

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra organické chemie



Eva KOCIÁNOVÁ

**Syntéza isodecarinu, studium struktury v závislosti na pH a
jeho inkorporace do cyklodextrinů**

Bakalářská práce

Studijní obor: Bioorganická chemie B1407

Vedoucí práce: doc.RNDr. Jakub Stýskala, Ph.D.

Olomouc 2015

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Olomouci, 20.5.2015

.....

Podpis

Poděkování

Mé poděkování patří doc.RNDr. Jakubu Stýskalovi, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost, čas a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnoval. Dále bych také chtěla poděkovat celé katedře organické chemie za umožnění realizace mé bakalářské práce na tomto pracovišti.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Eva Kociánová
Název práce: Syntéza isodecarinu, studium struktury v závislosti na pH a jeho inkorporace do cyklodextrinů
Typ práce: Bakalářská
Pracoviště: Katedra organické chemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci
Školitel: doc.RNDr. Jakub Stýskala, Ph.D.
Rok obhajoby práce: 2015

Abstrakt:

Tato bakalářská práce, která je rozdělena do osmi kapitol, se zabývá deriváty benzo[*c*]fenanthridinu a dále se věnuje tématice cyklodextrinů. V první polovině teoretické části jsou uvedeni někteří zástupci benzo[*c*]fenanthridinových alkaloidů a je zde blíže popsána jejich struktura, vlastnosti, biologická aktivita a syntézy vybraných zástupců. Druhá polovina teoretické části je věnována cyklodextrinům, kde je pojednáváno hlavně o jejich struktuře, využití těchto sloučenin a jejich derivátech. Hlavní náplní vlastní práce je syntéza isodecarinu, problematika této laboratorní přípravy a dále je zde v souvislosti s jeho rozpustností diskutována jeho možná biologická dostupnost. Ve snaze zvýšit rozpustnost isodecarinu ve vodě a také možnou biodostupnost bylo úkolem připravit sůl syntetizované látky a dále komplexy cyklodextrinů s připravenou sloučeninou.

Klíčová slova: Benzo[*c*]fenanthridiny, isodecarin, cyklodextriny

Počet stran: 47

Počet příloh: 8

Jazyk: Český

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Eva Kocianova
Title: Synthesis of isodecarine, study of its structure depending on pH and its incorporation into cyclodextrines
Type of thesis: Bachelors
Department: Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, Palacký University Olomouc
Advisor: doc.RNDr. Jakub Stýskala, Ph.D.
The year of presentation: 2015

Abstract:

This Bachelors thesis, which is divided into eight chapters is focused on benzo[*c*]phenanthridines and cyclodextrines. In the first half of the theoretical part the representatives are given. There are described their properties, structures, some synthetic ways which leads to formation of benzo[*c*]phenanthridines and their biological activity. The second half of the theoretical part is devoted to cyclodextrines, where is mainly discussed their structures, uses and derivatives. The main aim of the work is a synthesis of isodecarine and the increase of its solubility and possible biological availability. In order to enhance the solubility and bioavailability of isodecarine was prepared its salt and the cyclodextrines complexes including synthesized compound.

Keywords: Benzo[*c*]phenanthridines, isodecarine, cyclodextrines

Number of pages: 47

Number of appendixes: 8

Language: Czech

Obsah

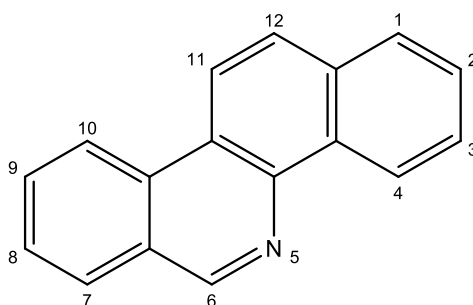
| | | |
|-------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1 | Úvod..... | 7 |
| 2 | Cíle práce | 8 |
| 3 | Teoretická část | 9 |
| 3.1 | Benzo[<i>c</i>]fenanthridinové alkaloidy..... | 9 |
| 3.1.1 | Sanguinarin | 10 |
| 3.1.2 | Chelerythrin..... | 12 |
| 3.1.3 | Nitidin | 13 |
| 3.1.4 | Fagaridin a isofagaridin..... | 14 |
| 3.1.5 | Isodecarin | 16 |
| 3.2 | Cyklodextriny..... | 18 |
| 3.2.1 | Obecné informace | 18 |
| 3.2.2 | Struktura cyklodextrinů..... | 19 |
| 3.2.3 | Inkluzní komplexy | 20 |
| 3.2.4 | Modifikované cyklodextriny | 22 |
| 4 | Výsledky a diskuze | 24 |
| 4.1 | Příprava isodecarinu..... | 24 |
| 4.1.1 | Benzylace 6-bromo-2-hydroxy-3-methoxybenzaldehydu..... | 25 |
| 4.1.2 | Příprava <i>N</i> -(6-brom-2-benzyloxy-3-methoxybenzyliden)-6,7-methyldioxy-1-aminonaftalenu | 26 |
| 4.1.3 | Příprava <i>N</i> -(6-brom-2-benzyloxy-3-methoxybenzyl)-6,7-methyldioxy-1-aminonaftalenu | 27 |
| 4.1.4 | Příprava 7-benzyloxy-8-methoxy-2,3-methyldioxybenzo[<i>c</i>]fenanthridinu..... | 28 |
| 4.1.5 | Příprava 7-hydroxy-8-methoxy-2,3-methyldioxybenzo[<i>c</i>]fenanthridinu (isodecarin)..... | 30 |
| 4.2 | Studium struktury v závislosti na pH - příprava isodecarinu hydrochloridu | 31 |
| 4.3 | Studium inkorporace isodecarinu do cyklodextrinů..... | 33 |
| 5 | Experimentální část..... | 37 |
| 6 | Závěr | 43 |
| 7 | Citovaná literatura..... | 45 |
| 8 | Přílohy | 48 |

1 Úvod

Benzo[*c*]fenanthridiny zastupují širokou skupinu látek, která se řadí mezi alkaloidy. Tyto nízkomolekulární látky primárně izolované z přírodních zdrojů jsou organické, polycyklické sloučeniny, které ve svém základním skeletu obsahují atom dusíku.

Předmětem zkoumání se staly především díky jejich zjištěné biologické aktivitě, která kromě kancerostatické aktivity zahrnuje i antimikrobiální, antimykotické a protizánětlivé účinky. Mohou interagovat s mnoha látkami, jako je např. DNA či mikrotubuly a také pozměnit aktivitu široké škály enzymů⁵.

K nejznámějším alkaloidům tohoto typu, které mají blíže popsanou biologickou aktivitu a kterým je v dnešní době stále věnována pozornost patří např. sanguinarin, chelerythrin, nitidin, fagaridin a také isodecarin a jejich syntetická analoga (např. NK109). V přírodě se tyto látky nacházejí v některých rostlinách, nejčastěji z čeledi makovitých, routovitých¹ a zemědýmovitých⁵, jakožto sekundární rostlinné metabolity.



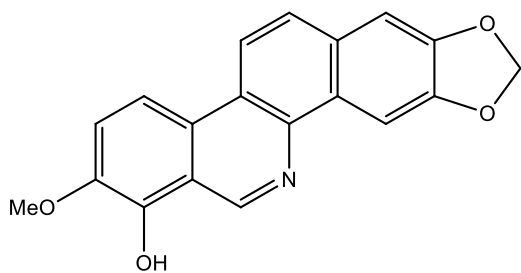
*Benzo[*c*]fenanthridinový skelet*

2 Cíle práce

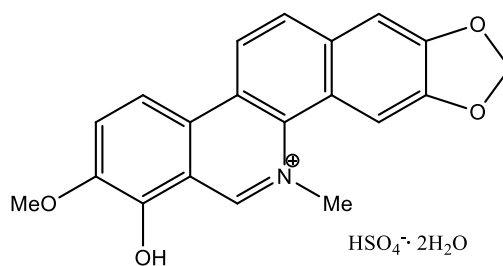
Cílem této bakalářské práce je především syntéza isodecarinu a inkorporace této sloučeniny do cyklodextrinů za účelem zvýšení její rozpustnosti ve fyziologických prostředích.

Isodecarin je látka, která byla nedávno synteticky připravena^{1,2,3}. Je tedy známa. Některé prekurzory vedoucí k syntéze této látky však byly popsány ve čtvrtprovozním měřítku a bez izolace. Úkolem je tedy ověřit a vhodným způsobem přizpůsobit syntézu pro gramové množství.

Isodecarin – sloučenina z řady bezno[*c*]fenanthridinových alkaloidů je známa pro své cytostatické účinky na nádorových buněčných liniích⁴. Její struktura je podobná velice slibnému kancerostatickému derivátu obsahující benzo[*c*]fenanthridinový skelet - NK109¹. Značná nevýhoda isodecarinu je v jeho špatné rozpustnosti ve fyziologických prostředích, která brání provést pokročilé biologické testování. Překonat tuto nesnáz je dalším cílem této bakalářské práce. Myšlenka je taková: zkusit připravit sůl se silnou minerální kyselinou a otestovat její vlastnosti a dále využít známých vlastností cyklodextrinu a zainkorporovat isodecarin do vnitřní kavity za vzniku inkluzních sloučenin. Závěrem pak vyhodnotit závislost inkorporace dextrinu na typu a koncentraci použitého cyklodextrinu.



Isodecarin



NK109

3 Teoretická část

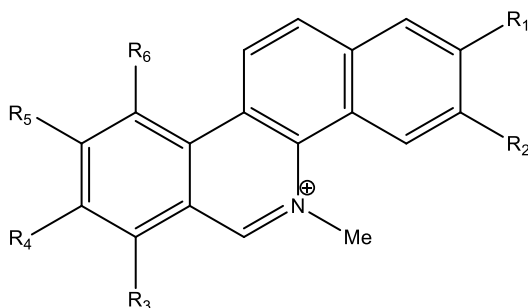
V této kapitole jsou popsány struktury, základní informace, vybrané syntetické přípravy hlavních zástupců benzo[*c*]fenanthridinových alkaloidů a struktury a vlastnosti cyklodextrinů.

3.1 Benzo[*c*]fenanthridinové alkaloidy

Benzo[*c*]fenanthridinové alkaloidy jsou nízkomolekulární sekundární rostlinné metabolity, obsahující ve své molekule dusík. Představují významnou skupinu látek, které jsou zajímavé díky své různorodé biologické aktivitě⁶.

Rostlinám obsahujícím tyto alkaloidy slouží jejich sekundární metabolity jako chemická ochrana před býložravci a mikroorganismy⁷. Bylo také zjištěno, že benzo[*c*]fenanthridinové alkaloidy jsou produkovány v buněčných kulturách některých druhů rostlin v rámci působení kvasinek, alginátů a bakteriálních elicitorů⁸. Tyto alkaloidy také vykazují fluorescenční vlastnosti⁵.

Tato práce bude zaměřena především na tetrasubstituované sloučeniny s benzo[*c*]fenanthridinovým skeletem (**1**) (kde $R_5 = R_6 = H$). Ty můžeme rozdělit dle různých kritérií. Jedním z nich je poloha substituentů obsahující kyslík na základní struktuře, kdy vznikají 2, 3, 7 a 8 nebo 2, 3, 8 a 9 substituované molekuly, což hraje významnou roli v projevech biologické aktivity⁵.



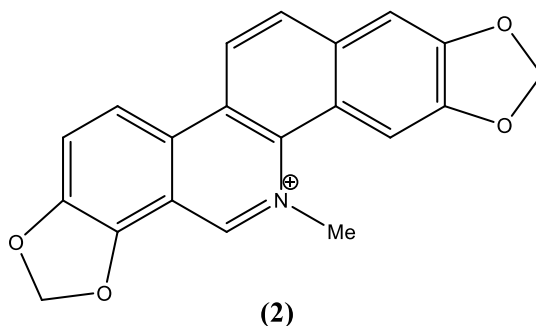
Dalším kritériem rozdělení je substituce dusíkového atomu. V prvním případě je dusík substituovaný a jedná se tedy o iminiovou kvartérní strukturu, kdežto v druhém případě dusík nenesení žádný další substituent. Přítomnost iminiové vazby $C=N^+$ je

důležitá z hlediska rozpustnosti a chemické reaktivity. Na uhlíku této vazby je nízká elektronová hustota, což vede ke snadnému nukleofilnímu ataku. V literatuře již byla popsána spousta reakcí nukleofilního charakteru na diskutovaných sloučeninách^{9,10}.

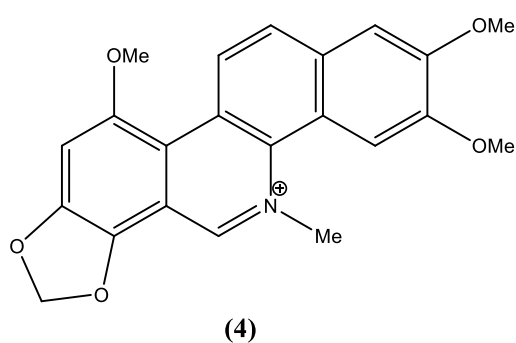
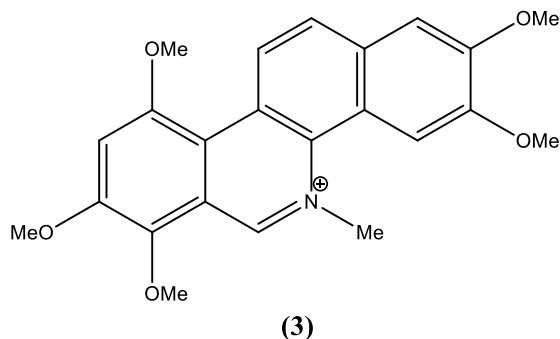
V následujících podkapitolách budou blíže specifikováni vybraní zástupci, jejich vlastnosti a některé přípravy.

3.1.1 Sanguinarin

Jedním z hlavních a nejlépe prozkoumaných zástupců z benzo[*c*]fenanthridinových alkaloidů je sanguinarin (**2**)⁵, který je oproti základnímu skeletu substituován v poloze 2,3,7 a 8. Tato látka byla primárně získána izolací z podzemní části těla rostliny *Sanguinaria canadensis*¹¹.



V některých dalších rostlinách se společně se sanguinarinem vyskytují i pentasubstituované deriváty jako jsou např. sanguilutin (**3**), sanguirubin (**4**) či jiné deriváty, které jsou diskutovány dále¹¹.



Bylo zjištěno, že sanguinarin vykazuje antimikrobiální¹² a antimykotické¹³ účinky. Vzhledem ke zmíněné biologické aktivitě se látka využívá jako součást

produktů dentální hygieny¹⁴ (např. zubní pasta Santoin), ale i jako doplňků zvířecího krmiva¹⁵. Mnoho studií se zabývá také jeho potenciální kancerostatickou aktivitou, která je zkoumána díky jeho schopnosti indukovat apoptózu. Dřívější studie také potvrdily jeho chemoterapeutické účinky. Tímto bylo prokázáno, že sanguinarin překonává fenomén rezistence více léčiv na několik buněčných linií¹¹.

První příprava sanguinarinu byla publikována v roce 1968 (viz schéma č. 1)¹⁶. Výtěžky této syntézy však nebyly příliš vysoké. V později publikované literatuře již byly uvedeny syntézy s vyššími výtěžky^{17,18}.

