

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra organické chemie

SYNTÉZA DEUTERIEM ZNAČENÝCH NEUROAKTIVNÍCH
STEROIDŮ

Diplomová práce

studijního programu Klinická a toxikologická analýza

Praha 2010

Alena Slavíčková

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857, Z4 055 0506.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitelky RNDr. Hany Chodounské, CSc. a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze a mimo Ústav organické chemie a biochemie, AVČR, v.v.i. je možné pouze po písemném souhlasu univerzity a tohoto ústavu.

V Praze dne 1. května 2010.

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat všem, kteří mě podporovali a pomáhali mi s vypracováním této diplomové práce. Především bych chtěla poděkovat paní RNDr. Haně Chodounské, CSc. za cenné rady a laskavé odborné vedení, Mgr. Evě Šťastné PhD., Mgr. Vojtěchu Kaprasovi za odbornou pomoc a velkou trpělivost. Za interpretaci infračervených spekter děkuji Ing. Pavlu Fiedlerovi. Ing. Barboře Slavíkové za odbornou i psychickou podporu a celému týmu Medicinální steroidy za pomoc a přátelskou pracovní atmosféru.

Abstract

The work is focused on the synthesis of deuterium-labelled neuroactive steroids useful as internal standards for determination of their pharmacokinetics and bioavailability. The starting material for the synthesis was commercially available 11 α -hydroxyprogesterone **16**. The target compound, 20-Oxo-[9,12,12-²H₃]5 β -pregnan-3 α -yl L-glutamyl 1-ester (**47**), contains 3 deuterium atoms in positions 9 α , 12 α , 12 β .

Alternative target with a 18-functionalized group (**34**) was also studied. It will be used for an analogue with deuterium atoms on carbon C-18.

Abstrakt

Práce se zaměřuje na přípravu deuteriem značených neuroaktivních steroidů, vhodných pro použití jako vnitřní standardy pro stanovení farmakokinetiky a biodostupnosti neuroaktivních steroidů. Jako výchozí látka pro syntézu izotopicky značených derivátů posloužil komerčně dostupný 11 α -hydroxyprogesteron **16**. Práce popisuje přípravu 20-Oxo-[9,12,12-²H₃]5 β -pregnan-3 α -yl L-glutamyl 1-esteru (**47**) obsahujícího 3 atomy deuteria v poloze 9 α , 12 α , 12 β .

Součástí práce je také syntéza derivátu **34** s C-18 funkcionalizovanou skupinou, který poslouží jako prekurzor pro syntézu dalšího derivátu s atomy deuteria na uhlíku C-18.

Seznam použitých zkratek

| | |
|----------------------------|--|
| ABCN | 1,1'-azobis(cyklohexylnitril) |
| Ac | acetyl |
| Ac ₂ O | acetanhydrid |
| AcOEt | ethyl-acetát |
| AMPA | α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionátový receptor |
| Boc | <i>t</i> -butoxykarbonyl |
| Boc-Glu(OBzl)-OH | 5-benzylester kyseliny Boc-L-glutamové |
| <i>t</i> -Bu | terc-butyl |
| Bu ₃ SnH | tributylstannan |
| Bzl | benzyl |
| CNS | centrální nervová soustava |
| D | deuterium |
| DCC | dicyklohexylcarbodiimid |
| DCM | dichlormethan |
| DMAP | 4-dimethylaminopyridin |
| Et | ethyl |
| Et ₃ N | triethylamin |
| GABA | γ -amino-máselná kyselina |
| GABA _A receptor | receptor pro kyselinu γ -aminomáselnou typu A |
| GABA _B receptor | receptor pro kyselinu γ -aminomáselnou typu B |
| GABA _C receptor | receptor pro kyselinu γ -aminomáselnou typu C |
| IČ | infračervený |
| KA | kainátový receptor |
| Me | methyl |
| MeOD | deuterovaný methanol |
| NMDA | kyselina N-methyl-D-asparagová |
| NMDAR | receptor NMDA |

| | |
|---------------------------------------|---|
| NMR | jaderná magnetická rezonance |
| PCC na Al ₂ O ₃ | pyridiniumchlorochromát na oxidu hlinitém |
| PTLC | preparativní tenkovrstvá chromatografie |
| TFA | kyselina trifluoroctová |
| THF | tetrahydrofuran |
| TLC | tenkovrstvá chromatografie |
| Ts | <i>p</i> -tosyl |
| TsNDND ₂ | [N,N,N'- ² H ₃]toluen- <i>p</i> -sulfonyl-hydrazin |
| UV | ultrafialový |

Obsah

| | |
|---|-----------|
| KATEDRA ORGANICKÉ CHEMIE | 1 |
| 1. ÚVOD | 9 |
| 2. ÚVOD DO PROBLEMATIKY | 15 |
| 4. DISKUZE A VÝSLEDKY | 23 |
| Příprava derivátu [9,12,12- ² H ₃]5β-pregnanu | 23 |
| Funkcionalizace v poloze C-18 | 26 |
| 5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 28 |
| 5.1.1. PŘÍPRAVA DERIVÁTU [9,12,12-²H₃]5β-PREGNANU..... | 34 |
| 11α-Hydroxy-5β-pregnan-3,20-dion (17a) | 34 |
| 3,20-Bis(ethyldioxy)-5β-pregnan-11α-ol (18) | 34 |
| 3,20-Bis(ethyldioxy)-5β-pregnan-11-on (19) | 35 |
| 3,20-Bis(ethyldioxy)-[9,12,12- ² H ₃]5β-pregnan-11β-ol (41) | 35 |
| 3,20-Bis(ethyldioxy)-[9,12,12- ² H ₃]5β-pregnan-11β-yl-O-(S-methyldithiokarbonát) (42) | 36 |
| [9,12,12- ² H ₃]5β-Pregnan-3,20-dion (43) | 37 |
| 3α-Hydroxy-[9,12,12- ² H ₃]5β-pregnan-20-on (44)..... | 37 |
| 20-Oxo-[9,12,12- ² H ₃]5β-pregnan-3α-yl-(2S)-5-(benzyloxy)-2-[(terc- butoxykarbonyl)amino]-5-oxo-pentanoát (45) | 38 |
| 20-Oxo-[9,12,12- ² H ₃]5β-pregnan-3α-yl-N-(terc-butoxykarbonyl)-L-glutamyl 1-ester (46) | 39 |
| 20-Oxo-[9,12,12- ² H ₃]5β-pregnan-3α-yl-L-glutamyl 1-ester (47) | 39 |
| 5.1.2. PŘÍPRAVA NEDEUTEROVANÉHO DERIVÁTU 5β-PREGNANU..... | 40 |
| 3,20-Bis(ethyldioxy)-5β-pregnan-11β-ol (48) | 40 |
| 3,20-Bis(ethyldioxy)-5β-pregnan-11β-yl-O-(S-methyl-dithiokarbonát) (49) | 40 |
| 5β-Pregnan-3,20-dion (50) | 41 |

| | |
|--|-----------|
| 3α-Hydroxy-5β-pregnan-20-on (51) | 41 |
| 20-Oxo-5β-pregnan-3α-yl-(2S)-5-(benzyloxy)-2-[(terc-butoxy-karbonyl)amino]-5-oxo-pentanoát (52) | 42 |
| 20-Oxo-5β-pregnan-3α-yl-N-(terc-butoxykarbonyl)-L-glutamyl 1-ester (53) | 43 |
| 20-Oxo-5β-pregnan-3α-yl-L-glutamyl 1-ester (54) | 43 |
| 5.2. FUNKCIONALIZACE V POLOZE C-18 | 44 |
| 5β-Pregnan-3,20-dion (29a) | 44 |
| 3α-Hydroxy-5β-pregnan-20-on (30) | 44 |
| 20-Oxo-5β-pregnan-3α-yl-acetát (31) | 45 |
| (20R)-20-Hydroxy-5β-pregnan-3α-yl-acetát (32a) a (20S)-20-hydroxy-5β-pregnan-3α-yl-acetát (32b) | 46 |
| (20S)-5β-Pregnan-3α,20-diyl-3-acetát-20-nitrit (33) | 46 |
| (18E, 20S)-20-hydroxy-18-hydroxyimino-3-yl-acetát (34) | 47 |
| 6. ZÁVĚR | 48 |
| 7. LITERATURA | 49 |

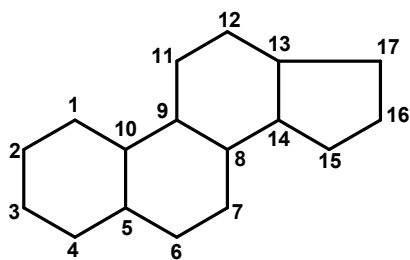
1. Úvod

Steroidy jsou velmi významné biologicky aktivní látky, vyskytují se ve všech živých organismech, od jednoduchých virů po člověka¹.

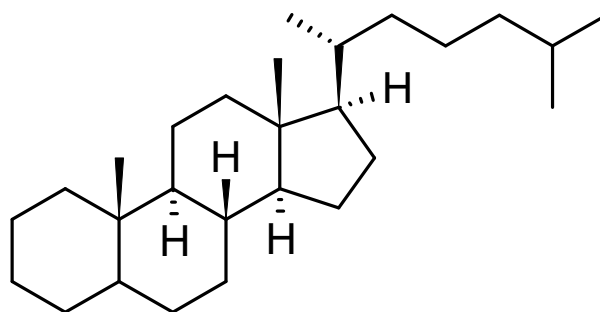
Steroidy plní v organismech mnoho funkcí. Nejznámější jsou signální úloha sexuálních hormonů, někdy zneužívaných jako anabolika, „stresových“ hormonů kortikoidů a působení neurosteroidů. Neméně důležitá je jejich úloha jako stavebních prvků membrán².

Nejznámějším příkladem je cholesterol. V lidském těle je to nejvíce zastoupený steroid. V organismu hraje klíčovou roli, vyskytuje se téměř ve všech částech těla jako volný, nebo ve formě esteru s mastnými kyselinami či kyselinou sírovou. Je součástí membrán, uplatňuje se jako prekurzor všech dalších steroidů. Biosyntéza cholesterolu v organismech probíhá transformací z acyklického uhlovodíku skvalenu¹.

Základní steroidní skelet je tvořen cyklopentanoperhydro(a)fenantrenem (**Obr. 1**).



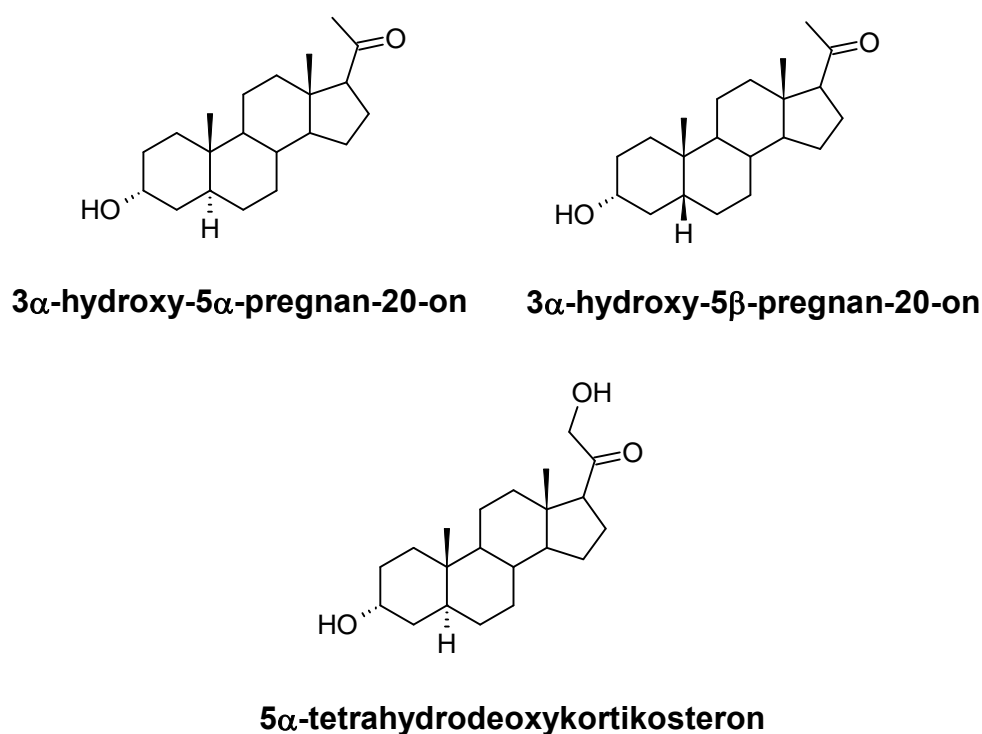
Obr. 1



Obr. 2

Strukturální rysy vyskytující se u všech steroidů lze ukázat na základním uhlovodíku – cholestanu (**Obr. 2**). Všechny substituenty, které leží pod rovinou steroidního skeletu, se označují jako α -substituenty a substituenty směřující nad tuto rovinu jsou β -substituenty. β -Konfiguraci mají methylové skupiny C-18 a C-19 a substituent na C-17. Standardní je α -konfigurace vodíkových atomů H-9 a H-17. Obvykle se konfigurace skeletálních vodíků uvádí jen tehdy, je-li odlišná od standardní. To neplatí pro polohu 5. U té je třeba konfiguraci vyznačit vždy¹. V přírodě se totiž vyskytují sloučeniny mající konfiguraci 5α i 5β , a to přibližně se stejnou četností.

Mozek si pro svoji potřebu vytváří tzv. neurosteroidy². 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 deaktivaci³. Příklady struktur některých přirozeně se vyskytujících neurosteroidů jsou na **Obr. 3**. Pro látky, které působí obdobně, avšak nevznikají v nervové tkáni, jako např. testosteron nebo alphaxalon, případně pro syntetické analogy se užívá termínu neuroaktivní steroidy².



Obr. 3

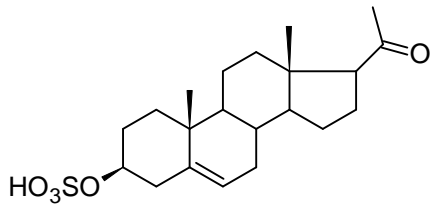
Steroidní hormony, které jsou produkovány endokrinními žlázami (androgeny, gestageny, kortikoidy), účinkují klasickým mechanismem. To znamená, že jsou transportovány krví až do cílových tkání. Pronikají do buňky, kde se specifickým způsobem vážou na receptorové proteiny a vytváří komplex steroidní hormon-receptor. Po přemístění tohoto útvaru do oblasti buněčného 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)².

Naopak neurosteroidy účinkují v centrální nervové soustavě velmi rychle, mají schopnost ovlivnit neuronální dráždivost během milisekund až sekund². Rychlé působení neurosteroidů je známé 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.

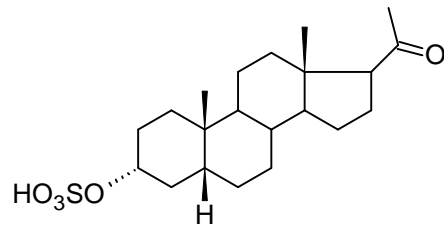
Přesto však byla molekulární podstata takového působení dlouho neznámá, až v 70. letech byl při podrobném výzkumu působení alphaxalonu rozpoznán vliv neurosteroidů na receptory pro neurotransmitery⁴. Efekt se liší od klasického steroidního svým mechanismem. Hlavním rozdílem je již zmíněný rychlý nástup i odeznění. Podstatou aktivity je modifikace dráždivosti membránových receptorů nervových buněk. Neurosteroidy jsou převážně produkovány v blízkosti místa svého působení.^{2,3}

V osmdesátých letech byly uveřejněny první informace o vlivu steroidních látek na funkci GABA_A receptoru (receptor pro kyselinu γ -aminomáselnou typu A) a na další receptory ze skupiny ligandem aktivovaných iontových kanálů, například glutamátové, glycinové a nikotinové acetylcholinové receptory. Společně s důkazem tvorby steroidů přímo v nervové tkáni hrál tento objev zásadní roli při rozvoji zájmu o další výzkum metabolismu neurosteroidů a způsobu, jakým ovlivňují nervovou činnost pomocí modulace aktivity iontových kanálů. Výzkum v této oblasti přináší nové možnosti v psychofarmakologických a terapeutických postupech, neboť mnoho neurologických a psychiatrických onemocnění je spojeno právě s činností ligandem aktivovaných iontových kanálů².

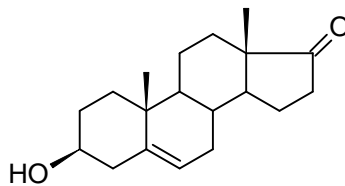
Na iontové kanály má specifický vliv především pregnenolon a dehydroepiandrosteron. Pregnenolon v mozku se vyskytuje jako nekonjugovaný steroid, jako ester kyseliny sírové - pregnenolon sulfát a jako estery vyšších mastných kyselin² (**Obr. 4**).



