

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta



SYNTÉZA NOVÝCH DERIVÁTŮ GUAJAZULENU

Synthesis of new guaiazulene derivatives

Bakalářská práce

Žofie Počtová

Studijní program: Chemie v přírodních vědách

Vedoucí bakalářské práce: Prof. RNDr. Martin Kotora, CSc.

Praha 2015

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně, že jsem uvedla všechny použité zdroje informací a že práce nebyla předložena za účelem získání jiného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že využití získaných výsledků mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze s písemným souhlasem univerzity.

Poděkování

V první řadě patří mé poděkování Prof. RNDr. Martinu Kotorovi, CSc., mému školiteli, za pomoc a vedení při řešení problematiky spojené s touto prací.

Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Davidu Nečasovi Ph.D. za rady a čas, který věnoval, aby mi pomohl při práci v laboratoři. Děkuji za pomoc i kolektivu v laboratoři 019.

Mé díky patří také RNDr. Simoně Hybelbauerové za měření a pomoc při měření NMR spekter a dalšímu personálu univerzity za měření spekter IČ a MS.

Obsah

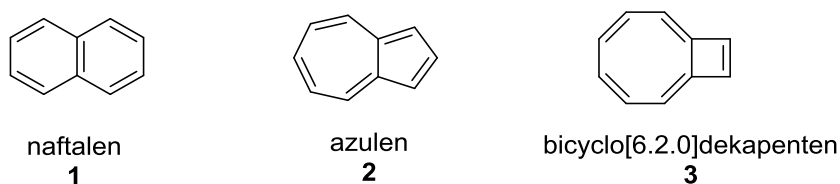
1. Teoretický úvod: vlastnosti a chemie azulenu a příbuzných látek	4
1.1. Fyzikální vlastnosti azulenu	4
1.2. Sloučeniny azulenu v přírodě	5
1.3. Použití azulenu a rizika s tím spojená	7
1.4. Reakce sloučenin s azulenovým skeletem	8
1.4.1. Acylace	8
1.4.2. Alkylace	10
1.4.3. Halogenace	11
1.4.4. Polymerizace	12
2. Cíle práce	14
3. Výsledky a diskuse	15
3.1. Příprava derivátů guajazulenu s aldehydovou skupinou	15
3.2. Alkylace aldehydové skupiny na derivátu guajazulenu	18
3.3. Diels-Alderova reakce dienové skupiny na derivátu guajazulenu	21
4. Experimentální část	23
4.1. Použité látky, metody, přístroje	23
4.2. Použité postupy a naměřená data	23
5. Závěr	28
6. Použité zkratky	29
7. Odkazy	30

1. Teoretický úvod: Vlastnosti a chemie azulenu a příbuzných látek

1.1. Fyzikální vlastnosti azulenu

Azulen (**2**) je aromatický uhlovodík ($C_{10}H_8$), tvořený jedním pětičlenným a jedním sedmičlenným kruhem. Je isomerní s naftalenem (**1**) (bicyclo[4.4.0]dekapenten) a bicyclo[6.2.0]dekapenten (**3**) (obr. 1).¹

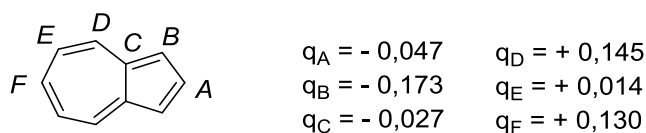
Obrázek 1 Izomery azulenu.



Na rozdíl od bezbarvého naftalenu má azulen charakteristickou modrou barvu, jež je typická i pro mnohé sloučeniny s azulenovým skeletem a která mu dala jméno (španělsky azul = modrý). Azulen objevil Septimus Piesse v roce 1863 a jeho strukturu poprvé popsal chorvatský chemik Leopold Růžička. Teplota tání byla experimentálně stanovena na 98–101 °C a teplota varu na 241 – 243 °C.²

Výpočty podle teorie LCAO-MO ukázaly, že na pětičlenném kruhu je velká elektronová hustota na rozdíl od kruhu sedmičlenného, kde je nízká, což souvisí s faktem, že azulen má poměrně velký dipólový moment ($\mu = 0,8\text{--}1,08\text{ D}$), oproti tomu naftalenem má dipólový moment nulový. Rozložení náboje na jednotlivých atomech byly spočítané pomocí Hückelovy metody (obr. 2)³ a jasně ukazují, že nejvyšší elektronová hustota je na atomech B, tedy v pozici 1 a 3.

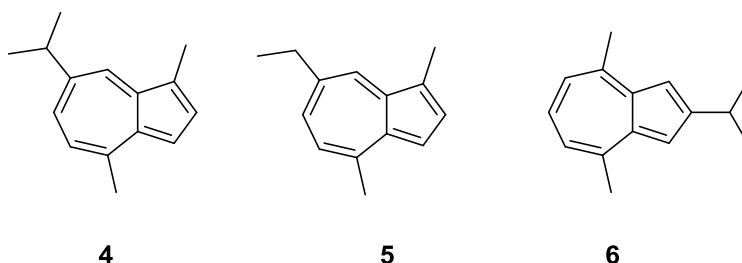
Obrázek 2 Rozložení náboje na jednotlivých atomech azulenu.



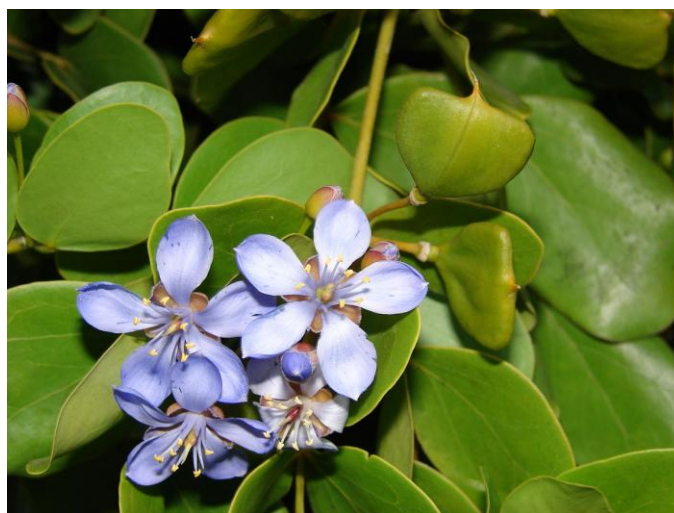
1.2. Sloučeniny azulenu v přírodě

Azulen a jeho deriváty se vyskytují v mnoha přírodních sloučeninách, mohou mít různé biologické vlastnosti (např. antibakteriální účinek) a často se jedná o pigmenty. Poprvé byl azulen izolován z heřmánku (*Matricaria chamomilla*) destilací vodní parou. Je to jediný známý modrý organický chromofor, který neobsahuje heteroatom.⁴ V průběhu let dostaly i další deriváty azulenu triviální názvy, například guajazulen (**4**) získaný ze stromu guajak léčivý (*Guajacum officinale* L.) (obr. 4),⁵ chamazulen (**5**) získaný z oleje heřmánku (*Matricaria chamomilla*) nebo vetivazulen (**6**) obsažený v travnaté Indické rostlině vetiver (*Chrysopogon zizanioides*) (obr. 3).³

Obrázek 3 Sloučeniny s azulenovým skeletem získané z přírody.



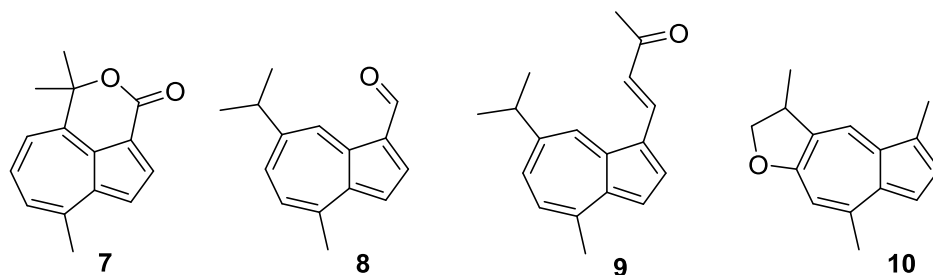
Obrázek 4 Guajak léčivý (*Guajacum officinale* L.).



Azulen sám o sobě je modrý, jeho deriváty pak jsou většinou modré, fialové nebo zelené. Pigment odvozený od azulenu (1-stearoyloxymethylene-4-methyl-7-isopropenylazulene) (**8**) byl izolován například z modré houby *Lactarius indigo* (obr. 6),^{6,7} červeno-fialový pigment pojmenovaný oreolactone z oddenků keře *Oreocnide frutescens* rostoucího v Číně (**7**),⁸ zelený pigment **9** izolovaný z plodnic houby *Basidiomycete lactarius*

spolu se třemi dalšími červeno-fialovými pigmenty azulenového typu,⁹ pigment z mořské rostliny *Gorgonian acalycigorgia* (2,3-dihydrolinderazulene) (**10**).¹⁰ Modrý pigment tvořený dimerem derivátu azulenu byl izolovaný z polokeře *Ajania fruticulosa*, rostoucího v Číně, Kazachstánu a Rusku (**7**).⁴

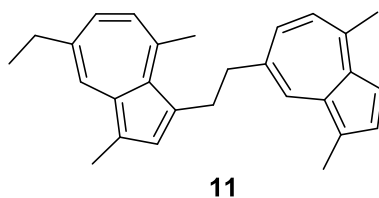
Obrázek 5 Pigmenty s azulenovým skeletem.