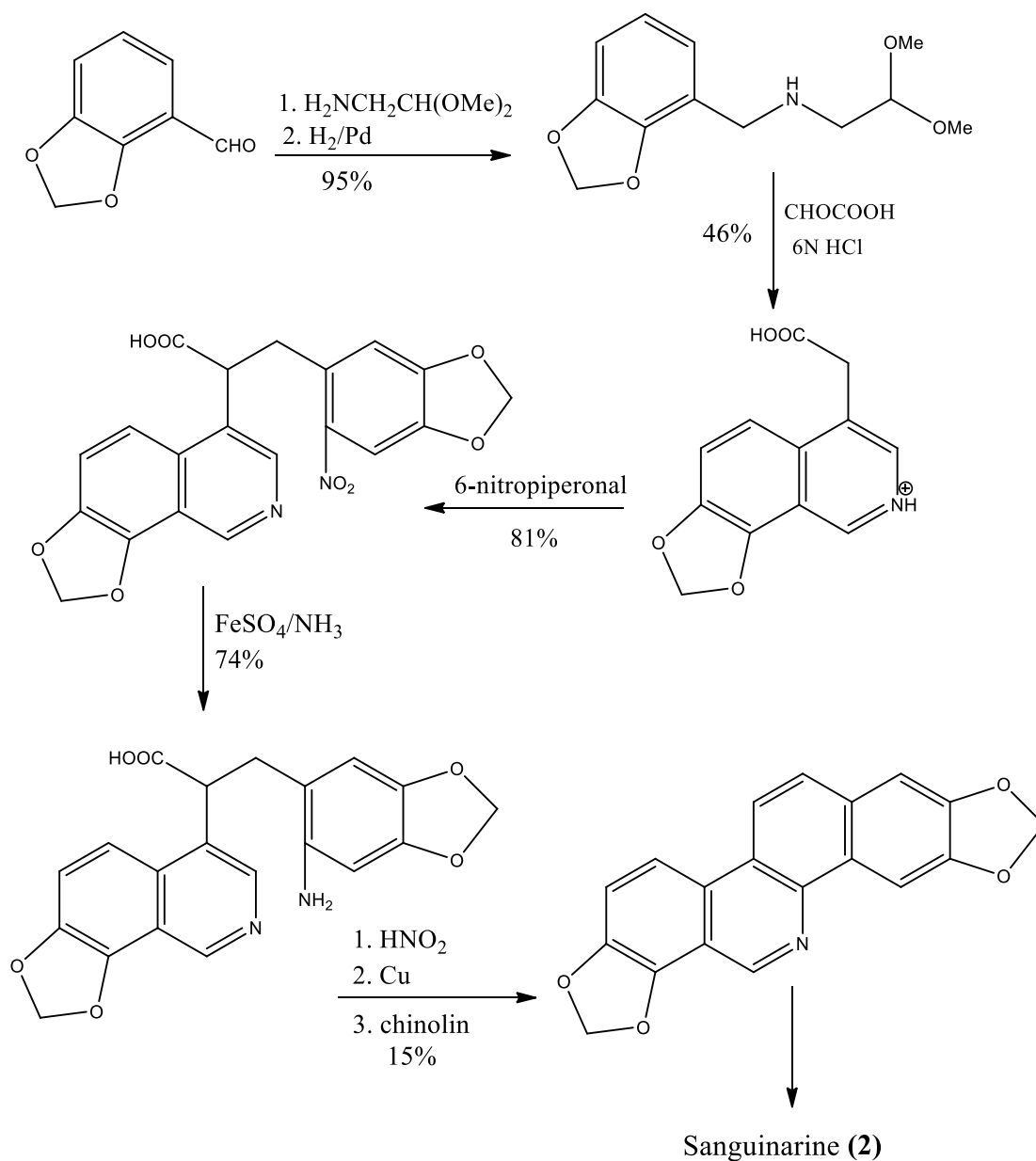
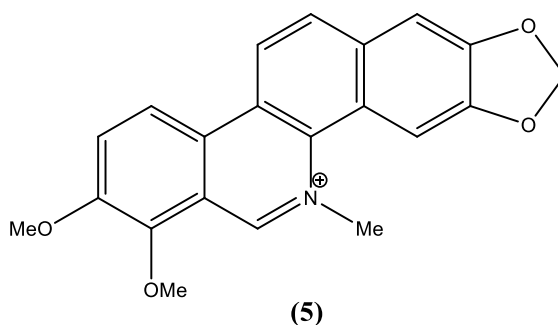


Schéma č. 1

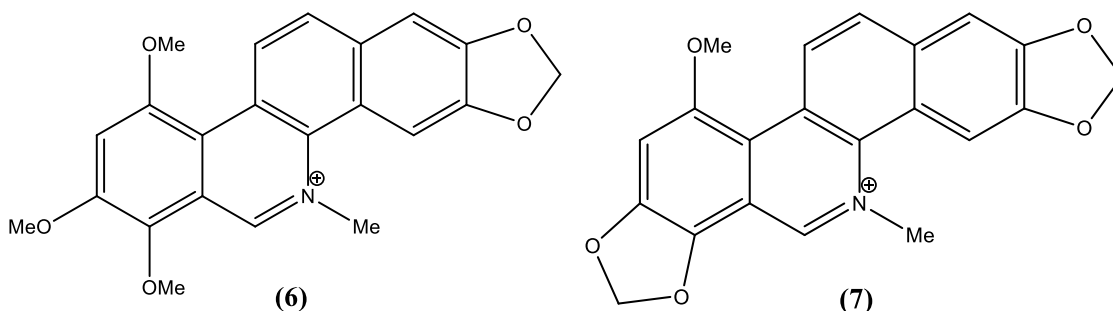
3.1.2 Chelerythrin

Dalším významným zástupcem z řad benzo[*c*]fenanthridinových alkaloidů je chelerythrin. Tato látka je předmětem zkoumání především proto, že vykazuje širokou škálu farmakologických účinků. Prvotně byla získána izolací z rostlin např. *Chelidonium majus*⁵. Důležitým poznatkem ve studiu biologické aktivity této látky byl objev její potenciální aktivity proti leishmanióze, což je souborný název pro parazitární onemocnění způsobené různými prvoky rodu *Leishmania*. Tato choroba je přenášena na člověka kousnutím samic bodavého hmyzu rodu *Phelobotomine*. Každý rok se objevuje okolo 1,3 milionu nových případů postižení touto chorobou. Dalších 310 milionů lidí je v ohrožení nejčastěji v oblasti tropických a subtropických zemí. Antileishmaniální aktivita chelerythrinu byla prokázána v *in vitro* studiích, *in vivo* však dosud popsána nebyla¹⁹.

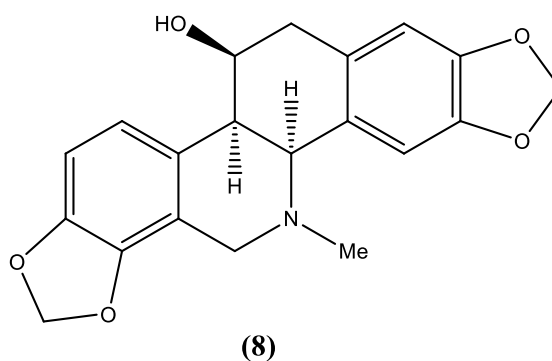
Chelerythrine nachází široké využití ve farmakologických studiích jakožto silný inhibitor proteinkinázy C a může také indukovat apoptózu^{20,21}. Dále má i protizánětlivé účinky, které byly prokázány jak *in vitro*, tak *in vivo*^{22,23,24}.



Chelerythrin, stejně jako sanguinarin se někdy v rostlinách vyskytují společně s jejich deriváty jako je např. chelilutin (6) či chelirubin (7). Chelilutin (6) společně se sanguilutinem (3) jsou zajímavé z důvodu jejich antiproliferační aktivity a díky jejich schopnosti indukovat oxidativní stres²⁵, chelirubinu (7) jsou pak připisovány účinky antituberkulotické²⁶.

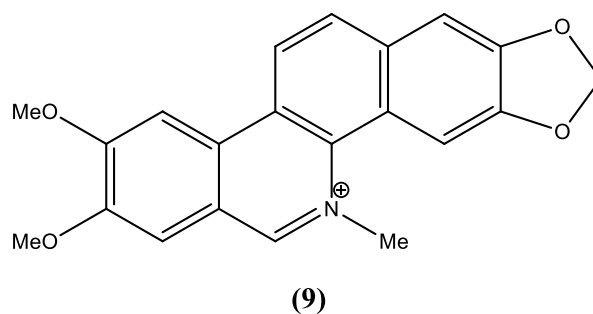


Dalším podobným zástupcem je také chelidonin (**8**), který byl společně s dalšími benzo[*c*]fenanthridiny izolován z rostliny *Chelidonium majus*. Směs izolovaných alkaloidů byla testována v rámci účinků proti jedné z nejčastěji se vyskytujících nemocí způsobené parazity na sladkovodních rybách, která může způsobit smrt většiny sladkovodních druhů po celém světě. Ze směsi alkaloidů byla poté vyizolována látka s nejlepšími výsledky a následně byla identifikována právě jako chelidonin (**8**), který však na rozdíl od předešlých jmenovaných zástupců neobsahuje iminivou C=N⁺ vazbu²⁷.



3.1.3 Nitidin

Nitidin (**9**), regioizomer chelerythrinu byl poprvé izolována v roce 1959 z rostliny *Zanthoxylum nitidum* (rouťovité)²⁸, poté byl asi o 40 let později objeven v Keni jako součást tradičního léku proti malárii²⁹ a v nedávné době bylo zjištěno, že je obsažen v rostlině *Zanthoxylum rhoifolium*, která je tradičně užívána jako lék v Jižní Americe³⁰. Rozšířené využívání nitidinu zdůrazňuje důležitost této látky v oblasti léčby malárie. Nitidinu je také připisována řada biologických aktivit, zahrnující antimikrobiální³¹, anti-HIV³², analgetické a protizánětlivé účinky³³. Dále byla popsána i jeho cytotoxická a kancerostatická aktivita³⁴ a jeho inhibiční účinky topoizomerázy I/II³⁵.



3.1.4 Fagaridin a isofagaridin

Fagaridin byl izolován v roce 1973 z rostliny *Fagara xanthoxyloides* Tortem a jeho spolupracovníky, kteří jej identifikovali jako sloučeninu **(10)**³⁶. V roce 1989 bylo zjištěno, že tato látka **(10)** jeví značnou protinádorovou aktivitu³⁷. Poté byla zveřejněna syntéza této sloučeniny za účelem klinických testů¹. Během studia syntézy byla zpochybněna struktura fagaridinu, jak byla popisována Tortem a kol., kteří vyizolovali tehdejší fagaridin jako hydroxid. Sloučenina **(10)**, kterou však připravili autoři článku³⁸ nezreagovala za alkalických podmínek na hydroxid, ale na ketoamin **(11)** (viz schéma č. 2).

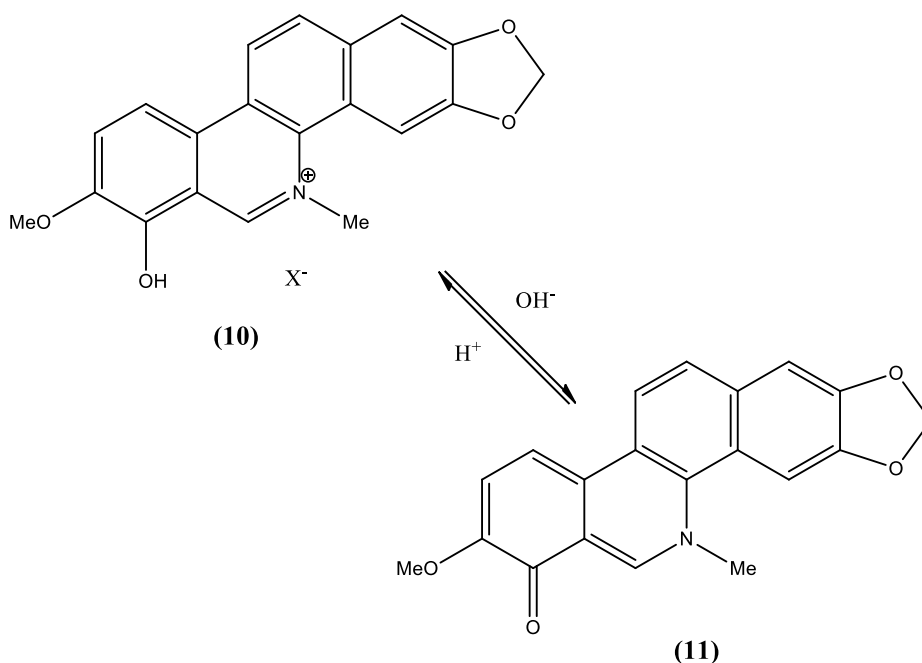
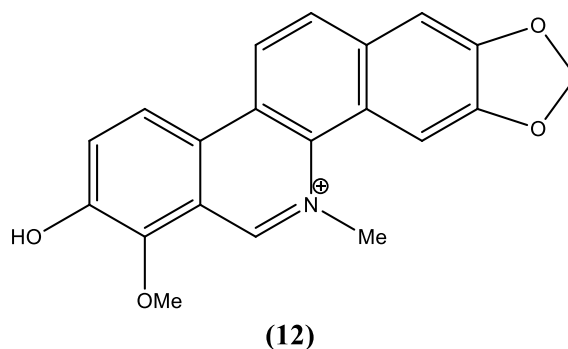


Schéma č. 2.

Tento ketoamin **(11)** je pevná látka, charakteristická svým fialovým zbarvením, což Torto nevedl. Bylo také zjištěno, že analytická data dle autorů zabývající se fagaridinem³⁸ se neshodovala s těmi, které poskytl Torto a kol., kteří popsali strukturu fagaridinu na základě srovnání NMR dat izolované látky s daty podobných benzo[*c*]fenanthridinů a to nitidinu **(9)** a chelerythrinu **(5)**. Dalším důvodem, co mylně ukazovalo na strukturu látky **(10)** byl fakt, že když na fagaridin působili diazomethanem, tak se sloučenina namethylovala za vzniku chelerythrinu.

Z uvedených poznatků autoři literatury³⁸ usoudili, že látka, která byla izolovaná v roce 1973 Tortem a jeho spolupracovníky nebyl fagaridin (**12**), ale pravděpodobně jeho isomer isofagaridin (**10**).



Velice významnou látkou odvozenou od isofagaridinu je 7-hydroxy-8-methoxy-5-methyl-2,3-methylenedioxybenzo[*c*]phenanthridinium hydrogensulfát nazvaný také jako NK109. Tato synteticky připravená látka vykazuje značnou kancerostatickou aktivitu, která dosahuje lepších účinků proti leukémii P388 než mnohem známější nitidin nebo fagaronin³⁹. NK109 inhibuje topoizomerázu II stabilizací štěpitelného komplexu DNA a Topo II^{40,41} a je velice účinný proti několika buněčným liniím lidského tumoru rezistentním vůči léčivům⁴². Byly také provedeny klinické testy v Japonsku⁴³, které ukázaly, že ačkoliv má NK109 v těchto testech dostatečnou protinádorovou aktivitu, je v biologickém prostředí lehce metabolizován. Zkoumání metabolismu NK109 v myších odhalilo důležitou metabolickou dráhu, kterou je redukce NK109 (**13**) za vzniku jeho 5,6-dihydroderivátu (**14**) (viz schéma č. 3).

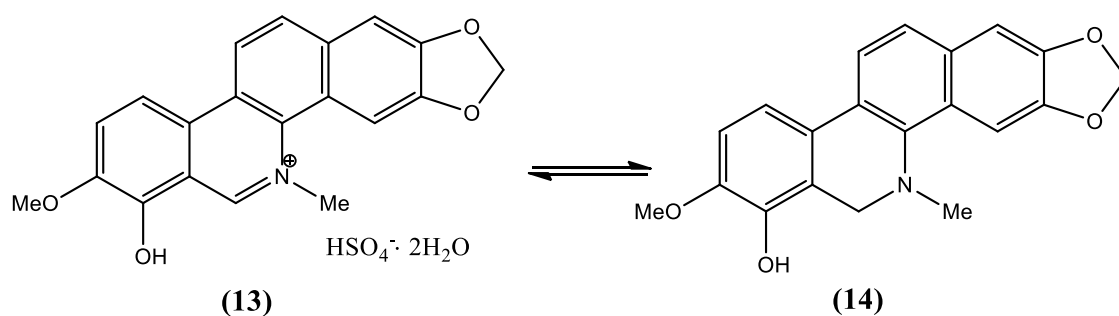


Schéma č. 3

NK109 (**13**) silně inhibuje růst nádorových buněk *in vitro*, avšak k účinné protinádorové aktivitě *in vivo* je nutné použít vysokou dávku této látky⁴³, protože její

hlavní metabolit (**14**) je inaktivní. Z tohoto důvodu byla také snaha vyvinout syntézy derivátů NK109 (**13**), které jsou vůči redukcí v metabolických drahách rezistentní⁴⁴.