20-oxo-pregn-5-en-3β-yl-sulfát



20-oxo-5β-pregnan-3α-yl-sulfát



3β-hydroxyandrost-5-en-17-on

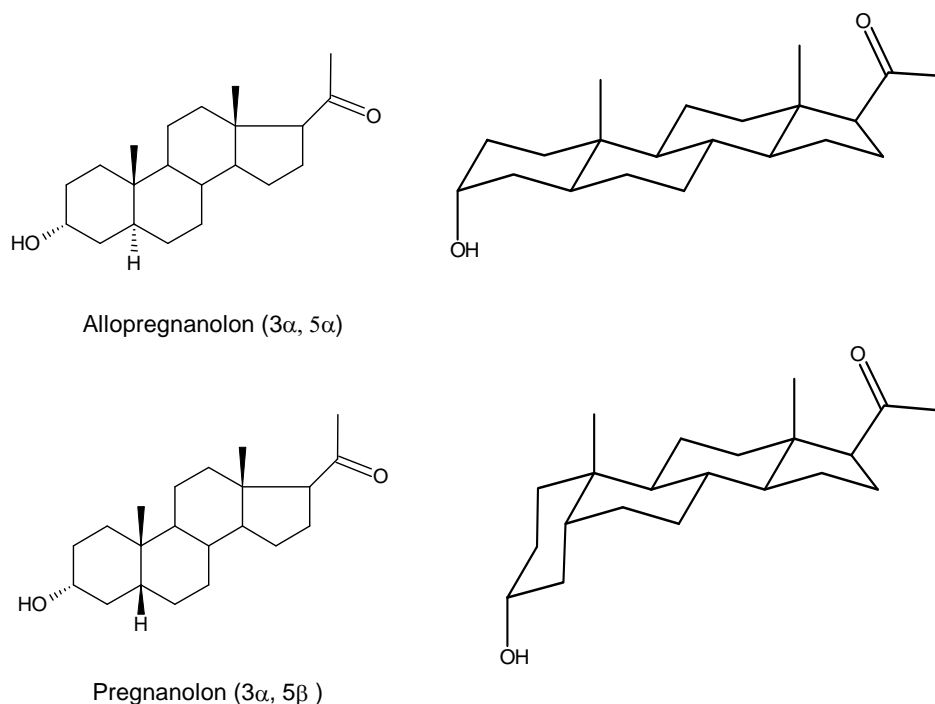
Obr.4

V CNS jsou ionotropní GABA a NMDA receptory mediátory většiny synaptických přenosů, právě tyto receptory podléhají působení neurosteroidů. Hlavním inhibičním neurotransmiterem v CNS je kyselina γ -aminomáselná (GABA z angl. Gamma Amino Butyric Acid). Tento neuropřenašeč způsobuje aktivaci GABA receptorů, ty se dělí na ionotropní GABA_A receptory, které přímo tvoří kanál pro Cl⁻ ionty, dále metabotropní GABA_B receptory, ty jsou pomocí G-proteinů spřaženy s Na⁺ a K⁺ kanály a GABA_C receptory, které tvoří také kanál pro Cl⁻ ionty, ale od GABA_A se liší složením podjednotek a farmakologickými vlastnostmi. Nejvíce prozkoumanou oblastí je vliv neuroaktivních steroidů na činnost GABA_A receptorů. První látkou, u které se podařilo prokázat souvislost s funkcí GABA_A receptoru, bylo syntetické anestetikum alphaxalon. GABA_A receptory jsou ovlivňovány i některými endogenními steroidy, jako např. allopregnanolonem nebo pregnanolonem³.

Dalším klíčovým ionotropním receptorem je NMDA receptor, aktivaci tohoto receptoru způsobuje kyselina glutamová (v lékařské a fyziologické literatuře nazývaná „glutamát“). Jedná se o nejvýznamnější excitační neurotransmiter v CNS. Stejně jako GABA receptory i glutamátové receptory se vyskytují jako ionotropní i metabotropní. Ionotropní se dále dělí do tří podskupin, jejichž názvy získaly podle svého příslušného selektivního

agonisty, jedná se o NMDA receptor (N-methyl-D-aspartát), AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionátový receptor) a KA (kainátový receptor). Nejvýznamnějším z těchto receptorů je NMDA receptor (NMDAR), který má vysokou propustnost pro Ca^{2+} ionty a tím může ovlivňovat řadu intracelulárních procesů. K aktivaci NMDAR je nezbytná přítomnost dvou endogenních agonistů současně, a to glutamátu a glycinu. V závislosti na napětí na membráně může být NMDAR blokován extracelulárními Mg^{2+} ionty. Společným znakem pro endogenní neurosteroidy s prokázaným vlivem na NMDAR je přítomnost sulfátové skupiny v poloze C3, která je nositelem záporného náboje. Endogenní neurosteroidy ovlivňují NMDAR i bez přítomnosti této sulfátové skupiny, ale jen velmi slabě³.

Neurosteroidy mění pravděpodobnosti otevření příslušných iontových kanálů GABA_A i NMDA receptorů. U obou typů receptorů lze pozorovat potenciační i inhibiční účinky neurosteroidů. Klíčovou roli v účincích má konfigurace na uhlíku C3 a C5 steroidního skeletu. Pro funkci na NMDA receptoru je nepostradatelná sulfátová skupina v poloze C3, u GABA_A receptoru znamená přítomnost sulfátové skupiny vždy inhibici a to bez ohledu na celkovou strukturu steroidu. Na **Obr. 5** je znázorněno, jak konfigurace na uhlíku C5 určuje tvar celé molekuly, jestli je molekula spíše planární (5α) nebo lomená (5β)³.



Obr. 5

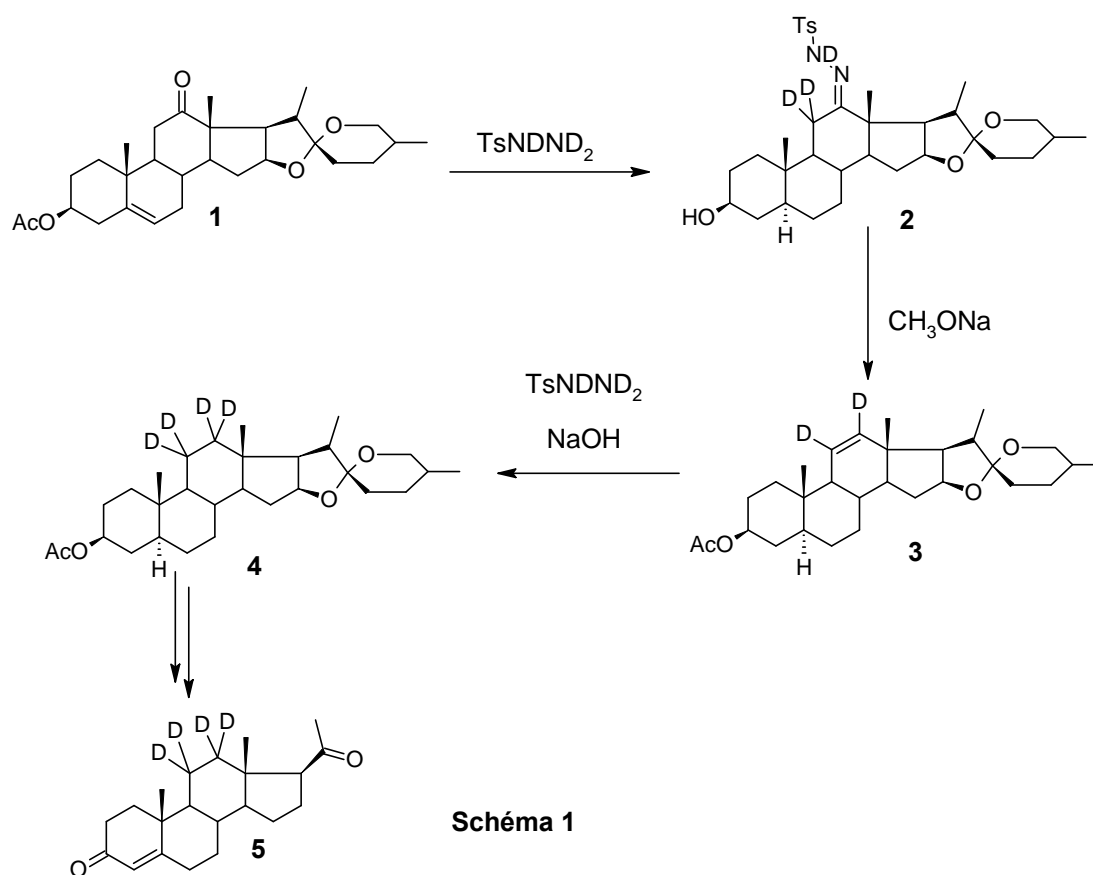
Schopnost ovlivnit ionotropní receptory činí neuroaktivní steroidy zajímavými z hlediska terapeutického využití. Mají prokázané účinky při tlumení strachu, agresivity, jako

anestetika i hypnotika. Novější studie ukazují jejich potenciál při medikaci stavů po traumatickém poranění mozku, případně mozkové mrtvici^{3,5}.

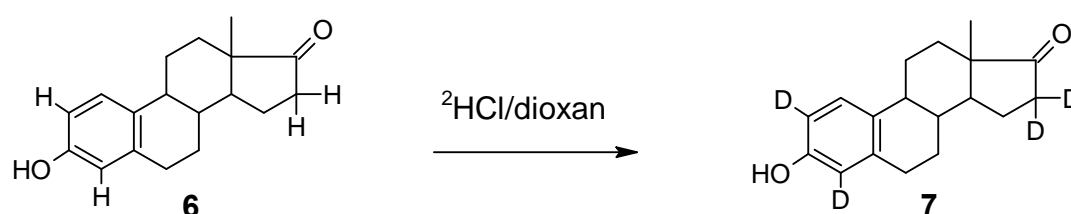
2. Úvod do problematiky

Izotopicky značené sloučeniny se uplatňují například při studiích, které se věnují metabolismu hormonů. Mají významnou roli při diagnostickém použití, kde pomáhají při určení příčin hormonálních poruch⁶. Pro izotopické značení se využívá zejména několik stabilních izotopů biogenních prvků, mimo jiné právě atomy deuteria. Výhodou značení molekul deuteriem je to, že jsou chemicky téměř nerozeznatelné od jejich neznačených analogů, ale ve fyzikálním smyslu lze tyto analogy rozlišit NMR spektroskopií nebo hmotnostní spektrometrií⁷. Nejvhodnější počet atomů vodíku substituovaných deuteriem je 3 nebo 4, což poskytuje dostatečné odlišení od přírodních izotopických forem substrátu (hlavně ¹³C) a přitom zaručuje identické chemické vlastnosti. Obohacení steroidu stabilním izotopem je možné stanovit pomocí hmotnostní spektrometrie po extrakci z biologických tkání a separaci plynovou nebo kapalinovou chromatografií. Pro přesnost těchto stanovení je nezbytná metabolická stabilita atomů deuteria. Je třeba volit vhodná místa obohacení steroidního substrátu - taková, kde je malá pravděpodobnost metabolické výměny nebo chemické přeměny (C-9, C-12, C-18) a tedy nedojde ke zkreslení výstupních dat⁸.

Pro syntézu multi-deuterovaných steroidů existuje množství vypracovaných postupů, ovšem nemnoho z nich popisuje přípravu značených steroidů v dostatečné izotopické čistotě. Zpracována byla například příprava [11,11,12,12-²H₄]-progesteronu značeného 4 atomy deuteria na C-11 a C-12, zobrazená na schématu 1. Výchozí látkou byl hekogenin-acetát **1**, který byl reakcí s [N,N,N'-²H₃]toluen-*p*-sulfonyl-hydrazinem převeden na jeho toluen-*p*-sulfonylhydrazon **2** bez ztráty deuterií z C-11. [N,N,N'-²H₃]toluen-*p*-sulfonyl-hydrazin byl připraven reakcí toluen-*p*-sulfonylhydrazinu v benzenu s D₂O. Aprotickým rozkladem tosylhydrazonu **2** byl získán 11-dehydro-[11,12-²H₂]tigogenin (**3**), který reakcí s [N,N,N'-²H₃]toluen-*p*-sulfonyl-hydrazinem poskytl derivát se čtyřmi deuterii [11,11,12,12-²H₄]tigogenin acetát (**4**). Z něj byl v několika krocích připraven tetradeuterovaný derivát **5**. Bylo dosaženo izotopické čistoty 61 % tetradeuterovaného derivátu⁸ **5**.



R.C. Murphy popsal syntézu tetradeuterovaného derivátu [2,4,16,16-²H₄]-estronu (7) popsané na schématu 2. Pro klíčovou isotopickou výměnu byla využita nestálost protonů 2,4 a 16 α ,16 β v kyselém prostředí systému ²HCl/dioxan. Čistota tetradeuterovaného derivátu byla 80 % tetradeuterovaného derivátu⁹.



Problematika derivatizace angulárních methylů byla popsána například v práci Dyera a Harrowa¹⁰. Příprava [19,19,19-²H₃]adrost-4-en-3,17-dionu (15) zobrazená na schématu 3 byla provedena z 3,17-dioxo-4-androsten-19-ové kyseliny (8), která reakcí s diazomethanem v diethyletheru poskytla methyl 3,17-dioxo-4-androsten-19-oát (9). Ten byl acetalizován s ethylenglykolem a orthomravenčanem ethylnatým v tetrahydrofuranu za katalýzy kyselinou

p-toluensulfonovou na methyl 3,3,17,17-bisethylendioxyandrost-5-en-19-oát (**10**). Redukcí tohoto derivátu pomocí LiAlD₄ v tetrahydrofuranu byl získán 3,3,17,17-bisethylendioxy[19-²H₂]-androst-5-en-19-ol (**11**), jehož ochráněním vznikl [19-²H₂]-19-hydroxyandrost-4-en-3,17-dion (**12**). Tosylace primárního alkoholu **12** následovaná intramolekulární cyklizací pomocí zinku ve vroucí kyselině octové byl získán [5β,19-²H₂]cykloandrostan-3,17-dion (**14**). Otevřením cyklopropanového kruhu pomocí ²HCl a zpětnou výměnou atomů deuteria C-2, C-4 a C-16 v přítomnosti koncentrované HCl byl získán [19,19,19-²H₃]adrost-4-en-3,17-dion. Bylo dosaženo 97 % deuteria na C-19¹⁰.

