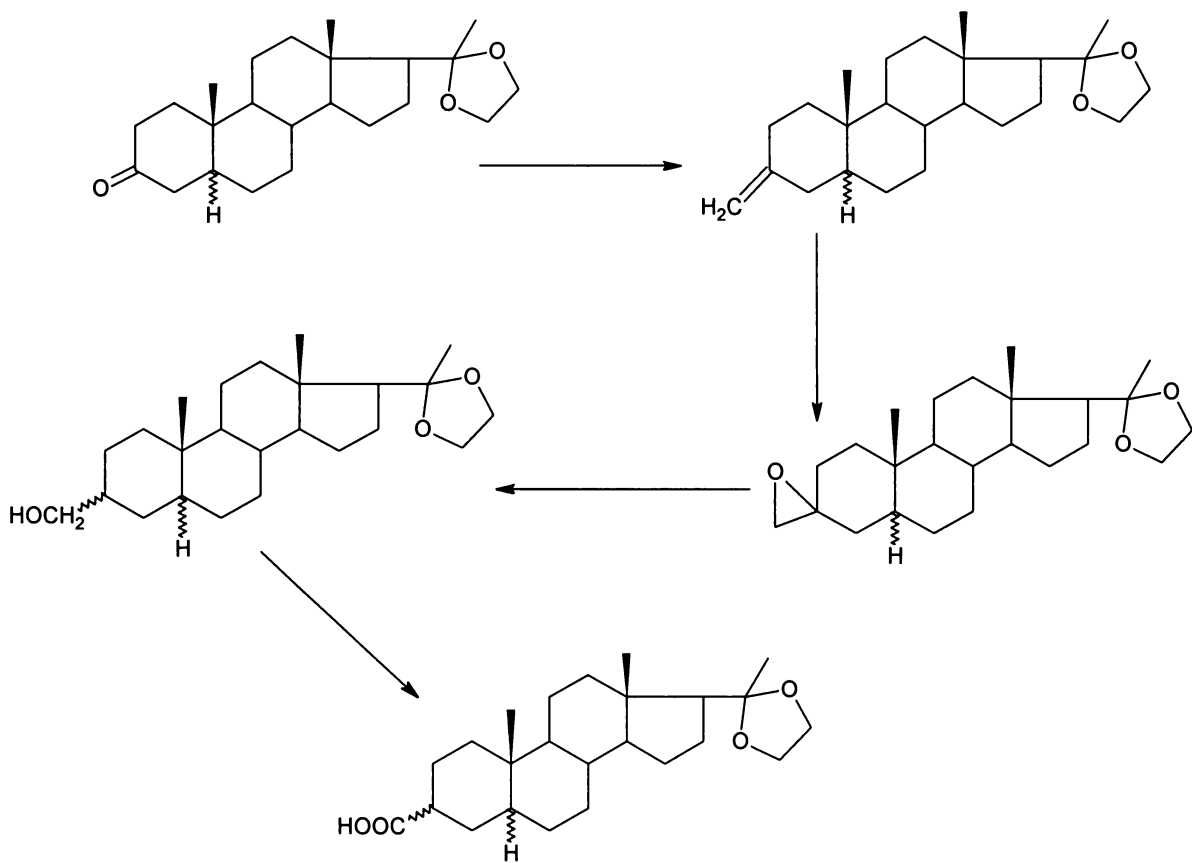


Schéma A

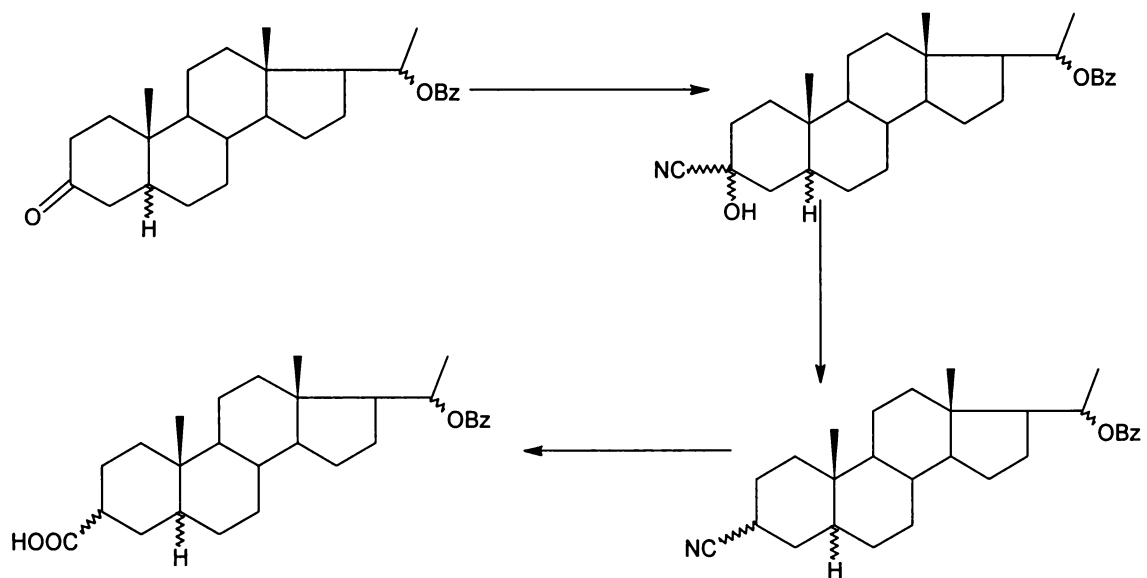


Schéma B

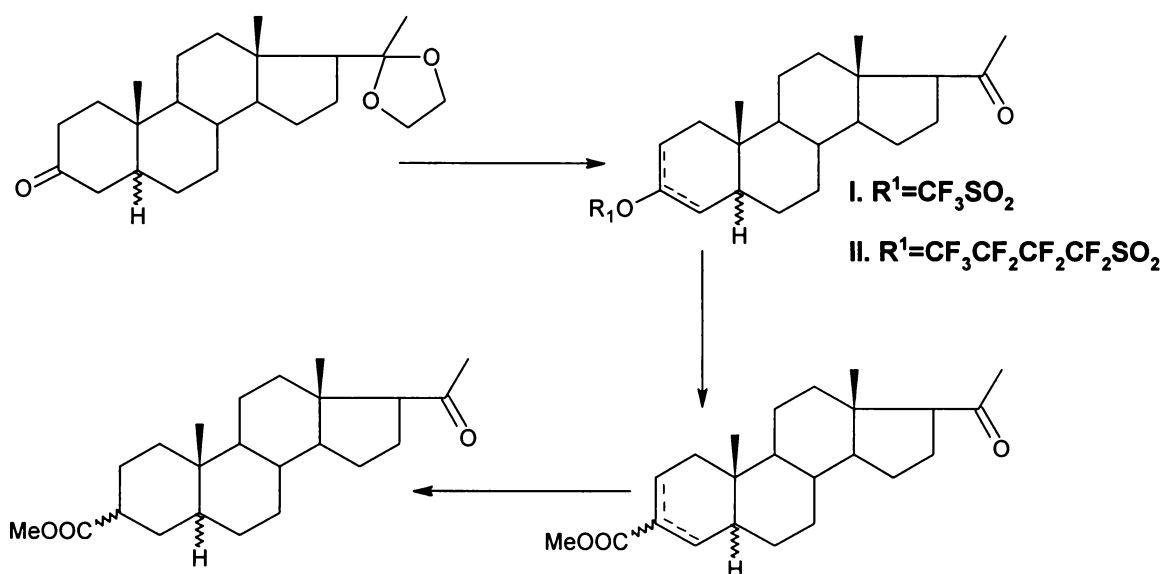


Schéma C

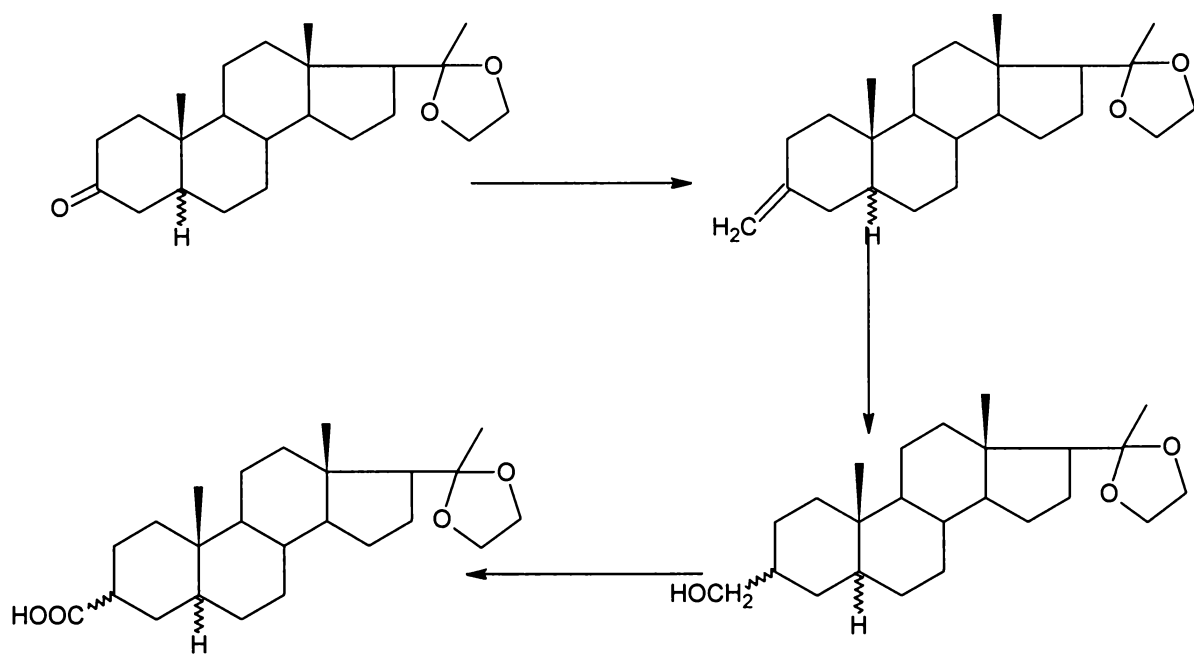


Schéma D

Zásadním a zcela klíčovým problémem v případě syntézy 3-karboxylových kyselin pregnanového typu je stereochemie reakce a tvorba 3 α a 3 β -izomerů s různou selektivitou. Jelikož metodika uvedená na Schématu A, B a C byla již na oddělení Medicinálních steroidů v předchozí době zkoušena a selektivita reakce nebyla dostatečná, byla pro mou práci vybrána metoda popsaná na Schématu D.

3. Cíle bakalářské práce

Cílem této práce byla příprava níže uvedených steroidních karboxylových kyselin s předpokládanou biologickou aktivitou.

1. 3α - a 3β -karboxylové kyseliny pregnanového typu v 5α -řadě.
2. 3α - a 3β -karboxylové kyseliny pregnanového typu v 5β -řadě.

4. Diskuze a výsledky

Byly připraveny axiální i ekvatoriální karboxylové kyseliny pregnanového typu v 5 α - i v 5 β -řadě.

Výchozí látkou pro syntézu karboxylových kyselin v 5 α -řadě (Schéma 2) byl 5 α -pregnan-3,20-dion s chráněnou 20-keto skupinou (**5**), který lze snadno připravit čtyřmi reakčními kroky (Schéma 1): Komerčně dostupný pregnenolon acetát (**1**) byl hydrogenován na palladiovém katalyzátoru (Pd na CaCO₃) za vzniku nasyceného 5 α -derivátu, jehož 20-keto skupina byla následně ochráněna jako acetál. Takto připravený ochráněný derivát byl hydrolyzován na 3 β -hydroxy derivát (**4**), který byl poté oxidován na žádaný 5 α -pregnan-3,20-dion s chráněnou 20-keto skupinou (**5**).