Obrázek 6 Houba *Lactarius indigo*.



Obrázek 7 Přírodní pigment tvořený dimerem derivátu azulenu.



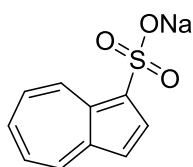
1.3. Použití azulenu a rizika s tím spojená

Azulen a sloučeniny s azulenovým skeletem jsou hojně využívány v kosmetických a farmaceutických přípravcích. Přidává se například do mastí, pro jeho protizánětlivé a antibakteriální účinky. Je součástí některých koupelňových solí a pěn na holení, kde pomáhá zklidnit podrážděnou pokožku. Pravděpodobně také pomáhá při regeneraci buněk, proto se přidává do krémů proti vráskám a péči o pleť.

Jako příklad lze uvést oční mast Ophthalmo-Azulen, která má protizánětlivé a desinfekční účinky, účinnou látkou je guajazulen (4) (7,5 mg v 5 g oční masti), či mast Dermazulen, která také obsahuje guajazulen (4) a má hojící, protizánětlivé a mírně desinfekční účinky.¹¹

Existuje také azulenová antibakteriální zubní pasta (0,2-0,4 hm% azulenu) a díky bakteriocidnímu účinku chrání ústní dutinu a zdraví zubů.¹² Pro léčení a prevenci ústní infekce se do zubní pasty nebo ústní vody přidává sodná sůl azulensulfonové kyseliny (12).^{13,14}

Obrázek 8 Sodná sůl azulensulfonové kyseliny přidávaná do zubní pasty nebo ústní vody.



12

Přes všechny léčebné vlastnosti, vykazuje azulen i mutagenní účinky po vystavení slunečnímu záření (fototoxicita). Vyvolá je UV záření (hlavní absorpční pás při $\lambda = 340$ nm), viditelné záření (hlavní absorpční pás při 600 nm) i kombinace obou. Tyto účinky byly prokázány u azulenu i guajazulenu, které se v kosmetice používají nejčastěji (testováno na bakterii *Salmonella typhimurium*). Proto je třeba si po aplikaci přípravku s obsahem azulenu nebo jeho derivátů dávat pozor na slunečním záření. Akutní toxicita azulenu podaného orálně byla u myši stanovena na $LD_{50} = 3$ g/kg a u krysa na $LD_{50} = 4$ g/kg.¹⁵

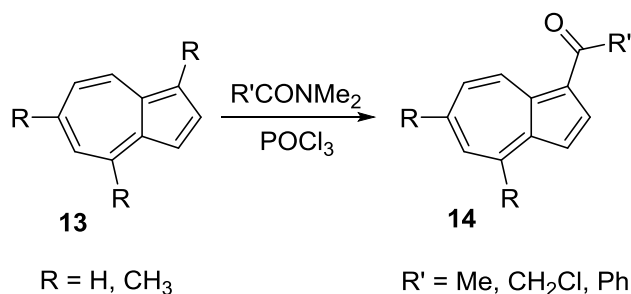
1.4. Reakce sloučenin s azulenovým skeletem

1.4.1 Acylace

Z výše uvedených výpočtu elektronové hustoty vyplývá, že elektrofilní aromatická substituce by měla probíhat na pozici 1 a 3. To bylo potvrzeno i v praxi.^{3,16} Existuje několik postupů, jak acylace provádět.

Jeden z postupů acylace azulenu a jeho substitučních derivátů je založen na reakci dimethylamidů karboxylových kyselin v přítomnosti oxychloridu fosforečného.³ V této reakci byly použity amidy kyseliny octové, chloroctové a benzoové (schéma 1).

Schéma 1



Příprava 1-acylazulenu nebo 1,3-diacylazulenu reakcí azulenu s chloridem, bromidem či anhydridem karboxylové kyseliny probíhá za přítomnosti chloridu hlinitého nebo chloridu cíničitého jako katalyzátoru (schéma 2). Těto acylace bylo úspěšně dosaženo například reakcí azulenu s chloridem nebo bromidem kyseliny šťavelové, malonové a fenyloctové.³ Bylo zjištěno, že reakce azulenu s trifluoroacetanhydridem proběhne téměř kvantitativně i bez katalyzátoru (schéma 3).^{3,16}

Schéma 2

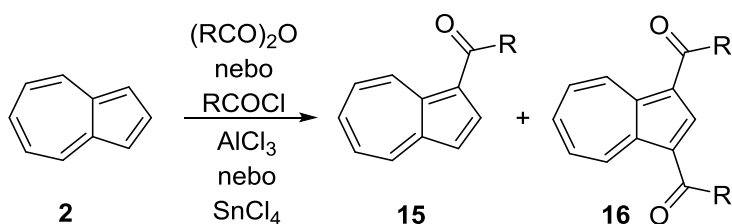
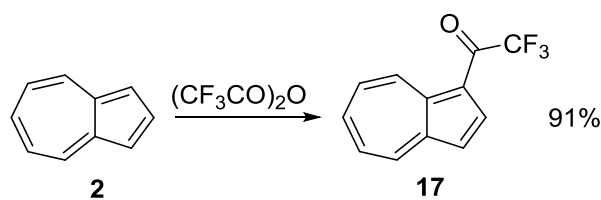
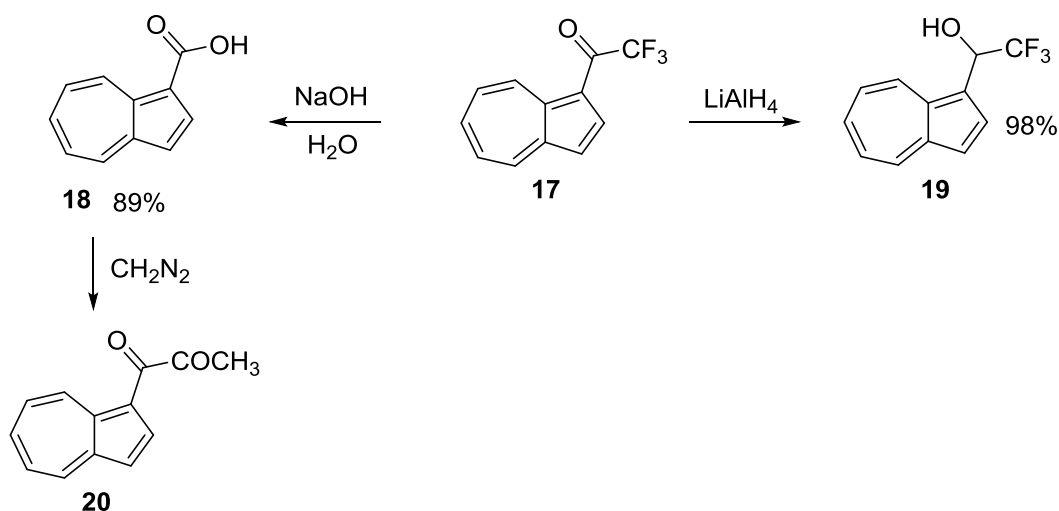


Schéma 3



1-Trifluoracetylazulen lze následně využít pro tvorbu příslušných karboxylových kyselin, esterů a alkoholů. Úspěšně byla provedena bazická hydrolyza trifluoracetylazulenu za vzniku karboxylové kyseliny (89%), esterifikace pomocí diazomethanu a redukce na alkohol tetrahydridohlinitanem lithným (98%) (schéma 4).¹⁶

Schéma 4

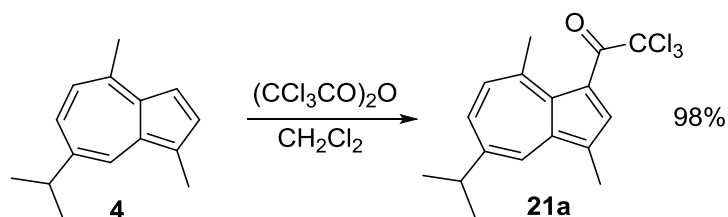


Byla vyzkoušena také acylace 1-chlorazulenu a 1-fenylazulenu trifluoracetanhydridem s výtěžkem 84% a 88%. Produkty mohou být obdobně hydrolyzovány na 1-substituované-3-azulen karboxylové kyseliny s výtěžkem 80-85%. Pokud se ovšem nechá reagovat azulen substituovaný více deaktivující thiokyanidovou skupinou na pozici 1 s trifluoracetanhydridem, výtěžek se rapidně sníží (24%).¹⁶

Reakce azulenu s trichloracetanhydridem probíhá pomaleji než s trifluoracetanhydridem, ale stejným způsobem. 1-Trichloracetylazulen byl získán s výtěžkem 48% a jeho bazická hydrolyza poskytla 1-acetylkarboxylovou kyselinu s téměř kvantitativní konverzí (99,5%). Hydrolyza trichloracetylazulenu probíhá podstatně rychleji