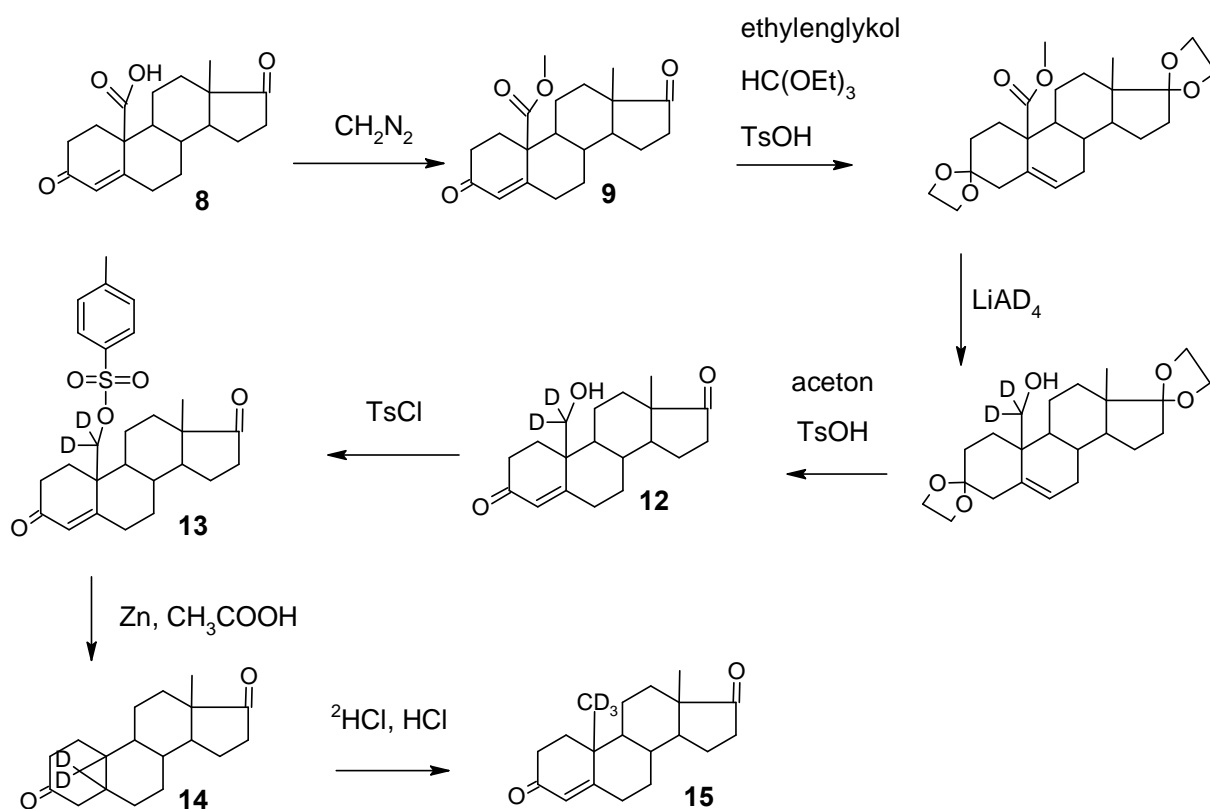


Schéma 3

Cílem této diplomové práce je příprava nasyceného steroidního derivátu se třemi atomy deuteria v kruhu B zobrazená na schématu 4. Pro přípravu byla navržena syntéza, ve které se vychází z komerčně dostupného 11α-hydroxyprogesteronu (**16**). Obecně známou stereoselektivní hydrogenací Δ⁴-dvojně vazby výchozí látky **16** se získá směs, kde významně převažuje 5β derivát **17a** doprovázený minoritním 5α derivátem **17b**. Následuje ochránění 3-keto a 20-keto skupiny jako diketal **18**. Následnou oxidací 11α-hydroxyskupiny pomocí PCC/Al₂O₃ se získá příslušný 11-oxo derivát **19**. Deuterium je poté zavedeno do molekuly bazicky katalyzovanou výměnou vodíkových atomů na uhlících sousedících s karbonylem

v poloze 11. Získaný deuterovaný intermediát **20** je dále reakcí s tosylhydrazinem převeden na příslušný hydrazon **21**, jehož redukcí pomocí NaBH_4 vzniká trideuterovaný diketal. Odstranění obou chránících ketalů poskytuje příslušný 3,20-diketon **22**, jehož redukcí za kontrolovaných podmínek lze získat požadovaný 3 α -Hydroxy-[9,12,12- $^2\text{H}_3$]5 β -pregnan-20-on (**23**).

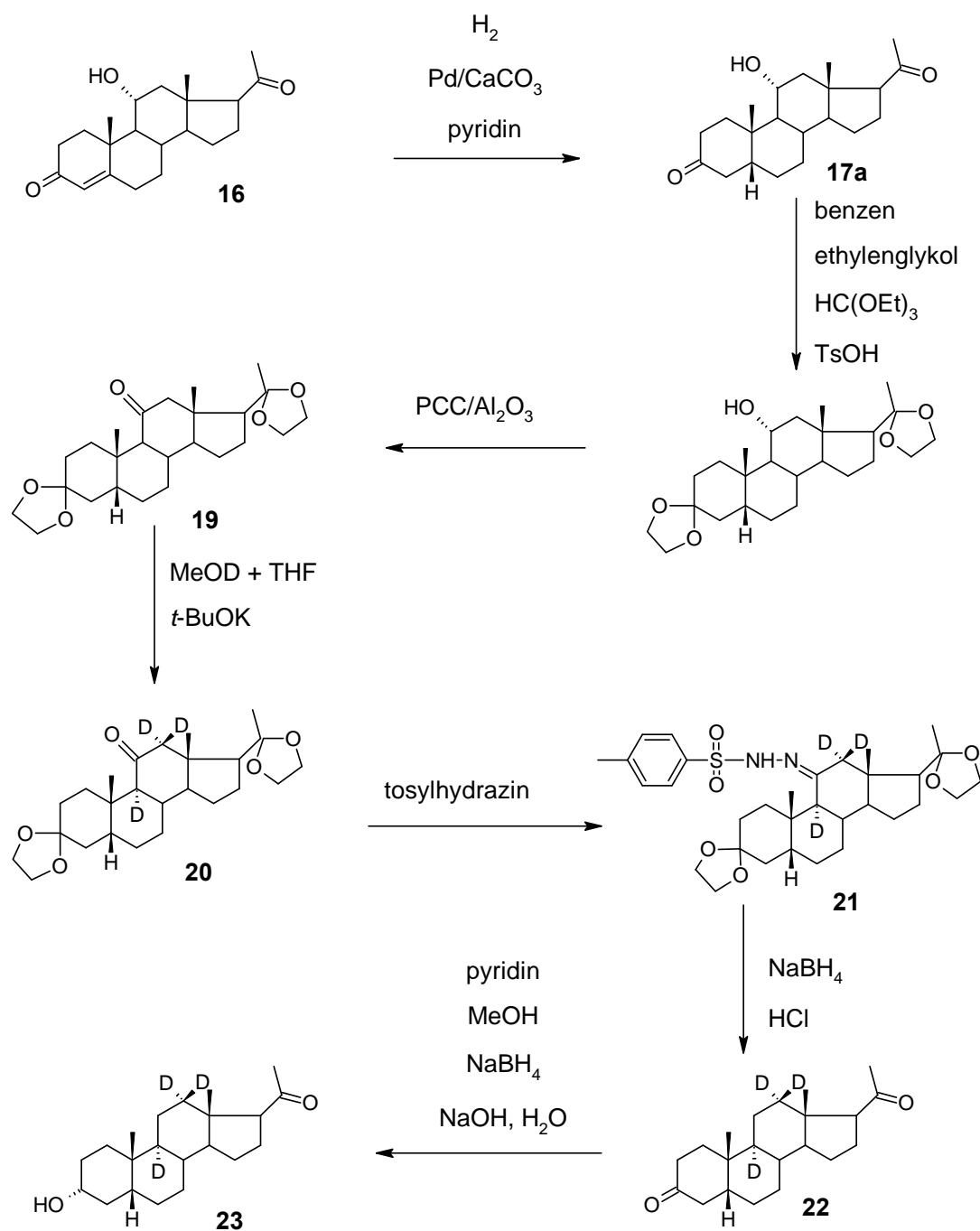


Schéma 4

Dalším cílem této diplomové práce byla studie pro přípravu trideuterovaného derivátu v poloze C-18. Zásadním krokem pro budoucí přípravu trideuterovaného derivátu je funkcionalizace C-18, které lze dosáhnout pomocí Bartonovy reakce¹¹ (schéma 5). Jedná se o fotolýzu nitritů UV zářením o vlnové délce (300-320 nm), fotolýzou dochází k homolytickému štěpení O-NO vazby za vzniku radikálu **25**, následuje další homolytické intramolekulární odštěpení, tentokrát vodíku z angulární methylové skupiny **26**, systém se stabilizuje zachycením NO radikálu methylenovým radikálem za vzniku nitrosoderivátu **27**. Nitroso deriváty pak tautomerují na oximy.

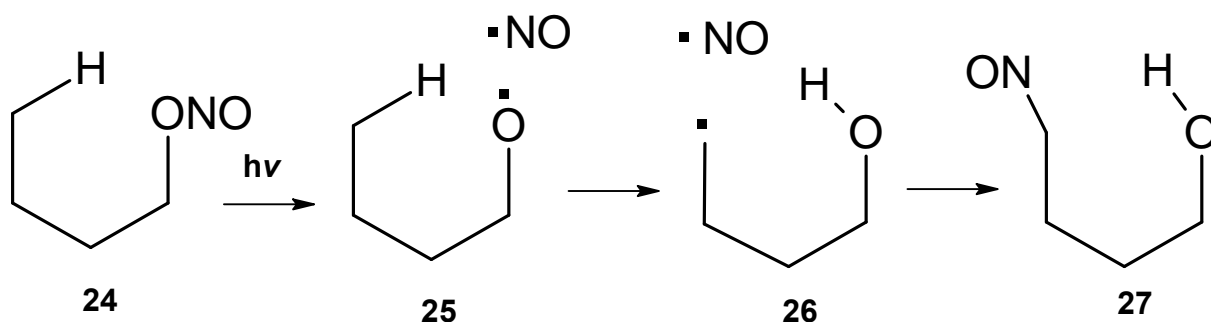


Schéma 5

Schéma 6a popisuje sled reakcí vedoucích k získání prekursoru pro syntézu C-18 trideuterovaného steroidu. Výchozí látkou v tomto schématu byl progesteron, jehož stereoselektivní hydrogenací v alkalickém prostředí byl získán převážně 5 β derivát **29a** vedle menšího množství 5 α izomeru **29b**. Vzniklý nasycený diketon **29a** byl pak následně regio- a stereoselektivně redukován na 3 α -hydroxy derivát **30**, který byl poté ochráněn acetylací za vzniku esteru **31**. Selektivní redukcí ketonu **31** za podmínek Lüchovy reakce lze získat rozumný podíl S-alkoholu **32a**, který je pak podroben nitrosylaci. Výše popsanou fotochemickou funkcionalizací byl získán hydroxyoxim **34**.

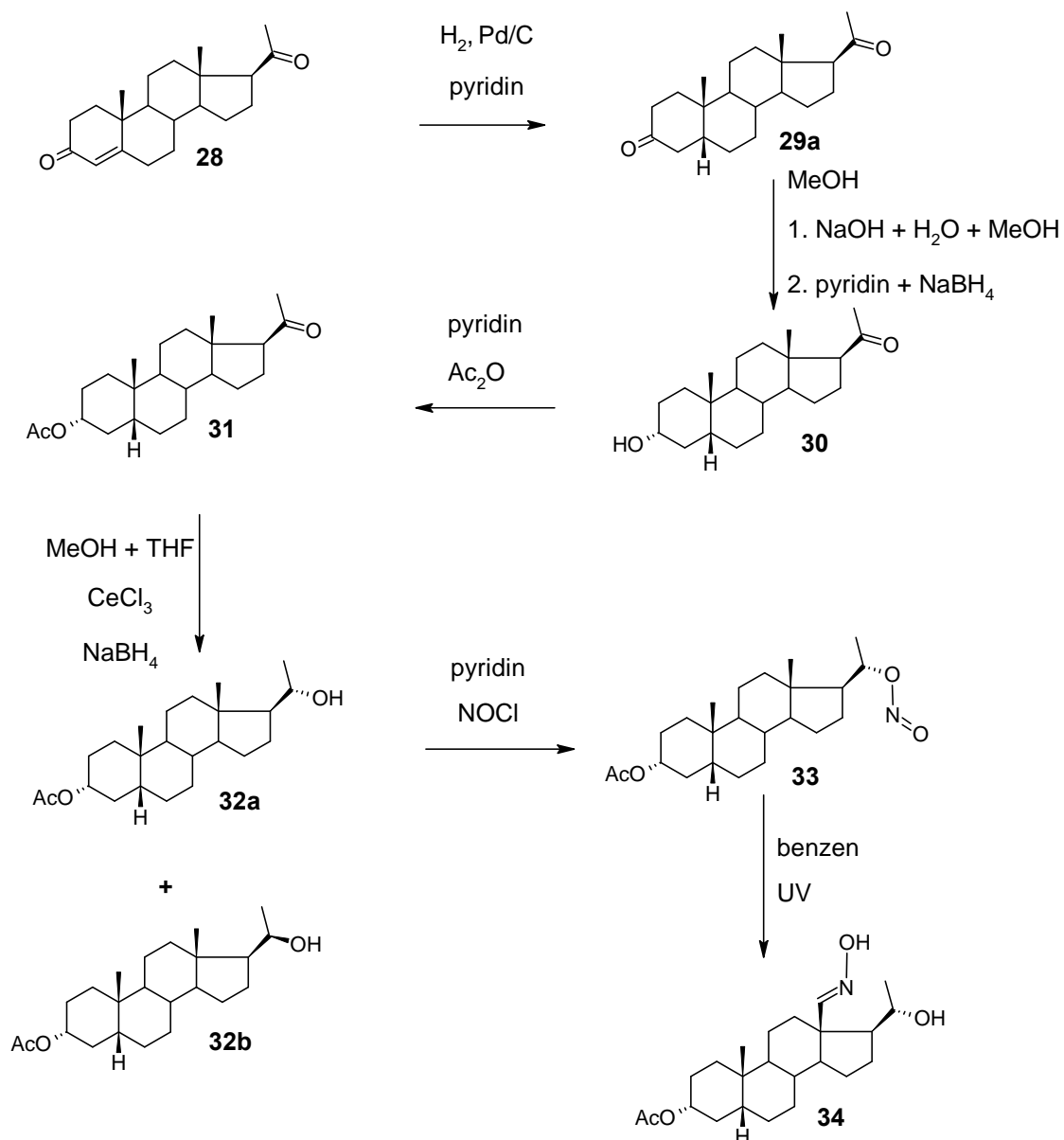


Schéma 6a

Schéma 6b zobrazuje strategii syntézy trideuterovaného derivátu v poloze C-18 s využitím získaného funkcionalizovaného derivátu **34**. U hydroxyoximu **34** bude provedeno ochránění v poloze C-20, poté deoximace a následně oxidace na kyselinu **a**. Redukce na C-18 pomocí LiAlD_4 a poté zavedení třetího deuteria poskytne derivát **b**. Odchráněním hydroxylové skupiny v poloze C-20 a její oxidací bude získán C-18 trideuterovaný derivát **c**.

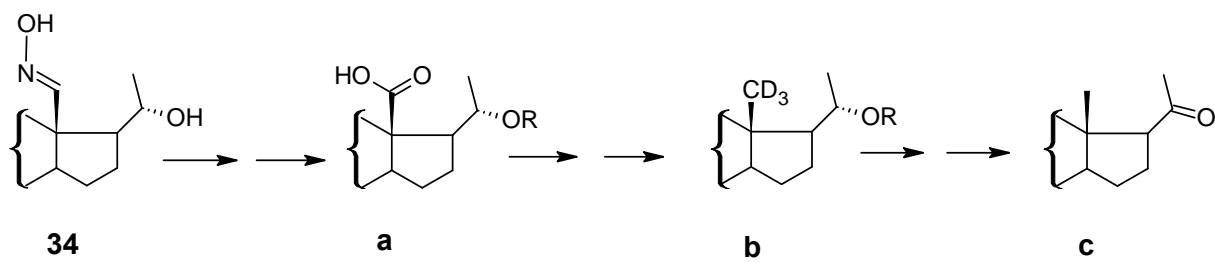


Schéma 6b

3. Cíle diplomové práce

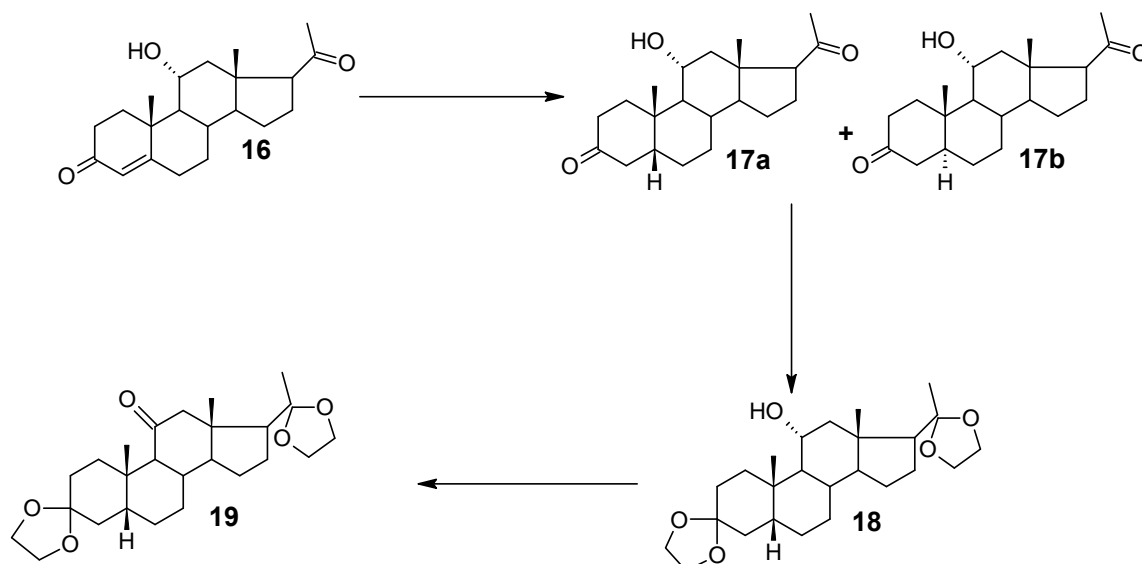
Cílem této práce byla příprava izotopicky značeného vnitřního standardu pro studium chování neuroaktivních steroidů v živých organismech a studie pro přípravu deuterovaného derivátu v poloze C-18.