Výchozí látkou pro syntézu karboxylových kyselin v 5 β řadě (Schéma 3) byl 5 β -pregnan-3,20-dion (**11**), který je připravitelný v jednom reakčním kroku hydrogenací progesteronu.

Pro přípravu karboxylových kyselin v obou řadách bylo použito základní reakční schéma, jehož prvním krokem bylo převedení 3-oxoskupiny Wittigovou reakcí na methylenovou skupinu. Ze získaného exomethylenderivátu byla hydroborací získána směs primárních alkoholů, které je možno separovat pomocí např. HPLC. Posledním krokem syntézy byla oxidace připravených alkoholů Jonesovým činidlem za vzniku požadovaných karboxylových kyselin.

20-Ketoskupina byla v obou případech (pokaždé v jiné fázi) ochráněna jako ethylendioxo-derivát a ve vhodné části syntézy (po hydroboraci) byla jednoduše odchráněna stáním ve vodném roztoku acetonu s kyselinou chlorovodíkovou.

Touto metodikou se podařilo připravit všechny 4 požadované karboxylové kyseliny ve velmi dobrém výtěžku.

U připravených karboxylových kyselin byla testována jejich aktivita na NMDA receptoru na Oddělení buněčné neurofyziologie Fyziologického ústavu AV ČR. Zjištěná aktivita byla pro kyselinu **8b** rovna $31,1 \pm 5,7\%$ (potencuje), pro kyselinu **15a** $40,1 \pm 7\%$ (inhibuje) a pro kyselinu **15b** se rovnala $-64,7 \pm 5,9\%$ (inhibuje). Pro kyselinu **8a** nebyly v době sepisování bakalářské práce ještě k dispozici výsledky testování.