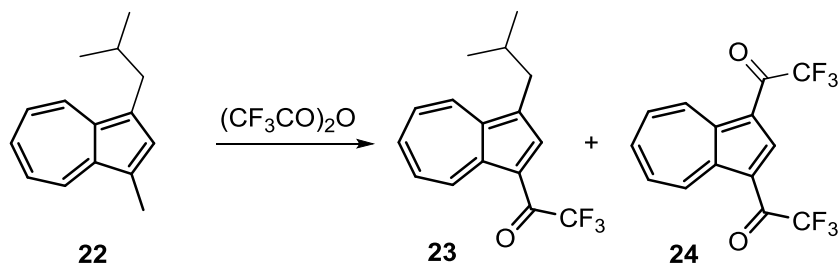
než hydrolyza trifluoracetylazulenu.¹⁶ Acylace trichloracetanhydridem probíhá stejně také s guajazulenem (schéma 5). Ukázalo se, že 1-trichloracetylová skupina je zde vhodná nejen pro další reakce, ale také ke zvýšení reaktivity 3-methylové skupiny při její oxidaci. 1-trichloracetylguajazulen byl připraven s výtěžkem 98%.¹⁷

Schéma 5



Pokud jsou již pozice 1 a 3 na azulenu obsazené nějakými jinými skupinami, např. alkylovými, je možné jednu nebo obě nahradit za skupinu acylovou. Snadnost substituce stoupá od methylové skupiny přes *i*-propylovou, *t*-butylovou k trifenylmethylové skupině (schéma 6).³

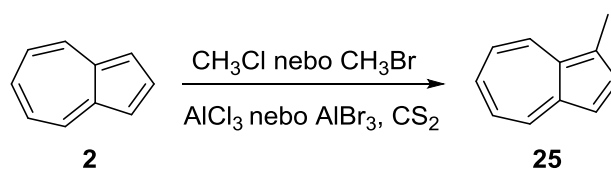
Schéma 6



1.4.2 Alkylace

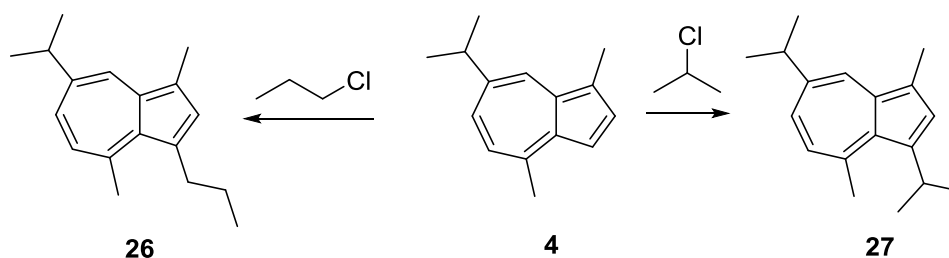
Methylace azulenu byla úspěšně provedena za podmínek Friedel-Craftsovy alkylace (schéma 7). Reakcí azulenu s methylbromidem nebo methylchloridem v přítomnosti chloridu nebo bromidu hlinitého byl získán 1-methylazulen. Jako rozpouštědlo lze použít příslušný alkylhalogenid nebo sirouhlík.¹⁸

Schéma 7



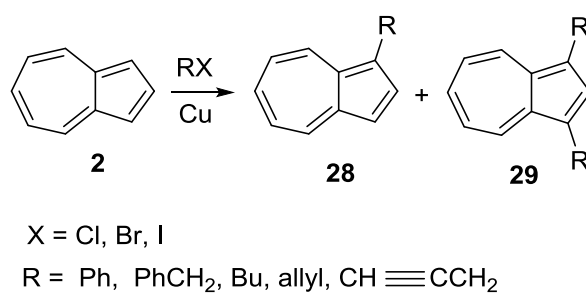
Alkylace guajazulenu byla vyzkoušena reakcí s propylchloridem a izopropylchloridem za vzniku 3-alkyl guajazulenu¹⁹ (schéma 8).

Schéma 8



Alkylace azulenu byla také provedena s několika halogenderiváty uhlovodíků za přítomnosti mědi²⁰ (schéma 9).

Schéma 9



1.4.3 Halogenace

Bromace a chlorace azulenu pomocí CuX_2 poskytuje odpovídající 1,3-halogenderiváty azulenu s poměrně vysokými výtěžky, jodace funguje při použití jodu a acetátu měďnatého. (schéma 10). Stejně vysokých nebo vyšších výtěžků lze docílit reakcí azulenu substituovaného na pozici 1 například kyano, thiokyano či nitro skupinou s CuX_2 , přičemž

vznikne 1-substituovaný-3-haloazulen²¹ (schéma 11). Halogenace s vysokým výtěžkem byla také uskutečněna při reakce azulenu s *N*-bromosukcinimidem za vzniku 1,3-bromazulenu²² (schéma 12).

Schéma 10

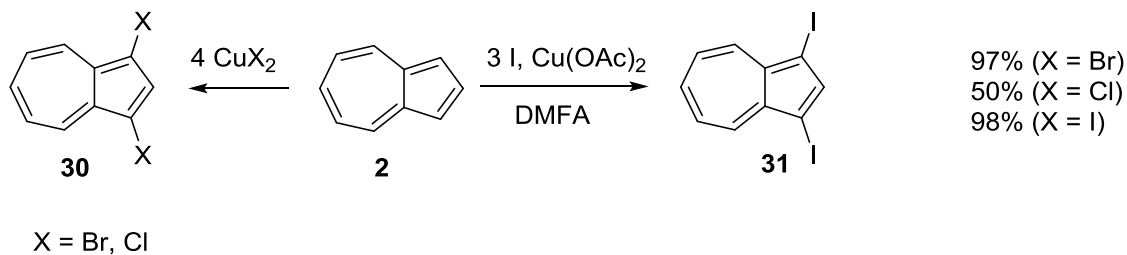


Schéma 11

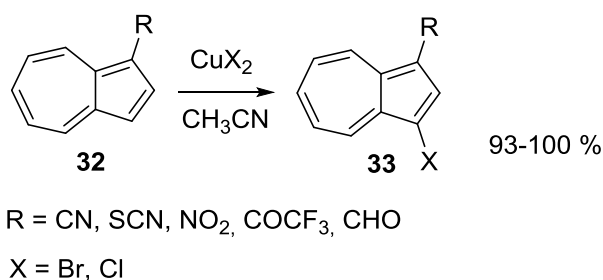
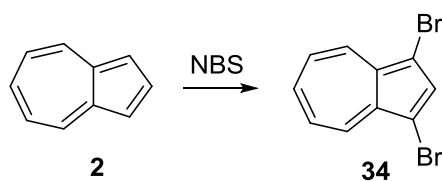


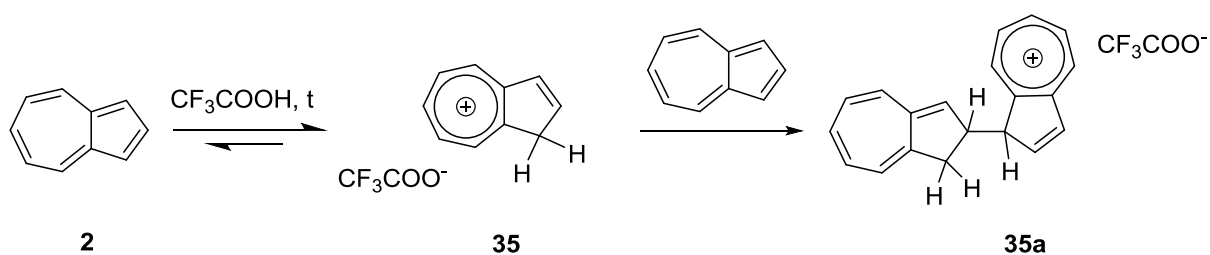
Schéma 12



1.4.4 Polymerizace

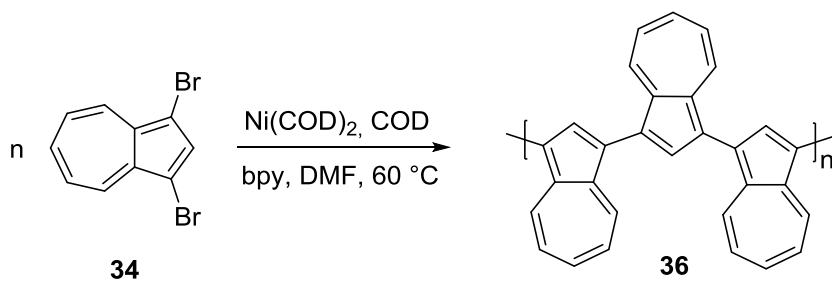
Polyazuleny se řadí mezi vodivé polymery, dají se využít ve fotovoltaice a při výrobě různých elektronických součástek. První 1,2-polyazulen byl syntetizován v roce 1997 zahříváním azulenu s trifluoroctovou kyselinou (schéma 13). Tyto polymery byly ale téměř nerozpustné ve většině rozpouštědel, což zhoršovalo jejich uplatnění. Snaha o následnou aromatizaci polymeru a zvýšení rozpustnosti oxidací byla neúspěšná.²³

Schéma 13



Rozpustný 1,3-polyazulen byl připraven postupem podle Yamamota, tedy reakcí 1,3-dibromazulenu s použitím nikelnatého katalyzátoru (schéma 14).²² Tenké vodivé filmy polyazulenu se pak dají připravit elektrochemickými metodami.²⁴

Schéma 14



2. Cíle práce

Vzhledem k tomu, že sloučeniny obsahující azulenový systém (uspořádání) se jednak nachází v přírodě a jednak díky svým fyzikálně-chemickým vlastnostem mají velké využití v mnohých oblastech chemie, studium jejich syntézy a vlastností je nejen zajímavou, ale i přínosnou záležitostí.