1. Příprava derivátu [9,12,12-²H₃]5β-pregnanu.
2. Příprava prekursoru funkcionalizovaného v poloze C-18 pro syntézu derivátu [18,18,18-²H₃]5β-pregnanu.

4. Diskuze a výsledky

Příprava derivátu [9,12,12-²H₃]5β-pregnanu

Při syntéze trideuterovaného derivátu **23** byl výchozí látkou 11α-hydroxyprogesteron (**16**), který byl hydrogenován Pd-katalyzovanou hydrogenací za vzniku nasyceného 5β derivátu **17a** s výtěžkem 46 %, touto reakcí vzniká také derivát 5α **17b**, a to ve výtěžku 17 %. Tyto deriváty byly těžko separovatelné. Následně byla C-3 a C-20 ketoskupina derivátu **17a** ochráněna jako acetal **18**, bylo dosaženo výtěžku 75 %. Hydroxylová skupina na C-11 byla oxidována na keton **19** pomocí PCC na Al₂O₃. Výtěžek této reakce byl 84 %. S cílem zkrátit reakční dobu bylo k oxidaci použito většího nadbytku PCC na Al₂O₃ s přidavkem PCC.



V další reakci byl keton **19** bazicky katalyzovanou deuterací převeden na trideuterovaný keton **20**, který měl reakcí s tosylhydrazinem poskytnout tosylhydrazon **21**. Klíčovým problémem se ukázala být právě reakce ketonu s tosylhydrazinem za vzniku tosylhydrazonu, který měl být redukován NaBH₄. Reakce neprobíhala žádaným způsobem. Pravděpodobně z důvodu špatné přístupnosti stericky bráněné polohy 11 tosylhydrazon nevznikal.

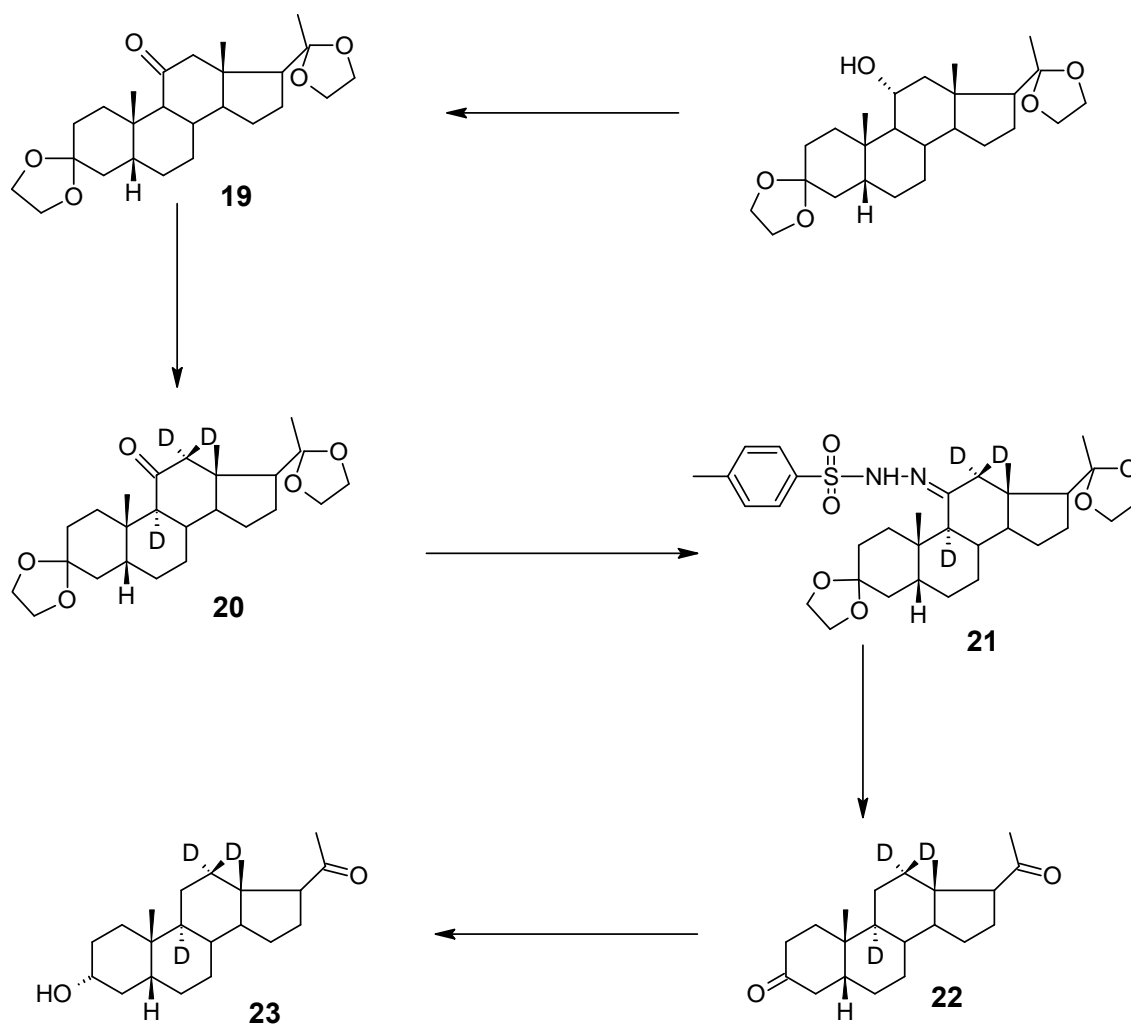


Schéma 4

Alternativním řešením pro deoxygenaci ketoskupiny bez výměny α -vodíků je postupná redukce ketonu na alkohol, mesylace a odredukování odstupující skupiny (schéma 7). Sled kroků v našem případě zobrazuje schéma 7. Bazicky katalyzovaná deuterace zde byla provedena stejně jako v předchozím případě, avšak v témž kroku následovala redukce deuterovaného ketonu LiAlH_4 s výtěžkem 98 % deuterovaného alkoholu 36. Poté byla provedena mesylace prostřednictvím mesylchloridu s výtěžkem 57 % a následovat měla deoxygenace mesylátu 37, která se však opět ukázala jako problematická. Důvodem je stejně jako v předchozím případě sterická zábrana v poloze 11.

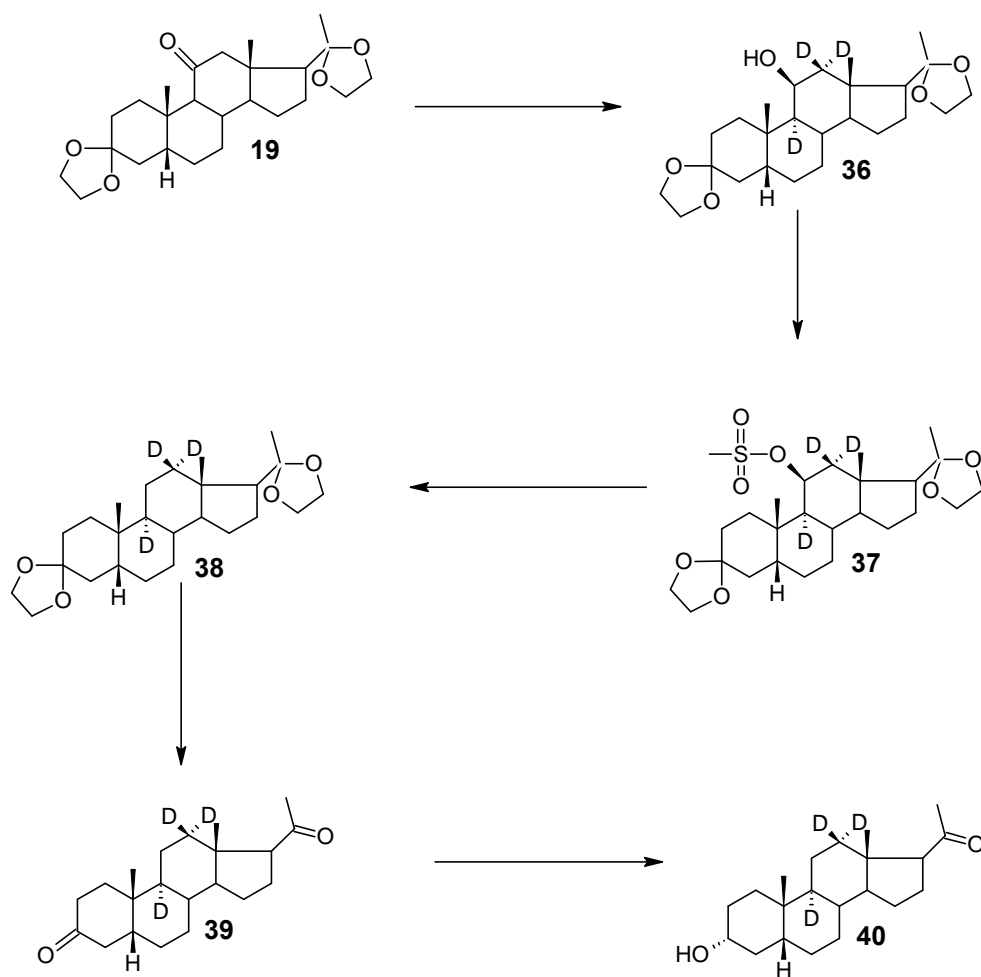
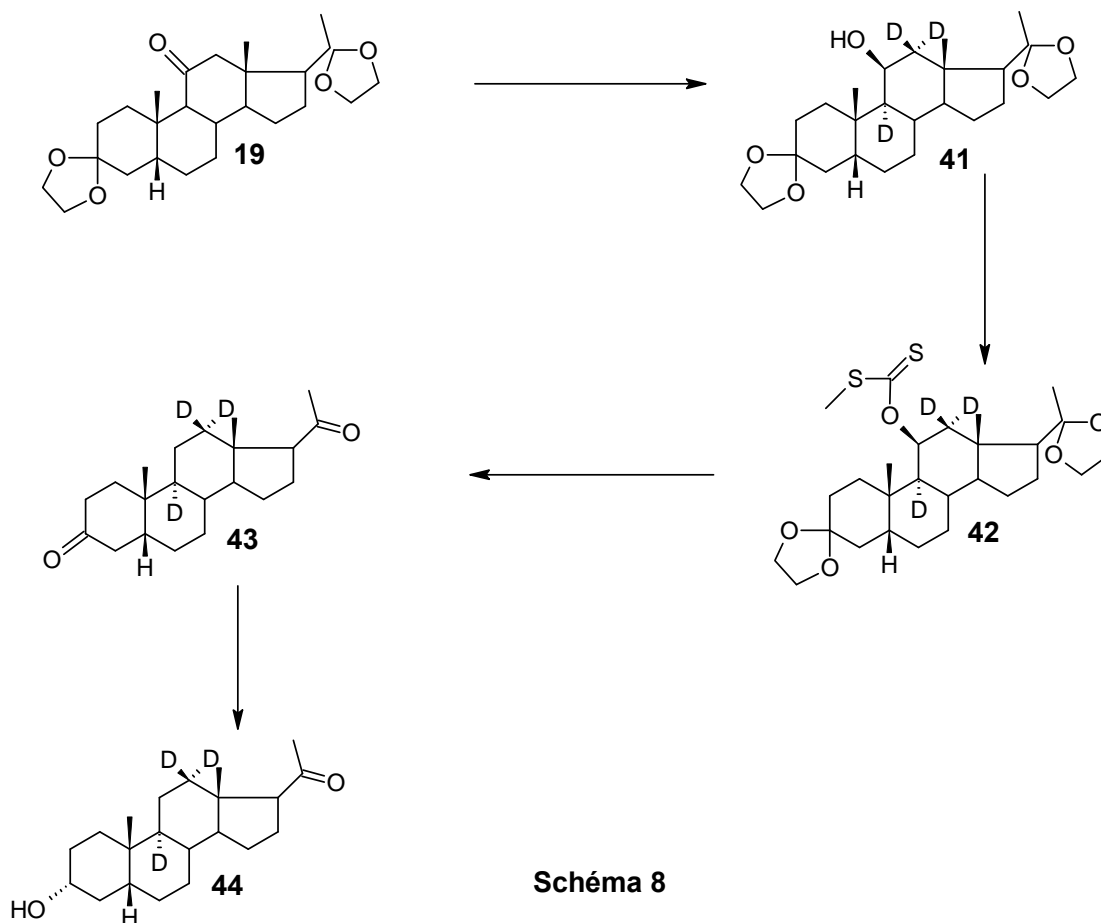


Schéma 7

Schéma 8 pak zobrazuje variantu, kterou se podařilo připravit žádaný derivát pomocí deoxygenace hydroxylové skupiny za použití xanthátů. Počáteční kroky jsou opět analogické předchozím postupům. Derivát **19** byl poté deuterován za již zmíněných podmínek a následovala redukce ketonu bez jeho izolace. Výtěžek hydroxyderivátu **41** byl 94 %. Ze vzniklého alkoholu **41** byl připraven xanthát **42** s výtěžkem 85 %, který byl následně odštěpen za použití klasických Bartonových podmínek¹², s Bu_3SnH jako donorem hydridového aniontu a ABCN jako iniciátorem. Následné odchránění v poloze C-3 a C-20 poskytlo diketon **43**. V dalším kroku byl diketon **43** redukován na C-3 α alkohol **44** ve výtěžku 50 %.



Před provedením syntézy této deuterované řady byla nejprve připravena řada podle stejného schématu, avšak bez výměny vodíků za atomy deuteria.

Funkcionalizace v poloze C-18

Výchozí látkou pro syntézu derivátu s funkcionalizovanou skupinou C-18 byl komerčně dostupný progesteron **28**, který byl Pd-katalyzovanou hydrogenací selektivně zredukován na nasycený 5 β derivát **29a** s výtěžkem 91 %. Reakcí vzniklo také menší množství derivátu 5 α , deriváty byly rozděleny krystalizací, kdy krystalický produkt obsahoval čistý derivát 5 β a matečné louhy obsahovaly směs 5 α a 5 β izomerů. Ten byl následně regioselektivně zredukován na 3-hydroxy derivát **30** s výtěžkem 51 %, jehož acetylací acetanhydridem v pyridinu vznikl takřka kvantitativně (97 %) acetát **31**. Další reakcí byla 20-ketoskupina zredukována na alkohol reakcí s chloridem ceritým a tetrahydridoboritanem sodným za vzniku *R*-alkoholu **32b** s výtěžkem 36 % a *S*-alkoholu **32a** s výtěžkem 18 %. Tyto izomery byly děleny chromatograficky, přičemž byl získán čistý *R*-alkohol a *S*-alkohol a

zároveň směs těchto izomerů s výtěžkem 25 %. Do další reakce se pokračovalo pouze s *S*-alkoholem **32a**, který byl nitrosylován s výtěžkem 91 %. Získaný nitroso derivát **33** byl poté vystaven působení UV záření o vlnové délce 300-320 nm. Radikálovou funkcionalizací vznikl hydroxyoxim **34** s výtěžkem 22 %.