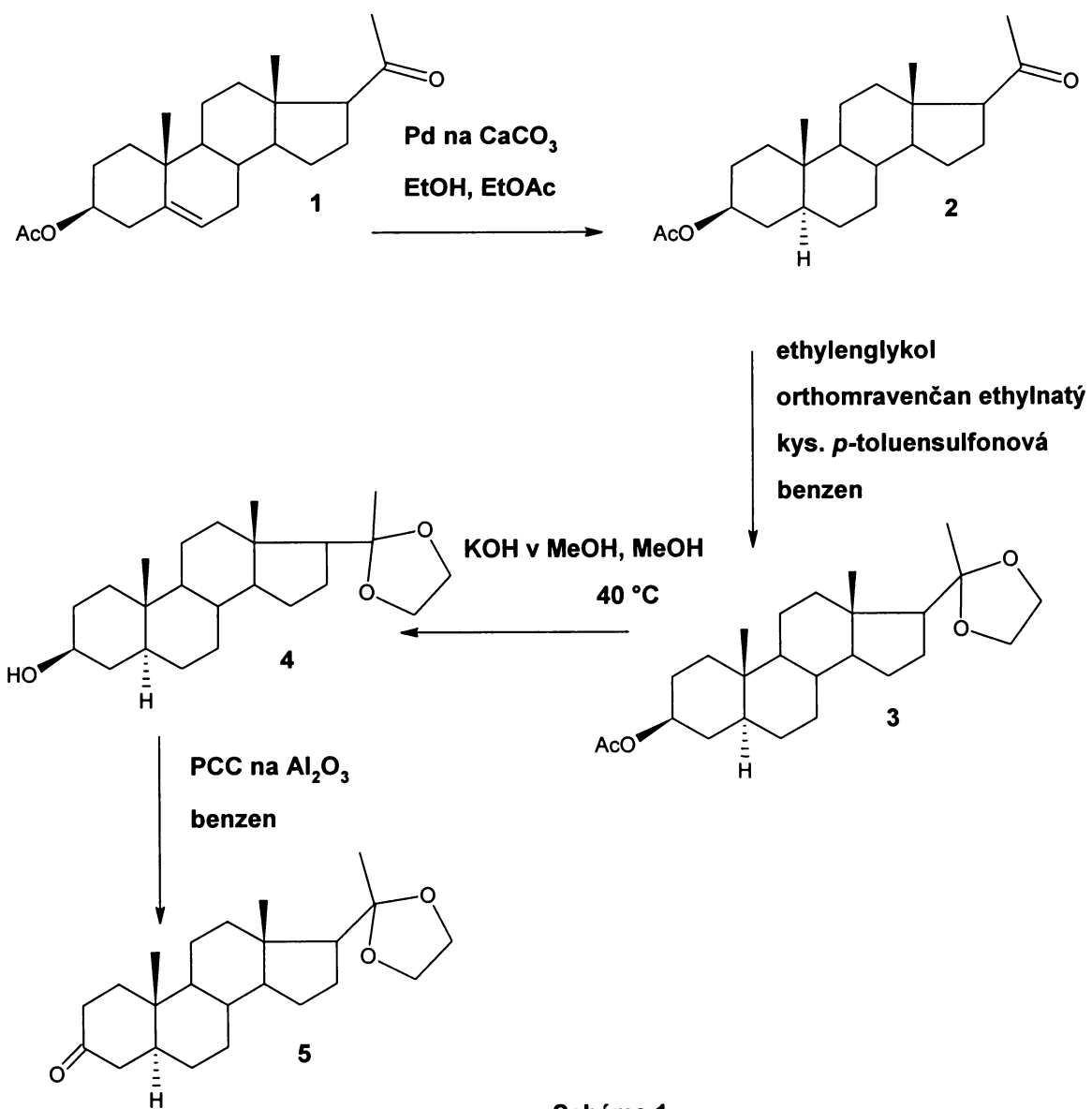


Schéma 1

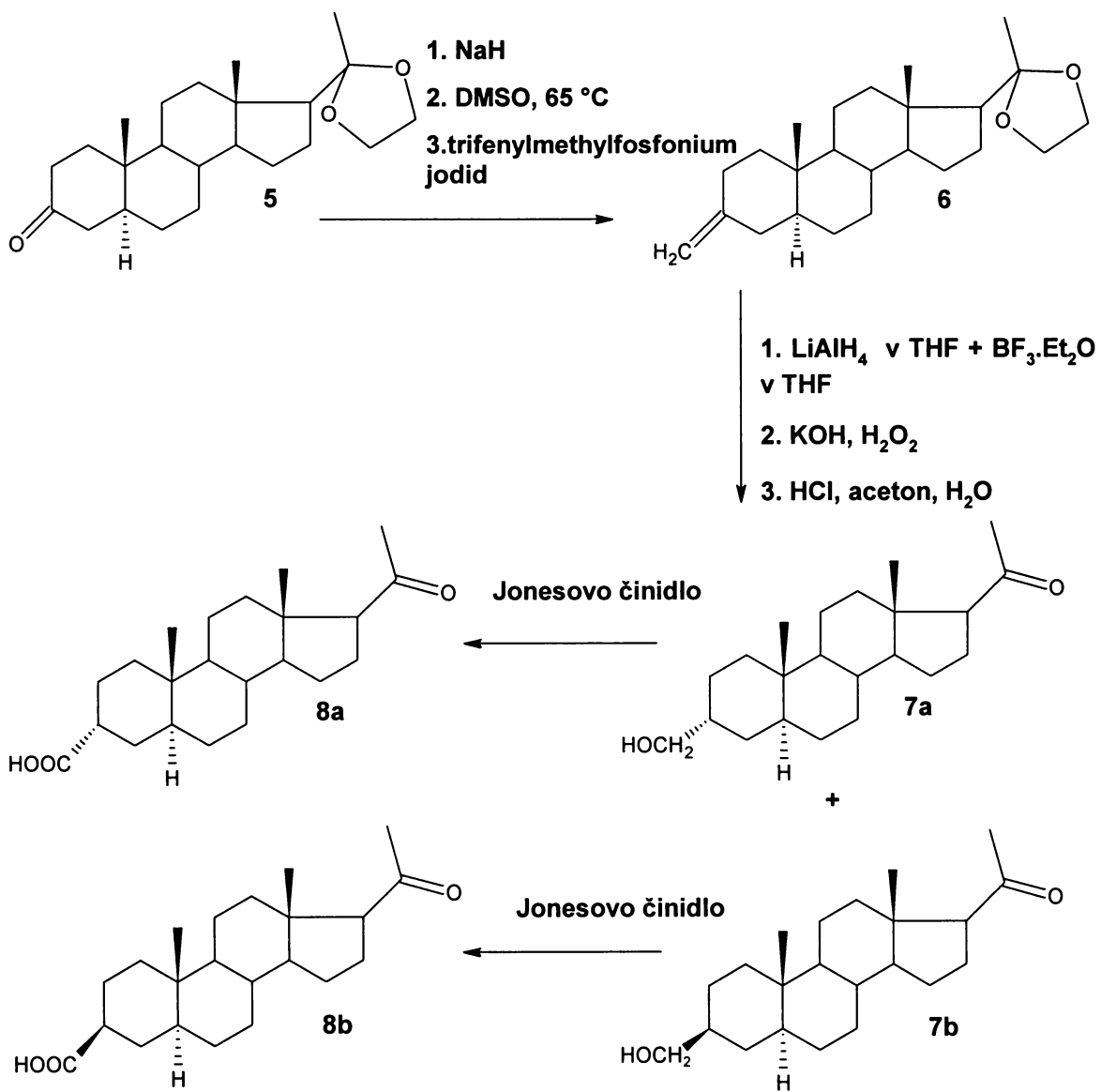


Schéma 2

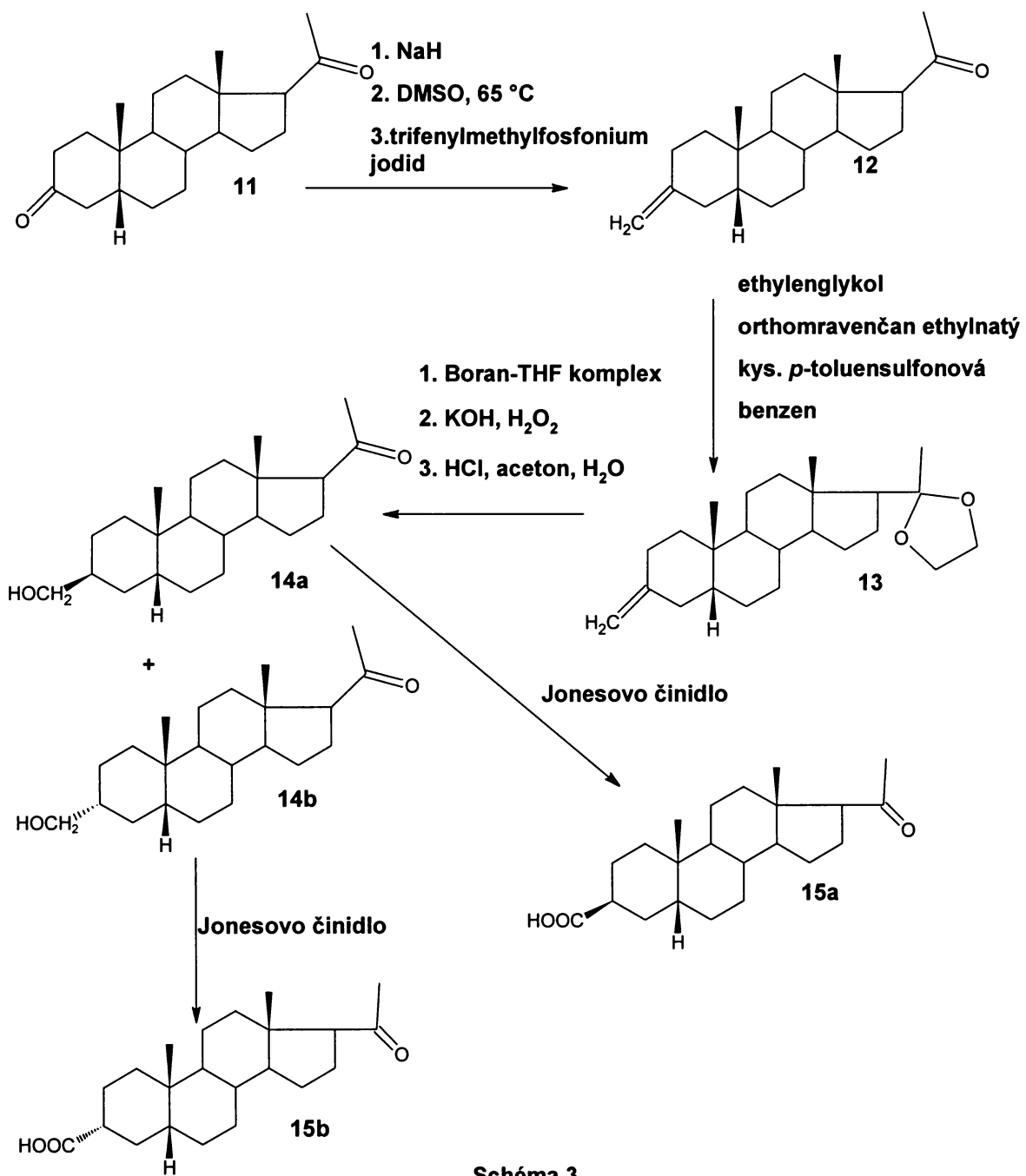


Schéma 3

5. Experimentální část

Body tání byly určeny na bodotávku Hund H 600 (Helmut Hund, Německo) a nejsou korigovány. Vzorky pro analýzu byly sušeny nad oxidem fosforečným při 50 °C a tlaku 100 Pa. Optická rotace byla měřena v chloroformu polarimetrem Autopol IV (Rudolf Research Analytical, Flanders), USA, $[\alpha]_D$ hodnoty jsou uvedeny v $10^{-1} \cdot \text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$. Infračervená spektra byla měřena v roztocích vzorků v chloroformu pomocí spektrometru Bruker IFS 55, vlnočty jsou udány v cm^{-1} . ^1H NMR spektra byla měřena v FT modu při 24 °C a 400 MHz na spektrometru Bruker AVANCE-400 v deuteriochloroformu, s tetramethylsilanem (TMS) jako vnitřním standardem. Chemické posuny jsou udány v ppm (δ -stupnice), interakční konstanty (J) a šířky multiplétů (W) jsou udány v Hz. Multiplicity signálů jsou označeny následovně: s – singlet, d – dublet, t – triplet, q – kvadruplet, m – multiplét, písmeno b označuje široký signál (broad). Všechna spektra byla interpretována jako spektra prvního řádu. Při zpracování reakčních směsí byl používán vodný roztok kyseliny chlorovodíkové (5%), případně nasycený vodný