3.1.5 Isodecarin

Velice příbuznou sloučeninou isofagaridinu (**10**) je také isodecarin (**16**), který však na rozdíl od předešlého zástupce neobsahuje *N*-metylovanou skupinu. Tato látka, která byla izolována extrakcí z rostliny *Zanthoxylum intergrifolium* vykazuje *in vitro* cytotoxickou aktivitu proti P-388 nebo HT-29 buněčným liniím⁴⁵. Synteticky lze isodecarin připravit např. dle schématu č. 4 a následně č. 5, kde v první části dochází ke vzniku pinakolesteru 2-(6,7-methylenedioxy-3,4-dihydronaftyl)boronové kyseliny (**15**)².

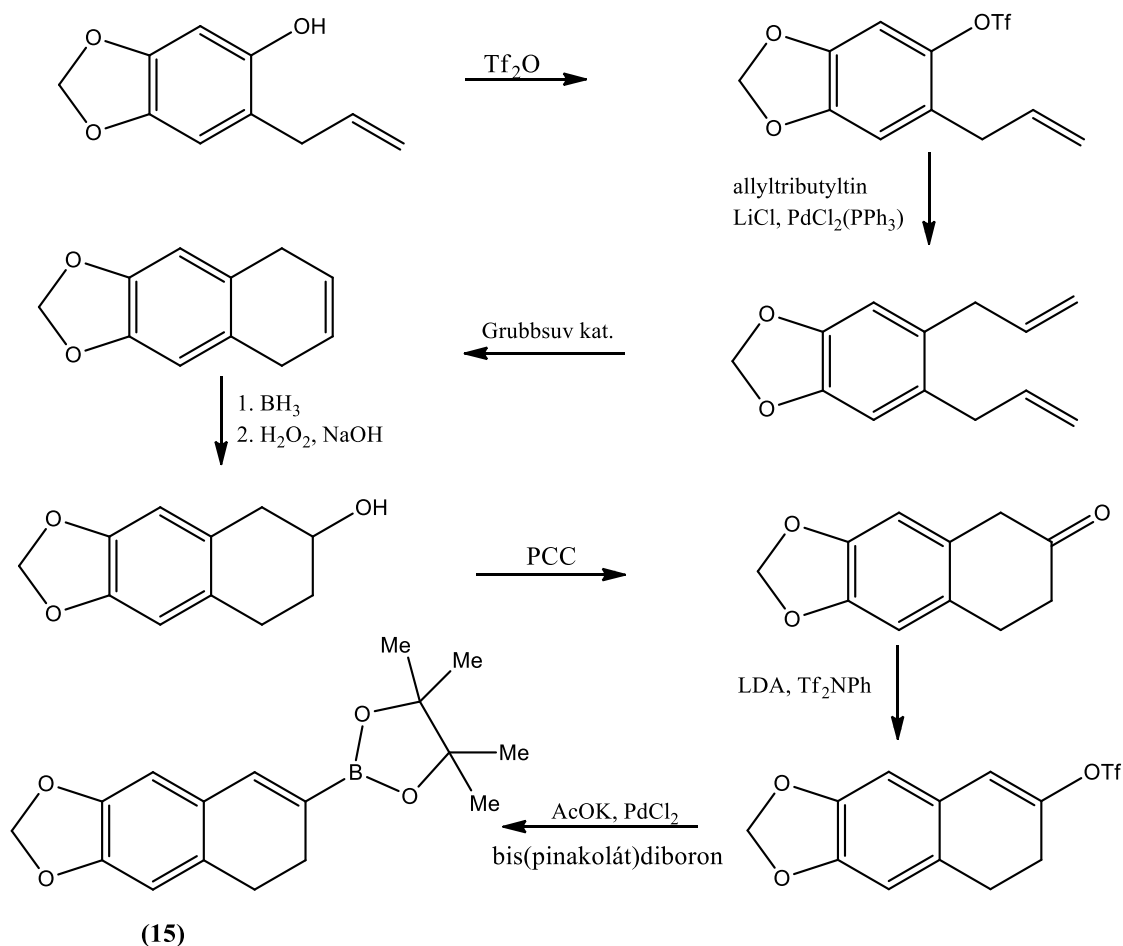


Schéma č. 4

Takto připravený pinakolester kyseliny boronové (**15**) dále reaguje s 2-brombenzaldehydem (**16**) (viz schéma č. 5) až na výsledný isodecarin (**17**).

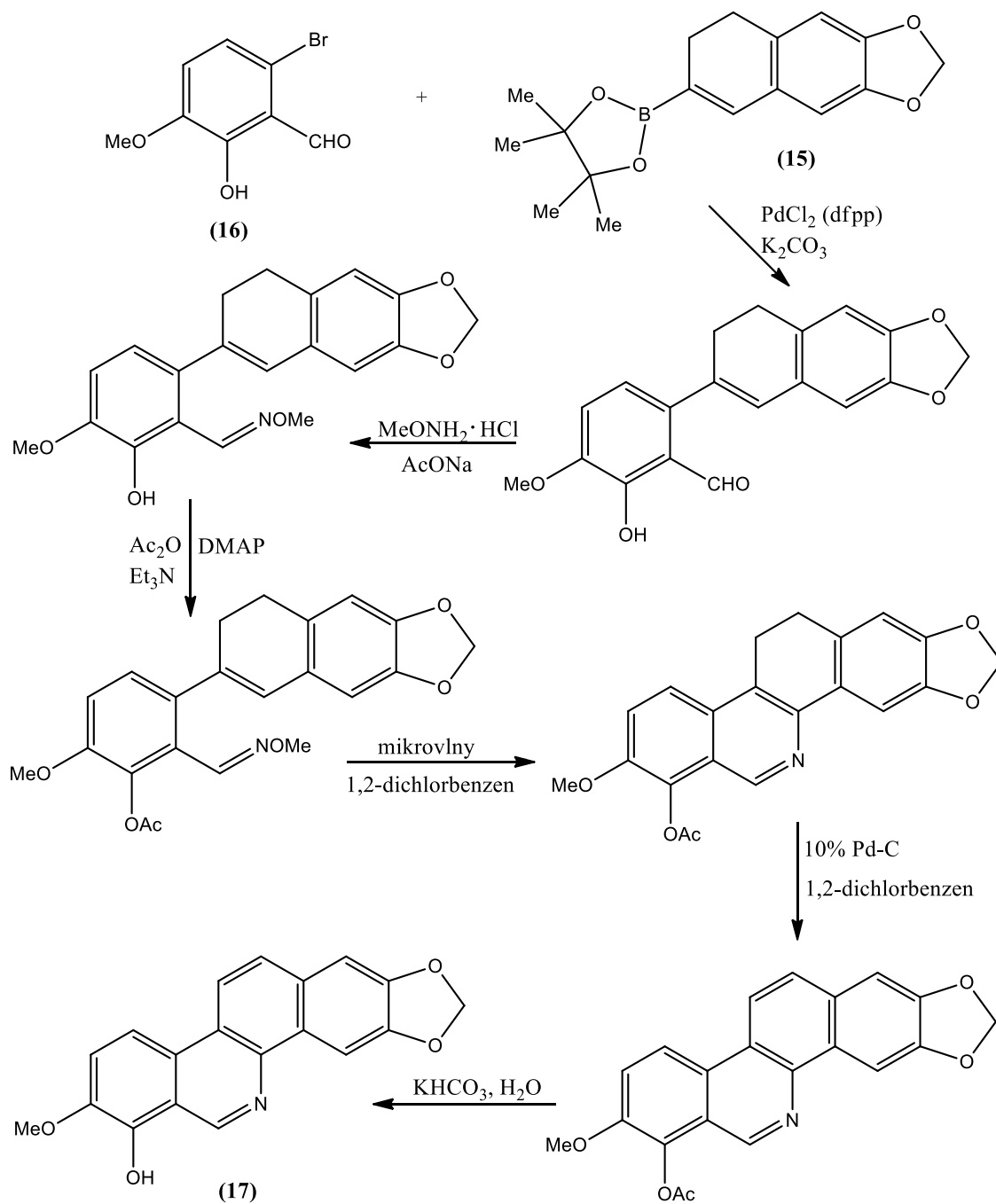


Schéma č. 5

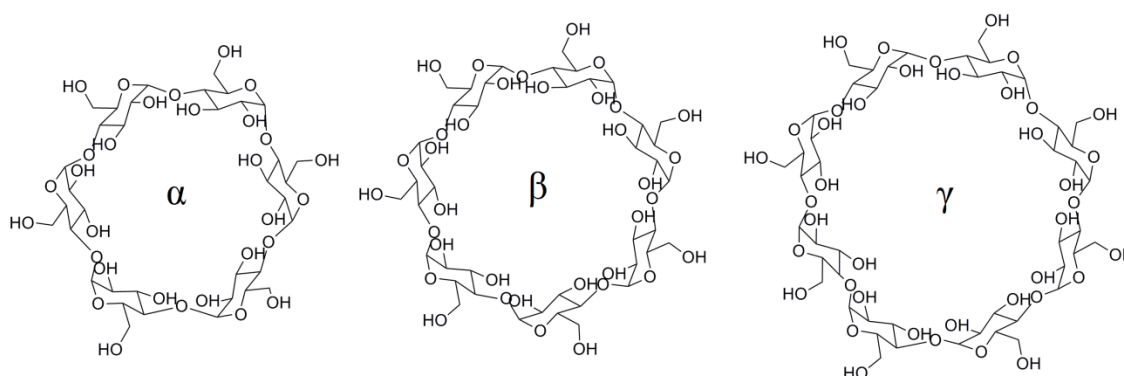
Jsou známy i další syntetické cesty vedoucí k přípravě isodecarinu (17), které jsou publikovány v literatuře³. Jednou z nich je i již popsaná syntéza¹, prováděná v rámci této bakalářské práce, která je blíže rozebrána v kapitole výsledků a diskuze (viz schéma č. 6).

3.2 Cyklodextriny

Vzhledem k tomu, že některé cyklodextriny byly použity jako stěžejní pomocné látky pro zvýšení rozpustnosti isodecarinu, jsou o nich v této kapitole podány stručné informace.

3.2.1 Obecné informace

Cyklodextriny jsou cyklické oligopolymery molekul D-glukosy spojené 1,4- α -glykosidickou vazbou, které v malých množstvích vznikají v přírodě ze škrobu působením enzymů při kvasných a hnilobných procesech⁴⁶. Tato biochemická transformace poskytuje směs cyklických a lineárních oligosacharidů, které obsahují šest až více než sto glukosových jednotek. Za optimalizovaných podmínek jsou nejvíce zastoupeny makrocykly s šesti, sedmi a osmi jednotkami, které jsou označovány α -, β - respektive γ -cyklodextriny (viz obr. č. 1)^{47, 48, 49}.



Obr. č. 1

Tyto tři komerčně dostupné makrocykly se ze směsi izolují selektivní precipitací organickými látkami (např. hexan), se kterými tvoří málo rozpustné inkluzní komplexy. Podrobnější informace o α -, β - a γ -cyklodextrinech jsou shrnuty v tabulce č. 1^{47, 48, 49}.

Uvedené cyklodextriny získávané biotechnologií se označují jako přírodní (nativní), z nich se pak připravují modifikované cyklodextriny, jejichž počet stále narůstá⁴⁶.

| | α -CD | β -CD | γ -CD |
|---------------------------------------------------|--------------|-------------|--------------|
| Počet glukosových jednotek | 6 | 7 | 8 |
| Molekulová hmotnost | 972,9 | 1135,0 | 1297,14 |
| Rozpustnost ve vodě (g/dm ³) při 25°C | 14,5 | 1,9 | 23,2 |
| Vnitřní průměr kavity (Å, mezi H3) | 5,2-5,7 | 6,4-7,8 | 7,5-9,5 |
| Hloubka kavity (Å) | 8,0 | 8,0 | 8,0 |
| Vnitřní objem kavity (Å ³) | 174 | 262 | 472 |
| Parciální molární objem (Å ³) | 611 | 704 | 801 |
| Optická rotace α_D (°) | +150,5 | +162,5 | +177,4 |

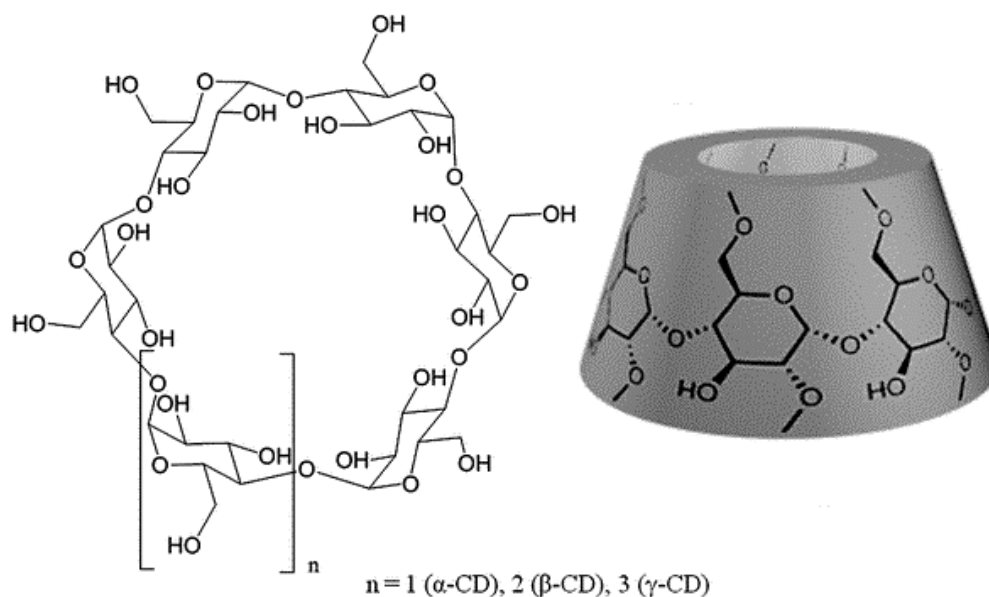
Tabulka č. 1

Cyklodextriny našly široké uplatnění v průmyslu, dnes se jejich produkce vyšplhala až na tisíce tun ročně. Kromě využití v oblasti supramolekulární chemie našly tyto sloučeniny uplatnění v separačních metodách (chirální fáze pro plynovou a kapalinovou chromatografii a kapilární elektroforézu), ve farmaceutickém průmyslu (zvýšení biodostupnosti léčiv), v průmyslu barev a laků (stabilizace barevných pigmentů), v potravinářském průmyslu (stabilizace chuťových a vonných přísad) a v kosmetickém průmyslu (kožní krémy). Dále je zajímavé podotknout, že jsou tyto látky vyráběny z obnovitelných zdrojů (škrob), jejich toxicita je nízká a jsou biologicky degradabilní.

3.2.2 Struktura cyklodextrinů

Struktura cyklodextrinů byla studována v roztoku i pevné fázi. Glukosové jednotky mají v nativních cyklodextrinech ⁴C₁ židličkovou konformaci, pouze v několika případech modifikovaných derivátů byla v krystalu zjištěna inverzní ¹C₄ konformace. Tvarem připomíná makrocycklus α -, β - a γ -cyklodextrinů dutý kornout (viz obr. č. 2), na jehož vnějším širším okraji se nacházejí sekundární hydroxylové skupiny a užší okraj je obklopen primárními hydroxyly. Z tohoto důvodu je vnějšek kavity hydrofilní, zatímco vnitřek má lipofilní charakter. Neutronovou difrakcí bylo zjištěno, že makro-cycklus α -, β - a γ -cyklodextrinů je stabilizován pásem vodíkových vazeb mezi

kyslíky hydroxylových skupin sousedních glukosových jednotek^{47, 48, 49}. Se vzrůstajícím počtem glukosových jednotek v cyklu se vzdálenost těchto hydroxylových skupin zkracuje, pevnost vodíkových vazeb tudíž roste.