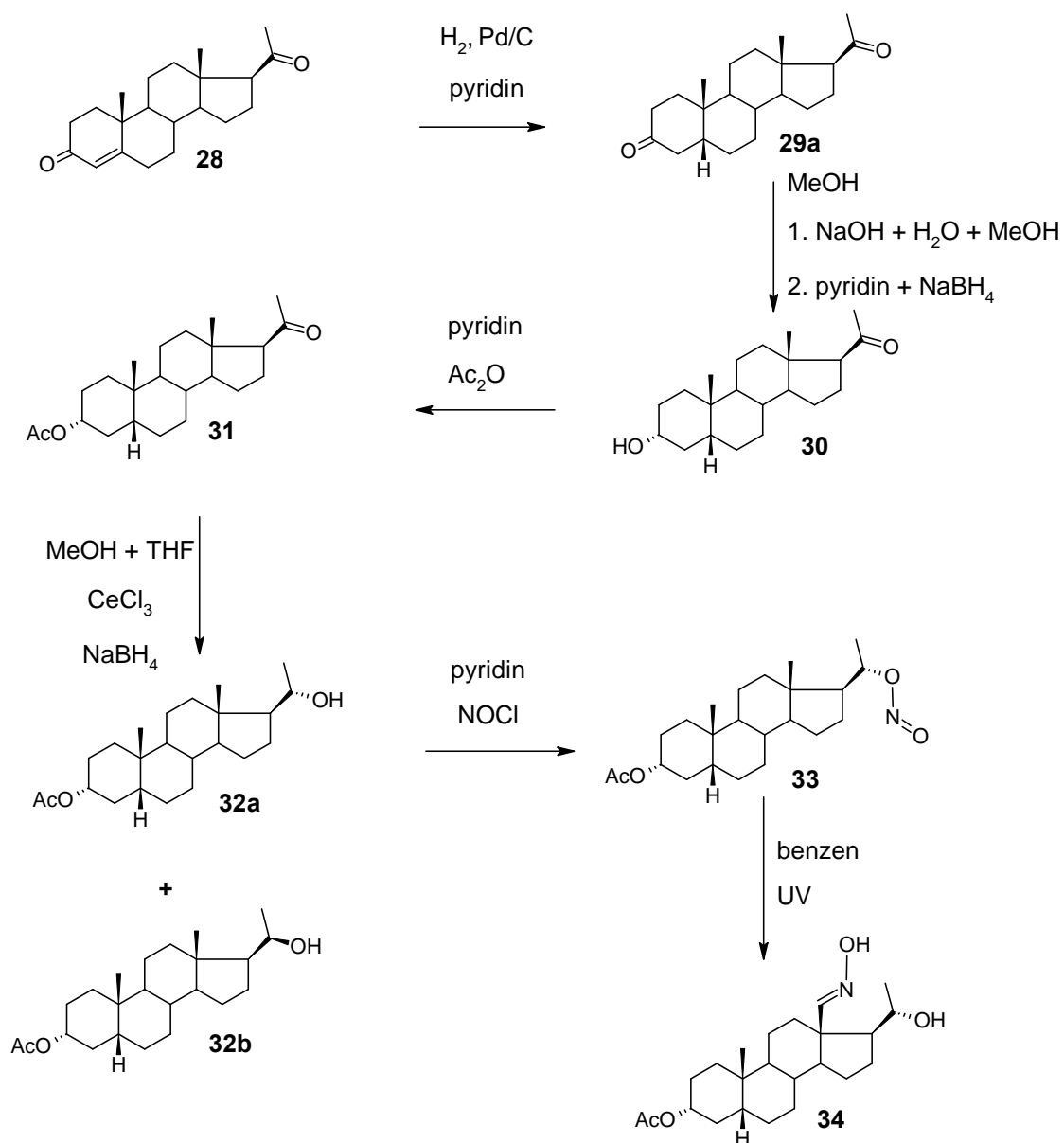


Schéma 6

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. 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. Mobilní fáze pro sloupcovou chromatografii jsou uvedeny vždy u experimentu. Bartonova reakce byla prováděna ve fotoreaktoru vyrobeném firmou UniCat, který je opatřen výbojkou se spektrem 300 až 320 nm.

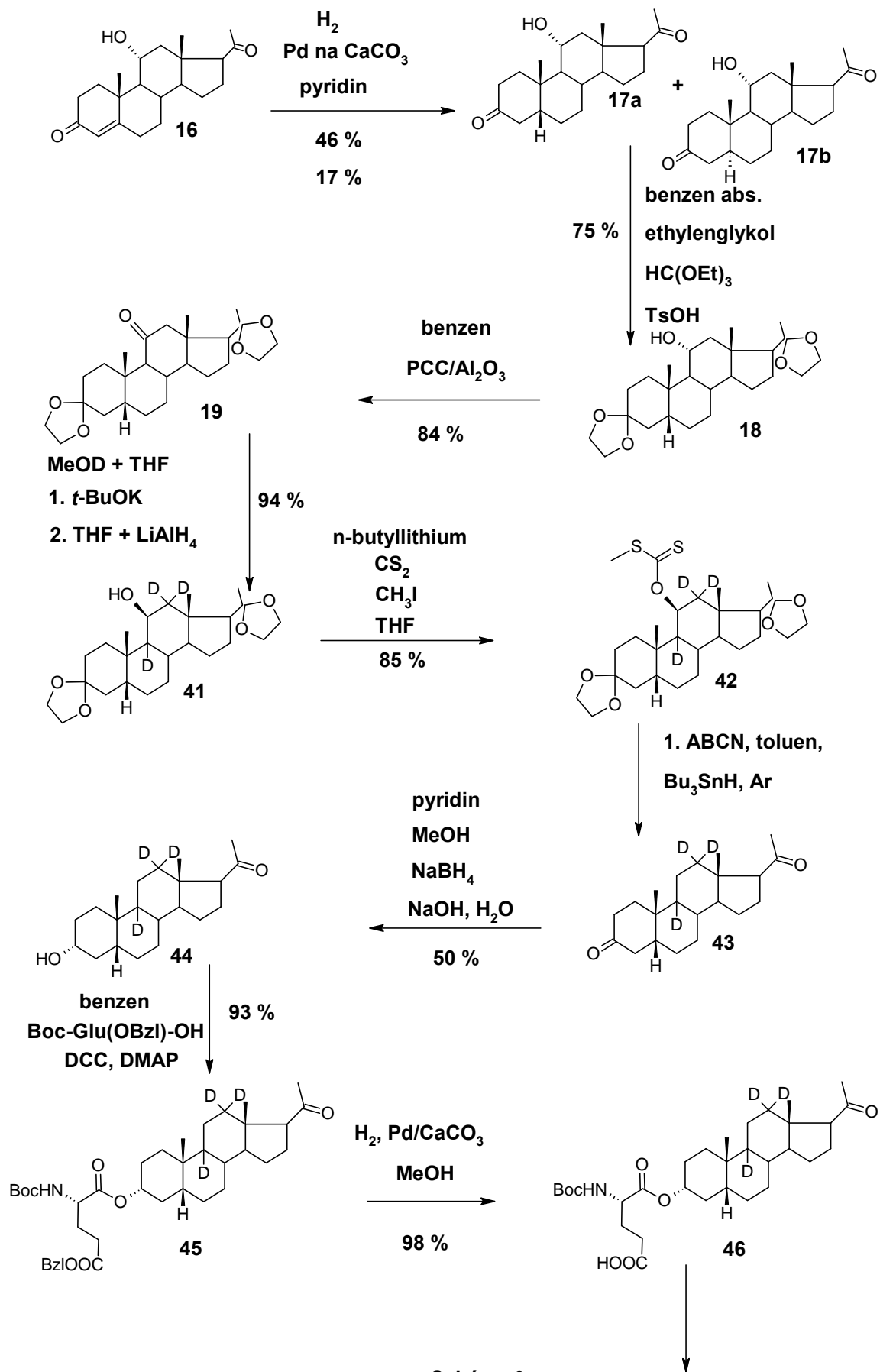


Schéma 9

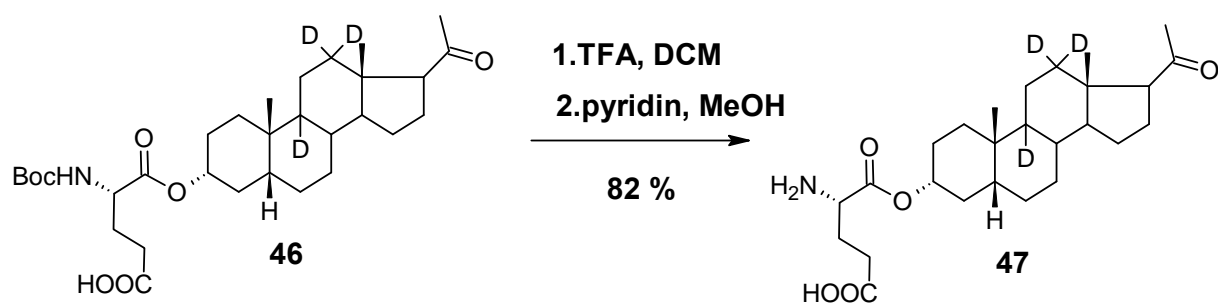


Schéma 9 - pokračování

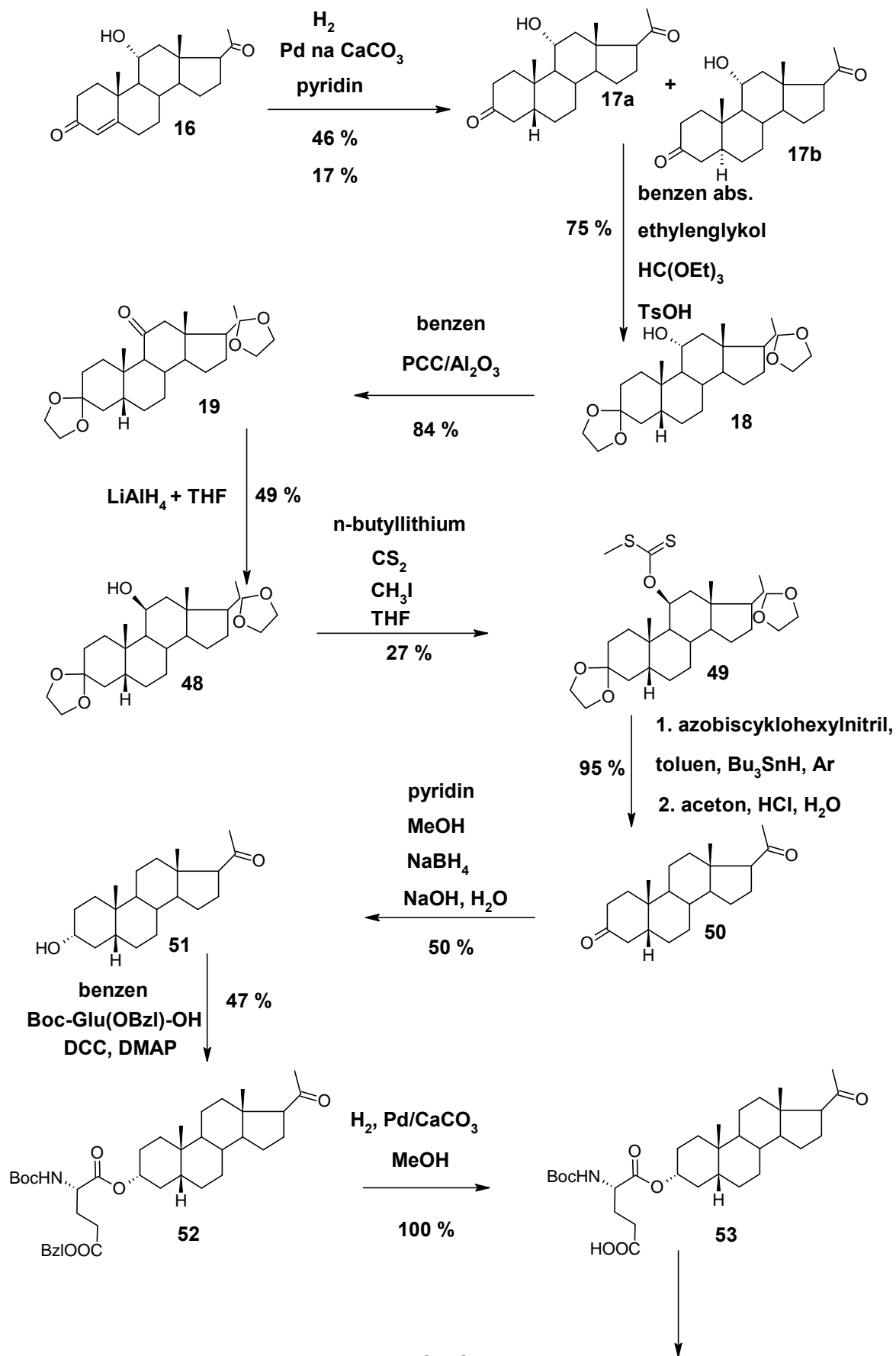


Schéma 10

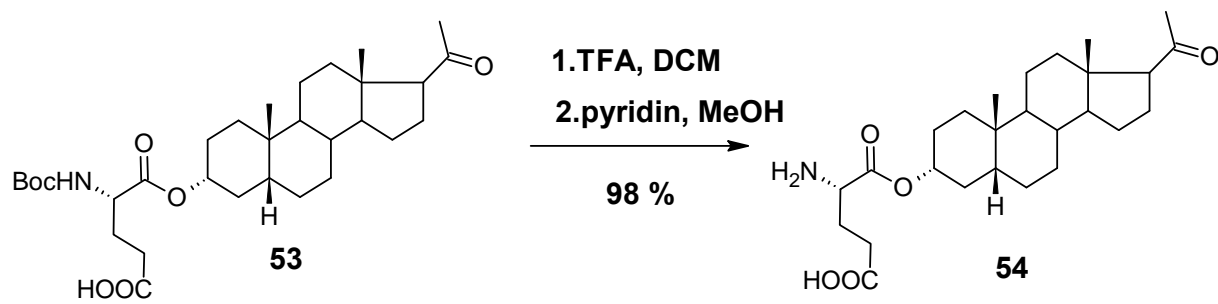


Schéma 10 - pokračování

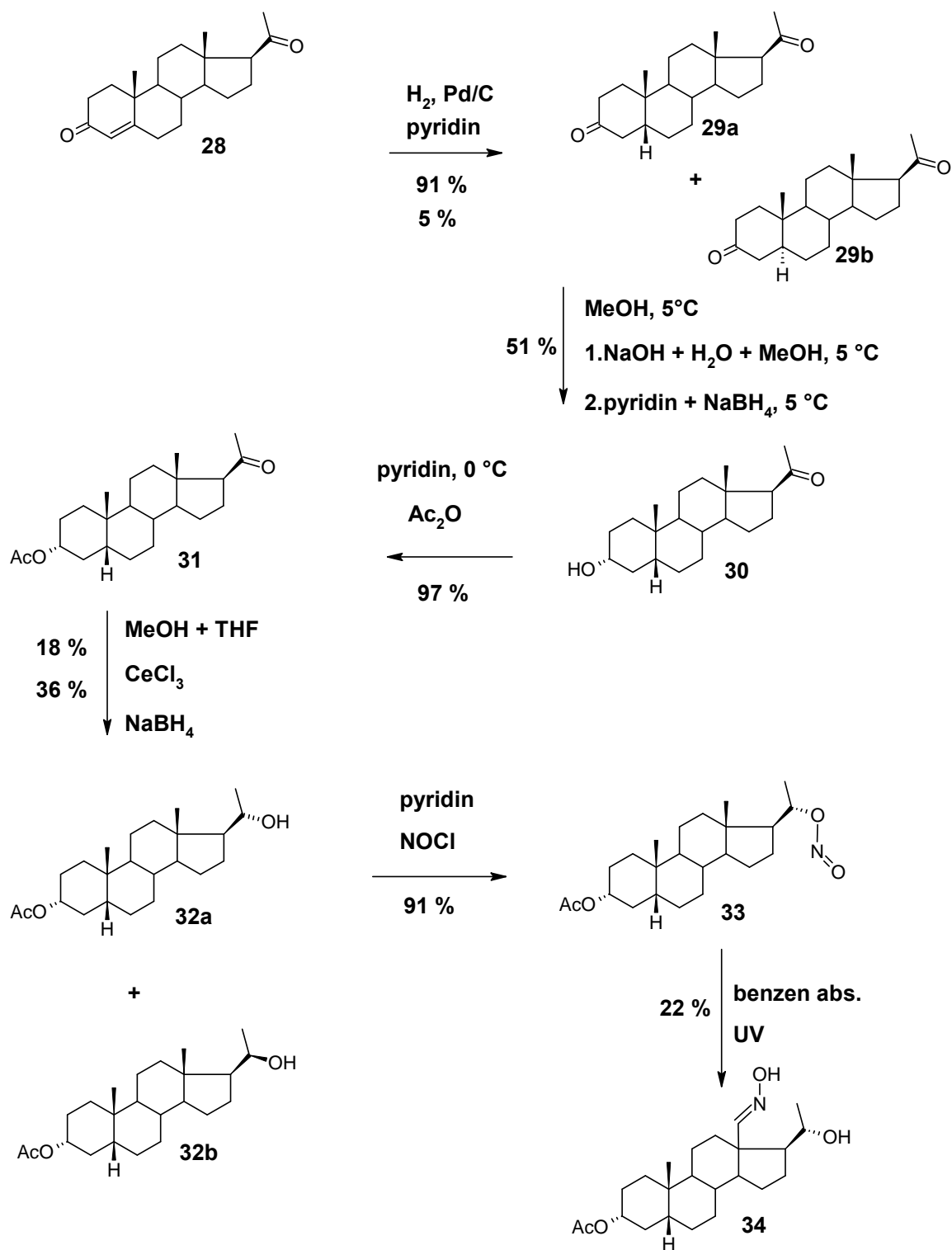


Schéma 6

5.1.1. Příprava derivátu [9,12,12-²H₃]5β-pregnanu

11α-Hydroxy-5β-pregnan-3,20-dion (17a)

11α-Hydroxyprogesteron **16** (15 g, 45,1 mmol) byl rozpuštěn v absolutním pyridinu (66 ml), poté bylo do roztoku přidáno Pd na CaCO₃ (1,5 g, 5%). Reakční baňka byla evakuována, poté naplněna vodíkem a reakční směs byla hydrogenována po 8 h. Poté byl katalyzátor odfiltrován přes křemelinu, reakční směs byla nalita do roztoku HCl (100 ml, 5%) a extrahována chloroformem (60 ml). Spojené organické fáze byly promyty vodou (50 ml), hydrogenuhličitanem draselným (50 ml), a nakonec sušeny bezvodým síranem sodným. Odpařením za sníženého tlaku a chromatografií na silikagelu (450 g) v soustavě petrolether – ethyl-acetát (1:1), byly získány deriváty **17a** (50 %) a **17b** (17 %). Krystalizací ze směsi aceton - *n*-heptan byl získán žádaný produkt **17a** jako bílá krystalická látka (6,9 g, 46 %).