Cílem této práce bylo:

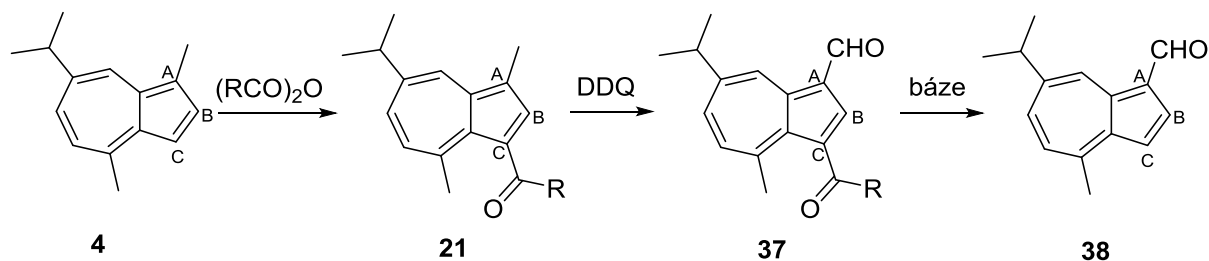
- a) seznámit se s chemií azulenů,
- b) prozkoumat možnosti přípravy nových derivátů guajazulenu,
- c) případně využít tyto postupy pro syntézu dalších, například biologicky aktivních látek.

3. Výsledky a diskuze

3.1. Příprava derivátů guajazulenu s aldehydovou skupinou

Nejprve jsem chtěla podle známého postupu připravit aldehyd **38**, což je vlastně derivát guajazulenu s oxidovanou methylovou skupinou na atomu uhlíku A (schéma 15), kterou lze využít pro další reakce. První možná metoda spočívá v přímé oxidaci guajazulenu, ale podle údajů v odborné literatuře,¹⁷ při pokusech o oxidaci přímo guajazulenu vznikla pouze směs látek, která obsahovala méně než jedno procento požadovaného produktu. Další metoda přípravy je založena na postupu, který obsahuje tři kroky.¹⁷ Prvním je acylace na atomu uhlíku C, druhým oxidace methylové skupiny na atomu uhlíku A a třetím odstranění acylové skupiny z atomu uhlíku C (schéma 15). Dle publikovaného článku je acylace nezbytná pro to, aby mohla být methylová skupina oxidována. Poslední reakce se provádí v případě trichloracetylového derivátu za bazických podmínek a jedná se vlastně o haloformovou reakci následovanou spontánní dekarboxylací.

Schéma 15



Jako skupinu, kterou je guajazulen acylován, jsem se rozhodla použít trichloracetylovou skupinu, se kterou měli v publikaci největší výtěžky při oxidaci (99 %). Acylaci jsem provedla reakcí guajazulenu **4** s anhydridem kyseliny trichloroctové v dichlormethanu za laboratorní teploty (Schéma 16). Po zpracování reakční směsi byl surový produkt podroben kolonové chromatografii na silakagelu. Z kolony vycházela jako první modrá frakce, která podle srovnání retenčních faktorů byla výchozí látka guajazulen. Druhá frakce měla hnědožlutou barvu a NMR potvrdilo, že jde o produkt **21a**. Reakci jsem několikrát opakovala a izolované výtěžky se pohybovaly v rozmezí 65-81 %. Publikovaný údaj je 98 %.

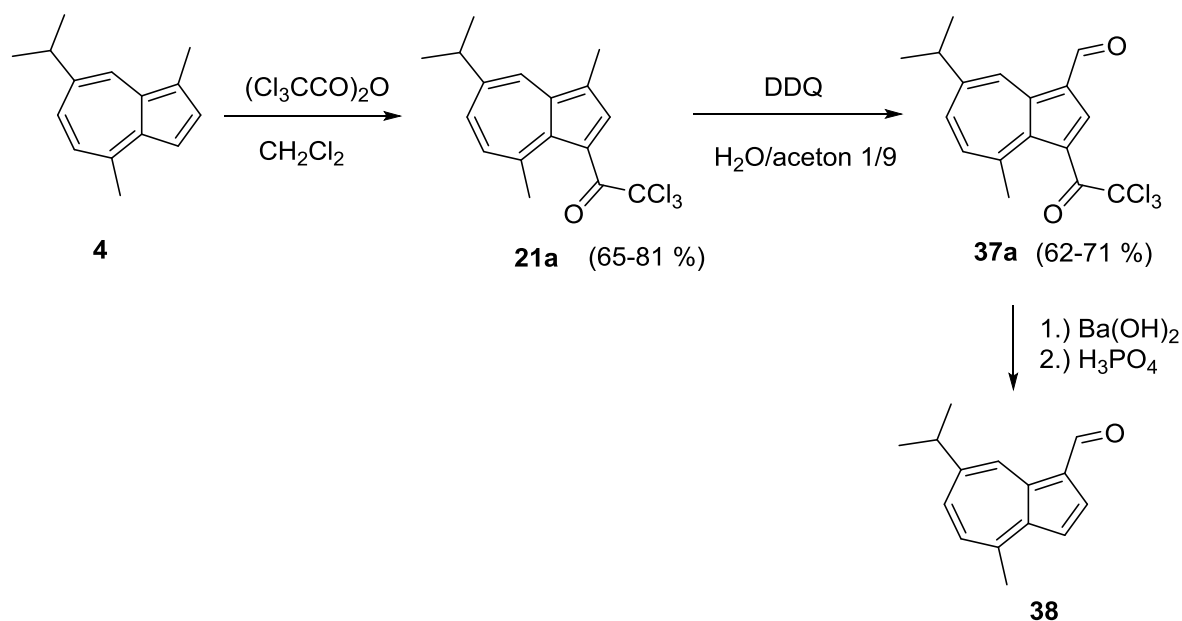
Druhým krokem byla oxidace methylové skupiny, které jsem docílila reakcí **21a** s DDQ ve směsi acetonu a vody za laboratorní teploty. Následně jsem provedla kolonovou

chromatografii na alumině. Pro získání produktu bohatě postačila asi 3 cm vrstva aluminu, jelikož skrz kolonu procházel jen produkt **37a**. Naměřené vodíkové spektrum získané látky opět souhlasilo s publikovanými údaji. Reakci jsem opět prováděla několikrát a výtěžky se pohybovaly v rozmezí 62-71 %. Publikovaný údaj je 99 %.

Převedení trichloracetylové skupiny na karboxylovou ve třetím kroku se provádí za bazických podmínek. Podle odborné literatury je při použití silně zásaditých hydroxidů (NaOH nebo KOH) výsledkem pouze neidentifikovaná směs produktů. Při použití slabšího hydroxidu barnatého má ale reakce probíhat s konverzí 99%.¹⁷ Držela jsem se tedy postupu a provedla reakci **37a** s hydroxidem barnatým v roztoku acetonu a vody. Reakční směs jsem 10 min míchala a zahřívala ve vodní lázni na 60 °C. Poté jsem směs okyselila 85% kyselinou trihydrogenfosforečnou a míchala na vodní lázni ohřáté na 90 °C asi 10 min. Do směsi jsem následně přidala několik mililitrů vody a toluenu, aby se vytvořily dvě dobře viditelné fáze. Organickou fází jsem odebrala a filtrovala přes fritu, na které byla asi 3cm vrstva síranu hořečnatého. Vše souhlasilo s popsáním postupem do té doby, kdy jsem přidala kyselinu, načež se barva organické fáze změnila na fialovou, tak jak je popsáno. Již při průchodu přes vrstvu síranu hořečnatého ale bylo vidět, jak se reakční směs rozložila na mnoho barevných produktů, z nichž žádný nepřevládá a které jsem dále neizolovala. Reakci jsem opakovala znovu se stejným výsledkem.

V odborném časopise byla obdobná reakce popsána také jako součást více následných reakcí, zde tedy neizolovali produkt po dekarboxylaci, ale ihned jej nechali reagovat v reakci další. Postup odstranění trichloracetylové skupiny byl podobný, ale lišil se hlavně tím, že se zde nepřidávala kyselina.²⁵ Reakci jsem tedy zkusila znovu. Nechala jsem tedy reagovat **37a** s hydroxidem barnatým v acetonu ve vodní lázni při 50 °C. Po 15 minutách byla reakční směs vytřepána s benzenem. Na TLC destičce jsem ovšem nepozorovala žádnou novou skvrnu jakožto potenciální produkt a tak jsem i v tomto případě zkusila reakční směs okyselit 85% kyselinou trihydrogenfosforečnou. Na TLC destičce se nyní objevila fialová skvrna, která by mohla být produktem, ovšem na dalším TLC zrealizovaném po pár minutách už bylo opět vidět mnoho barevných skvrn odpovídajícím zřejmě řadě nových látek. Tyto látky jsem dále neizolovala.

Schéma 16



Je tedy možné konstatovat, že první dva kroky proběhly podle popsaných podmínek snadno a bez problémů. Třetí krok se mi, bohužel, nepodařilo reprodukovat a kýžený produkt se mi tak nepodařilo získat.