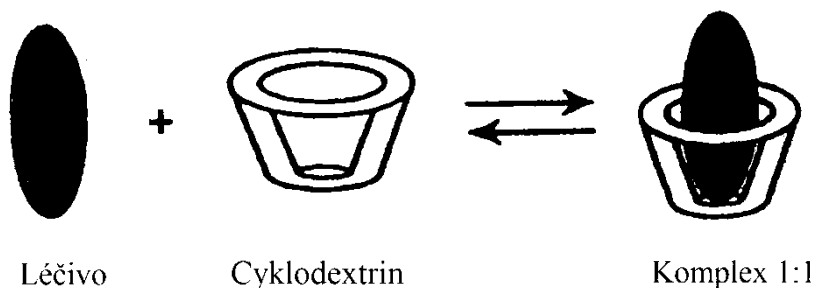
Obr. č. 2.

Se vzrůstajícím počtem glukosových jednotek vzrůstá pnutí makrocyklů, které již (počínaje δ -cyklodextrinem) není dostatečně kompenzováno cyklickým pásem vodíkových vazeb, což vede k distorzi makrocyklů.

3.2.3 Inkluzní komplexy

Cyklodextriny mají na základě struktury a tvaru molekuly schopnost vytvářet s různými sloučeninami inkluzní (uzávěrové) komplexy supramolekulové povahy. Toho se nejčastěji využívá ve farmaceutickém průmyslu za účelem tvorby komplexu léčiva s vhodným cyklodextrinem. Princip inkluze molekuly do cyklodextrinu je takový, že se do jejich centrální dutiny (hostitel) vklíní organická molekula léčiva nebo jeho iont (host) (viz obr. č. 3)⁴⁶. Tento jev probíhá nejčastěji ve vodě nebo ve směsi vody a jiného polárního rozpouštědla, děj však může probíhat i na rozhraní pevné a plynné fáze. Vzhledem k lipofilní povaze dutiny v molekule cyklodextrinu inkluze tvoří lipofilní molekuly těžce rozpustné ve vodě. Léčivo, které do komplexu vstoupí, zůstává

chemicky nezměněné, ale celý komplex je ve vodě podstatně rozpustnější. Na tomto základě lze regulovat rozpustnost lipofilních léčiv ve vodě a získávat z nich tak tuhé, chemicky stabilnější komplexy.



Obr. č. 3.

Stechiometrie komplexů závisí na velikosti kavity a charakteru hosta, přičemž komplexy různých stechiometrií mohou v roztoku koexistovat v rovnováze. Fyzikálně-chemickými metodami byly stanoveny asociační konstanty a termodynamické parametry několika tisíc inkluzních komplexů převážně nativních cyklodextrinů. Asociační konstanty, které charakterizují stabilitu komplexu, jsou pro vybrané látky uvedeny v tabulce č. 2⁴⁸.

| | Asociační konstanta inkluzních komplexů | | | | | |
|--------------------------------------|-----------------------------------------|-------------|--------------|--------------|----------------|-------------|
| | α -CD | β -CD | γ -CD | δ -CD | ϵ -CD | ζ -CD |
| Kyselina benzoová | 16 | 23 | 3 | 3 | 3 | 5 |
| Kyselina 2-methylbenzoová | 13 | 13 | 7 | 6 | 6 | 5 |
| Kyselina 4-methylbenzoová | 36 | 66 | 8 | 2 | 4 | 6 |
| Kyselina 2,4-dimethylbenzoová | 45 | 42 | 8 | 3 | 4 | 5 |
| Kyselina salicylová | 11 | 65 | 13 | 9 | 8 | 8 |
| Kyselina 3-fenylpropanová | 35 | 79 | 7 | 2 | 3 | 5 |

| | | | | | | |
|-----------------------------------------|----|------|----|------|---|----|
| Kyselina 4-terc-butybenzoová | 51 | 457 | 59 | 60 | 4 | 9 |
| Ibuprofen | 55 | 2600 | 59 | 1013 | - | 10 |

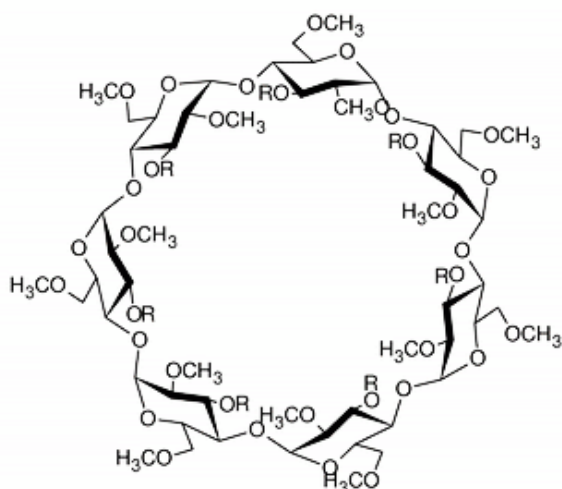
Tabulka č. 2

V technologii léků se převod léčivé látky do komplexu s cyklodextriny využívá z důvodu solubilizace při přípravě kapalných léků a na zvýšení rychlosti rozpouštění léčiva aplikovaného v tuhém a polotuhém agregátním stavu. Cyklodextriny jsou tedy pomocné látky ovlivňující biogalenické vlastnosti léků, protože v perorálních léčích zlepšují vstřebávání málo rozpustných léčivých látek a zkracují čas potřebný k dosažení jejich terapeutických hladin v krvi.

Druhou významnou oblastí využívání komplexů s cyklodextriny je jejich stabilizační účinek. Zlepšují stálost vodných roztoků chemicky labilních léčivých látek, biopolymerů, polypeptidů, bílkovinných frakcí apod⁴⁶.

3.2.4 Modifikované cyklodextriny

Nativní cyklodextriny již našly široké využití v průmyslu, kde hraje důležitou roli cena materiálu. Chemickou modifikací je však možno cíleně měnit fyzikálně-chemické vlastnosti. Velké úsilí bylo vynaloženo na přípravu derivátů, které vykazují lepší rozpustnost ve vodě i v organických rozpouštědlech. Velikost a tvar kavity byly optimalizovány pro inkludovanou molekulu. Byly připraveny deriváty, které mají specifické funkce (např. modely enzymů). Přes značnou obtížnost přípravy modifikovaných derivátů se některé z nich již vyrábějí a používají v průmyslovém měřítku např. permetylované cyklodextriny (např. jako chirální stacionární fáze) (viz obr. č. 4). Regioselektivní modifikace umožnila přípravu metalo-cyklodextrinů s katalytickými funkcemi^{47, 48, 49}.



R = H Dimethyl- β -cyklodextrin
R = CH₃ Trimethyl- β -cyklodextrin

Obr. č. 4

Na rozdíl od jiných makrocyklů (např. kalixarenů), kde může být často modifikace provedena již při přípravě stavebních bloků před vlastní makrocyklizací, při syntéze modifikovaných cyklodextrinů se prakticky vždy vychází z nativního makrocyklu. Vzhledem k velkému počtu reakčních míst je příprava čistých a definovaných derivátů obtížná, nicméně v posledních letech byly vyvinuty metody umožňující přípravu chemicky homogenních derivátů relativně jednoduše. Dosud popsané modifikace se týkají výlučně α -, β - a γ -cyklodextrinů; vyšší nativní homology jsou v preparativních množstvích obtížně dostupné a složitost selektivní modifikace roste s přibývajícím počtem hydroxylových skupin^{47, 48, 49}.

Mezi nejčastější modifikované vyráběné cyklodextriny patří methyl- β -cyklodextrin (M- β -CD) a hydroxypropyl- β -cyklodextrin (HP- β -CD). Dalšími komerčně dostupnými deriváty jsou analogické α -cyklodextriny a γ -cyklodextriny⁴⁶.

4 Výsledky a diskuze

V této části je popsána samotná syntéza isodecarinu a jeho intermediátů. Dále je zde uvedeno, proč a jak bylo prováděno zvyšování rozpustnosti, popř. biodostupnosti připravené látky.

4.1 Příprava isodecarinu

Tato podkapitola se zabývá syntézou 7-hydroxy-8-methoxy-2,3-methylendioxybenzo[*c*]fenanthridinu (isodecarinu) (viz schéma č. 6), jejími intermediáty a problémy vzniklémi během prováděných reakcí, které jsou popsány pod jednotlivými body.

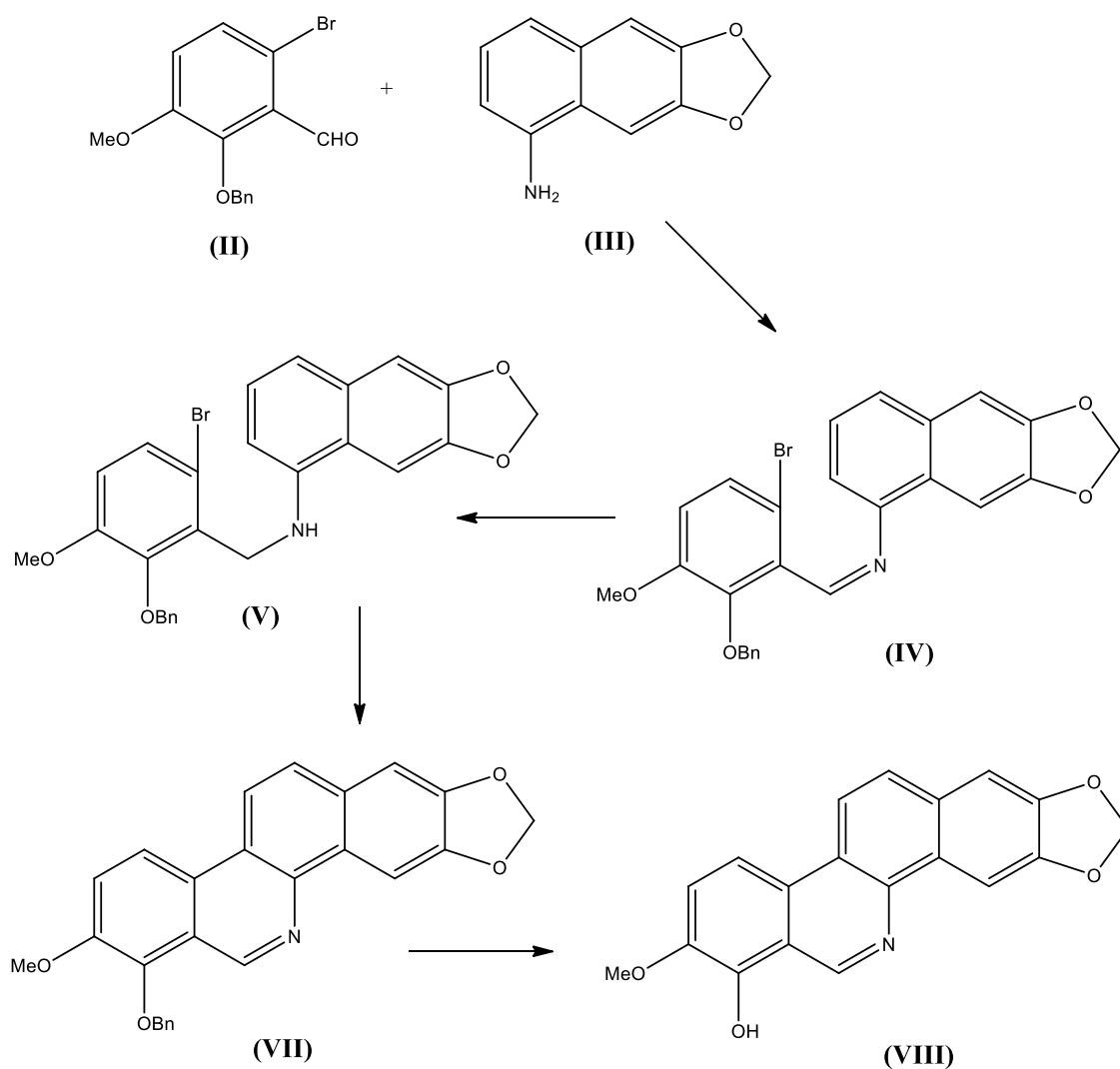


Schéma č. 6

4.1.1 Benzylace 6-bromo-2-hydroxy-3-methoxybenzaldehydu

Mezi první výchozí látku několikastupňové syntézy isodecarinu patří 6-bromo-2-hydroxy-3-methoxybenzaldehyd (**I**). Aby bylo možné s touto látkou dále pracovat, bylo potřeba nabenzilyovat a ochránit tak přítomný hydroxyl, kvůli případné nechtěné oxidaci či jiné vedlejší reakci na této hydroxy skupině (viz schéma č. 7).

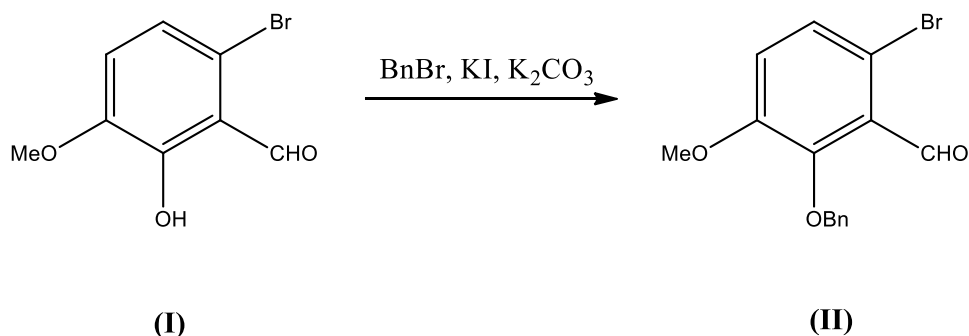


Schéma č. 7

V literatuře¹ byla uvedená benzylace prováděna pomocí BnCl, avšak v tomto případě byl díky lepší reaktivitě zvolen BnBr. Uvedené chemikálie ve schématu byly smíchány v methanolu a následně refluxovány v olejové lázni. Dle literatury¹ měla činit doba refluxu 7 hodin a následně po dalším přidavku K₂CO₃ další 2 hodiny. Při analýze prováděné reakce pomocí LC-MS však bylo zjištěno, že dostatečná doba refluxu potřebná ke kvantitativnímu průběhu reakce je 5 hodin. Z tohoto důvodu byl další přídavek K₂CO₃ také vynechán.

Ve zmíněné literatuře není popsán způsob izolace této látky, a proto byl ve snaze o její vyizolování toluenový roztok po zpracování reakční směsi odpařen na RVO a vzniklá olejovitá kapalina byla následně rozpuštěna v diethyéteru. Do výsledného roztoku byl pak přidáván hexan až do vzniku krystalizačního zákalu. Výsledkem byla světle žlutá krystalická látka (**II**). Měřením na LC-MS byl potvrzen nabenzilyovaný produkt (**II**) (viz příloha č. 1).

4.1.2 Příprava *N*-(6-brom-2-benzyloxy-3-methoxybenzyliden)-6,7-methyldioxy-1-aminonaftalenu

Následujícím krokem k přípravě isodecarinu byla kondenzace 6-bromo-2-benzyloxy-3-methoxybenzaldehydu (**II**) s 6,7-methyldioxy-naftalen-1-aminem (**III**) (viz schéma č. 8). Tato kondenzační reakce je typickým příkladem vzniku iminů neboli Schiffových bází, pro které je charakteristické jejich výrazné zbarvení.