B.t.: 124,0-126,0°C, , [lit.¹³ 106-108 °C], [α]_D + 72,7 (c 0,14).

¹H NMR (400 MHz) v CDCl₃: 0,66 s, 3 H (3 x H-18); 1,14 s, 3 H (3 x H-19); 2,14 s, 3 H (3 x H-21); 2,56 t, 1H, J₁ = 9, J₂ = 9 (H-17α); 3,96-4,04 m, 1H (H-11β).

IČ spektrum: 1703 (C=O, oba karbonyly); 1358 (CH₃, -COCH₃).

Pro C₂₁H₃₂O₃ (332,5) vypočteno: 75,86% C, 9,70% H; nalezeno: 75,76% C, 9,81% H.

3,20-Bis(ethylendioxy)-5β-pregnan-11α-ol (18)

Steroid **17a** (4 g, 12,0 mmol) byl rozpuštěn v absolutním benzenu (90 ml) v 250 ml baňce s míchadlem. Poté byl do směsi přidán ethylenglykol (4,8 ml; 86,1 mmol), ortomravenčan ethylnatý (10,4 ml; 62,5 mmol) a monohydrát kyseliny *p*-toluensulfonové (42 mg; 0,22 mmol). Roztok byl míchán za laboratorní teploty 4 h a poté ponechán stát za laboratorní teploty dalších 12 h. Směs byla nalita do nasyceného roztoku hydrogenuhličitanu draselného (70 ml), produkt byl extrahován do ethyl-acetátu (3x 50 ml). Spojené organické fáze byly vytřepány hydrogenuhličitanem draselným (2x 150 ml), vodou (2x 150 ml) a sušeny bezvodým síranem sodným. Ethyl-acetát byl odpařen za sníženého tlaku, byl získán požadovaný derivát **18** jako olejovitá látka (3,8 g, 75 %).

[α]_D + 15,1 (c 0,28).

¹H NMR (400 MHz) v CDCl₃: 0,76 s, 3 H (3 x H-18); 1,07 s, 3 H (3 x H-19); 1,29 s, 3 H (3 x H-21); 3,86-4,01 m, 8 H (-O-CH₂-CH₂-O-); 4,11-4,15 m, 1H (H-11β).

IČ spektrum: 1475 (CH₂, ethylenketal); 1374 (CH₃, C-20, ethylenketal); 1099 (ring, ethylenketal); 3601, 3491 (OH).

Pro C₂₅H₄₀O₅ (420,6) vypočteno: 71,39 % C, 9,59 % H; nalezeno: 71,52 % C, 9,42 % H.

3,20-Bis(ethylendioxy)-5β-pregnan-11-on (19)

K roztoku steroidu **18** (2,5 g, 5,9 mmol) v benzenu byl přidán PCC na Al₂O₃ (2,5 g, 3,0 mmol) a směs byla míchána za laboratorní teploty. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC ve směsi petrolether-ether (1:1). Po 24 hodinách byl za stálého míchání přidán další PCC na Al₂O₃ (3 g, 3,6 mmol) a PCC (0,5 g, 2,3 mmol), reakční směs byla míchána 12 hodin. Po zreagování byla směs přefiltrována a krystalována ze směsi aceton – *n*-heptan, byl získán produkt **19** jako bílá krystalická látka (2,1 g, 84 %).

B.t.: 124,4-126,6°C, [lit.¹⁴ 125,4-127 °C], [α]_D + 54,1 (c 0,23).

¹H NMR (400 MHz) v CDCl₃: 0,70 s, 3 H (3 x H-18); 1,17 s, 3 H (3 x H-19); 1,25 s, 3 H (3 x H-21); 3,84-3,99 m, 8 H (-O-CH₂-CH₂-O-).

IČ spektrum: 1702 (C=O, keton); 1181 (CH₂, ethylenketal); 1098 (ring, ethylenketal); 1373 (C-H, methyl).

Pro C₂₅H₃₈O₅ (418,6) vypočteno: 71,74% C, 9,15% H; nalezeno: 71,57% C, 9,13% H.

3,20-Bis(ethylendioxy)-[9,12,12-²H₃]5β-pregnan-11β-ol (41)

Steroid **19** (1,00g, 2,4 mmol) byl rozpuštěn ve směsi MeOD (20 ml; 490,2 mmol) a tetrahydrofuranu (30 ml) a následně byl k roztoku přidán terc-butoxid draselný (1,30 g; 11,6 mmol). Reakční směs byla refluxována 13 dní. Po uplynutí této doby byla odpařena ve vakuu, přidán D₂O (2,5 ml), supernatant byl dekantován a sraženina znovu promyta D₂O (2,5 ml). Pevný zůstatek byl sušen azeotropickou destilací s toluenem (3 x 10 ml) a poté rozpuštěn v suchém THF (10 ml). Roztok steroidu byl pak pomalu přikapáván do refluxující směsi LiAlH₄ (1,00 g; 26,35 mmol) s THF (20 ml). Po dvou hodinách refluxu byl nadbytek hydridu rozložen nasyceným vodným roztokem Na₂SO₄ (4 ml), směs byla vysušena bezvodým Na₂SO₄, zfiltrována a promyta diethyletherem (30 ml). Odpařením za sníženého tlaku a následnou krystalizací ze směsi petrolether – diethylether byly získány bílé krystaly deuterovaného steroidu **41** (0,95 g, 94 %).

B.t.: 129,4-132,9°C, $[\alpha]_D + 35,7$ (c 0,20).

^1H NMR (400 MHz) v CDCl_3 : 0,98 s, 3 H (3 x H-18); 1,20 s, 3 H (3 x H-19); 1,35 s, 3 H (3 x H-21); 3,85-4,00 m, 8 H (-O-CH₂-CH₂-O-); 4,26 s, 1 H, (H-11 α).

IČ spektrum: 1086 (C-OH, alkohol); 1181 (CH₂, ethylenketal); 1098 (ring, ethylenketal); 2101, 2189 (CD₂); 1383 (C-H, methyl).

MS: 446,3 (98 %, M(D₃) + Na); 445,3 (1,9 % M(D₂) + Na); 444,3 (0,3 % M(D₁) + Na).

Pro C₂₅H₃₇D₃O₅ (423,6) vypočteno: 70,88% C, 8,80% H; nalezeno: 70,98% C, 9,20% H.

3,20-Bis(ethylendioxy)-[9,12,12-²H₃]5 β -pregnan-11 β -yl-O-(S-methyldithiokarbonát) (42)

Alkohol **41** (832 mg, 2,0 mmol) byl rozpuštěn v sušeném tetrahydrofuranu (10 ml), roztok byl vychlazen na 0°C a za míchání byl do směsi přikapán 1,6 M roztok *n*-butyllithia (1,50 ml; 15,92 mmol) v hexanu. Reakční směs byla poté pomalu vytemperována na laboratorní teplotu a dále míchána 12 h. Po uplynutí této doby byl do roztoku přidán sirouhlík (365 μ l; 6,04 mmol) a došlo okamžitě ke žlutému zabarvení roztoku. Tento byl opět míchán 24 h za laboratorní teploty a nakonec byl k roztoku přidán methyljodid (250 μ l; 4,02 mmol). Po dalších 2 hodinách byla reakce ukončena přidáním nasyceného roztoku NaHCO₃ (50 ml). Následně byla provedena extrakce do diethyletheru (3x15 ml), spojená organická fáze byla promyta nasyceným roztokem chloridu sodného, sušena bezvodým síranem sodným a odpařena za sníženého tlaku. Chromatografie na silikagelu (30 g) v soustavě petrolether – AcOEt - triethylamin (80:20:1) poskytla xanthát **42** jako světle žlutou pěnu (854 mg, 85 %).

$[\alpha]_D + 8,6$ (c 0,28).

^1H NMR (400 MHz) v CDCl_3 : 0,75 s, 3 H (3 x H-18); 0,94 s, 3 H (3 x H-19); 1,13 s, 3 H (3 x H-21); 2,56 s, 3 H (3 x H-MeS); 3,73-3,90 m, 8 H (-O-CH₂-CH₂-O-); 5,86 s, 1 H, (H-11 α).

IČ spektrum: 1245 (C-O-C, xanthát); 1054 (C=S, xanthát); 1180 (CH₂, ethylenketal); 2100, 2191 (CD₂); 1373 (C-H, methyl).

MS: 536,3 (98 %, M(D₃) + Na); 535,3 (1,9 % M(D₂) + Na); 534,3 (0,3 % M(D₁) + Na).

Pro C₂₇H₃₉D₃O₅S₂ (513,8) vypočteno: 63,12% C, 7,65% H, 12,48% S; nalezeno: 62,98% C, 7,88% H, 13,02% S.

[9,12,12-²H₃]5β-Pregnan-3,20-dion (43)

Ke steroidu **42** (848 mg; 1,7 mmol) byl přidán pod ochrannou argonovou atmosférou 1,1'-azobis(cyklohexankarbonitril) (81 mg; 0,33 mmol), látky byly rozpuštěny v bezvodém toluenu (50 ml) a roztok byl přiveden k varu. Do refluxující reakční směsi byl přidán Bu₃SnH (670 μl; 2,49 mmol), směs byla dále refluxována 4 h. TLC v soustavě petrolether – aceton (8:2) prokázalo úplnou konverzi. Toluén byl ze směsi odpařen ve vakuu a olejovitý zbytek rozpuštěn v acetonu (50 ml). Za míchání byla k roztoku přidána postupně voda (5 ml) a koncentrovaný roztok HCl (36%, 2 ml). Roztok byl míchán 15 minut. Reakční směs byla zahuštěna ve vakuu, nalita do nasyceného roztoku NaHCO₃ (100 ml), extrahována AcOEt (3x 20 ml), promyta nasyceným roztokem NaCl (80 ml), vysušena bezvodým MgSO₄ a odpařena ve vakuu. Olejovitý zbytek byl nanesen na sloupec silikagelu (40 g) a eluován soustavou petrolether – diethylether (9 : 1). Konverze z výchozí látky na diketon **43** (646 mg) byla kvantitativní, výtěžek nebyl stanoven, protože derivát obsahoval těžko oddělitelné tributylcínové zbytky, které byly ovšem snadno odstraněny v následujícím kroku.

[α]_D + 83,3 (c 0,11).

¹H NMR (400 MHz) v CDCl₃: 0,64 s, 3 H (3 x H-18); 1,03 s, 3 H (3 x H-19); 2,13 s, 3 H (3 x H-21); 2,55 t, 1H, J = 9 (H-17α).

IČ spektrum: 1703 (C=O, oba karbonyly); 1358 (CH₃, oba karbonyly); 2100, 2191 (CD₂); 1384 (C-H, methyl).

MS: 342,3 (98 %, M(D₃) + Na); 341,3 (1,9 % M(D₂) + Na); 340,3 (0,3 % M(D₁) + Na).

3α-Hydroxy-[9,12,12-²H₃]5β-pregnan-20-on (44)

Diketon **43** (506 mg, 1,6 mmol) byl rozpuštěn v methanolu (37 ml). Reakční směs byla vychlazená v ledové lázni na 5 °C. Hydroxid sodný (44 mg, 1,1 mmol) byl rozpuštěn v destilované vodě (440 μl) v 50 ml baňce. K roztoku byl přidán methanol (12,3 ml). Do další 50 ml baňky byl nalit pyridin (11,4 ml) a přidán tetrahydridoboritan sodný (80 mg). Oba roztoky byly také vychlazeny na 5 °C. Po vytemperování byl do 1 l baňky s rozpuštěným diketonem **43** v methanolu nalit roztok MeOH, NaOH a H₂O a za stálého míchání byl pomalu přiléván roztok pyridinu a tetrahydroboritanu sodného. Průběh reakce byl kontrolován pomocí TLC. Po vymizení výchozího diketonu (asi po 15 min) byla reakce ukončena neutralizací reakční směsi 5% HCl (pH bylo měřeno indikátorovým papírkem). Roztok byl nalit do 1000 ml směsi vody a ledu. Bílá sraženina byla odsáta na Büchnerově nálevce. Sloupcovou

chromatografií na silikagelu (15 g) elucí směsí petrolether : ether (8:2) byl získán požadovaný 3 α alkohol, který byl krystalizován ze směsi aceton - *n*-heptan za zisku alkoholu **44** (253 mg, 50 %).

B.t.: 128,2-130 °C [α]_D + 86,0 (c 0,10).

¹H NMR (400 MHz) v CDCl₃: 0,59 s, 3 H (3 x H-18); 0,93 s, 3 H (3 x H-19); 2,11 s, 3 H (3 x H-21); 2,56 t, 1 H, J = 9,1 (H-17 α); 3,61 – 3,68 m, 1H (H-3).

IČ spektrum: 1036 (C-OH); 1698, 1360 (C=O, acetát); 2101, 2191 (CD₂); 1384, 1378 (C-H, methyl).

MS: 344,3 (98 %, M(D₃) + Na); 343,3 (1,9 % M(D₂) + Na); 342,3 (0,3 % M(D₁) + Na).

Pro C₂₁H₃₁D₃O₂ (321,5) vypočteno: 78,45% C, 9,72% H; nalezeno: 78,98% C, 10,10% H.

20-Oxo-[9,12,12-²H₃]5 β -pregnan-3 α -yl-(2S)-5-(benzyloxy)-2-[(*tert*-butoxykarbonyl)amino]-5-oxo-pentanoát (45)

Alkohol **44** (245 mg, 0,8 mmol) a Boc-Glu(OBzl)-OH (257 mg, 0,8 mmol) byly rozpuštěny v sušeném benzenu (8,5 ml). Pod argonem byl do směsi přidán 4-dimethylaminopyridin (10 mg, 0,1 mmol) a dicyklohexylcarbodiimid v benzenu (840 μ l, 0,84 mmol) a reakční směs byla míchána 12 h. Poté byla směs nalita do nasyceného roztoku NaHCO₃ (50 ml), produkt byl extrahován AcOEt (3 x 15 ml) a spojené organické fáze byly 2x promyty vodou (po 15 ml). Vysrážená N,N'-dicyklohexylmočovina byla odfiltrována, filtrát byl sušen Na₂SO₄ a rozpouštědla byla odpařena. Filtrát byl nanesen na sloupec silikagelu (15 g) a chromatografován v soustavě petrolether – diethylether (9:1). Odpařením rozpouštědel byl získán olejovitý derivát **45** (456 mg, 93 %).

[α]_D + 103 (c 0,12).

¹H NMR (400 MHz) v CDCl₃: 0,60 s, 3 H (3 x H-18); 0,93 s, 3 H (3 x H-19); 1,42-1,45 m, 9 H (3 x CH₃-Boc); 2,12 s, 3 H (3 x H-21); 2,43-2,52 m, 2 H (2 x H, CH₂-4'); 2,54 t, 1 H, J = 8,8 (H-17 α); 4,29 dd, 1H, J₁ = 8,1, J₂ = 12,8 (H, CH-2'); 4,73-4,80 m, 1 H (H-3 β); 5,10-5,12 m, 1 H, (NH); 5,13-5,16 m, 2 H (2 x H, CH₂-benzyl); 7,34-7,38 m, 5 H (fenyl).

IČ spektrum: 1704 (C=O, acetát); 1357 (C-H, acetát); 2100, 2192 (CD₂); 1731 (C=O, glutamát); 1714 (C=O, -NHBoc); 1499 (amid, -NHBoc); 1232 (C-O, glutamát); 1384 (C-H, methyl).

MS: 663,4 (98 %, M(D₃) + Na); 662,4 (1,9 % M(D₂) + Na); 661,4 (0,3 % M(D₁) + Na).

Pro C₃₈H₅₂D₃NO₇ (640,9) vypočteno: 71,22 % C, 8,19 % H, 2,19 % N; nalezeno: 71,31% C, 8,23 % H, 2,16 % N.

20-Oxo-[9,12,12-²H₃]5β-pregnan-3α-yl-N-(terc-butoxykarbonyl)-L-glutamyl 1-ester (46)

Derivát **45** (449 mg, 0,7 mmol) byl rozpuštěn v absolutním MeOH (8 ml) a k roztoku bylo přidáno 5% Pd/CaCO₃ (45 mg). Po 8 h hydrogenace za intenzivního míchání a mírného přetlaku vodíku (10 mbar) byla reakce ukončena. Katalyzátor byl odfiltrován, produkt z filtrátu byl po odpaření rozpouštědla rozpuštěn v diethyletheru a napěněn. Byla získána bílá pěna sloučeniny **46** (379 mg, 98 %).