roztok hydrogenuhličitanu sodného. Tenkovrstvá chromatografie (TLC) byla prováděna na deskách pokrytých vrstvičkou silikagelu (ICN Biochemicals). Preparativní tenkovrstvá chromatografie (PTLC) byla prováděna na deskách 200x200 mm pokrytých 0,7 mm silikagelu (ICN Biochemicals). Preparativní sloupcová chromatografie byla prováděna na silikagelu Fluka (60 μm). K detekci steroidních látek na TLC deskách byla použita 98% kyselina sírová s následným zahřátím na 300 – 400 °C. Látky na PTLC deskách byly vizualizovány 0,5% roztokem morinu v methanolu s následným osvětlením UV zářením (254 nm). Produkty byly izolovány kontinuální extrakcí příslušné chromatografické zóny diethyletherem. Rozpouštědla byla z roztoků odpařována na vakuové odparce (0,25 kPa) při teplotě lázně 40°C. Používaný HPLC systém měl toto uspořádání: vysokotlaké čerpadlo Gilson (model 321-322), preparativní HPLC kolona (Labio 25 x 250 mm, sorbent Biospher PSI 200, 7 μm), RI detektor (Lab. přístroje Praha), propojený přes RS-232 s PC s programem Chromulan 0.10 a automatický sběrač frakcí Gilson (model 206). Mobilní fáze pro sloupcovou chromatografii a HPLC jsou uvedeny vždy u experimentu. Jonesovo činidlo bylo připraveno smísením CrO_3 (67 g, 0,67 mmol) s roztokem H_2SO_4 (58 ml H_2SO_4 ve 100 ml vody) a směs byla doplněna vodou do 250 ml.