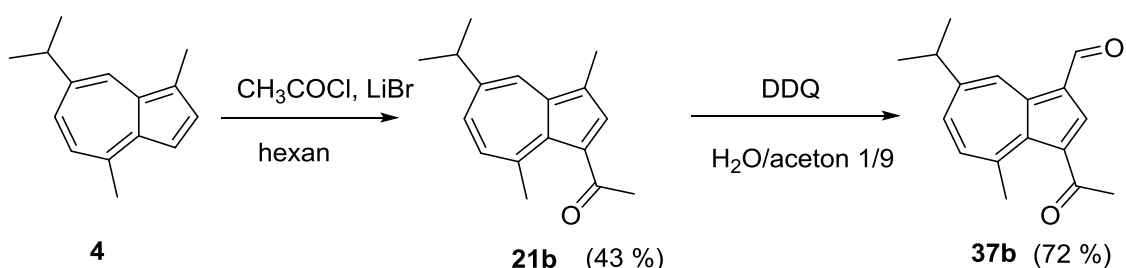
Otázkou samozřejmě zůstává, proč se nepodařilo reprodukovat poslední krok. Možné vysvětlení může být v tom, že podle postupů popsaných v odborné literatuře byly reakce prováděny v měřítku ~ 0.1 mol a více. V mém případě byly reakce prováděny v měřítku ~ 1 mmol, tj. v měřítku o dva řády menším. Dále bylo v literatuře konstatováno, že aldehyd **38** je málo stálý a je tedy možné, že kýžený produkt vznikl, ale následně se rychle rozkládal.

Dále jsem se rozhodla zkusit připravit látky **21** a **37**, tentokrát s acetylovou skupinou na uhlíku C (**21b**, **37b**) (schéma 17). Acylaci jsem provedla podle popsaného postupu²⁷ a to reakcí guajazulenu s dvěma ekvivalenty acetylchloridu v hexanu. Přidala jsem bromid lithný jakožto Lewisovu kyselinu a roztok několik hodin míchala za zvýšené teploty. Reakci jsem nechala probíhat ještě přes dvě noci za laboratorní teploty. Poté jsem do reakční směsi přidala ethanol a vodu a produkt jsem extrahovala do diethyletheru. Tuto organickou část jsem vytřepala s vodou, roztokem hydrogenuhličitanu sodného a nasyceným roztokem chloridu sodného, přičemž jsem přidala trochu dichlormethanu pro lepší oddělení fází. Organickou fází jsem sušila síranem hořečnatým. Dále jsem provedla sloupcovou chromatografii na silikagelu. Vzorek jsem rozpustila v dichlormethanu, nanasla na trochu silikagelu v baňce, odpařila rozpouštědlo a vložila na kolonu na sucho. Jako rozpouštědlo jsem použila hexan a po projití

první modré frakce kolonou 10/1 hexan/ethylacetát. Chromatografie poskytla čtyři frakce. První frakce modré barvy byla výchozí látka, dále byla frakce zelená a žlutá. Poslední frakce, která měla hnědou barvu na koloně a modrou v roztoku, byl produkt **21b**, který jsem získala s výtěžkem 43% ve formě tmavě modré viskózní látky. Naměřené vodíkové spektrum získané látky souhlasilo s publikovanými údaji.²⁸

V dalším kroku jsem provedla oxidaci methylové skupiny **21b** a to stejným postupem, jakým jsem provedla oxidaci methylové skupiny u **21a**. K **21b** rozpuštěném ve směsi vody a acetonu jsem přidala DDQ a roztok za laboratorní teploty míchala 15 minut. Po odpaření rozpouštědla jsem provedla chromatografii na alumině a jako rozpouštědlo jsem použila toluen. Skrze kolonu opět procházel pouze červený produkt, který jsem získala s výtěžkem 72% a který jsem identifikovala podle vodíkového NMR spektra, jež souhlasilo s publikovanými údaji.²⁷

Schéma 17



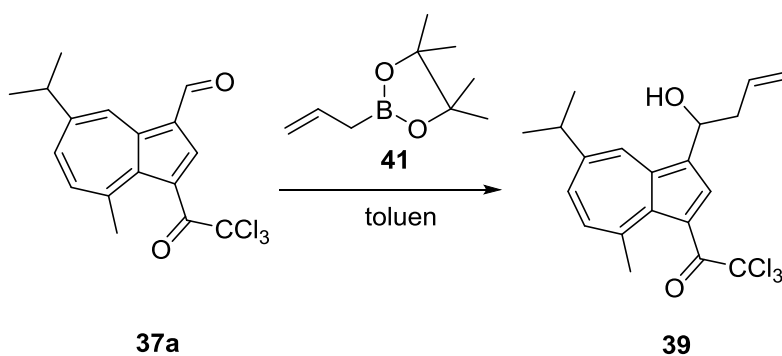
Lze tedy shrnout, že acylace guajazulenu a následná oxidace methylové skupiny probíhaly bez problémů dle popsáných postupů, když byla na guajazulen acylována skupina trichloracetylová i acetylová.

3.2. Allylace aldehydové skupiny na derivátu guajazulenu

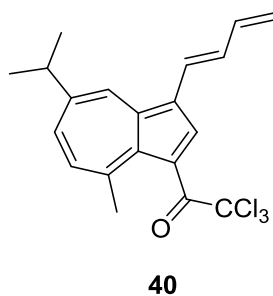
Jako další reakci jsem se rozhodla vyzkoušet allylaci aldehydové skupiny látky **21a**. Tato reakce ani její produkt **39** nebyly dosud popsány.

Allylaci jsem provedla reakcí **37a** s 4,4,5,5-tetramethyl-2-(2-propen-1-yl)-1,3,2-dioxaborolanem (**41**), látkou, která se k allylacím na aldehydovou skupinu dle odborné literatury používá (schéma 18).²⁶

Schéma 18



Pro reakci byl použit jako rozpouštědlo toluen. Směs byla za laboratorní teploty míchána přes noc. Následující den jsem po odpaření rozpouštědla provedla sloupcovou chromatografii na silikagelu, která poskytla tři frakce. Analýzou vodíkového a uhlíkového NMR spektra jsem určila, že první zelená frakce obsahuje látku **40**, což je produkt dehydratace alkoholu **39**.

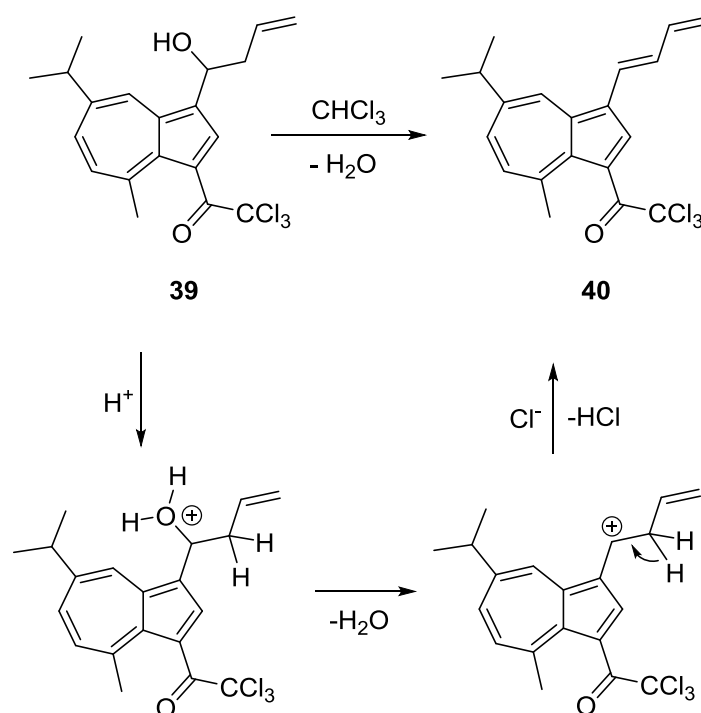


Druhá frakce byla červená a srovnáním retenčních faktorů jsem zjistila, že jde o výchozí látku. Třetí tmavě červená frakce byla největší. S určením o kterou látku jde, jsem ale zpočátku měla problém. Naměřené NMR spektrum bylo totiž identické se spektrem první frakce a obsahovalo jen malé signály látky **39**. Jednalo se tedy převážně o látku **40**. Nejprve jsem myslela, že se produkt **39** přeměňuje na **40** při průchodu silikagelovou kolonou. Použila jsem tedy pro sloupcovou chromatografii aluminu, ale výsledek se nezměnil. Když se mi stále nedařilo izolovat kýžený produkt **39**, rozhodla jsem se zkusit dehydrataci podpořit a získat **40** jako hlavní produkt. Provedla jsem stejnou reakci, tedy nechala jsem přes noc reagovat **37a** s **41** v toluenu. Další den jsem z reakční směsi odpařila rozpouštědlo, přidala dichlormethan a baňku dala na vodní lázeň ohřátou na 40 °C. Poté jsem do směsi přidala hydrogensíran draselný a nechala na vodní lázni míchat hodinu a půl. Následně provedená sloupcová chromatografie na silikagelu poskytla tři frakce, stejné jako při předchozí reakci. Zjistila jsem, že pokus o provedení dehydratace nebyl příliš úspěšný, první frakce obsahující látku **40** byla stále velmi malá a převládá frakce třetí. Zkusila jsem provést tento postup ještě jednou, ale

namísto hydrogensíranu draselného přidat silikagel. Sloupcová chromatografie na silikagelu poskytla opět tři frakce, obdobně jako při předchozích reakcích. Tentokrát bylo první frakce o trochu více, ale stejně se mi podařilo z ní získat pouhé 3 mg (3%) produktu **40** na rozdíl od třetí frakce, které jsem izolovala 58 mg.