[α]_D + 140,0 (c 0,22).

¹H NMR (400 MHz) v CDCl₃: 0,60 s, 3 H (3 x H-18); 0,94 s, 3 H (3 x H-19); 1,43-1,46 m, 9 H (3 x CH₃-Boc); 2,12 s, 3 H (3 x H-21); 2,44-2,48 m, 2 H, (2 x H, CH₂-4'); 2,55 t, 1 H, J = 8,8 (H-17α); 4,30 dd, 1H, J₁ = 7,8, J₂ = 12,4 (H, CH-2'); 4,76-4,82 m, H (H-3β); 5,20 d, 1 H, J = 7,8 (NH).

IČ spektrum: 1739 (C=O, -COOH); 1701 (C=O, acetát); 1357 (C-H, acetát); 2101, 2192 (CD₂); 1730 (C=O, glutamát); 1712 (C=O, -NHBoc); 1501 (amid, -NHBoc); 1378, 1384 (C-H, methyl).

MS: 573,3 (98 %, M(D₃) + Na); 572,3 (1,9 % M(D₂) + Na); 571,3 (0,3 % M(D₁) + Na).

Pro C₃₁H₄₆D₃NO₇ (550,7) vypočteno: 67,61 % C, 8,44 % H, 2,54 % N; nalezeno: 67,75 % C, 8,39 % H, 2,63 % N.

20-Oxo-[9,12,12-²H₃]5β-pregnan-3α-yl-L-glutamyl 1-ester (47)

Sloučenina **46** (363 mg, 0,7 mmol) byla rozpuštěna v dichlormethanu (6 ml) a za míchání byla přikapána trifluoroctová kyselina (0,83 ml, 11,2 mmol). Směs byla míchána 2 h při laboratorní teplotě a poté ponechána 12 h při 5 °C. Následně byla reakční směs odpařena 3x s benzenem, rozpuštěna ve směsi pyridinu (1 ml) a MeOH (1 ml), znovu odpařena, rozpuštěna v chloroformu a vytřepána s vodou. Organická fáze byla sušena bezvodým Na₂SO₄, rozpouštědla byla odpařena na odparce. Olejovitý odparek byl rozpuštěn v diethyletheru, jehož odpařením byla získána bílá pěna požadovaného derivátu **47** (245 mg, 82 %).

[α]_D + 108,0 (c 0,10).

¹H NMR (400 MHz) v CDCl₃: 0,61 s, 3 H (3 x H-18); 0,96 s, 3 H (3 x H-19); 2,14 s, 3 H (3 x H-21); 2,49 t, 2 H, J = 8,8 (2 x H, CH₂-4'); 2,59 t, 1 H, J = 8,8 (H-17α); 3,73 dd, 1H, J₁ = 3,8, J₂ = 7,8 (H, CH-2'); 4,78-4,88 m, H (H-3β).

IČ spektrum: 1739 (C=O, -COOH); 1700 (C=O, acetát); 1359 (C-H, acetát); 2099, 2192 (CD₂); 1729 (C=O, glutamát); 3375 (NH₂).

MS: 473,4 (98 %, M(D₃) + Na); 472,4 (1,9 % M(D₂) + Na); 471,4 (0,3 % M(D₁) + Na).

Pro C₂₆H₃₈D₃NO₅ (450,6) vypočteno: 69,30 % C, 8,51 % H, 3,11 % N; nalezeno: 69,31 % C, 8,53 % H, 3,02 % N.

5.1.2. Příprava nedeuterovaného derivátu 5β-pregnanu

3,20-Bis(ethylendioxy)-5β-pregnan-11β-ol (48)

Steroid **19** (100 mg, 0,2 mmol) byl rozpuštěn v tetrahydrofuranu (6 ml), následně byl přidán LiAlH₄ (80 mg) a směs byla refluxována 2 hod. Poté byl přidán nasycený roztok síranu sodného (20 ml), směs byla vysušena bezvodým síranem sodným, přefiltrována, promyta diethyletherem (50 ml) a rozpouštědla byla odpařena za sníženého tlaku. Krystalizací ze směsi diethylether – petrolether byl získán derivát **48** (49,2 mg, 49 %).

B.t.: 138-139,5°C, [lit.¹⁴ 138,5-139,5 °C] [α]_D + 38,2 (c 0,12).

¹H NMR (400 MHz) v CDCl₃: 0,97 s, 3 H (3 x H-18); 1,00-1,08 m, 1 H, (H-9α); 1,2 s, 3 H (3 x H-19); 1,29 s, 3 H (3 x H-21); 1,38-1,50 m, 1 H (H-12 α); 2,18-2,23 dd, 1H, J₁ = 2,5, J₂ = 14,1 (H-12β); 3,85-3,99 m, 8 H (-O-CH₂-CH₂-O-); 4,16-4,19 m, 1 H, (H-11α).

IČ spektrum: 1085 (C-OH, alkohol); 1181, 1171 (CH₂, ethylenketal); 1096 (ring, ethylenketal); 1381, 1373 (C-H, methyl).

Pro C₂₅H₄₀O₅ (420,6) vypočteno: 71,39% C, 9,59% H; nalezeno: 71,17% C, 9,65% H.

3,20-Bis(ethylendioxy)-5β-pregnan-11β-yl-O-(S-methyl-dithiokarbonát) (49)

Steroid **48** (250 mg, 0,6 mmol) byl rozpuštěn v sušeném tetrahydrofuranu (5 ml), roztok byl vychlazen na 0°C a byl k němu přidán 1,6 M roztok *n*-butyllithia (0,45 ml, 4,78 mmol) v hexanu. Po 24 hod byl přidán sirouhlík (110 μl, 1,82 mmol) a roztok byl míchán dalších 24 hod. Poté byl přidán methyljodid (75 μl, 1,21 mmol) a směs byla míchána 1,5 hod. Reakce byla zastavena přidáním destilované vody (20 ml), roztok byl extrahován diethyletherem (3x15 ml), organická fáze promyta nasyceným roztokem chloridu sodného, sušena bezvodým síranem sodným a odpařena za sníženého tlaku. Sloupcovou chromatografií na silikagelu (10 g), elucí směsí petrolether : ethyl-acetát (8:2) + 0,5% Et₃N byl získán žlutý olejovitý produkt **49** (81 mg, 27 %).

$[\alpha]_D + 11,1$ (c 0,27).

^1H NMR (400 MHz) v CDCl_3 : 0,74 s, 3 H (3 x H-18); 0,94 s, 3 H (3 x H-19); 1,13 s, 3 H (3 x H-21); 1,51-1,60 m, 1 H (H-12 α); 1,73-1,79 m, 1 H, (H-9 α); 2,31-2,34 dd, 1H, $J_1 = 2,5$, $J_2 = 14,6$ (H-12 β); 2,55 s, 3 H (3 x H-MeS); 3,72-3,88 m, 8 H (-O-CH₂-CH₂-O-); 5,87 s, 1 H, (H-11 α).

IČ spektrum: 1244 (C-O-C, xanthát); 1054 (C=S, xanthát); 1179 (CH₂, ethylenketaly); 1373 (C-H, methyl).

Pro C₂₇H₄₂O₅S₂ (510,8) vypočteno: 63,49% C, 8,29% H, 12,56% S; nalezeno: 64,06% C, 8,48% H, 12,1% S.

5 β -Pregnan-3,20-dion (50)

K látky **49** (850 mg; 1,7 mmol) byl přidán pod ochrannou argonovou atmosférou 1,1'-azobis(cyklohexankarbonitril) (81 mg; 0,33 mmol), látky byly rozpuštěny v toluenu (50 ml) a roztok byl přiveden k varu. Následně byl do refluxující reakční směsi přidán Bu₃SnH (670 μ l; 2,5 mmol) a směs byla dále refluxována 4 h. TLC ve soustavě petrolether – aceton (8:2) prokázalo úplnou konverzi. Směs byla odpařena ve vakuu a olejovitý zbytek rozpuštěn v acetonu (50 ml). Za míchání byla k roztoku přidána postupně voda (5 ml) a koncentrovaný roztok HCl (36%, 2 ml). Roztok byl míchán 15 minut do vymizení diketalu z reakční směsi. Reakční směs byla zahuštěna ve vakuu, nalita do nasyceného roztoku NaHCO₃ (100 ml), extrahována AcOEt (3x 20 ml), promyta nasyceným roztokem NaCl (80 ml), vysušena bezvodým MgSO₄ a odpařena ve vakuu. Olejovitý zbytek byl nanesen na sloupec silikagelu a chromatografován směsí petrolether – diethylether (9:1). Byl získán diketon **50** (661 mg), který obsahoval těžko oddělitelné tributylcínové zbytky, výtěžek tedy nebyl stanoven. NMR i R_f odpovídalo identické látce získané při funkcionalizaci C-18.

$[\alpha]_D + 108,4$ (c 0,16).

^1H NMR (400 MHz) v CDCl_3 : 0,64 s, 3 H (3 x H-18); 1,03 s, 3 H (3 x H-19); 2,13 s, 3 H (3 x H-21); 2,55 t, 1H, $J = 9$ (H-17 α).

IČ spektrum: 1703 (C=O, oba karbonyly); 1387 (C-H, methyl).

3 α -Hydroxy-5 β -pregnan-20-on (51)

Diketon **50** (800 mg, 2,5 mmol) byl rozpuštěn v methanolu (60 ml). Směs byla vychlazena v ledové lázni na 5 °C. Hydroxid sodný (70 mg, 1,8 mmol) byl rozpuštěn v destilované vodě

(700 μ l) v 50 ml baňce. K roztoku byl přidán methanol (19,7 ml). Do další 50 ml baňky byl nalit pyridin (18 ml) a přidán tetrahydridoboritan sodný (128 mg). Oba roztoky byly také vychlazeny na 5 °C. Po vytemperování byl do baňky s rozpuštěným diketonem **50** v methanolu nalit roztok MeOH, NaOH a H₂O a za stálého míchání byl pomalu přiléván roztok pyridinu a tetrahydroboritanu sodného. Průběh reakce byl kontrolován pomocí TLC. Po vymizení výchozí látky byla reakce ukončena přidáním 5% HCl do reakční směsi (pH bylo měřeno indikátorovým papírkem). Roztok byl nalit do 2 l směsi vody a ledu. Bílá sraženina byla odsáta na Büchnerově nálevce a sloupcovou chromatografií na silikagelu (25 g) elucí směsí petrolether : ether (8:2) byl získán požadovaný **3 α** alkohol, který byl krystalizován ze směsi aceton - *n*-heptan za zisku alkoholu **51** (408 mg, 50 %).

B.t.: 144-148 °C, [lit.¹⁶ 146-148 °C], [α]_D + 104,4 (c 0,18).

¹H NMR (400 MHz) v CDCl₃: 0,60 s, 3 H (3 x H-18); 0,93 s, 3 H (3 x H-19); 2,11 s, 3 H (3 x H-21); 2,53 t, 1 H, J = 9,1 (H-17 α); 3,60 – 3,68 m, 1H (H-3).

IČ spektrum: 3610, 3476 (OH); 1698, 593 (C=O); 1386, 1378 (C-H, methyl); 1034 (C-OH).

Pro C₂₁H₃₄O₂ (318,5) vypočteno: 79,19 % C, 10,76 % H; nalezeno: 79,10 % C, 10,71 % H.

20-Oxo-5 β -pregnan-3 α -yl-(2S)-5-(benzyloxy)-2-[(*tert*-butoxy-karbonyl)amino]-5-oxo-pentanoát (52)

Alkohol **51** (250 mg, 0,8 mmol) a Boc-Glu(OBzl)-OH (291 mg, 0,9 mmol) byly rozpuštěny v sušeném benzenu (6,7 ml). Poté byl do směsi pod ochrannou argonovou atmosférou přidán 4-dimethylaminopyridin (8 mg, 0,07 mmol) a dicyklohexylcarbodiimid v benzenu (660 μ l, 0,66 mmol) a reakční směs byla míchána 12 h. Směs byla nalita do nasyceného roztoku NaHCO₃ (50 ml), produkt byl extrahován AcOEt (3 x 15 ml) a spojené organické fáze byly 2x promyty vodou (po 15 ml). Vysrážená N,N'-dicyklohexylmočovina byla odfiltrována, filtrát byl sušen Na₂SO₄ a rozpouštědla byla odpařena. Filtrát byl nanesen na sloupec silikagelu (15 g) a chromatografován v soustavě petrolether – diethylether (9:1). Odpařením rozpouštědel byl získán olejovitý derivát **52** (233 mg, 47 %).

[α]_D + 38,0 (c 0,11).

¹H NMR (400 MHz) v CDCl₃: 0,60 s, 3 H (3 x H-18); 0,93 s, 3 H (3 x H-19); 1,42-1,45 m, 9 H (3 x CH₃-Boc); 2,12 s, 3 H (3 x H-21); 2,43-2,47 m, 2 H (2 x H, CH₂-4'); 2,53 t, 1 H, J =

8,8 (H-17 α); 4,3 dd, 1H, $J_1 = 8,1$, $J_2 = 12,8$ (H, CH-2'); 4,73-4,78 m, 1 H (H-3 β); 5,08-5,10 m, 1 H (NH); 5,13-5,18 m, 2 H (2 x H, CH₂-benzyl); 7,35-7,40 m, 5 H (fenyl).

IČ spektrum: 1704 (C=O, acetát); 1357 (CH₃, acetát); 3435 (NH, -NHBoc); 1704 (C=O, -NHBoc); 1499 (amid, -NHBoc); 2979 (CH₃, -NHBoc); 1731 (C=O, glutamát); 1452 (ring, benzyl); 1330 (CH₂, benzyl); 1386 (C-H, methyl).

Pro C₃₈H₅₅NO₇ (637,8) vypočteno: 71,55 % C, 8,69 % H, 2,20 % N; nalezeno: 71,62 % C, 9,01 % H, 2,37 % N.

20-Oxo-5 β -pregnan-3 α -yl-N-(terc-butoxykarbonyl)-L-glutamyl 1-ester (53)

Sloučenina **52** (200 mg, 0,3 mmol) byl rozpuštěn v absolutním MeOH (3 ml) a k roztoku bylo přidáno 5% Pd/CaCO₃ (20 mg). Po 8 h hydrogenace za intenzivního míchání a mírného přetlaku vodíku (10 mbar) byla reakce ukončena. Katalyzátor byl odfiltrován, produkt z filtrátu byl po odpaření rozpouštědla rozpuštěn v diethyletheru a napěněn. Byla získána bílá pěna sloučeniny **53** (171 mg, 100 %).

$[\alpha]_D + 62,9$ (c 0,08).

¹H NMR (400 MHz) v CDCl₃: 0,60 s, 3 H (3 x H-18); 0,94 s, 3 H (3 x H-19); 2,12 s, 3 H (3 x H-21); 2,46 t, 2 H, $J = 8,8$ (2 x H, CH₂-4'); 2,55 t, 1 H, $J = 8,8$ (H-17 α); 4,3 dd, 1H, $J_1 = 8,0$, $J_2 = 12,4$ (H, CH-2'); 4,76-4,81 m, 1 H (H-3 β); 5,20 d, 1 H, $J = 7,8$ (NH).

IČ spektrum: 1710 (C=O, acetát); 1357 (CH₃, acetát); 3434 (NH, -NHBoc); 2979 (CH₃, -NHBoc); 1736 (C=O, glutamát, -COOH); 3511 (OH, -COOH); 1736, 1710 (C=O, -COOH); 1486 (C-H, methyl).

Pro C₃₁H₄₉NO₇ (547,7) vypočteno: 67,98 % C, 9,02 % H, 2,56 % N; nalezeno: 67,62 % C, 8,72 % H, 2,49 % N.

20-Oxo-5 β -pregnan-3 α -yl-L-glutamyl 1-ester (54)

Derivát **53** (200 mg, 0,4 mmol) byla rozpuštěna v dichlormethanu (4,5 ml) a za míchání byla přikapána trifluoroctová kyselina (0,43 ml, 5,8 mmol). Směs byla míchána 2 h při laboratorní teplotě a poté ponechána 12 h při 5 °C. Poté byla reakční směs odpařena 3x s benzenem, rozpuštěna ve směsi pyridinu (1 ml) a MeOH (1 ml), znovu odpařena, rozpuštěna v chloroformu a vytřepána s vodou. Organická fáze byla sušena bezvodým Na₂SO₄, rozpouštědla byla odpařena na vakuové odparce. Olejovitý odparek byl rozpuštěn

v diethyletheru, jehož odpařením byla získána bílá pěna požadovaného derivátu **54** (159 mg, 98 %).