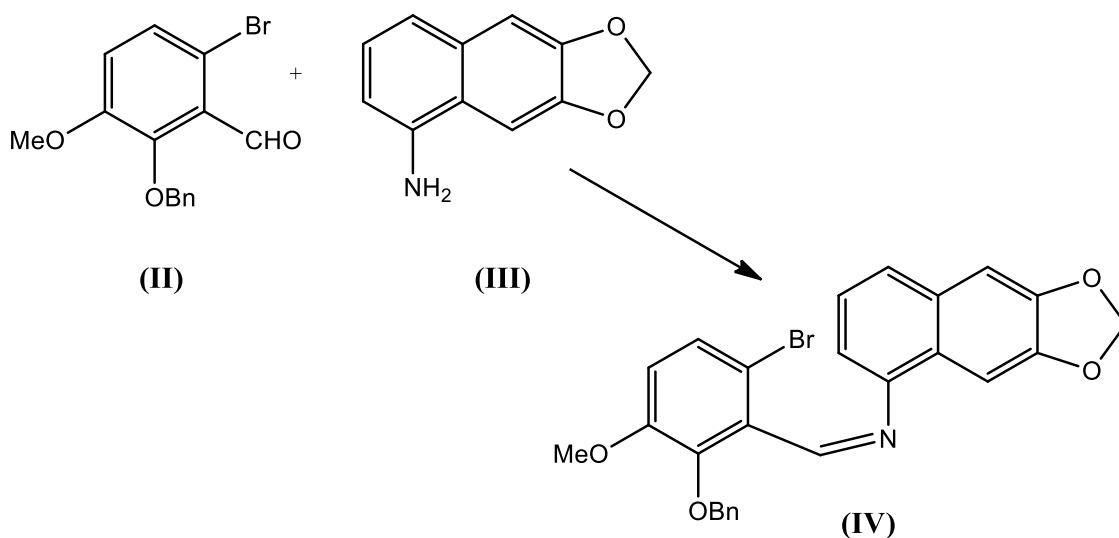


Schéma č. 8

Nabenzylovaný derivát aldehydu (**II**) byl rozpuštěn v ethanolu a do tohoto roztoku byl přidán 6,7-methyldioxy-naftalen-1-amin (**III**). Po 1,5 h refluxu byla baňka ochlazena na laboratorní teplotu. Na rozdíl od literatury¹, kde byl jako rozpouštědlo zvolen toluen, byl v tomto případě použit ethanol, ze kterého látka po ochlazení samovolně kvantitativně krystalizuje a není pak třeba dalšího čištění. Výsledkem kondenzační reakce byly žluté jehlicovité krystaly. Analýza pomocí LC-MS potvrdila produkt (**IV**) (viz příloha č. 3).

4.1.3 Příprava *N*-(6-brom-2-benzyloxy-3-methoxybenzyl)-6,7-methyendioxy-1-aminonaftalenu

Dalším krokem syntézy byla dle literatury¹ redukce výše připravené Schiffovy báze (**IV**) na příslušný amin (**V**) pomocí komplexu Me_2NHBH_3 v kyselém prostředí (viz schéma č. 9).

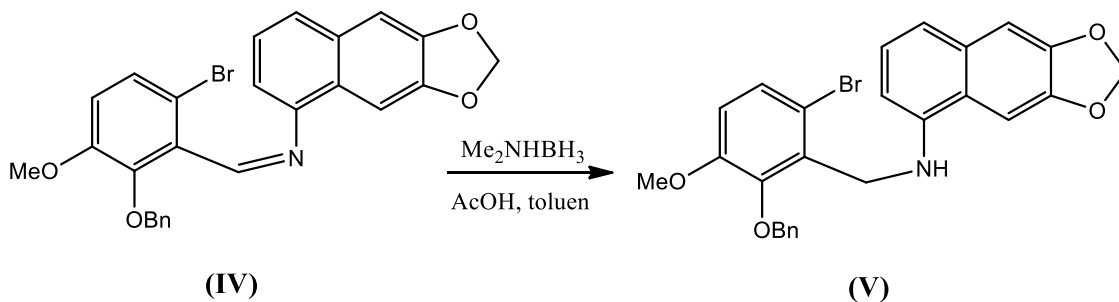


Schéma č. 9

Schiffova báze (**IV**) byla rozpuštěna v toluenu a následně byl přidán Me_2NHBH_3 . Do tohoto roztoku byla pomalu přikapávána kyselina octová, díky níž započala reakce. V literatuře¹ je uvedena reakční doba redukce 1 hodina, avšak díky průběžné analýze pomocí TLC a LC-MS bylo zjištěno, že se po jedné hodině v reakční směsi stále nacházel nezredukovaný imin (**IV**). Ke kvantitativnímu průběhu reakce bylo proto nutné prodloužit reakční čas na 1,5 h; což již byla dostatečná doba.

Poté byla redukce ukončena přidavkem kyseliny chlorovodíkové. Množství HCl muselo být optimální pro ukončení reakce, jelikož při několika pokusech bylo zjištěno, že ve velmi kyselém roztoku dochází k fragmentaci molekuly a k debenzylaci chráněné OH skupiny. Po hodinovém míchání byla provedena neutralizace směsi NaOH . Výsledkem redukce byla světle béžová látka (**V**) analyzována pomocí LC-MS (viz příloha č. 4).

4.1.4 Příprava 7-benzyloxy-8-methoxy-2,3-methyendioxybenzo[*c*]fenanthridinu

Benzo[*c*]fenanthridinový skelet byl připraven dle literatury¹ radikálovou cyklizací použitím Bu_3SnH a AIBN a následnou oxidací vzniklého cyklického aminu (VI) oxidačním činidlem MnO_2 (viz schéma č. 10).

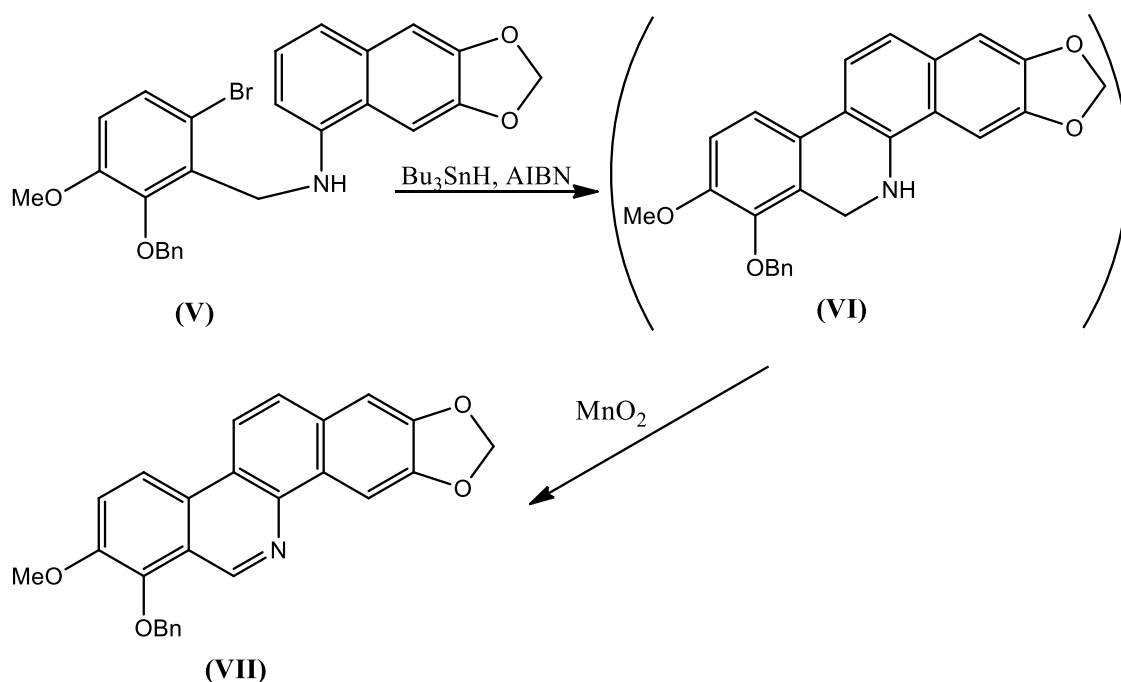


Schéma č. 10

Aparatura pro použití následující reakce byla nejprve vypláchnuta dusíkem, kvůli riziku možného předčasného rozkladu použitého činidla – AIBN vzduchem.

K roztoku aminu (V) v toluenu byl nejprve přidán Bu_3SnH a poté roztok AIBN. Mechanismus cyklizace probíhal radikálovým způsobem, kdy účinkem vzniklých radikálů z rozloženého AIBN iniciovalo rozpad molekul Bu_3SnH za současné tvorby vodíkových radikálů. Takto vzniklý radikál byl pak schopen atakovat amin (V) a umožnit tak uzavření cyklu. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC a LC-MS.

Při prvotní cyklizaci v menším měřítku (0,5 g látky V) byl reakční čas pro kvantitativní konverzi látky (V) 1,5 h. Při následné cyklizaci ve větším množství (6,5 g látky V) však nestačilo ani 5 h. Analýza TLC i LC-MS prokázala přítomnost asi 50% nezcyklizovaného aminu (V), které se již s dalším časem neměnilo ani po přidání dalšího ekvivalentu AIBN a Bu_3SnH . Proto byla reakce ukončena a reakční směs

obsahující látku (**V**) a (**VI**) byla zoxidována pomocí MnO_2 , kdy v reakční směsi zůstala látka (**V**) a nově vznikla látka (**VII**). Dalším úkolem bylo zjistit, proč reakce ve větším měřítku probíhala popsáním způsobem, když cyklizace v menším měřítku proběhla kvantitativně. Jelikož byla veškerá výchozí látka (**V**) spotřebována, muselo se dále pracovat se směsí obsahující zacyklený imin (**VII**) a nezcyklizovaný amin (**V**), který byl ve směsi přítomen z 45%.

Jelikož mají látky (**V**) a (**VII**) rozdílnou polaritu ($\Delta R_f = 0,3$), byla pro jejich oddělení použita kolonová chromatografie. Jako mobilní fáze byl na základě TLC zvolen chloroform. Při prvotních jímáních frakcí byla registrována látka, která při srovnání se standardy odpovídala aminu (**V**). Poté následovalo velké množství frakcí, ve kterém nebyla obsažena žádná identifikovatelná látka (analýza pomocí TLC). Látka (**VII**) se velice silně sorbovala na stacionární fázi, kterou byl silikagel. Spotřeba zvolené MF činila 8 litrů, přičemž se požadovaná látka neustále eluovala ve velice malé koncentraci. K vyeluování látky z kolony byla použita mobilní fáze chloroform/methanol v poměru 40:5. Výsledkem byla béžovohnědá pevná látka o 100% čistotě a o hmotnosti 0,619 g, přičemž původní množství použité směsi činilo 2 g.

Z důvodu velikosti kolony byla pro tuto dělicí metodu použita pouze třetina připraveného aminu (**V**). Protože byla spotřeba rozpouštědla moc vysoká a separace byla problematická a ztrátová, hledalo se náhradní řešení, které by tento problém vyřešilo.

Jediná změna proti syntéze látky (**VI**) v menším množství byl použitý Bu_3SnH . Jelikož byla nová lahvička se zmíněným činidlem spotřebována, při reakci v menším měřítku byla pro druhou syntézu použita část Bu_3SnH jiné šarže staršího roku. Z obavy o špatnou kvalitu použitého Bu_3SnH byla tato látka získána nová a zbytek reakční směsi byl podroben další cyklizaci. Při průběžné analýze bylo zjištěno, že cyklizace probíhá kvantitativně. Problém byl tedy v použitém Bu_3SnH .

Dalším krokem ve výše uvedeném schématu č. 10 je oxidace za vzniku látky (**VII**). Reakční směs s cyklizovaným aminem (**VI**) byla ochlazená na laboratorní teplotu a byl přidán MnO_2 . Dle literárního zdroje¹ je uváděn reakční čas 1 h. Při monitorování oxidace pomocí TLC (oxidovaný produkt (**VII**) fluoreskoval při 366 nm, nezoxidovaný (**VI**) nikoliv) však bylo zjištěno, že i po 4 hodinách se v reakční směsi stále nachází nezoxidovaný amin (**VI**). Z tohoto důvodu byla doba oxidace prodloužena na 20 h. Následná analýza LC-MS prokázala kvantitativní průběh reakce za vzniku produktu (**VII**) (viz příloha č. 5).

4.1.5 Příprava 7-hydroxy-8-methoxy-2,3-methylenedioxybenzo[*c*]fenanthridinu (isodecarin)

Následující reakce zahrnuje odstranění chránicí skupiny, kterou je v tomto případě benzyl. Debenzylaci lze provést několika různými způsoby. U této reakce byla zvolena deproteckce pomocí vodíku za přítomnosti katalyzátoru (10% Pd/C), která je popsána v literatuře⁴⁵.

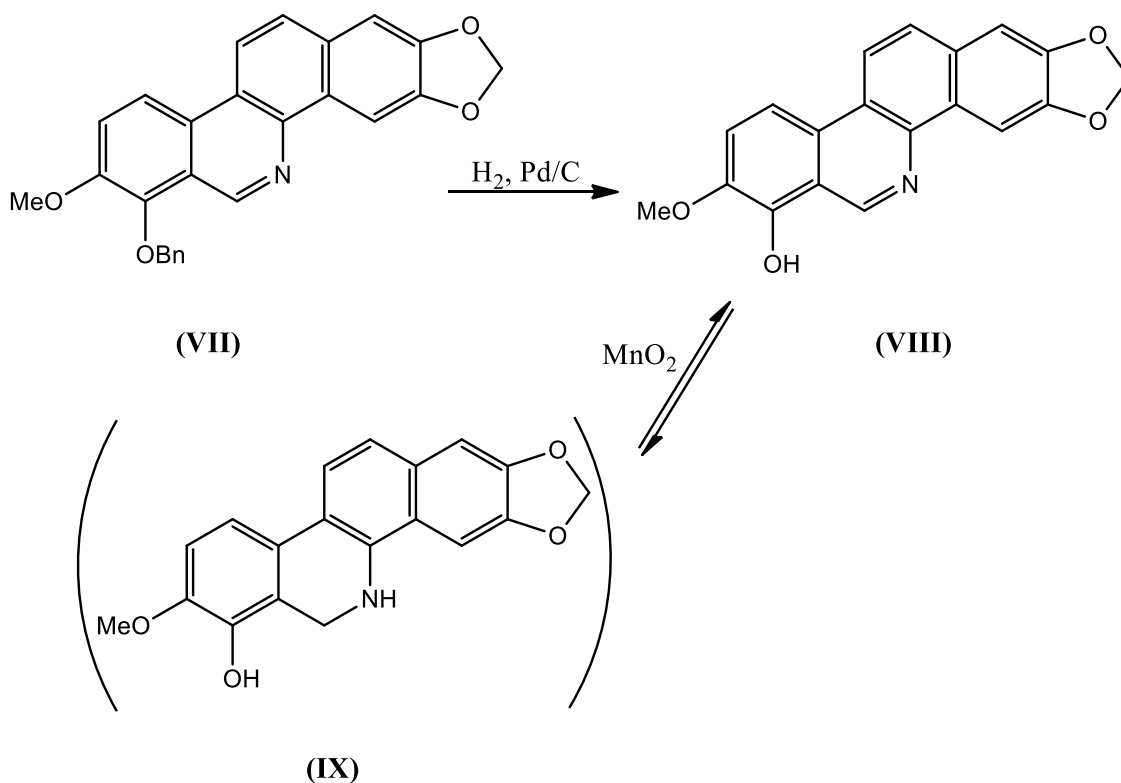


Schéma č. 11

7-Benzyloxy-8-methoxy-2,3-methylenedioxybenzo[*c*]fenanthridin (VII) byl rozpuštěn v THF. Hydrogenolýza této látky byla provedena za mírného přetlaku vodíkem vytvořeným nafukovacím balonkem. Po 4 h byla provedena analýza na LC-MS, která prokazovala ještě obsah určitého množství výchozí látky (VII), proto byla reakční doba prodloužena na 16 h. Při další analýze LC-MS se na chromatogramu objevil kromě požadované látky - isodecarinu (VIII) další pík, který měl molekulovou hmotnost v kladném modu o dvě jednotky vyšší než požadovaný produkt ($[M + H]^+ = 322$), který tuto směs tvořil z 27% (viz příloha č. 6a). Toto nečekané

zjištění ukazovalo na možnou vedlejší reakci vodíku, která probíhala na dvojné vazbě mezi atomy C=N za vzniku 5,6-dihydroisodecarinu (**IX**) (viz schéma č. 11). Tuto strukturu bylo možné i do určité míry dotvrdit z ^1H NMR spektra hydrogenační směsi (viz příloha č. 6b). Vzorek debenzylované směsi byl proto podroben dalším experimentům ve snaze zoxidovat vznikající jednoduchou vazbu a zvýšit tak výtěžek a čistotu isodecarinu. Z reakční směsi látek (**VIII a IX**) byly odebrány vzorky, do kterých byla jednotlivě přidána různá oxidační činidla (MnO_2 , H_2O_2 a směs $\text{MnO}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$). Po 24 hodinovém míchání a následné analýze pomocí TLC bylo zjištěno, že neoptimalnější oxidační činidlo je samotný MnO_2 . Proto byla většinová část debenzylované směsi dooxidována přidavkem zmíněného oxidantu. Další analýzy potvrdily probíhající reakci za tvorby dvojné vazby a tak byl získán produkt, který již 5,6-dihydroisodecarin (**IX**) neobsahoval. Následnou rekrystalizací ze směsi THF-EtOH byl získán isodecarin (**VIII**) (viz příloha č. 7).