Když jsem ovšem prováděla tuto reakci, změřila jsem vodíkové spektrum i od frakce třetí. Tentokrát signály odpovídaly téměř čisté látce **39**. Uvědomila jsem si, že důvod může být ten, že jsem NMR spektrum měřila bezprostředně po přípravě vzorku do kyvety. Tyto výsledky mě nakonec přivedly k závěru, že dehydratace **39** probíhala při rozpuštění **39** v chloroformu. Chloroform se vzdušným kyslíkem oxiduje za vzniku fosgenu a kyseliny chlorovodíkové, která dehydrataci katalyzuje (schéma 19). Doposud jsem totiž vždy při měření NMR spekter využívala jako rozpouštědlo deuterovaný chloroform a roztok v kyvetě stál před měřením i několik hodin.

Schéma 19



Allylaci jsem tedy zopakovala a po sloupcové chromatografii na silikagelu izolovala třetí frakci. Vodíkové a uhlíkové NMR spektrum měřené za použití deuterovaného benzenu potvrdilo, že jde o čistý produkt **39**.

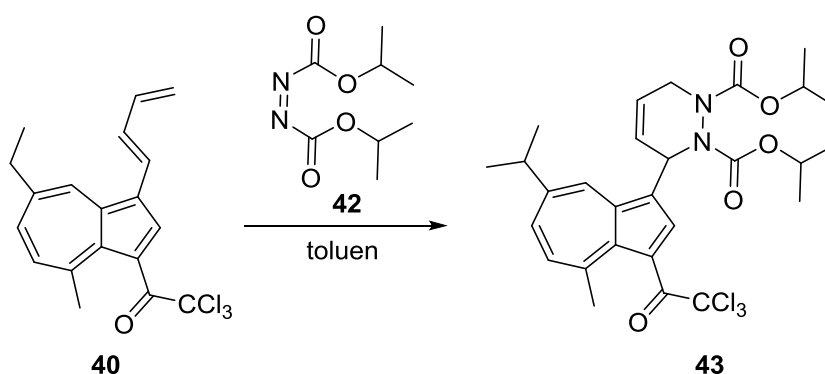
Poznatek o dehydrataci jsem se rozhodla využít. Izolovaný produkt **39** jsem rozpustila v chloroformu a nechala bez míchání stát v baňce přes noc. Roztok do druhého dne změnil barvu z červené na zelenou a naměřené NMR spektrum potvrdilo, že jde o látku **40**.

Závěrem lze říci, že allylace proběhla úspěšně. Hlavní produkt (**39**) je ale poněkud nestálý a měření tohoto vzorku je nutno provádět co nejdříve. V kyselém prostředí snadno podlehne dehydrataci za vzniku **40**. Dehydratace v chloroformu začne probíhat již po několika minutách, přičemž lze pozorovat změnu barvy roztoku z červené na zelenou. Produkt **39** ponechaný v baňce v lednici, natožpak za laboratorní teploty, se během několika dní rozkládá, jelikož při provedení TLC se objevuje mnoho nových skvrn. Taktéž produkt **39** se ponechaný v baňce v lednici začne podle TLC po několika dnech rozkládat a je vidět několik nových skvrn.

3.3. Diels-Alderova reakce dienové skupiny na derivátu guaiazulenu

Když jsem získala sloučeninu s dienovou skupinou, nabízela se možnost vyzkoušet Diels-Alderovu reakci. Při prvním pokusu jsem za látku vystupující jako dienofil použila DIAD (**42**). Nechala jsem reagovat dien (**40**) a dienofil (**42**) v poměru jedna k jedné v toluenu (schéma 20). Reakční směs jsem čtyři hodiny míchala a zahřívala na vodní lázni na 50 °C. Dále jsem ji ponechala bez zahřívání míchat přes noc. Druhý den se ale na TLC neobjevila žádná skvrna kromě výchozí látky. Směs jsem dále nezpracovávala.

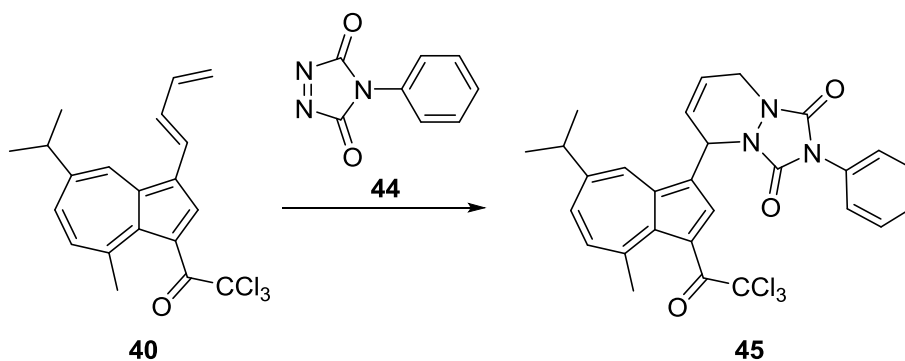
Schéma 20



Diels-Alderovu reakci jsem se rozhodla vyzkoušet ještě jednou a to s PTAD (**44**) jako dienofilem. Nechala jsem tedy reagovat dien (**40**) s dienofilem (**44**) v dichlormethanu (schéma 21). Reakční směs jsem nechala míchat hodinu za laboratorní teploty. Na TLC se objevilo několik nových skvrn. Odpařila jsem rozpouštědlo a provedla sloupcovou

chromatografii na silikagelu, kde jsem použila rozpouštědla 4/1 Et₂O/ hexan. Chromatografie poskytla několik frakcí, většinou malých. Izolovala jsem pouze největší hnědou frakci, která z kolony vycházela poslední. Naměřené signály z NMR spektra ale neodpovídaly tomu, že by se jednalo o produkt (**45**).

Schéma 21



Při tomto pokusu o Diels-Alderovu reakci spolu látky tedy zreagovaly, ale kýžený produkt **45** buď nevznikl vůbec, nebo vznikl v malém množství a mohl být obsažen v některé z malých frakcí, které jsem neizolovala a neanalyzovala.

4. Experimentální část

4.1. Použité látky, metody, přístroje

Sloučeniny použité v reakcích byly zakoupeny z komerčních zdrojů. Všechna rozpouštědla použitá v reakcích byla po zakoupení předestilována.

Pro sloupcovou chromatografii byl použit silikagel Goa Acros organics a oxid hlinitý. Při provádění TLC byly použity destičky hliníkové, pokryté vrstvou silikagelu 60 F₂₅₄ (Merck).

Vodíková a uhlíková NMR spektra byla měřena na NMR spektrometru Varian UNITY 300 (¹H při 300 MHz, ¹³C při 75 MHz, 25 °C) nebo Bruker AVANCE III 600 (¹H při 600 MHz, ¹³C při 151 MHz, 25 °C). K těmto měřením byl využit deuterovaný chloroform CDCl₃ nebo deuterovaný benzen C₆D₆. Chemické posuny jsou uváděny ve stupnici δ a interakční konstanty J v Hz. Spektra IČ byla měřena na spektrometru FTIR Nicolet Svarar Drift v KBr. Spektra MS byla měřena na hmotnostním spektrometru SHIMADZO QP 2010 (GC-MS kvadrupól).

4.2. Použité postupy a naměřená data

2,2,2-Trichlor-1-(5-isopropyl-3,8-dimethylazulen-1-yl)ethan-1-one (21a)

Do 250 ml baňky opatřené chlorkalciovou trubičkou byl k roztoku guajazulenu (**4**) (2.0 mmol, 396 mg) v dichlormethanu (10 ml) přidán anhydrid kyseliny trichloroctové (5.5 mmol, 1.7 g, 1.0 ml) a reakční směs byla míchána 2 hodiny při 25 °C. Poté byl k reakční směsi přidán hexan (20 ml) a směs byla třikrát vytřepána s vodou (50 ml) a jednou s nasyceným roztokem NaCl (50 ml). Organická fáze byla sušena bezvodým Na₂SO₄ (1 h), zfiltrována a rozpouštědlo bylo odpařeno za sníženého tlaku na rotační vakuové odparce. Sloupcovou chromatografií odparku na silikagelu (3/2 hexan/toluen) byla získána první modrá frakce (výchozí látka) a druhá hnědo-žlutá frakce poskytla 689 mg (72 %) produktu (**21a**). Reakce byla opakována s různými navážkami a s výtěžky v rozmezí 65-81 %. Naměřená ¹H NMR data byla ve shodě s publikovanými hodnotami.¹⁷ ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 20 °C) δ 8.31 (s, 1H), 7.45 (d, *J* = 12 Hz, 1H), 7.66 (dd, *J* = 12, 3 Hz, 1H), 8.30 (d, *J* = 3 Hz, 1H), 3.18 (sept., *J* = 6 Hz, 1H), 1.39 Hz (d, *J* = 6 Hz, 6H), 2.82 (s, 3H), 2.61 (s, 3H), *R_f* (3/2 hexan/toluen) = 0.43.