$[\alpha]_D + 106,7$ (c 0,12).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz) v CDCl_3 : 0,61 s, 3 H (3 x H-18); 0,96 s, 3 H (3 x H-19); 2,13 s, 3 H (3 x H-21); 2,46 t, 2 H, $J = 8,8$ (2 x H, $\text{CH}_2\text{-4}'$); 2,59 t, 1 H, $J = 8,8$ (H-17 α); 3,61 dd, 1H, $J_1 = 3,8$, $J_2 = 8,8$ (H, $\text{CH-2}'$); 4,78-4,86 m, 1 H (H-3 β).

IČ spektrum: 3516 (OH, -COOH); 1739 (C=O, -COOH); 1702 (C=O, acetát); 1359 (C-H, acetát); 1729 (C=O, glutamát); 3376 (NH_2).

Pro $\text{C}_{26}\text{H}_{41}\text{NO}_5$ (447,7) vypočteno: 69,77 % C, 9,19 % H, 3,11 % N; nalezeno: 69,56 % C, 9,19 % H, 2,99 % N.

5.2. Funkcionalizace v poloze C-18

5 β -Pregnan-3,20-dion (29a)

Progesteron **28** (30 g, 95,4 mmol) byl rozpuštěn v absolutním pyridinu (60 ml) v 1 l baňce. Za míchání byl přidán katalyzátor Pd/C (5%, 600 mg). Reakční baňka byla 3x promyta argonem, naplněna vodíkem. Výchozí sloučenina byla hydrogenována po 30 h. Následně byla reakční směs zfiltrována přes křemelinu a filtrát byl ponechán krystalizovat 12 h při 5 °C. Krystalický produkt obsahoval čistý 5 β **29a** (27,4 g, 91 %), matečný louh (2,44 g) obsahoval směs 5 α a 5 β izomerů (3:5).

B.t.: 118,6-119,1 °C, [lit.¹⁵ 118.5-120 °C], $[\alpha]_D + 108,4$ (c 0,16).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz) v CDCl_3 : 0,64 s, 3 H (3 x H-18); 1,03 s, 3 H (3 x H-19); 2,13 s, 3 H (3 x H-21); 2,55 t, 1H, $J = 9$ (H-17 α).

IČ spektrum: 1703 (C=O, oba karbonyly); 1388 (C-H, methyl).

Pro $\text{C}_{21}\text{H}_{32}\text{O}_2$ (316,5) vypočteno: 79,70 % C, 10,19 % H; nalezeno: 79,73 % C, 10,42 % H.

3 α -Hydroxy-5 β -pregnan-20-on (30)

Diketon **29a** (12 g, 37,9 mmol) byl rozpuštěn v methanolu (1150 ml) v 5 l kádince. Reakční směs byla vychlazená na 5 °C. Hydroxid sodný (1,25 g, 31,3 mmol) byl rozpuštěn v destilované vodě (12,5 ml) v 500 ml baňce a k roztoku byl přidán methanol (354 ml). Do další 500 ml baňky byl nalit pyridin (326 ml) a přidán tetrahydridoboritan sodný (NaBH_4 , 2,28 g). Oba roztoky byly také vychlazeny na ledové lázni na 5 °C. Po vytemperování byl do

5 l kádinky s rozpuštěným diketonem **2** v methanolu nalit roztok MeOH, NaOH a H₂O a za stálého míchání byl pomalu přiléván roztok pyridinu a tetrahydroboritanu sodného. Průběh reakce byl kontrolován pomocí TLC. Po vymizení výchozího diketonu byla reakce ukončena neutralizační reakční směsí 5% HCl (pH bylo měřeno indikátorovým papírkem). Roztok byl nalit do 5000 ml směsi vody a ledu. Bílá sraženina byla odsáta na Büchnerově nálevce. Sloupcovou chromatografií na silikagelu (400 g) elucí směsí petrolether : ether (8:2) byl získán požadovaný 3 α alkohol, který byl krystalizován ze směsi aceton - *n*-heptan za zisku alkoholu **30** (6,12 g, 51 %).

B.t.: 144-148 °C, [lit.¹⁶ 146-148 °C], [α]_D + 104,4 (c 0,18).

¹H NMR (400 MHz) v CDCl₃: 0,60 s, 3 H (3 x H-18); 0,93 s, 3 H (3 x H-19); 2,11 s, 3 H (3 x H-21); 2,53 t, 1 H, J = 9,1 (H-17 α); 3,68 – 3,60 m, 1H (H-3 α).

IČ spektrum: 3610, 3476 (OH); 1698, 593 (C=O); 1386, 1378 (C-H, methyl); 1034 (C-OH).

Pro C₂₁H₃₄O₂ (318,5) vypočteno: 79,19 % C, 10,76 % H; nalezeno: 79,10 % C, 10,71 % H.

20-Oxo-5 β -pregnan-3 α -yl-acetát (31)

Alkohol **30** (6 g, 18,8 mmol) byl azeotropicky vysušen odpařením s benzenem. Poté byl rozpuštěn v absolutním pyridinu (30 ml). Roztok byl ochlazen v ledové lázni a za stálého míchání byl přikapán acetanhydrid (18 ml). Reakční směs byla ponechána stát přes noc za laboratorní teploty. Poté byla nalita do vody (200 ml) a 4% HCl (800 ml) a ponechána do dalšího dne vysrážet. Sraženina byla odsáta na Büchnerově nálevce a sušena při 40°C. Suchý produkt byl rozpuštěn v CHCl₃ (50 ml) a zfiltrován přes sloupec silikagelu. Odpařením byl získán acetát **31** (6.6 g, 97 %).

B.t.: 90 – 93 °C, [lit.¹⁷ 89-90 °C], [α]_D + 120,7 (c 0,21).

¹H NMR (400 MHz) v CDCl₃: 0,60 s, 3 H (3 x H-18); 0,93 s, 3 H (3 x H-19); 2,04 s, 3 H (OAc); 2,11 s, 3 H (3 x H-21); 2,53 t, 1 H, J = 9 (H-17 α); 4,76 – 4,70 m, 1 H (H-3).

IČ spektrum: 1720 (C=O, acetát); 1253,1029 (C-O, acetát); 1383 (C-H, methyl).

Pro C₂₃H₃₆O₃ (360,5) vypočteno: 76,62 % C, 10,06 % H; nalezeno: 76,57 % C, 10,06 % H.

(20R)-20-Hydroxy-5 β -pregnan-3 α -yl-acetát (32a) a (20S)-20-hydroxy-5 β -pregnan-3 α -yl-acetát (32b)

Keton **31** (7,5 g, 20,8 mmol) byl rozpuštěn ve směsi methanol-tetrahydrofuran (2:1, 289 ml). K roztoku byl přidán bezvodý chlorid ceritý (CeCl₃, 4,353 g, 1,1 ekv.). Za stálého míchání byl po částech přidán tetrahydridoboritan sodný (NaBH₄, 728 mg, 19,2 mmol). Po potvrzení proběhnutí reakce pomocí TLC byla reakční směs nalita do vody. Vzniklá sraženina byla odsáta (5,4 g) a filtrátu byl odpařen na vakuové odparce. Destilační zbytek byl extrahován ethyl-acetátem (2x 200 ml) a spojené organické fáze byly sušeny bezvodým síranem sodným. Ethyl-acetát byl odpařen za sníženého tlaku. Odparek (2,1 g) a sraženina (5,4 g) byly spojeny a chromatografií na sloupci silikagelu (230 g) byly izomery děleny ve směsi petrolether-ether (9:1). Byl získán (20R)-20-alkohol **32a** a (20S)-20-alkohol **32b** a nerozdělená směs izomerů 20R a 20S (1,88 g, 25%). Krystalizací ze směsi aceton – n-heptan byly získány bílé krystaly (20R)-20-alkoholu **32a** (2,7 g, 36 %) a bílé krystaly (20S)-20-alkoholu **32b** (1,35 g, 18 %).

(20R)-Izomer (32a):

B.t.: 129-132 °C, [lit.¹⁸ 137-140 °C], [α]_D + 31,0 (c 0,16).

¹H NMR (400 MHz) v CDCl₃: 0,74 s, 3 H (3 x H-18); 0,94 s, 3 H (3 x H-19); 1,14 d, 3 H, J = 6,1 (3 x H-21); 2,04 s, 3 H (OAc); 3,75 – 3,70 m, 1 H, (H-20); 4,77 – 4,69 m, 1 H (H-3).

IČ spektrum: 3611 (O-H, alkohol); 1721 (C=O, acetát); 1364 (CH₃, acetát); 1252, 1028 (C-O, acetát); 1380 (C-H, methyl).

Pro C₂₃H₃₈O₃ (362,6) vypočteno: 76,20 % C, 10,56 % H; nalezeno: 76,40 % C, 10,59 % H.

(20S)-Izomer (32b):

B.t.: 129,7 – 131,7 °C, [lit.¹⁹ 131-132 °C], [α]_D + 30 (c 0,16).

¹H NMR (400 MHz) v CDCl₃: 0,65 s, 3 H (3 x H-18); 0,93 s, 3 H (3 x H-19); 1,22 d, 3 H, J = 6,2 (3 x H-21); 2,03 s, 3 H (OAc); 3,66 – 3,73 m, 1 H, (H-20); 4,68 – 4,76 m, 1 H (H-3).

IČ spektrum: 3617 (O-H, alkohol); 1720 (C=O, acetát); 1364 (CH₃, acetát); 1252, 1027 (C-O, acetát); 1381 (C-H, methyl).

Pro C₂₃H₃₈O₃ (362,6) vypočteno: 76,20 % C, 10,56 % H; nalezeno: 76,09 % C, 10,47 % H.

(20S)-5 β -Pregnan-3 α ,20-diyl-3-acetát-20-nitrit (33)

Alkohol **32a** (1,5 g, 4,1 mmol) byl rozpuštěn v absolutním pyridinu (40 ml), roztok byl chlazen v ledové lázni a 20 min byl zaváděn nitrosylchlorid (NOCl), vyvíjený nakapáním nasyceného roztoku dusitanu sodného (NaNO₂) do míchané koncentrované kyseliny chlorovodíkové (HCl), vyvíjený reagent byl filtrován přes dusitan sodný (NaNO₂), chlorid

draselný (KCl) a chlorid vápenatý (CaCl₂). Roztok postupně zčernal. Po potvrzení proběhnutí reakce pomocí TLC byla celá směs nalita na led (400 ml), po rozpuštění ledu byla sraženina odsáta na Büchnerově nálevce a promyta vodou (100 ml). Byla získána žlutobílá pevná látka, krystalizací ze směsi aceton - *n*-heptan byly získány bílé krystaly nitroso derivátu **33** (1,48 g, 91 %).

B.t.: 127,2-128,1°C, [α]_D + 54,7 (c 0,32).

¹H NMR (400 MHz) v CDCl₃: 0,74 s, 3 H (3 x H-18); 0,94 s, 3 H (3 x H-19); 1,42 d, 3 H, J=6,3 (3 x H-21); 2,03 s, 3 H (OAc); 4,77 – 4,69 m, 1 H (H-3).

IČ spektrum: 1633 (N=O, nitrit); 1721 (C=O, acetát); 1257, 1027 (C-O, acetát); 1364 (CH₃, acetát); 1380 (C-H, methyl).

Pro C₂₃H₃₇NO₄ (391,5) vypočteno: 70,55% C, 9,52% H, 3,58% N; nalezeno: 70,56% C, 9,51% H, 3,48% N.

(18E, 20S)-20-hydroxy-18-hydroxyimino-3-yl-acetát (34)

Nitroso derivát **33** (1,5 g, 3,8 mmol) byl rozpuštěn v absolutním benzenu (20 ml) a injekční stříkačkou zaveden do UV reaktoru, kde byl ozařován. Průběh reakce byl sledován TLC. Po 72 h zreagovala většina výchozího materiálu. Reakční směs byla odpařena na rotační odparce. Sloupcovou chromatografií na silikagelu, elucí směsí petrolether : ether (8:2) byl získán požadovaný oxim **34** (330 mg, 22 %).

B.t.: 145-146,1°C [α]_D + 33,9 (c 0,12).

¹H NMR (400 MHz) v CDCl₃: 0,90 s, 3 H (3 x H-19); 1,19-1,20 d, 3 H (3 x H-21); 2,03 s, 3 H (OAc); 3,86-3,92 m, 1 H, (H-20); 4,68 – 4,76 m, 1 H (H-3); 7,39 s, 1 H, (H-oxim).

IČ spektrum: 3620 (OH, sek.alkohol); 3585 (OH, oxim); 1724 (C=O, acetát); 1252, 1028 (C-O, acetát); 1364 (CH₃, acetát); 1382 (C-H, methyl).

Pro C₂₃H₃₇NO₄ (391,5) vypočteno: 70,55% C, 9,52% H, 3,58% N; nalezeno: 70,62% C, 9,40% H, 3,52%.

6. Závěr

Z výchozí látky **16** byl připraven požadovaný derivát [9,12,12-²H₃]5β-pregnanu, přičemž bylo dosaženo isotopické čistoty 98 % trideuterovaného derivátu. Před syntézou této deuterované řady byla provedena také syntéza podle stejného schématu, avšak s vynecháním kroku výměny vodíků za atomy deuteria.

Derivát byl poskytnut laboratoři Dr. Kačera na VŠCHT, kde je používán jako vnitřní standard pro stanovení farmakokinetiky a biodostupnosti neuroaktivních steroidů.

Dále se podařilo provést funkcionalizaci 5β-derivátu pregnanu v poloze C-18 zavedením oximové skupiny. Získaný funkcionalizovaný derivát poslouží jako prekurzor pro přípravu další trideuterované sloučeniny.

7. Literatura

1. Moss G. P.: Nomenclature of steroids (Recommendation 1989) *Pure Appl. Chem.*, **1989**, 61, 1783.
2. Dorda M.; Vlček K.; Chodounská H.; Vyklický L. Jr.: Neurosteroidy – mechanismus působení a možnosti užití v klinické praxi. *Psychiatrie*, **2001**, *Supplementum 3*, 5.
3. Cais O.; Vyklický L.: Molekulární a systémové účinky neurosteroidů. *Psychiatrie*, **2006**, *Supplementum 3*, 10, 8-11.
4. Selye H.: Anesthetic Effect of Steroid Hormones. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **1941**, 46, 116-121.
5. Danysz W.; Parsons C. G.: Glycine and N-Methyl-D-Aspartate Receptors: Physiological Significance and Possible Therapeutic Applications. *Pharmacol. Rev.*, **1998**, 50, 597-664.
6. Chodounská H.; Šaman D.; Ubik K.; Kasal A.: An Expedient Synthesis of [16,16,17-²H₃]-Epitestosteron via a One-pot Deuteration and Reduction of the 17-Ketone Followed by Epimerization of a Deuterated Alcohol. *Tetrahedron Lett.*, **1995**, 36, No. 42, 7769-7770
7. Johnson D. W.; Phillipou G.; Seamark R. F.: Deuterium labelled steroid hormones: Syntheses and applications in quantitation and endocrinology. *J. Ster. Biochem.*, **1981**, 14, 793-800.
8. Kirk D. N.; Smith C. Z.; Honour J. W.: Synthesis of [11,11,12,12-²H₄]progesteron for mass spectral investigations of peripheral metabolism. *Steroids*, **1990**, 55, 222-227.
9. Murphy R. C.: Facile synthesis of deuterated estrogens. *Steroids*, **1974**, 24, 343-350.
10. Dyer R. L.; Harrow T. A.: Synthesis of C-19 deuterium labeled steroids. *Steroids*, **1979**, 33, 617-624.
11. Nussbaum A. L.; Carlon F. E.; Oliveto E. P.; Townley E.; Kabasakalian P.; Barton D. H. R.: *J. Am. Chem. Soc.*, **1960**, 82, 2973.
12. Barton D. H. R.; McCombie S. W.: *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1975**, 1574.
13. Kalvoda et al.: *Helv. Chim. Acta*, **1961**, 44, 186-195.
14. Oliveto et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, **1953**, 75, 486.
15. McCarry B. E.; Markežic R. L.; Johnson W. S.: *J. Am. Chem. Soc.*, **1973**, 95, 4416-4417.

16. Schmitt J.; Comoy P.; Panouse J.J.; Pluchet H.; Cornu P.J.; Hallot A.: *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **1962**, *3*, 455-462.
17. Hirotsu M.; Furuya T.: *Phytochemistry*, **1975**, *14*, 2601-2606.
18. Hossain M.; Kirk D. N.: *Steroids*, **1979**, *34*, 677-680.
19. Rajagopa M. S.; Turner A.B.: *J. Chem. Soc. C*, **1970**, *16*, 2266-2268.