5.1. Příprava 5 α -pregnan-3-karboxylových kyselin

20-Oxo-5 α -pregnan-3 β -yl acetát (2)

Pregnenolon acetát **1** (20,0 g, 56 mmol) byl v 2 l baňce s míchadlem rozpuštěn v 99% EtOH (400 ml) a ethyl-acetátu (120 ml). Do směsi byl po lžičkách přidán katalyzátor Pd na CaCO₃ (2,0 g, 9,7 mmol) a baňka byla naplněna argonem, který byl při samotné reakci vyměněn za vodík, reakční směs byla míchána přes noc. Druhý den byla reakční směs zkontrolována pomocí TLC ve směsi petrolether-ether (4:1) a pomocí ¹H NMR. Reakční směs byla přefiltrována přes filtrační papír a odpařena za sníženého tlaku. Tuhý odparek byl následně překrystalován ve směsi aceton-petrolether za vzniku krystalů **2** (18,7 mg, 93,5%).

B.t.: 124,6-127,7 °C, [α]_D +72,2 (c 0,238).

¹H NMR (400 MHz) v CDCl₃: 0,60 s, 3 H (3 x H-18); 0,82 s, 3 H (3 x H-19); 2,02 s, 3 H (3 x H-OAc); 2,11 s, 3 H (3 x H-21); 2,52 t, 1 H, J = 9 (H-17); 4,68 m, 1 H, W = 32,5 (H-3).

IČ spektrum: 1723 (C=O, acetát); 1699 (C=O, acetát); 1255, 1027 (C-O, acetát); 1367 (CH₃, acetát); 1359 (CH₃, acetát); 1389, 1380 (CH₃, methyl).

Pro C₂₃H₃₆O₃ (360,5) vypočteno: 76,62% C, 10,06% H; nalezeno: 77,02% C, 10,06% H.

20,20-(Ethylendioxy)-5 α -pregnan-3 β -yl acetát (3)

Pregnanolon acetát **2** (10 g, 28 mmol) byl rozpuštěn v absolutním benzenu (75 ml), roztok byl odpařen zhruba na polovinu a ke směsi byl přidán ethylenglykol (5 ml, 90 mmol). Následně byl přidán orthomravenčan ethylnatý (13,5 ml, 81 mmol) a monohydrát kyseliny *p*-toluensulfonové (0,107 g, 0,53 mmol). Směs byla míchána 12 hodin za laboratorní teploty, průběh reakce byl kontrolován TLC ve směsi petrolether-ether (7:3). Druhý den byla reakční směs nalita do nasyceného roztoku hydrogenuhličitanu sodného (70 ml), produkt byl extrahován ethyl-acetátem (100 ml), organická fáze byla promyta hydrogenuhličitanem sodným (70 ml), vodou (2 x 100 ml) a sušena bezvodým síranem sodným. Rozpouštědla byla odpařena za sníženého tlaku. Získaný odparek byl čištěn sloupcovou chromatografií ve směsi petrolether-ether (7:3) za vzniku látky **3** (5,04 g, 50,4%).

B.t.: 157,1-161,0 °C, [α]_D +11,1 (c 0,234).

^1H NMR (400 MHz) v CDCl_3 : 0,65 s, 3 H (3 x H-18); 0,72 s, 3 H (3 x H-19); 1,19 s, 3 H (3 x H-21); 1,92 s, 3 H (3 x H-OAc); 3,74-3,92 m, 4 H (-O-CH₂-CH₂-O-); 4,56 m, 1 H, W=32,6 (H-3).

IČ spektrum: 1724 (C=O, acetát); 1255, 1027 (C-O, acetát); 1369 (CH₃, acetát); 1377 (CH₃, ethylenketal); 1389 (CH₃, methyl); 1472, 1293 (CH₂, ethylenketal).

Pro $\text{C}_{25}\text{H}_{40}\text{O}_4$ (404,6) vypočteno: 74,22% C, 9,97% H; nalezeno: 74,60% C, 10,07% H.

20, 20-(Ethylendioxy)-5 α -pregnan-3 β -ol (4)

K derivátu **3** (5,25 g, 13 mmol), který byl rozpuštěn v methanolu (5 ml, za tepla) byl za horka nalit roztok hydroxidu draselného (0,71 g, 12,7 mmol) v methanolu (2 ml). Směs byla zahřívána a míchána na vodní lázni (40 °C). Průběh reakce byl kontrolován TLC ve směsi petrolether-ether (7:3). Následně byla k reakční směsi přilita voda (10 ml) a reakční směs stála 2 hodiny při 5 °C. Vzniklé krystaly **4** (4,49 g, 85,5%) byly odsáty a sušeny v termostatu (40 °C).

B.t.: 159,8-162,5 °C, $[\alpha]_{\text{D}} +19,7$ (c 0,228).

^1H NMR (400 MHz) v CDCl_3 : 0,75 s, 3 H (3 x H-18); 0,80 s, 3 H (3 x H-19); 1,29 s, 3 H (3 x H-21); 3,84-4,02 m, 4 H (-O-CH₂-CH₂-O-); 3,58 m, 1 H, W=35,1 (H-3).

IČ spektrum: 3610 (O-H, alkohol); 1035 (C-OH, alkohol); 1472, 1293 (CH₂, ethylenketal); 1374 (CH₃, ethylenketal); 1382 (CH₃, methyl).

Pro $\text{C}_{23}\text{H}_{38}\text{O}_3$ (362,5) vypočteno: 76,2% C, 10,56% H; nalezeno: 76,27% C, 10,66% H.

20, 20-(Ethylendioxy)-5 α -pregnan-3-on (5)

K roztoku látky **4** (4,49 g, 12 mmol) v benzenu byl přidán PCC na Al_2O_3 (5 g) a směs byla míchána za laboratorní teploty 48 hodin. Průběh reakce byl sledován TLC ve směsi petrolether-ether (1:1). Poté byl za stálého míchání přidán další PCC na Al_2O_3 (2 g), po 6 hodinách další PCC na Al_2O_3 (2 g). Reakční směs ponechána míchat 12 hodin a kontrolováno TLC, stále zůstala nezreagovaná výchozí látka. Směs byla sfiltrována, odpařena a rozpuštěna v benzenu a přidán PCC na Al_2O_3 (5 g) a PCC (0,5 g), reakční směs byla míchána 12 hodin. Po zreagování byla směs přefiltrována a krystalována ze směsi aceton - heptanu, byl získán produkt **5** (3,57 g, 79,6%).

B.t.: 149,8-153,9°C, $[\alpha]_{\text{D}} + 48,7$ (c 0,269).

^1H NMR (400 MHz) v CDCl_3 : 0,78 s, 3 H (3 x H-18); 1,01 s, 3 H (3 x H-19); 1,29 s, 3 H (3 x H-21); 3,85-4,03 m, 4 H (-O-CH₂-CH₂-O-).

IČ spektrum: 1705 (C=O, 3-ke-ton); 1472, 1294 (CH₂, ethylenketal); 1374 (CH₃, ethylenketal); 1385 (CH₃, methyl).

Pro C₂₃H₃₆O₃ (360,5) vypočteno: 76,62% C, 10,06% H; nalezeno: 76,98% C, 10,20% H.