7-Isopropyl-4-methyl-3-(2,2,2-trichloroacetyl)azulen-1-karbaldehyd (37a)

K roztoku 2,2,2-trichloro-1-(5-isopropyl-3,8-dimethylazulen-1-yl)ethan-1-onu (**21a**) (1.44 mmol, 0.49 g ve směsi H₂O/acetone (1/9 v/v, 10 ml) bylo přidáno DDQ (10.08 mmol, 2.29 g). Směs byla míchána 30 min při 25 °C. Po odpaření rozpouštědla na vakuové odparce byla provedena sloupcová chromatografie odparku na alumině (toluen), která poskytla 517 mg (62%) produktu (**37a**) ve formě červené krystalické látky (první červená frakce). Reakce byla provedena opakovaně s různými navážkami a s výtěžky v rozmezí 62-71 %. Naměřená ¹H data byla ve shodě s publikovanými hodnotami.¹⁷ ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃, 20 °C) δ 8.83 (s, 1H), 7.79 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H), 7.92 (dd, *J* = 10.8, 2.2 Hz, 1H), 9.99 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 3.29 (sept, *J* = 6.9 Hz, 1H), 1.43 (d, *J* = 6.8 Hz, 6H), 2.85 (s, 3H), 10.27 (s, 1H). *R_f*(toluen) = 0.35

1-(5-Isopropyl-3,8-dimethylazulen-1-yl)ethan-1-on (21b)

Ke roztoku guajazulenu (**4**) (4 mmol, 793 mg) v hexanu (2.4 ml) byl přidán acetylchlorid (8.00 mmol, 628 mg, 0.6 ml). K této míchané směsi byl přidán bromid lithný (3.33 mmol, 289 mg). Reakční směs byla pod chlorkalcinovou trubičkou míchána 8 hodin ve vodní lázni o 45 °C a dále přes dvě noci při 25 °C. Poté byl přidán ethanol (0.5 ml) s vodou (3 ml) a diethylether (2 ml). Ke směsi byl přidán dichlormethan (5 ml) a směs byla vytřepaná s vodou (10 ml), s roztokem hydrogen uhličitanu sodného (10 ml) a s nasyceným roztokem chloridu sodného (10 ml). Organická fáze byla vysušena síranem hořečnatým, zfiltrována a rozpouštědlo bylo odpařeno za sníženého tlaku na rotační vakuové odparce. Sloupcová chromatografie odparku na silikagelu (gradientová eluce hexan-10/1 hexan/ethylacetát) poskytla čtyři frakce. První frakce modré barvy byla výchozí látka guajazulen (**4**), následovala frakce zelená a žlutá, čtvrtá frakce (hnědá na silikagelu modrá v roztoku) byl produkt (**21b**). Bylo získáno 406 mg (43%) produktu jako modrá viskózní látka. Naměřená ¹H data byla ve shodě s publikovanými hodnotami.^{27,28} ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃, 20 °C) δ 7.92 (s, 1H), 7.32 (d, *J* = 10.9 Hz, 1H), 7.56 (dd, *J* = 10.9, 2.1 Hz, 1H), 8.25 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 3.12 (sept., *J* = 6 Hz, 1H), 1.37 (d, *J* = 6.8 Hz, 6H), 2.72 (s, 3H), 2.88 (s, 3H), 2.60 (s, 3H). *R_f*(hexan) = 0.30

3-Acetyl-7-isopropyl-4-methylazulen-1-karbaldehyd (37b)

K roztoku 1-(5-isopropyl-3,8-dimethylazulen-1-yl)ethan-1-onu (**21b**) (1.6 mmol, 382 mg) ve směsi H₂O/acetone (1/9 v/v, 20 mL) bylo přidáno DDQ (3,36 mmol, 763 mg). Směs byla míchána 15 min při 25 °C. Rozpouštědlo bylo odpařeno na rotační vakuové odparce. Při sloupcové chromatografii odparku na alumině, s toluenem jako rozpouštědlem, byla produktem červená frakce. Bylo získáno 293 mg (72 %) produktu (**37b**), jako pevné červené látky. Naměřená data souhlasila s publikovanými údaji.^{17,27} ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 20 °C) δ 10.27 (s, 1H), 7.71 (d, *J* = 12 Hz, 1H), 7.84 (dd, *J* = 12, 3 Hz, 1H), 8.90 (d, *J* = 3 Hz, 1H), 3.26 (sept., *J* = 6 Hz, 1H), 1.41 (d, *J* = 6 Hz, 1H), 2.76 (s, 1H), 2.91 (s, 1H), 8.46 (s, 1H).

2,2,2-Trichlor-1-(3-(1-hydroxybut-3-en-1-yl)-5-isopropyl-8-methylazulen-1-yl)ethan-1-on (39)

K roztoku 7-isopropyl-4-methyl-3-(2,2,2-trichloroacetyl)azulen-1-karbaldehydu (**37a**) (0.63 mmol, 230 mg) rozpuštěném v bezvodém toluenu (6 ml) byl přidán 4,4,5,5-tetramethyl-2-(2-propen-1-yl)-1,3,2-dioxaborolan (**41**) (1.012 mmol, 190 μl). Baňka byla opatřena chlorkalciovou trubičkou a směs byla míchána přes noc při 25 °C. Poté bylo rozpouštědlo odpařeno na rotační vakuové odparce. Chromatografie odparku poskytla tři frakce. První zelená frakce obsahovala 1-(3-(buta-1,3-dien-1-yl)-5-isopropyl-8-methylazulen-1-yl)-2,2,2-trichloroethan-1-on (**40**), druhá červená frakce byla výchozí látka (**37a**), třetí tmavě červená frakce, které bylo nejvíce, obsahovala produkt (**39**). Tímto postupem bylo získáno 147 mg (56%) produktu jako hnědo-červené viskózní látky. ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃, 20 °C) δ 8.54 (s, 1H), 6.81 (d, *J* = 6 Hz, 1H), 7.05 (dd, *J* = 12, 6 Hz, 1H), 8.55 (d, *J* = 6 Hz, 1H), 2.54–2.58 (m, 1H), 1.06 (d, *J* = 6 Hz, 3H), 1.07 (d, *J* = 6 Hz, 3H), 2.71 (s, 3H), 4.96 (dt, *J* = 6, 1 Hz, 1H), 2.62–2.67 (m, 2H), 5.76 (ddt, *J* = 18, 12, 6 Hz, 1H), 4.98 – 5.02 (m, 2H); ¹³C NMR (600 MHz, CDCl₃, 20 °C) δ 24.51 (2C), 28.86, 38.42, 43.28, 68.38, 68.41, 98.55, 118.04, 120.51, 130.95, 133.64, 135.42, 137.18, 137.96, 141.74, 142.04, 147.26, 149.65, 181.20; IR (KBr) ν 3527, 2959, 1670, 1529, 1398, 1368, 1186, 845, 698, 671 cm⁻¹; MS-EI *m/z* (% relativní intenzity) 398 (M⁺, 10), 357 (94), 281 (100), 263 (40), 239 (22), 212 (38), 197 (29), 49 (38), *R_f* (4/1 hexan/Et₂O) = 0.24.

2,2,2-Trichlor-1-[3-(1-hydroxybut-3-en-1-yl)-5-isopropyl-8-methylazulen-1-yl]ethan-1-on (40) a 1-[3-(buta-1,3-dien-1-yl)-5-isopropyl-8-methylazulen-1-yl]-2,2,2-trichloroethan-1-on (39)

K roztoku 7-isopropyl-4-methyl-3-(2,2,2-trichloroacetyl)azulen-1-karbaldehydu (**37a**) (0.30 mmol, 110 mg) rozpuštěném v bezvodém toluenu (2 ml) byl přidán 4,4,5,5-tetramethyl-2-(2-propen-1-yl)-1,3,2-dioxaborolan (**41**) (0.46 mmol, 86 μ L). Baňka byla opatřena chlorkalcinovou trubičkou a směs byla míchána přes noc při 25 °C. Poté bylo rozpouštědlo odpařeno na rotační vakuové odparce. Pak byl přidán dichlormethan (15 ml) a roztok byl dán na vodní lázeň o teplotě 40 °C. Byl přidán silikagel (150 mg) a směs byla dále míchána a zahřívána 1.5 hod. Následně bylo rozpouštědlo odpařeno na rotační vakuové odparce a byla provedena kolonová chromatografie na silikagelu (4/1 hexan/Et₂O). Byly získány čtyři frakce. První frakce obsahovala 1-[3-(buta-1,3-dien-1-yl)-5-isopropyl-8-methylazulen-1-yl]-2,2,2-trichloroethan-1-on (**40**), kterého byly získány 3 mg (2.63 %) jako viskózní látky. Druhá červená frakce byla výchozí látka (**37a**), třetí byla menší červená frakce a čtvrtá hnědočervená frakce byl 2,2,2-trichloro-1-[3-(1-hydroxybut-3-en-1-yl)-5-isopropyl-8-methylazulen-1-yl]ethan-1-on (**39**), kterého bylo získáno 58 mg (49 %) jako viskózní látky.

První frakce: ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 20 °C) δ 8.66 (s, 1H), 7.42 (d, $J = 12$ Hz, 1H), 7.66 (dd, $J = 12, 3$ Hz, 1H), 8.48 (d, $J = 3$ Hz, 1H), 3.17 (sept., $J = 6$ Hz, 1H), 1.40 (d, $J = 9$ Hz, 6H), 2.79 (s, 3H), 7.08 (d, $J = 15$ Hz, 1H), 6.87 (dd, $J = 15, 12$ Hz, 1H), 6.65 (ddd, $J = 18, 15, 9$ Hz, 1H), 5.38 (d, $J = 18$ Hz, 1H), 5.19 (d, $J = 9$ Hz, 1H); ¹³C NMR (600 MHz, CDCl₃, 20 °C) δ 181.84, 149.38, 147.56, 141.51, 140.49, 125.38, 119.06, 97.34, 137.84, 137.74, 136.24, 134.26, 133.81, 129.75, 124.13, 116.93, 28.66, 38.50, 24.62 (2C); IR (KBr) ν 2959, 1691, 1518, 1461, 1401, 1365, 1180, 994, 836, 698 cm⁻¹; MS-ESI m/z (% relativní intenzity) 403.0 (M+Na, 100), 404.9 (88), 407.0 (32), 319.0 (47), 317.0 (53), 253.1 (33). R_f (SiO₂, 4/1 hexan/Et₂O) = 0,52.