4.2 Studium struktury v závislosti na pH - příprava isodecarinu hydrochloridu

Vzhledem k vlastnostem připraveného isodecarinu (**VIII**), které zahrnují mimo jiné i potenciální kancerostatickou aktivitu, byla snaha vyvinout formu této látky o dobré biologické dostupnosti. Jelikož se samotný isodecarin (**VIII**) ve vodě nerozpouští a je také velice špatně rozpustný v běžných rozpouštědlech, bylo dalším úkolem rozpustnost zvýšit. Proto byla provedena reakce (viz schéma č. 12) za účelem tvorby soli, které jsou, jak je známo, ve vodě rozpustnější.

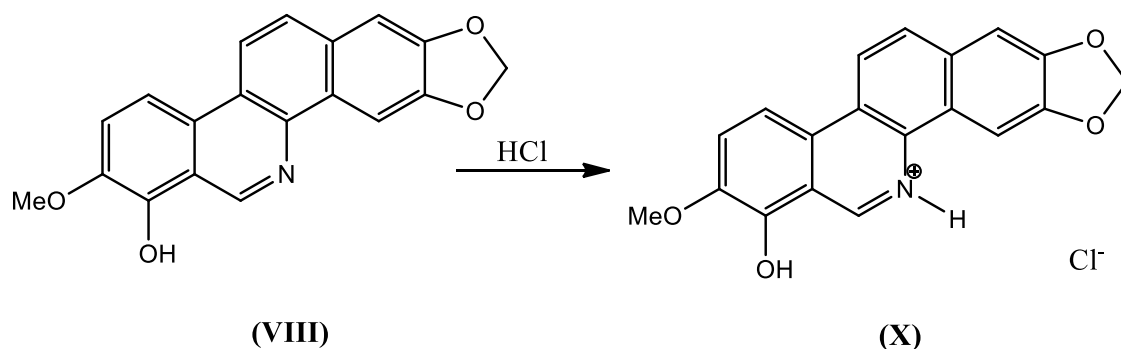


Schéma č. 12

Pro tvorbu hydrochloridu byl isodecarin (**VIII**) rozpuštěn v THF a do tohoto roztoku byl přidán chlorovodík v methanolu. Okamžitě se začala vysražovat oranžová pevná látka. Jelikož byl předpokládán vznik soli, byla následně provedena zkouška rozpustnosti ve vodě. Látka (**X**) se ve vodě překvapivě nerozpustila a poté ani po přidavku 37% HCl. Bylo nutno ověřit, zda skutečně vznikl hydrochlorid, popřípadě jestli došlo k nějaké další změně ve struktuře isodecarinu.

Analýza produktu byla provedena nejprve prostřednictvím LC-MS, která ale nevedla k jednoznačnému závěru, jelikož připravená látka (**X**) měla stejný retenční čas i molekulovou hmotnost jako sloučenina (**VIII**). Proto byla provedena analýza pomocí NMR (viz příloha č. 8). Vzhledem k velice nízké rozpustnosti látky (**X**) není však NMR spektrum zřetelně jasné i přesto, že měření bylo prováděno několikrát a byla vyzkoušena různá rozpouštědla. Ve spektru je však patrná přítomnost kyselého vodíku vyskytující se na atomu dusíku, která se projevuje širším signálem připomínající bouli. Tento tvar je způsoben pravděpodobně výměnnou reakcí tohoto protonu s vodou, která se ve spektru rovněž projevila širokým signálem. Aby byla struktura isodecarinu hydrochloridu (**X**) jasně potvrzena, byla provedena elementární analýza. Experimentálně zjištěné hodnoty a spočítané zastoupení prvků je zaneseno do tabulky č. 3.

| Stanovovaný prvek | Zastoupení prvku experimentálně [%] | Zastoupení prvku početně [%] | Odchylka [%] |
|-------------------|-------------------------------------|------------------------------|--------------|
| C | 63,88 | 64,14 | 0,26 |
| H | 4,30 | 3,97 | 0,33 |
| N | 3,76 | 3,94 | 0,18 |
| O | - | 17,99 | - |
| Cl | - | 9,96 | - |

Tabulka č. 3

Hodnoty elementární analýzy isodecarinu hydrochloridu (X)

Odchylka u stanovení touto metodou je tolerovatelná do $\pm 0,4\%$, což odpovídá hodnotám uvedeným v tabulce č. 3. Výsledky lze proto brát jako relevantní a je z nich patrné, že hodnoty odpovídají struktuře látky (**X**).

4.3 Studium inkorporace isodecarinu do cyklodextrinů

Vzhledem k zjištěnému faktu, že je výše připravený isodecarin hydrochlorid (**X**) ve vodě nerozpustný a nestabilní a pravděpodobně se ve vodném prostředí přeměňuje na isodecarin (**VIII**), bylo dalším řešením zvýšení jeho rozpustnosti a tím i možné biodostupnosti inkorporace do cyklodextrinů.

Jak již bylo popsáno v teoretické části, existuje řada typů cyklodextrinů, které mohou být i různě substituovány. Z důvodu pravděpodobné tvorby vodíkových můstků mezi volnými hydroxylovými skupinami molekul cyklodextrinů, byly účelně zvoleny dva typy derivátů, které měly tento děj potlačit. Jedním z těchto derivátů je methyl- β -cyklodextrin (M- β -CD) a druhým 2-hydroxypropyl- β -cyklodextrin (2-HP- β -CD), velice často používané cyklodextriny, jejichž základní parametry jsou:

- a) M- β -CD: průměrná mol. hmotnost = 1190; stupeň substituce = 0,57
- b) 2-HP- β -CD: průměrná mol. hmotnost = 1400, stupeň substituce = 0,58-0,73

Jako rozpouštědlo pro tvorbu roztoků cyklodextrinů byl použit vodný roztok octanu amonného o pH 7. Postupovalo se následovně: do připravených roztoků bylo vždy přidáno stejné množství isodecarinu (**VIII**), které bylo pomocí ultrazvukového homogenizátoru mikronizováno v roztoku octanu amonného. Podmínkou bylo, aby byl isodecarin (**VIII**) vždy nerozpuštěný, což bylo potvrzeno analýzou srovnávací suspenze, která obsahovala 1 ml mikronizovaného isodecarinu a 4 ml roztoku octanu amonného.

Po analýze srovnávací suspenze bylo provedeno vlastní měření suspenzí, do kterých bylo přidáno množství cyklodextrinů o zvyšující se koncentraci. Analýza pomocí LC-MS byla provedena po 16 hodinovém míchání a následně po 6 dnech, aby se zjistilo, zda inkorporace probíhá, případně jestli se inkludované množství isodecarinu (**VIII**) zvyšuje s časem.

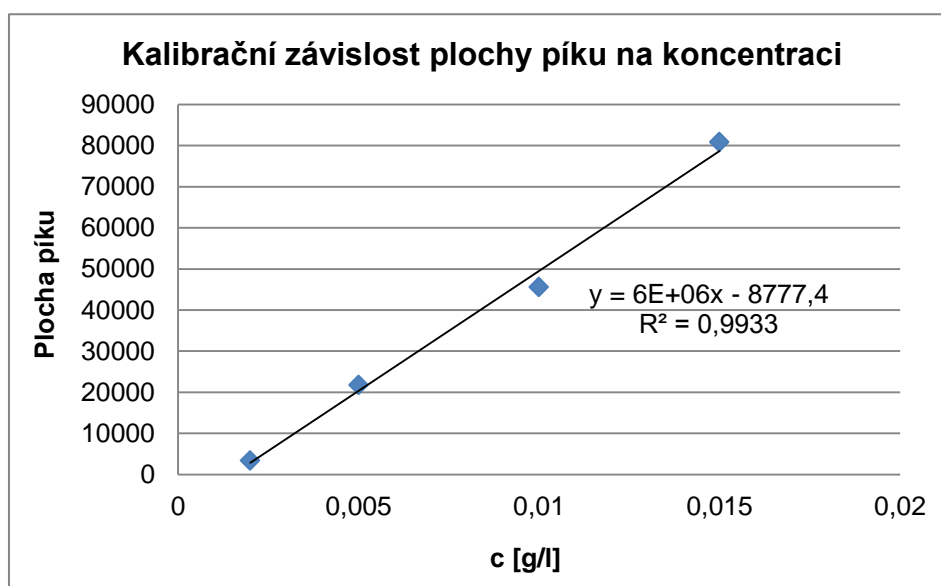
Z prováděné analýzy pomocí LC-MS vyplynulo, že připravený isodecarin je schopen se do cyklodextrinové struktury navázat. Bylo zjištěno, že množství isodecarinu v cyklodextrinech záleží na jejich koncentraci struktury a s časem se dále nezvyšuje. Z výsledků je patrné, že vhodnějším typem cyklodextrinů jsou 2-hydroxypropyl- β -cyklodextriny (viz tabulka č. 7 a graf č. 3), protože jsou schopny navázat větší množství sledované látky (**VIII**). U methyl- β -cyklodextrinů byla také

pozorována zvyšující se tendence stejně jako u 2-HP- β -CD, avšak nebylo dosahováno tak vysokých hodnot. Při nejnižší koncentraci M- β -CD nebylo kvůli malé mezi detekce přístroje množství isodecarinu zaznamenáno (viz tabulka č. 6 a graf č. 2). Závěrem tohoto experimentu je také fakt, že se zvyšující se koncentrací cyklodextrinů se zvyšuje i množství inkludované látky (VIII) (viz graf č. 2 a č. 3). Z připravené kalibrační závislosti plochy píku na koncentraci isodecarinu (viz tabulka č. 5 a graf č. 1) bylo poté pomocí výsledné regresní rovnice vypočteno množství inkludovaného isodecarinu v cyklodextrinech (viz tabulka č. 6 a č. 7).

| c [g/l] (isodecarin) | Plocha píku (isodecarin) |
|-------------------------|-----------------------------|
| 0,0020 | 3368 |
| 0,0050 | 21764 |
| 0,0100 | 45563 |
| 0,0150 | 80864 |

Tabulka č. 5

Tabulka hodnot koncentrace a plochy píku isodecarinu pro kalibrační závislost



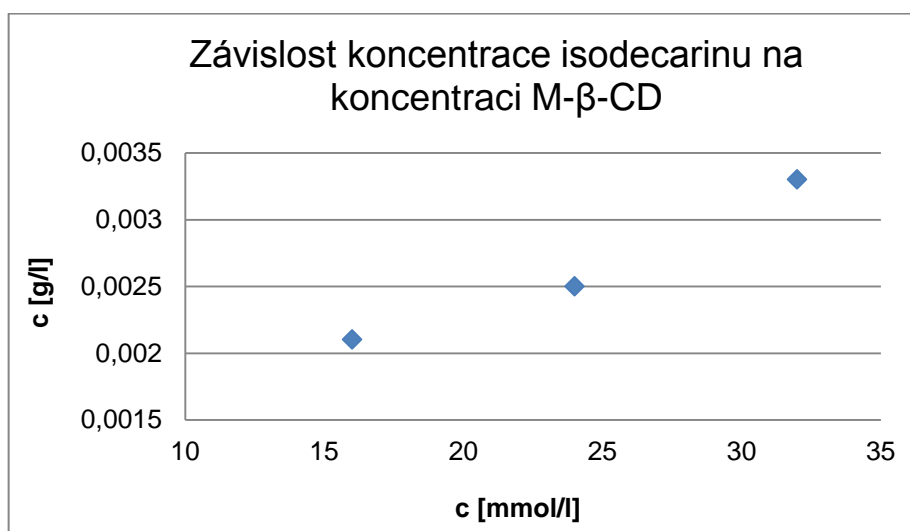
Graf č. 1

Graf kalibrační závislosti plochy píku na koncentraci isodecarinu

| c [mmol/l] (M-β-CD) | Plocha píku (isodecarin) | c _m [g/l] (isodecarin) |
|------------------------|-----------------------------|--------------------------------------|
| 8 | - | - |
| 16 | 3552 | 0,0021 |
| 24 | 5895 | 0,0025 |
| 32 | 11019 | 0,0033 |

Tabulka č. 6

Tabulka hodnot koncentrace M-β-CD, plochy píku a koncentrace isodecarinu



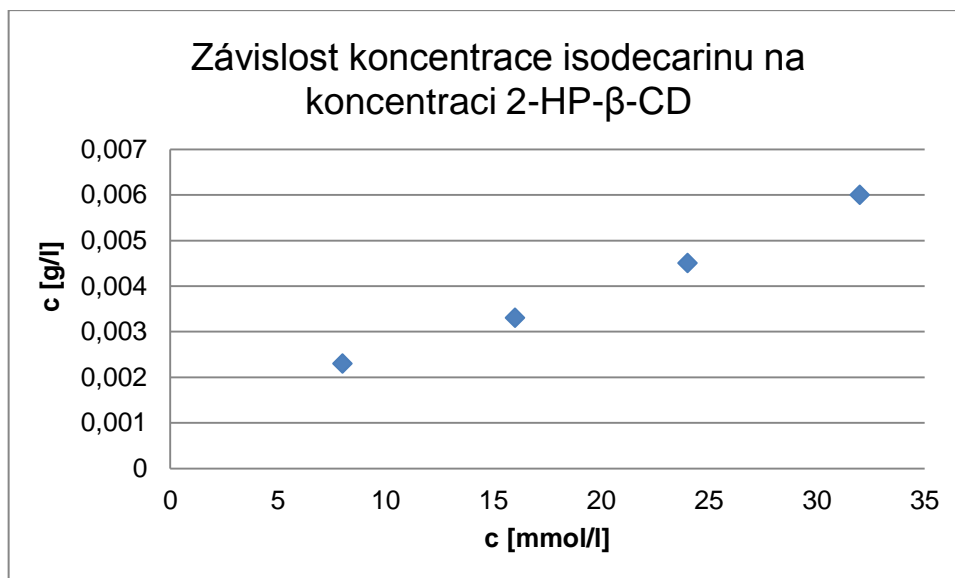
Graf č. 2

Graf závislosti koncentrace isodecarinu na zvyšující se koncentraci M-β-CD

| c [mmol/l] (2-HP-β-CD) | Plocha píku (isodecarin) | c _m [g/l] (isodecarin) |
|---------------------------|-----------------------------|--------------------------------------|
| 8 | 4990,283 | 0,0023 |
| 16 | 10691,47 | 0,0033 |
| 24 | 18016,87 | 0,0045 |
| 32 | 27197,5 | 0,0060 |

Tabulka č. 7

Tabulka hodnot koncentrace 2-HP-β-CD, plochy píku a koncentrace isodecarinu



Graf č. 3

Graf závislosti koncentrace isodecarinu na zvyšující se koncentraci 2-HP- β -CD

5 Experimentální část

Měření NMR spekter bylo provedeno v roztoku DMSO – d_6 (popř. CDCl_3) na spektrometru NMR JEOL 400 MHz (ECA400-II). Chemické posuny jsou uvedeny v ppm a jsou odvozeny od vnitřního standardu TMS.

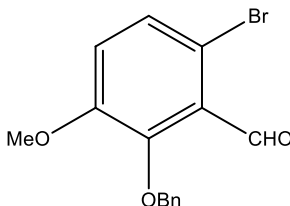
Měření hmotnostních spekter byla realizována měřením na přístroji TSQ Quantum ACCES (Thermo Scientific, USA).

CHN elementární analýza byla provedena na přístroji EA 1108 Elementar Analyser (Fisons Instrument).

IR spektra byla získána měřením a vyhodnocením na přístroji ATI Unicam Genesis FTIR, kde byla využita tabletová technika a jako standard byl použit KBr.

Mikronizace isodecarinu byla provedena pomocí přístroje UH Sonopuls Bandelin GM 3200.