3-Methylen-20, 20-(ethylenedioxy)-5 α -pregnan (6)

Baňka (100 ml) se septovým uzávěrem a míchadlem byla vysušena v termostatu (40 °C, 2 hodiny), poté byl do ní navážen hydrid sodný (NaH 50% v parafinovém oleji, 0,3 g, 6,25 mmol). NaH byl v inertní atmosféře třikrát opláchnut petroletherem. Takto byla odstraněna většina parafinového oleje. Poté byl přidán absolutní dimethylsulfoxid (DMSO, 44 ml) a roztok byl míchán a zahříván 1 hodinu na vodní lázni při 65 °C pod inertní atmosférou argonu. Po uplynutí této doby byla reakční směs nechána zchladnout za laboratorní teploty a byl přidán trifenylmethylfosfonium jodid (4,38 g, 10,8 mmol). Obsah baňky byl míchán 30 min za laboratorní teploty pod argonem a následně byl přidán keton **5** (1 g, 2,8 mmol) a směs byla nechána 24 hodin při -15°C. Žlutá reakční směs byla nalita do směsi nasyceného roztoku chloridu amonného (1 x 500 ml) s diethyletherem (1 x 400 ml) a vytřepána. Vodná fáze byla vytřepána diethyletherem (1 x 200 ml), etherické fáze byly spojeny, sušeny bezvodým síranem sodným, přefiltrovány a odpařeny. Získaný odparek byl čištěn sloupcovou chromatografií ve směsi petrolether-ether (30:1). Produktem byl olefin **6** (950 mg, 95%).

B.t.: 158-161,1 °C, $[\alpha]_D + 22,8$ (c 0,243).

^1H NMR (400 MHz) v CDCl_3 : 0,75 s, 3 H (3 x H-18); 0,86 s, 3 H (3 x H-19); 1,29 s, 3 H (3 x H-21); 3,85-4,02 m, 4 H (-O-CH₂-CH₂-O-); 4,54-4,56 m, 2 H (CH₂=).

IČ spektrum: 3070, 888 (=CH₂); 1648 (C=C); 1471, 1294 (CH₂, ethylenketal); 1375 (CH₃, ethylenketal);

Pro C₂₄H₃₈O₂ (358,6) vypočteno: 80,39% C, 10,68% H; nalezeno: 80,07% C, 10,75% H.

3 α -Hydroxymethyl-5 α -pregnan-20-on (7a) a 3 β -hydroxymethyl-5 α -pregnan-20-on (7b)

K roztoku LiAlH₄ (544,5 mg, 14,3 mmol) v suchém THF (72,5ml) byla pod inertní atmosférou za stálého míchání přidána směs BF₃.Et₂O (1,8 ml, 14,2 mmol) a THF (36 ml). Poté byl pod inertní atmosférou argonu přidán olefin **6** (950 mg, 2,65 mmol) v THF (36 ml)

a reakční směs byla míchána (5 hod, 0°C). Poté byla nechána 12 hod při -16°C a následně byl injekční stříkačkou přidán roztok hydroxidu draselného (0,58 g v 5,8 ml H₂O) a peroxid vodíku (3,5 ml, 30%) a reakční směs byla míchána 80 min pod argonem při 0°C. Reakční směs byla nalita do ethyl-acetátu (900 ml) a organická fáze byla promyta vodou (4 x 150 ml), sušena bezvodým síranem sodným, přefiltrována a odpařena. K odparku rozpuštěném v acetonu (10 ml) byla přidána voda (3 ml) a kyselina chlorovodíková (10%, 5 kapek). Směs byla nechána stát 30 min, byla nalita na vodu s ledem a vytřepána diethyletherem (2 x 200 ml). Organická fáze byla vytřepána hydrogenuhličitanem sodným (2 x 100 ml) a vodou (2 x 100 ml). Dále sušena bezvodým síranem sodným, přefiltrována a odpařením rozpouštědel byla získána směs alkoholů **7a** + **7b** (820 mg, 86,3%). Tato směs alkoholů byla rozdělena pomocí HPLC ve směsi ethyl-acetát : hexanová frakce (3:7). Byly získány alkoholy **7a** (437 mg, 53,3%) a **7b** (230 mg, 28%).

3 α -Izomer (7a):

B.t.: 140,8-143,4 °C, [α]_D + 101,7 (c 0,177).

¹H NMR (400 MHz) v CDCl₃: 0,60 s, 3 H (3 x H-18); 0,80 s, 3 H (3 x H-19); 2,11 s, 3 H (3 x H-21); 2,51 t, 1H, J = 9 (H-17); 3,65 d, 2H, J = 7,6 (CH₂OH).

IČ spektrum: 3622, 3475, 1045, 1027 (O-H, alkohol); 1698 (C=O, acetát); 1386 (CH₃, acetát).

Pro C₂₂H₃₆O₂ (332,5) vypočteno: 79,46% C, 10,91% H; nalezeno: 79,30% C, 11,02% H.

3 β -Izomer (7b):

B.t.: 158,5-162,4 °C, [α]_D +108,6 (c 0,181).

¹H NMR (400 MHz) v CDCl₃: 0,60 s, 3 H (3 x H-18); 0,80 s, 3 H (3 x H-19); 2,11 s, 3 H (3 x H-21); 2,52 t, 1H, J = 9 (H-17); 3,46 d, 2H, J = 5,6 (CH₂OH).

IČ spektrum: 3628, 1055 (O-H, alkohol); 1698 (C=O, methyl); 1387 (CH₃, acetát).

Pro C₂₂H₃₆O₂ (332,5) vypočteno: 79,46% C, 10,91% H; nalezeno: 79,60% C, 10,95% H.

20-Oxo-5 α -pregnan-3 α -karboxylová kyselina (8a)

K alkoholu **7a** (80 mg, 0,23 mmol), rozpuštěném v acetonu (3 ml) bylo po kapkách přidáváno Jonesovo činidlo až do zhnědnutí směsi. Poté byla reakční směs nechána stát 30 min za laboratorní teploty. Přebytek činidla byl rozložen přidáním isopropylalkoholu (1 ml) do reakční směsi. Reakční směs byla nalita do směsi voda-led (50 ml) a extrahována chloroformem (1 x 20 ml). Organická fáze byla promyta vodou (1 x 10 ml), sušena a odpařena. Krystalizací ze směsi aceton-voda byla získána kyselina **8a** (79 mg, 98,8%).

B.t.: 158,6-162,7 °C, [α]_D + 109,4 (c 0,212).

^1H NMR (400 MHz) v CDCl_3 : 0,60 s, 3 H (3 x H-18); 0,80 s, 3 H (3 x H-19); 2,11 s, 3 H (3 x H-21); 2,51 t, 1H, $J = 9,1$ (H-17); 2,72 t, 1H, $W = 5,6$ (H-3).

IČ spektrum: 3518 (O-H, COOH, monomer); 3092, 2652, 2570 (O-H, COOH, dimer); 1737 (C=O, COOH, monomer); 1699 (C=O, COOH, dimer); 1699, 593 (C=O, acetát); 1386 (CH_3 , methyl); 1358 (CH_3 , acetát).

Pro $\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{O}_3$ (346,5) vypočteno: 76,26% C, 9,89% H; nalezeno: 76,14% C, 9,97% H.