čtvrtá frakce: ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃, 20 °C) δ 8.54 (s, 1H), 6.81 (d, $J = 6$ Hz, 1H), 7.05 (dd, $J = 12, 6$ Hz, 1H), 8.55 (d, $J = 6$ Hz, 1H), 2.54–2.58 (m, 1H), 1.06 (d, $J = 6$ Hz, 3H), 1.07 (d, $J = 6$ Hz, 3H), 2.71 (s, 3H), 4.96 (dt, $J = 6, 1$ Hz, 1H), 2.62–2.67 (m, 2H), 5.76 (ddt, $J = 18, 12, 6$ Hz, 1H), 4.98 – 5.02 (m, 2H); ¹³C NMR (600 MHz, CDCl₃, 20 °C) δ 24.51 (2C), 28.86, 38.42, 43.28, 68.38, 68.41, 98.55, 118.04, 120.51, 130.95, 133.64, 135.42, 137.18, 137.96, 141.74, 142.04, 147.26, 149.65, 181.20; IR (KBr) ν 3527, 2959, 1670, 1529, 1398, 1368, 1186, 845, 698, 671 cm⁻¹; MS-EI m/z (% relativní intenzity) 398 (M⁺, 10), 357 (94), 281 (100), 263 (40), 239 (22), 212 (38), 197 (29), 49 (38). R_f (SiO₂, 4/1 hexan/Et₂O) = 0,24

1-[3-(Buta-1,3-dien-1-yl)-5-isopropyl-8-methylazulen-1-yl]-2,2,2-trichloroethan-1-on (40)

Do 50 ml baňky byl vložen 2,2,2-trichloro-1-[3-(1-hydroxybut-3-en-1-yl)-5-isopropyl-8-methylazulen-1-yl]ethan-1-on (**39**) (0,14 mmol, 57 mg) a chloroform (5 ml). Baňka byla uzavřena víčkem a bez míchání ponechána při 25 °C přes noc. Během této doby došlo ke změně barvy roztoku z červené na zelenou. Odpařením rozpouštědla bylo získáno 52 mg (98%) produktu.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , 20 °C) δ 8.66 (s, 1H), 7.42 (d, $J = 12$ Hz, 1H), 7.66 (dd, $J = 12, 3$ Hz, 1H), 8.48 (d, $J = 3$ Hz, 1H), 3.17 (sept., $J = 6$ Hz, 1H), 1.40 (d, $J = 9$ Hz, 6H), 2.79 (s, 3H), 7.08 (d, $J = 15$ Hz, 1H), 6.87 (dd, $J = 15, 12$ Hz, 1H), 6.65 (ddd, $J = 18, 15, 9$ Hz, 1H), 5.38 (d, $J = 18$ Hz, 1H), 5.19 (d, $J = 9$ Hz, 1H); ^{13}C NMR (600 MHz, CDCl_3 , 20 °C) δ 181.84, 149.38, 147.56, 141.51, 140.49, 125.38, 119.06, 97.34, 137.84, 137.74, 136.24, 134.26, 133.81, 129.75, 124.13, 116.93, 28.66, 38.50, 24.62 (2C); IR (KBr) ν 2959, 1691, 1518, 1461, 1401, 1365, 1180, 994, 836, 698 cm^{-1} ; MS-ESI m/z (% relativní intenzity) 403.0 ($\text{M}+\text{Na}$, 100), 404.9 (88), 407.0 (32), 319.0 (47), 317.0 (53), 253.1 (33). R_f (SiO_2 , 4/1 hexan/ Et_2O) = 0,52

5. Závěr

1. Byla vyzkoušena tří kroková syntéza derivátu guajazulenu s aldehydovou skupinou podle popsaného postupu. První dva kroky, trichloracetylace a oxidace methylové skupiny, proběhly bez problémů. Třetí krok, odstranění trichloracetylové skupiny, se zrealizovat nepodařilo.

První dva kroky byly úspěšně provedeny také s acetylovou skupinou místo trichloracetylové.

2. Byla provedena allylace aldehydové skupiny na derivátu guajazulenu za vzniku hlavního produktu s hydroxylovou a allylovou skupinou a vedlejšího produktu s dienovou skupinou.
3. Byla vyzkoušena Diels-Alderova reakce s derivátem guajazulenu obsahujícím dienovou skupinu. Reakce byla provedena dvakrát se dvěma různými dienofily, ale kýžené produkty se získat nepodařilo.

6. Použité zkratky

DDQ	2,3-dichloro-5,6-dikyano-1,4-benzochinon
DIAD	diizopropyl-diazen-1,2-dikarboxylová kyselina
PTAD	4-fenyl-1,2,4-diazolin-3,5-dion
s	singlet
d	dublet
t	triplet
m	multiplet
sept	septet
NMR	nukleární magnetická rezonance
IČ	infračervená spektroskopie
MS-EI	hmotnostní spektrometrie s elektronovou ionizací
MS-ESI	hmotnostní spektrometrie s elektrosprejovou ionizací

7 Odkazy

- 1 Sousa, C. C. S.; Matos, M. A. R.; Morais, V. M. F. *J. Chem. Thermodyn.* **2013**, *73*,
101-109.
- 2 CSID:8876, <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.8876.html>
- 3 Mochalin, V. B.; Porshnev, Yu. N. *Russ. Chem. Rev.* **1977**, 530-547.
- 4 Newsome, A. G.; Culver, C. A.; van Breemen, R. B. *J. Agr. Food Chem.* **2014**, *62*,
6498-6511.
- 5 „Status iucn3.1 EN cs“. Licencováno pod CC BY 2.5 via Wikimedia Commons –
[http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Status_iucn3.1_EN_cs.svg#mediaviewer/File:
:Status_iucn3.1_EN_cs.svg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Status_iucn3.1_EN_cs.svg#mediaviewer/File:Status_iucn3.1_EN_cs.svg)
- 6 "Lactarius indigo 48568 edit" by Dan Molter. Licensed under CC BY-SA 3.0 via
Wikimedia Commons
http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Lactarius_indigo_48568_edit.jpg#mediaviewer/File:Lactarius_indigo_48568_edit.jpg.
- 7 Harmon, A. D.; Weisgraber, K. H.; Weiss, U. *Experientia* **1980**, *36*, 54-56.
- 8 Zhang, C.; Liang, H.; Tu, G.; Zhao, Y. *Fitoterapia* **2010**, 849-851
- 9 Fang, L.; Yang, W.; Dong, Z.; Shao, H.; Liu, J. *Yunnan Zhiwu Yanjiu* **2007**, *29*, 122-
124
- 10 Sakemi, S.; Higa, T. *Experientia* **1987**, *43*, 624-625.
- 11 www.zentiva.cz
- 12 Song, F. *Faming Zhuanli Shenqing* **2013**, CN 103417402 A
- 13 Xu, Y. *Faming Zhuanli Shenqing* **2007**, CN 101062005
- 14 Yu, Q.; Sun, Z. *Kouqiang Huiyongpin Gongye* **2012**, *22*, 39-41.
- 15 Wang, L.; Yan, Jian; Fu, P. P.; Parekh, K. A.; Yu, H. *Mutat. Res. Fund. Mol. M.* **2003**,
530, 19-26.
- 16 Anderson A. G., Jr.; Anderson R. G. *J. Org. Chem.* **1962**, *27*, 3578–3581.
- 17 Okajima T.; Kurokawa S. *Chem. Lett.* **1997**, 69-70.
- 18 Anderson, A. G., Jr.; Cowles, E. J.; Tazuma, J. J.; Nelson, J. A. *J. Am. Chem. Soc.*
1955, *77*, 6321-6323.

-
- 19 Ohtani, Y.; Kawase, K.; Nakamura, K.; Ogura, I. *Yakugaku Zasshi* **1971**, *91*, 674-676.
- 20 Nefedov, V. A.; Tarygina, L. K. *Zhu. Org. Khim.* **1994**, *30*, 1639-1643.
- 21 Nefedov, V. A. *Zhu. Org. Khim.* **1973**, *9*, 783-784.
- 22 Wang, F.; Lai, Y.-H.; Kocherginsky, N. M.; Kostaski, Yu. Yu. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 995-998.
- 23 Kihara, N.; Nakayama, H.; Fukutomi, T. *Macromolecules* **1997**, *30*, 6385-6387.
- 24 Iwasaki, K.; Tatematsu, H.; Taneda, Y.; Matsumoto, K.; Hino, S. *Synthetic Met.* **1995**, *69*, 543-4.
- 25 Becker, D. A.; Ley, J. J.; Echevoyen, L.; Alvarado, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 4678-4684.
- 26 Jain, P.; Antilla, J. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 11884-11886.
- 27 Sigrist, R.; Hansen, H.-J. *Helv. Chim. Acta* **2010**, *93*, 1545-1567.
- 28 Muto, Y.; Ichikawa, H.; Takagi, K. *Chem. Pharm. Bull.* **1980**, *28*, 3688-3692.