2-Benzyloxy-6-bromo-3-methoxybenzaldehyd (II)



Do směsi 6-bromo-2-hydroxy-3-methoxybenzaldehydu (**I**) (4 g; 17,3 mmol), KI (2,88 g; 17,5 mmol) a bezvodého K_2CO_3 (5,98 g; 43,3 mmol) v methanolu (263 ml) byl přidán benzylbromid (10,36 g; 60,6 mol). Po 5 hodinách refluxu byla baňka s reakční směsí ochlazena na laboratorní teplotu. Po odpaření methanolu na vakuové odparce byla vzniklá kašovitá směs extrahována ve směsi toluenu a vody. Organická vrstva byla promyta vodou a následně vysušena MgSO_4 . Následně byl na vakuové odparce odpařen toluen. Na dně baňky zůstala žlutá olejovitá kapalina, která byla rozpuštěna v diethylétheru (20 ml). Po přidavku nadbytku hexanu byla směs ponechána krystalizaci v lednici. Vzniklé krystalky byly zfiltrvány, vysušeny a následně analyzovány pomocí LC-MS (viz příloha č. 1).

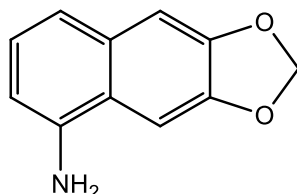
$\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{BrO}_3$ ($M = 320,00 \text{ g/mol}$)

Výtěžnost: 4,23 g (76%)

Čistota: 97% (HPLC)

MS (APCI, m/z) = 321 a 323 $[M+H]^+$

6,7-Methyldioxy-naftalen-1-amin (III)



Do roztoku 6,7-methyldioxy-1-nitronaftalenu (3,39 g; 0,0156 mol) v THF (68 ml) bylo přidáno Pd/C (211 mg; 10%). Takto připravená směs byla uzavřena v autoklávu, který byl promyt dusíkem a následně natlakován vodíkem na 7 bar. Po 40 minutách klesl tlak na hodnotu 3 bar, poté byl vodík doplněn dotlakováním autoklávu na 6 bar. Hydrogenace probíhala přes noc přibližně 20 h a tlak kles do druhého dne ještě o 0,5 bar. Katalyzátor byl zfiltrován a čirý nahnědlý roztok byl odpařen na odparce. Výsledkem byl nahnědlý prášek analyzován na LC-MS (viz příloha č. 2).

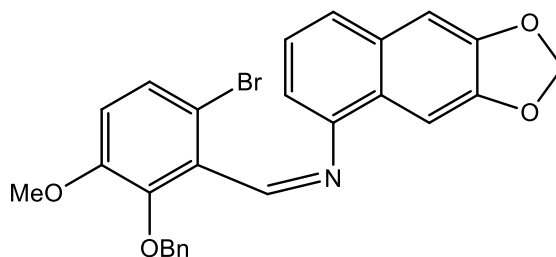
$C_{11}H_9NO_2$ ($M = 187,19$ g/mol)

Výtěžnost: 86 % (2,52 g)

Čistota: 99% (HPLC)

MS (APCI, m/z) = 188 $[M+H]^+$

N-(6-brom-2-benzyloxy-3-methoxybenzyliden)-6,7-methyldioxy-1-aminonaftalen (IV)



Do teplého roztoku 6,7-methyldioxy-naftalen-1-aminu (III) (2,2 g; 11,77 mmol) v ethanolu (87 ml) byl přidán roztok 2-benzyloxy-6-bromo-3-

methoxybenzaldehydu (**II**) (3,82 g; 11,9 mmol) v ethanolu (31 ml). Vzniklá směs byla za stálého míchání 1h refluxována. Po ochlazení na laboratorní teplotu se začaly vylučovat žluté hvězdicovité krystalky. Po kvantitativním vyloučení krystalů byla látka zfiltrována, promyta ethanolem a analyzována pomocí LC-MS (viz příloha č. 3).

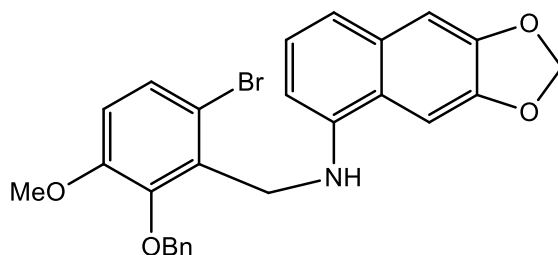
C₂₆H₂₀BrNO₄ (M = 490,35 g/mol)

Výtěžnost: 92 % (5,3 g)

Čistota: 96% (HPLC)

MS (APCI, *m/z*) = 490 a 492 [M+H]⁺

***N*-(6-brom-2-benzyloxy-3-methoxybenzyl)-6,7-methyendioxy-1-aminonaftalen (**V**)**



Schiffova báze (**IV**) (6,5 g; 13 mmol) byla rozpuštěna v toluenu (128 ml) a do vzniklého roztoku byl přidán dimethylaminoboran (0,595 g; 0,01 mol). Do této směsi byla pomalu přidána ledová kyselina octová (8,6 ml) a výsledný roztok se nechal hodinu míchat. Poté co proběhla redukce, byla reakce ukončena přidavkem 1 M HCl (64 ml). Po dalším hodinovém míchání byla směs neutralizována 5 M NaOH a organická vrstva byla oddělena. Vodná vrstva byla extrahována toluenem, organické vrstvy byly smíchány a následně vysušeny MgSO₄. Rozpouštědlo bylo odstraněno na vakuové odparce. Výsledný bílý aminonaftalen (**V**) byl analyzován na LC-MS (viz příloha č. 4).

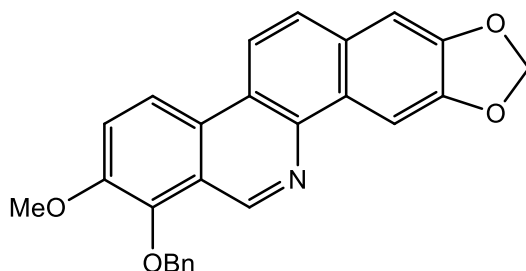
C₂₆H₂₂BrNO₄ (M = 492,36 g/mol)

Výtěžnost: 83 % (5,4 g)

Čistota: 95% (HPLC)

MS (APCI, *m/z*) = 492 a 494 [M+H]⁺

7-Benzyloxy-8-methoxy-2,3-methylenedioxybenzo[*c*]fenanthridin (VII)



Roztok *N*-(6-brom-2-benzyloxy-3-methoxybenzyl)-6,7-methylenedioxy-1-aminonaftalenu (**V**) (0,5 g; 1,016 mmol) a Bu₃SnH (0,934 g; 3,2 mmol) v toluenu (50 ml) byl vytemperován na teplotu 80°C. Do této směsi byl přidán roztok AIBN (0,293 g; 1,78 mmol) v toluenu (0,5 ml) a směs byla zahřáta na 110°C. Po 90 minutách refluxu byla reakční směs ochlazena na laboratorní teplotu, do níž byl přidán MnO₂ (0,902 g; 10,37 mmol) a směs byla dále míchána po dobu 1 h. Výsledný roztok byl zfiltrován pomocí celitu a rozpouštědlo bylo odpařeno na odparce. Vzniklý nabenzylovaný isodecarin (**VII**) byl suspendován v methanolu, odsát a analyzován na LC-MS (viz příloha č. 5).

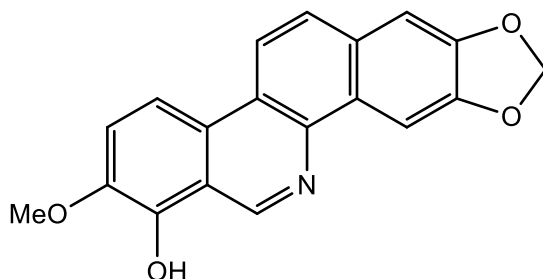
C₂₆H₁₉NO₄ (M = 409,43 g/mol)

Výtěžnost: 63 % (0,26 g)

Čistota: 100% (HPLC)

MS (APCI, *m/z*) = 410 [M+H]⁺

7-Hydroxy-8-methoxy-2,3-methylenedioxybenzo[*c*]fenanthridin (VIII)



7-Benzyloxy-8-methoxy-2,3-methylenedioxybenzo[*c*]fenanthridinu (**VII**) (1,2 g; 2,93 mmol) byl rozpuštěn v THF (130 ml), smíchan s Pd/C (429 mg; 10%) a uzavřen v Erlenmayerové baňce. Do této baňky byl přiveden vodík pomocí nafukovacího

balonku. Takto připravená směs se nechala míchat 16 h. Poté byl katalyzátor zfiltrován a produkt byl analyzován na LC-MS. Do vzniklé směsi isodecarinu (**VIII**) a 5,6-dihydroisodecarinu (**IX**) byl přidán MnO₂ (0,42 g; 4,83 mmol) a směs byla míchána 20 h. MnO₂ byl poté zfiltrován a vzniklý čirý roztok byl odpařen na vakuové odparce do sucha. Výsledkem byl isodecarin (**VIII**) v podobě žlutého prášku. Získaný isodecarin byl poté rekrystalizován suspendováním ze směsi horkého ethanolu (96 ml) a THF (24 ml) a následně analyzován pomocí LC-MS a NMR (viz příloha č. 7).

C₁₉H₁₃NO₄ (M = 319,31 g/mol)

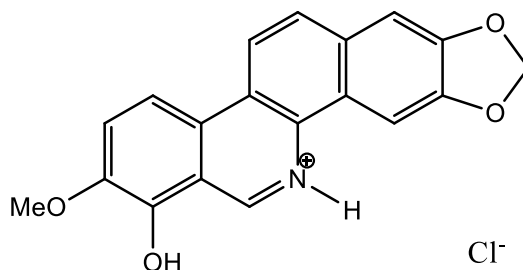
Výtěžnost: 71 % (0,66 g)

Čistota: 97% (HPLC)

MS (APCI, *m/z*) = 320 [M+H]⁺

¹H-NMR (DMSO – *d*₆): δ 3,99 (s, 3H); 6,21 (s, 2H); 7,51 (s, 1H); 7,73 (d, 1H, Ar); 7,95 (d, 1H, Ar); 8,27 (d, 1H, Ar); 8,54 (d, 1H, Ar); 8,54 (s, 1H); 9,66 (s, 1H); 10,00 (s, 1H)

7-Hydroxy-8-methoxy-2,3-methylenedioxybenzo[*c*]fenanthridinium chlorid (X**)**



Do roztoku isodecarinu (**VIII**) (200 mg; 0,63 mmol) v THF (5 ml) byl přidán chlorovodík v methanolu (0,38 ml; 120 g/l). Ihned po smísení došlo k vyloučení sraženiny. Po 10 minutovém míchání byla oranžová látka odsáta, promyta THF a analyzována na NMR (viz příloha č. 8).

C₁₉H₁₄ClNO₄ (M = 355,77 g/mol)

¹H-NMR (DMSO – *d*₆): δ 4,02 (s, 3H); 6,26 (s, 2H); 7,57 (s, 1H); 7,89 (d, 1H, Ar); 8,05 (d, 1H, Ar); 8,37 (d, 1H, Ar); 8,61 (d, 1H, Ar); 8,61 (s, 1H); 9,66 (s, 1H); 10,33 – 10,77 (bs, 1H)

IR (cm⁻¹): 797, 873, 1035, 1086, 1264, 1297, 1478, 1550, 1611, 2549, 3032

Elementární analýza: viz tabulka č. 3 (*Kapitola 4.2 – Studium inkorporace isodecarinu do cyklodextrinů*)

Příprava zásobních roztoků cyklodextrinů a susepenzí isodecarinu

Příprava suspenze isodecarinu:

Isodecarin (**VIII**) (100 mg) byl suspendován v octanu amonném (20 ml; 0,05 mol/l) o pH 7. Následně byla provedena mikronizace za použití ultrazvukového homogenizátoru.

Příprava roztoků cyklodextrinů:

Do jedné 25 ml odměrné baňky byl navážen hydroxymethyl- β -cyklodextrin (1,19 g; 1 mmol) a do druhé 2-hydroxypropyl- β -cyklodextrin (1,4 g; 1 mmol; 0,04 mol/l). Obě baňky byly doplněny roztokem octanu amonného (0,05 mol/l) po rysku. Výsledná koncentrace obou roztoků činila 0,04 mol/l.

Příprava suspenzí isodecarinu s roztoky cyklodextrinů:

Do osmi 10 ml vialek byly připraveny suspenze obsahující 1 ml mikronizovaného isodecarinu, dále roztok methyl- β -cyklodextrinu (respektive 2-hydroxypropyl- β -cyklodextrinu) (1ml, 2ml, 3ml, 4 ml; což odpovídalo výsledné koncentraci cyklodextrinu: 0,008 mol/l; 0,016 mol/l; 0,024 mol/l a 0,032 mol/l) a poté byly vialky doplněny roztokem octanu amonného (0,05 mol/l) na výsledný objem 5 ml. Srovnávací suspenze obsahovala 1 ml mikronizovaného isodecarinu a 4 ml roztoku octanu amonného. Připravené suspenze byly míchány po dobu 16 hodin.

Příprava vzorků na analýzu:

Do injekční stříkačky o objemu 1 ml bylo vždy odebráno 0,8 ml suspenze, což bylo poté zfiltrováno přes diskový mikrofiltr do 2 ml vialky. Z ní bylo pipetou odebráno přesně 0,5 ml do 1 ml odměrné baňky, která byla doplněna acetonitrem po rysku. Z takto připravených roztoků byla následně prováděna analýza pomocí LC-MS. Další analýza byla provedena po 6 dnech míchání.

6 Závěr

Cílem této bakalářské práce byla syntéza alkaloidu isodecarinu, jehož základem je benzo[*c*]fenanthridinový skelet. Důvodem syntézy jmenované sloučeniny byla ta, že benzo[*c*]fenanthridinům je v dnešní době stále věnována jistá pozornost, díky jejich rozsáhlé biologické aktivitě a dalším popsaným účinkům. Jelikož byla většina z těchto alkaloidů již v mnoha pracích diskutována, byl pro tuto práci zvolen právě isodecarin, benzo[*c*]fenanthridinový derivát vykazující cytostatickou účinnost, ale zároveň téměř nulovou rozpustnost ve fyziologických prostředích.

I když je syntéza isodecarinu (**VIII**) popsána v literatuře^{1,2,3}, vyskytly se při jeho přípravě a jeho příslušných intermediátů (**I-VII**) určité problémy, které se ale podařilo vyřešit a cílenou sloučeninu úspěšně připravit. Bylo například zjištěno, že při závěrečném zpracování reakční směsi při redukci Schiffovy báze (**IV**) musí být dodržen optimální přídavek HCl k ukončení této reakce, protože při nadměrné aciditě roztoku se látka vlivem silně kyselého prostředí debenzyluje a snižuje výtěžek. Během radikálové cyklizace sloučeniny (**V**) na sloučeninu (**VI**) se vyskytl neočekávaný problém s nekvantitativním průběhem reakce, což, jak se záhy ukázalo, bylo způsobeno nekvalitním činidlem Bu₃SnH. Nedostatečná aktivita se poté projevila i u oxidace látky (**VI**) oxidem manganičitým, což bylo vyřešeno pouze prodloužením reakčního času z 1 h na 20 h. Posledním problémem u syntézy isodecarinu (**VIII**) byla katalytická debenzylace sloučeniny benzylderivátu (**VII**). Při analýze bylo zjištěno, že nedochází pouze k odštěpení chránicí skupiny, ale také k redukci na dvojně vazbě C=N. Tento problém byl vyřešen nalezením vhodných podmínek pro dooxidování sloučeniny (**IX**) za použití MnO₂.

Dalším úkolem v této práci bylo zvýšení rozpustnosti a tím i možné biologické dostupnosti isodecarinu (**VIII**). Jelikož je syntetizovaná látka považována za potencionální léčivo, je esenciální, aby vykazovala dobrou biodostupnost při případném podání látky do organismu. Proto byla látka podrobena experimentu za účelem tvorby isodecarinu hydrochloridu (**X**), jehož struktura byla příslušnými analýzami prokázána. Následný test rozpustnosti ve vodě však nebyl úspěšný, jelikož se látka překvapivě nerozpustila. Isodecarin je tedy velice slabou bází, která tvoří stabilní hydrochlorid pouze v nevodném prostředí. Ve vodném prostředí dojde pak k hydrolýze zpět na isodecarin.