20-Oxo-5 α -pregnan-3 β -karboxylová kyselina (8b)

K alkoholu **7b** (83 mg, 0,24 mmol), rozpuštěném v acetonu (3 ml) bylo po kapkách přidáváno Jonesovo činidlo až do zhnědnutí směsi. Poté byla reakční směs nechána stát 30 min za laboratorní teploty. Přebytek činidla byl rozložen přidáním isopropylalkoholu (1 ml) do reakční směsi. Reakční směs byla nalita do směsi voda-led (50 ml) a extrahována chloroformem (1 x 20 ml). Organická fáze byla promyta vodou (1 x 10 ml), sušena a odpařena. Krystalizací ze směsi aceton-voda byla získána kyselina **8b** (80 mg, 96,4%).

B.t.: 184,0-187,5 °C, $[\alpha]_{\text{D}} + 118,8$ (c 0,170).

^1H NMR (400 MHz) v CDCl_3 : 0,60 s, 3 H (3 x H-18); 0,81 s, 3 H (3 x H-19); 2,11 s, 3 H (3 x H-21); 2,36 tt, 1H, $J_1 = 12,4$, $J_2 = 4,2$ (H-3); 2,52 t, 1H (H-17).

IČ spektrum: 3516 (O-H, COOH, monomer); 3090, 2668, 2579 (O-H, COOH, dimer); 1735 (C=O, COOH, monomer); 1701 (C=O, COOH, dimer); 1421, 1291 (dimer -COOH); 593 (C=O, acetát); 1358 (CH_3 , acetát); 1387 (CH_3 , methyl).

Pro $\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{O}_3$ (346,5) vypočteno: 76,26% C, 9,89% H; nalezeno: 76,02% C, 9,95% H.

5.2. Příprava 5 β -pregnan-3-karboxylových kyselin

3-Methylen-5 β -pregnan-20-on (12)

Baňka (100 ml) se septovým uzávěrem a míchadlem byla vysušena v termostatu (40 °C, 2 hodiny), poté byl do ní rychle navážen NaH (50% v parafinovém oleji, 0,3 g, 6,25 mmol). NaH byl v inertní atmosféře 3x opláchnut petroletherem. Takto byla odstraněna většina parafinového oleje. Poté byl přidán absolutní DMSO (44 ml) a roztok byl míchán a zahříván 1 hodinu na vodní lázni při 65 °C pod inertní atmosférou argonu. Po uplynutí uvedené doby byla reakční směs nechána zchladnout za laboratorní teploty a byl přidán trifenylmethylfosfonium jodid (5,62 g, 13,9 mmol). Obsah baňky byl míchán 30 min na laboratorní teplotu pod argonem. Takto připravené činidlo bylo pomalu přikapáváno ke ketonu **11** (4 g, 11,2 mmol) rozpuštěném v tetrahydrofuranu (250 ml) za současného chlazení na 10 – 15 °C. Průběh byl kontrolován TLC petrolether-ether (4:1), po 1,5 hod byla reakční směs nalita do směsi nasyceného roztoku chloridu amonného (1 x 500 ml) s diethyletherem (1 x 400 ml) a protřepána. Vodná fáze byla vytřepána diethyletherem (1 x 400 ml), organické fáze byly spojeny, sušeny bezvodým síranem sodným, přefiltrovány a odpařeny. Produktem byl olefin **12** (3 g, 75%).

B.t.: 86,3-88,5°C, $[\alpha]_D + 136,2$ (c 0,254).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz) v CDCl_3 : 0,61 s, 3 H (3 x H-18); 0,93 s, 3 H (3 x H-19); 2,12 s, 3 H (3 x H-21); 4,57-4,59 m, 2 H ($\text{CH}_2=$).

IČ spektrum: 1698, 593 (C=O, acetát); 1357 (CH_3 , acetát); 3071, 888 ($=\text{CH}_2$); 1648 (C=C); 1386, 1377 (CH_3 , methyl).

Pro $\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{O}$ (314,5) vypočteno: 84,02% C, 10,90% H; nalezeno: 84,1% C, 10,95% H.

3-Methylen-20, 20-(ethylendioxy)-5 β -pregnan (13)

Methylenderivát **12** (1,5 g, 4,8 mmol) byl rozpuštěn v absolutním benzenu (45 ml), roztok byl odpařen zhruba na polovinu a ke směsi byl přidán ethylenglykol (1,12 ml, 20,1 mmol). Následně byl přidán orthomravenčan ethylnatý (2 ml, 12 mmol) a monohydrát kyseliny *p*-toluensulfonové (0,016 g, 0,079 mmol). Směs byla míchána 2 dny za laboratorní teploty. Reakční směs byla nalita do nasyceného roztoku hydrogenuhličitanu sodného (50 ml), produkt byl extrahován ethyl-acetátem (100 ml), organická fáze byla promyta hydrogenuhličitanem sodným (50 ml), vodou (2 x 100 ml) a sušena bezvodým síranem

sodným. Rozpouštědla byla odpařena za sníženého tlaku. Získaný odparek byl čištěn sloupcovou chromatografií ve směsi petrolether : diethylether (7:3) za vzniku látky **13** (0,97 g, 65%).

B.t.: 102,1-106,3°C, $[\alpha]_D + 46,4$ (c 0,263).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz) v CDCl_3 : 0,76 s, 3 H (3 x H-18); 0,93 s, 3 H (3 x H-19); 1,30 s, 3 H (3 x H-21); 3,87-4,01 m, 4 H (-O-CH₂-CH₂-O-); 4,56-4,58 m, 2 H (CH₂=).

IČ spektrum: 887 (CH₂=); 1070, 1053 (ethylenketal); 1376 (CH₃, methyl).

Pro C₂₄H₃₈O₂ (358,6) vypočteno: 80,39% C, 10,68% H; nalezeno: 80,40% C, 10,88% H.

3β-Hydroxymethyl-5β-pregnan-20-on (14a) a 3α-hydroxymethyl-5β-pregnan-20-on (14b)

Methylenderivát **13** (2 g, 6 mmol) byl rozpuštěn v čerstvě destilovaném tetrahydrofuranu (50 ml), k reakční směsi byl za míchání přikapán roztok komplexu boran-THF (1M) v THF (55,8 ml) při 0 °C pod inertní atmosférou argonu. Průběh reakce byl kontrolován TLC ve směsi petrolether-ether (4:1). Po 3 hodinách přidán hydroxid draselný (3,7g v 37 ml H₂O) a peroxid vodíku (22,2 ml, 30%) a reakční směs byla míchána 80 min pod argonem při 0°C. Reakční směs byla nalita do ethyl-acetátu (1000 ml) a organická fáze byla vytřepána vodou (4 x 400 ml), poté sušena bezvodým síranem sodným, přefiltrována a odpařena. K odparku rozpuštěném v acetonu (20 ml) byla přidána voda (6 ml) a kyselina chlorovodíková (10%, 10 kapek). Směs byla nechána stát 30 min, byla nalita na vodu s ledem a vytřepána diethyletherem (2 x 400 ml). Organická fáze byla vytřepána hydrogenuhlíčanem sodným (2 x 200 ml) a vodou (2 x 200 ml). Dále sušena bezvodým síranem sodným, přefiltrována a odpařením rozpouštědel byla získána směs alkoholů **14a** + **14b** (2 g, 100%). Tato směs alkoholů byla rozdělena na sloupci silikagelu (80 g), mobilní fází byla směs petrolether-ether (7% etheru v petroletheru). Byly získány alkoholy **14a** (700 mg, 35%) a **14b** (260 mg, 13 %).

3β-Izomer (14a):

B.t.: 112,8-115,6°C, $[\alpha]_D + 68,4$ (0,209).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz) v CDCl_3 : 0,60 s, 3 H (3 x H-18); 0,90 s, 3 H (3 x H-19); 2,11 s, 3 H (3 x H-21); 2,54 t, 1H, J = 9 (H-17); 3,64-3,68 m, 2H (CH₂OH).

IČ spektrum: 3625 ((O-H, alkohol); 1698 (C=O, acetát); 1358 (CH₃, acetát).

Pro C₂₂H₃₆O₂ (332,5) vypočteno: 79,46% C, 10,91% H; nalezeno: 79,33% C, 11,02% H.

3α-Izomer (14b):

B.t.: 126,8-129,7°C, $[\alpha]_D + 80,2$ (0,222).

^1H NMR (400 MHz) v CDCl_3 : 0,60 s, 3 H (3 x H-18); 0,94 s, 3 H (3 x H-19); 2,11 s, 3 H (3 x H-21); 2,54 t, 1H, $J = 9$ (H-17); 3,48-3,50 t, 2H, $J=5,7$ (CH_2OH).

IČ spektrum: 3627 (O-H, alkohol); 1698 (C=O, acetát); 1359 (CH_3 , acetát).

Pro $\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{O}_2$ (332,5) vypočteno: 79,46% C, 10,91% H; nalezeno: 79,51% C, 9,98% H.

20-Oxo-5 β -pregnan-3 β -karboxylová kyselina (15a)

K alkoholu **14a** (50 mg, 0,15 mmol), rozpuštěném v acetonu (4 ml) bylo po kapkách přidáváno Jonesovo činidlo až do zhnědnutí směsi. Poté byla reakční směs nechána stát 30 min za laboratorní teploty. Přebytek činidla byl rozložen přidáním isopropylalkoholu (1 ml) do reakční směsi. Reakční směs byla nalita do směsi voda-led (30 ml) a extrahována chloroformem (2 x 25 ml). Organická fáze byla promyta vodou (1 x 30 ml), sušena a odpařena. Krystalizací ze směsi aceton-voda byla získána kyselina **15a** (26 mg, 52%).

B.t.: 212,1-215,2°C, $[\alpha]_D + 94,0$ (0,200).

^1H NMR (400 MHz) v CDCl_3 : 0,60 s, 3 H (3 x H-18); 0,93 s, 3 H (3 x H-19); 2,12 s, 3 H (3 x H-21); 2,76-2,79 m, 1H (H-3); 2,53 t, 1H (H-17).

IČ spektrum: 1737 (C=O, COOH, monomer); 1699 (C=O, COOH, dimer); 1386 (CH_3 , methyl).

Pro $\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{O}_3$ (346,5) vypočteno: 76,26% C, 9,89% H; nalezeno: 76,56% C, 9,98% H.

20-Oxo-5 β -pregnan-3 α -karboxylová kyselina (15b)

K alkoholu **14b** (83 mg, 0,25 mmol), rozpuštěném v acetonu (5 ml) bylo po kapkách přidáváno Jonesovo činidlo až do zhnědnutí směsi. Poté byla reakční směs nechána stát 30 min za laboratorní teploty. Přebytek činidla byl rozložen přidáním isopropylalkoholu (1 ml) do reakční směsi. Reakční směs byla nalita do směsi voda-led (50 ml) a extrahována chloroformem (1 x 100 ml). Organická fáze byla promyta vodou (1 x 50 ml), sušena a odpařena. Krystalizací ze směsi methanol-voda byla získána kyselina **15b** (37mg, 44,6%).

B.t.: 132,9-136,0°C, $[\alpha]_D + 81,6$ (0,250).

^1H NMR (400 MHz) v CDCl_3 : 0,60 s, 3 H (3 x H-18); 0,95 s, 3 H (3 x H-19); 2,11 s, 3 H (3 x H-21); 2,35-2,43 m, 1H (H-3); 2,54 t, 1H, $J=9$ (H-17).

IČ spektrum: 1732 (C=O, COOH, monomer); 1700 (C=O, COOH, dimer); 1385 (CH_3 , methyl).

Pro $\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{O}_3$ (346,5) vypočteno: 76,26% C, 9,89% H; nalezeno: 76,03% C, 9,68% H.

6. Závěr

Z výchozích látek **5** a **11** se podařilo připravit všechny čtyři žádané steroidní karboxylové kyseliny v řadách 5- α (**8a**, **8b**) a 5- β (**15a**, **15b**). Následně byla testována jejich aktivita na rekombinantních NMDA receptorech a to na Oddělení buněčné neurofyzologie Fyziologického ústavu AV ČR. Testování potvrdilo předem předpokládanou biologickou aktivitu syntetizovaných kyselin na NMDA receptoru.

7. Literatura

1. Dorda M.; Vlček K.; Chodounská H.; Vyklický L. Jr.: Neurosteroidy – mechanismus působení a možnosti užití v klinické praxi. *Psychiatrie*, **2001**, *Supplementum* 3,5.
2. Cais O.; Vyklický L.: Molekulární a systémové účinky neurosteroidů. *Psychiatrie*, **2006**, *Supplementum* 3, 10, 8-11.
3. Selye H.: Anesthetic Effect of Steroid Hormones. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **1941**, 46, 116-121.
4. Danysz W.; Parsons C. G.: Glycine and N-Methyl-D-Aspartate Receptors: Physiological Significance and Possible Therapeutic Applications. *Pharmacol. Rev.*, **1998**, 50, 597-664.
5. Drašar P.; Pouzar V.; Černý I.; Havel M.; Egorova V. V.; Ananchenko S. N.; Torgov I. V.; Tureček F.: Synthetic approach to analogues of 19-norsteroids with an acyclic side chain. *Steroids*, **1989**, 53, 107-129.
6. Chodounská H.; Urban J.; Šťastná E.; Buděšínský M.: Synthesis of the 3-carboxy derivatives of 5beta-pregnan-20-one. *21st Conference on Isoprenoids*. Bialystok: University of Bialystok, **2005**, s 71.
7. Chodounská H.; Kasal A.: Allopregnanolon derivatives: Synthesis of 3-hydroxy-7a-homo-5-pregnan-20-one. *Coll. Czech. Chem. Commun.*, **2000**, 65, 1156-1162.
8. Lyapkalo I.M.; Högermaier J.; Reissig H. U.: *Tetrahedron*, **2004**, 60, 7721-7729.
Skoda-Földers R.; Kollár L.: *Chem. Rev.*, **2003**, 103, 4095-4130.
9. Chodounská H.; Pouzar V.; Buděšínský M.; Slavíková B.; Kohout L.: Synthesis of 3-methyl-3-hydroxy-6-oxo-androstane derivatives, *Steroids*, **2004**, 69, 605-612.