Dalším řešením vedoucí ke zvýšení biodostupnosti látky byla inkorporace isodecarinu (**VIII**) do vhodné struktury, která má ve vodě lepší rozpustnost. Zvolenými látkami pro tento experiment byly cyklodextrinové deriváty. Byly použity dva typy těchto derivátů a to methyl- β -cyklodextrin a 2-hydroxypropyl- β -cyklodextrin. Výsledky analýz ukázaly, že látka (**VIII**) je schopna se v určitém množství do těchto derivátů navázat. Vhodnějším typem cyklodextrinu je pro tuto konkrétní látku (**VIII**) dle získaných výsledků 2-HP- β -CD, jehož schopnost navázat látku (**VIII**) byla průměrně dvakrát větší než u M- β -CD. Oproti srovnávací suspenzi, která obsahovala pouze roztok octanu amonného a suspendovaný isodecarin o neměřitelné koncentraci se koncentrace isodecarinu při použití 2-HP- β -CD (o vzrůstající koncentraci 2-HP- β -CD: 8, 16, 24 a 32 mmol/l) zvýšila o 0,0023; 0,0033; 0,0045 a 0,0060 g/l. Při použití M- β -CD (o vzrůstající koncentraci: 16, 24 a 32 mmol/l) se koncentrace zvýšila o 0,0021; 0,0025 a 0,0033 g/l. Navázané množství sloučeniny (**VIII**) se s časem dále nezvyšuje, ale závisí na koncentraci a typu použitých cyklodextrinů.

Závěrem je tedy úspěšná syntéza požadované látky (**VIII**) a zdařilá příprava jeho soli (**X**), která však v roztoku nebyla stabilní. Experiment prováděný s cyklodextriny měl také pozitivní výsledky.

7 Citovaná literatura

1. Nakanishi T., Suzuki M., Mashiba A., Ishikawa K., Yokotsuka T.: *J. Org. Chem.*, **63**, 4235 – 4239, (1998).
2. Kohno K., Azuma S., Choshi T., Nubohiro J., Hibino S.: *Tetrahedron Letters*, **50**, 590 – 592, (2009).
3. Ishihara Y., Azuma S., Choshi T., Tsutsumi H., Ishizu T., Hibino S.: *Tetrahedron*, **67**, 1320 – 1333, (2011).
4. Chen J.J., Fang H.Y., Duh Ch. Y., Chen I.S.: *Planta Medica*, **71**, 470, (2005).
5. Slaninova I., Pencikova K., Urbanova J., Slanina J., Taborska E.: *Phytochem Rev.*, **13** (1), 51 – 68, (2014).
6. Simanek V.: *The Alkaloids*, **26**, 185, (1985).
7. Schmeller T., Latz – Bruening B., Wink M: *Phytochemistry*, **44** (2), 257 – 266, (1996).
8. Alcantara J., Bird D. A., Franceschi V. R., Facchini P. J.: *Plant Physiology*, **138** (1), 173 – 183, (2005).
9. Dostal J., Slavik J.: *Studies in Natural Product Chemistry*, **27**, 155 – 184, (2002).
10. Dvorak Z., Kuban V., Klejdus B., Hlavac J., Vicar J., Ulrichova J., Simanek V.: *Heterocycles*, **68** (11), 2403 – 2422, (2006).
11. Hallock S., Tang Shou- Ching, Buja L. M., Trump B.F., Liepins A., Weerasinghe P.: *Toxicologic Patgology*, **35**, 300 – 309, (2007).
12. Liu H., Wang J., Zhao J., Lu S., Wang J., Jiang W., Ma Z., Zhou L.: *Nat. Prod. Commun.*, **4**, 1557 – 1560, (2009).
13. Zdarilova A., Malikova J., Dvorak Z., Ulrichova J., Simanek V.: *Chem. Listy*, **100**, 30 – 41, (2006).
14. Dzink J. L., Socransky S. S.: *Antimicrob. Agents Chemother.*, **27**, 663 – 665, (1985).
15. Vrublova E., Vostalova J., Vecera R., Klejdus B., Stejskal D., Kosina P., Zdarilova A., Svobodova A., Lichnovsky V., Anzenbacher P., Dvorak Z., Vicar J., Simanek V., Ulrichova J.: *Food Chem. Toxicol.*, **46**, 2546 – 2553, (2008).
16. Dyke S. F., Moon B. J., Sainsbury M.: *Tetrahedron Letters*, **36**, 3933 – 3934, (1968).

17. Hanaoka M., Yoshida S., Annen M., Mukai Ch.: *Chemistry Letters*, **5**, 739 – 742, (1986).
18. Tatton M. R., Simpson I., Donohoe T. J.: *Chemical communications*, **50** (77), 11314 – 11316, (2014).
19. Castillo D., Sauvain M., Rivaud M., Jullian V.: *Planta medica*, **80** (11), 902 – 906, (2014).
20. Zhang Z. F., Guo Y., Zhang J.B., Wei X. H.: *Arch Pharm Res*, **34**, 791 – 800, (2011).
21. Funakoshi T., Aki T., Nakayama H., Watanuki Y., Imori S., Uemura K.: *Toxicol In Vitro*, **25**, 1581 – 1587, (2011).
22. Pencikova K., Kollar P., Müller P., Zavalova V., Taborska E., Urbanova J., Hosek J.: *Phytomedicine*, **19**, 1581 – 1587, (2011).
23. Niu X. F., Zhou P., Li W. F., Xu H. B.: *Fitoterapia*, **82**, 620 – 625, (2011).
24. Li W., Fan T., Zhang Y., Niu X., Xing W.: *Inflammation*, 1814 – 1824, **35**, (2012).
25. Slunská Z., Gelnarová E., Hammerová J., Taborska E., Slaninová I.: *Toxicology in Vitro*, **24**, 697 – 706, (2010).
26. Blanchot M., Candito D. A., Larnaud F., Lateuns M.: *Organic Letters*, **13**, 1486 – 1489, (2011).
27. Yao J.Y., Zhou Z.M., Pan X. Y., Hao G.J., Li X. L., Xu Y., Shen J. Y., Ru H. S., Yin W. L.: *Parasitol Res.*, **109**, 1465 – 1469, (2011).
28. Arthur H. R., Hui W. H., Ng Y. L.: *J. Chem. Soc. (Resumed)*, 1840 – 1845, (1959).
29. Gakuju D. M., Mberu E. K., Dossaji S. F., Gray A.I., Waigh R. D., Waterman P. G.: *Antimicrob Agents Chemother*, **39**, 2606- 2609, (1995).
30. Jullian V., Bourdy G., Georges S., Maurel S., Sauvain M.: *J. Ethnopharmacol*, **106**, 348 – 352, (2006).
31. Del Poeta M., Chen S. F., Von Hoff D., Dykstra C. C., Wani M. C., Manikumar G.: *Antimicrob. Agents Chemother.*, **43**, 2862 – 2868, (1999).
32. Tan G. T., Pezzuto J. M., Kinghorn A. D., Hughes S. H.: *J. Nat. Prod.*, **54**, 143 – 154, (1999).
33. Hu J., Zhang W. D., Liu R. H., Zhang C., Shen Y. H., Li H. L., Liang M. J., Xu X. K.: *Chem Biodivers.*, **3**, 990 – 995, (2006).
34. Sethi V. S.: *Cancer Res.*, **36**, 2390 – 2395, (1976).
35. Fang S. D., Wang L. K., Hecht S. M.: *J. Org. Chem.*, **58**, 5025 – 5027, (1993).
36. Torto F. G., Mensah I. A., Baxter I.: *Phytochemistry*, **12**, 2315 – 2317, (1973).

37. Hanaoka M., Ekimoto H., Kobayashi M. F., Irie Y., Takahashi, K.: *Chem. Abstr.*, **116**, 718, (1989).
38. Nakanishi T., Suzuki M.: *J. Nat. Prod.*, **61**, 1263 – 1267, (1998).
39. Nakanishi T., Suzuki M., Saimoto A., Kabasawa, T.: *Nat. Prod.*, **62**, 864, (1999).
40. Fukuda M., Inomata M., Nishio K., Fukuoka K., Kanzawa F., Arioka H., Ishida T., Fukumoto H., Kurokawa H., Oka M., Saijo N.: *Jpn. J. Cancer Res.*, **87**, 1086, (1996).
41. Kabasawa T., Kobayashi F., Ekimoto H., Suzuki M., Hanaoka M.: *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, **37**, 427, (1996).
42. Kanzawa F., Nishio K., Ishida T., Fukuda M., Kurokawa H., Fukumoto H., Nomoto K., Fukuoka K., Bojanowski K., Saijo N.: *Br. J. Cancer.*, **76**, 571, (1997).
43. Tamura T., Yamamoto N., Yamamoto N., Kamiya Y., Shimada Y., Ieda Y., Nakagawa K., Fukuoka M., Saijo N.: *Abstracts of Papers*, 2406, (1999).
44. Nakanishi T., Masuda A., Suwa M., Akiyama Y., Hoshino-Abe N., Suzuki M.: *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **10**, 2321 – 2323, (2000).
45. Styskala J., Cankar P., Soural M., Hlavac J., Hradil P., Simanek V.: *Heterocycles*, **73**, 769 – 775, (2007).
46. Komarek M., Rabisova M. a kol.: *Technologie léků*, Galén, Praha, (2006), 8072624237.
47. Szejtli J. Osa T.: *Comprehensive Supramolecular Chemistry – Cyclodextrins* 3. díl, Pergamon, Oxford, (1996), 9780080406107.
48. Szejtli J.: *Chem. Rev.*, **98**, 1743 – 1754, (1998).
49. Easton Ch. J., Lincoln S. F.: *Modified Cyclodextrins – Scaffolds and Templates for Supramolecular Chemistry*, Imperial College Press, Londýn, (1999), 186094144.

8 Přílohy

Příloha č. 1

LC chromatogram 6-bromo-2-benzyloxy-3-methoxybenzaldehydu (II)



Příloha č. 2

LC chromatogram 6,7-methyldioxynaftalen-1-aminu (III)



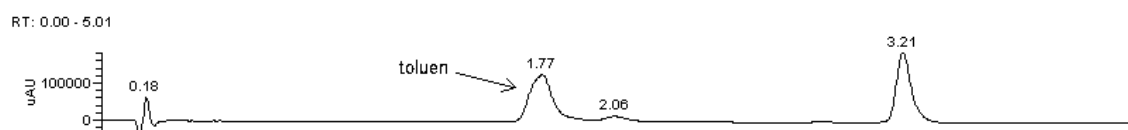
Příloha č. 3

LC chromatogram Schiffovy báze (IV)



Příloha č. 4

LC chromatogram *N*-(6-brom-2-benzyloxy-3-methoxybenzyl)-6,7-methyldioxy-1-aminonaftalenu (V)



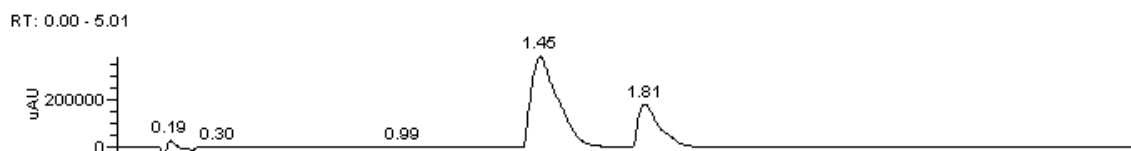
Příloha č. 5

LC chromatogram 7-benzyloxy-8-methoxy-2,3-methylenedioxybenzo[*c*]-
fenanthridinu (**VII**)

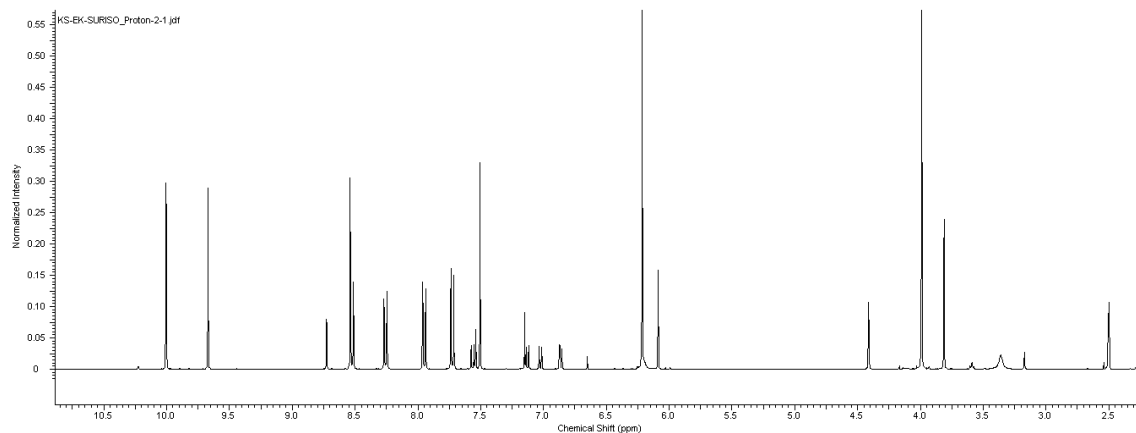


Příloha č. 6

a) LC chromatogram směsi isodecarinu (**VIII**) a 5,6-dihydroisodecarinu (**IX**)

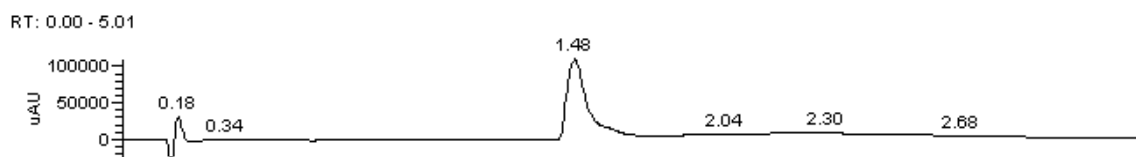


b) ^1H NMR spektrum směsi isodecarinu (**VIII**) a 5,6-dihydroisodecarinu (**IX**)

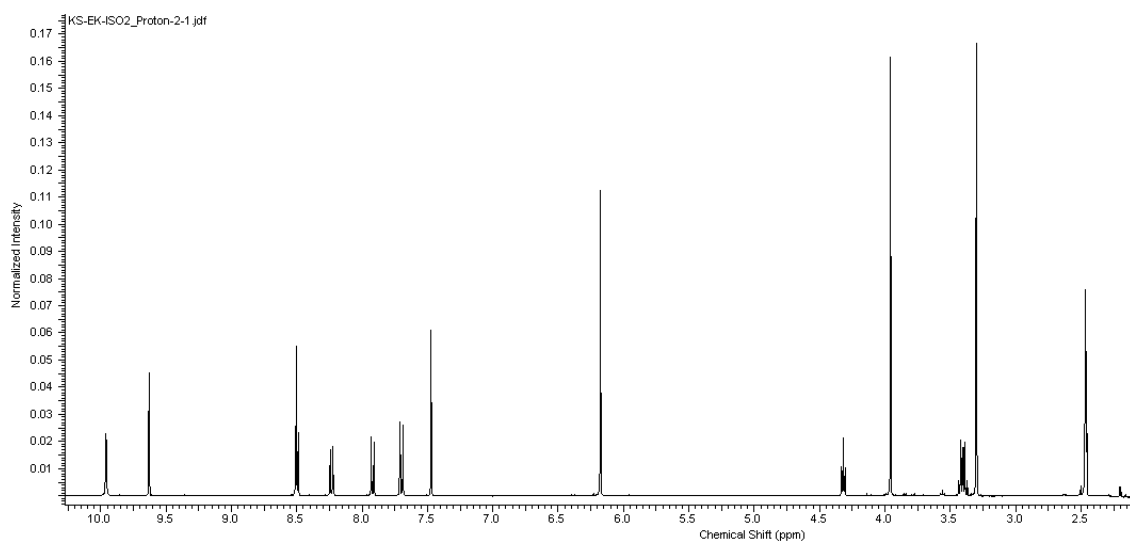


Příloha č. 7

a) LC chromatogram isodecarinu (**VIII**)



b) ^1H NMR spektrum isodecarinu (VIII)



Příloha č. 8

^1H NMR spektrum isodecarinu hydrochloridu (X)

