

Univerzita Palackého v Olomouci  
Přírodovědecká fakulta

**Katedra organické chemie**



**Studium oxidace A kruhu lupanových triterpenů**

*Diplomová práce*

Autor práce:

Bc. Vladimír Horka

Studijní obor:

Bioorganická chemie a chemická biologie

Vedoucí práce:

doc. RNDr. Milan Urban, Ph.D.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že já, Vladimír Horka, jsem tuto práci vypracoval samostatně pod vedením doc. RNDr. Milana Urbana, Ph.D. s uvedením veškerých použitých zdrojů a literatury v závěru tohoto dokumentu. Dále tato práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Souhlasím se zpřístupněním mé práce v knihovně Katedry organické chemie, Přírodovědecké katedry, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci, 6. 5. 2021

Podpis:

## Poděkování

Tímto bych chtěl poděkovat svému vedoucímu doc. RNDr. Milanovi Urbanovi, Ph.D. za veškerou poskytnutou pomoc, vstřícný přístup, cenné rady, trpělivost a ochotu. Velice si vážím příležitosti podílet se na výzkumu KOCH-UP pod jeho vedením.

Dále bych chtěl poděkovat doktoru Adamovi Příbylkovi, za prováděné analýzy a celému NMR oddělení naší katedry (Mgr. Jan Bachořík a Mgr. David Profous). Poděkování patří i katedře analytické chemie PŘF-UP za umožnění změření IR spekter. Velké díky pak patří celé výzkumné skupině docenta Urbana, kde jsem získal veškerou podporu a všechny důležité poznatky, které byly využity pro experimentální část této diplomové práce. V neposlední řadě všem studentům a zaměstnancům na katedře organické chemie i ústavu molekulární a translační medicíny za velmi kolegiální prostředí a ochotu vždy poradit a pomoci.

Tato závěrečná práce vznikla za finanční podpory Interní Grantové Agentury Univerzity Palackého (IGA\_PrF\_2021\_024).

# Bibliografické informace

**Autor práce:** Bc. Vladimír Horka

**Název práce:** Studium oxidace A kruhu lupanových triterpenů

**Typ práce:** Diplomová

**Pracoviště:** Katedra organické chemie, ústav molekulární a translační medicíny

**Vedoucí práce:** doc. RNDr. Milan Urban, Ph.D.

**Odborný konzultant:** doc. RNDr. Milan Urban, Ph.D.

**Rok obhajoby:** 2021

**Abstrakt:** Tato práce se zabývá souhrnem oxidačních reakcí, které vedou k přípravám výše oxidovaných derivátů lupanu. Diosfenolický strukturní motiv, na který je v této práci kladen důraz, již dříve vykázal potenciální cytotoxické vlastnosti. V tomto díle je hlavně diskutována použitelnost jednotlivých způsobů příprav vybraných lupanových derivátů diosfenolu. Jedná se o optimalizaci více krokové syntézy výše oxidovaných látek. Postupy, zde uvedené, jsou zaměřeny na přípravu derivátů, vhodných k dalším konjugacním reakcím. Celkem bylo připraveno sedm výchozích oxidovaných prekurzorů rozdílnými sledy oxidačních reakcí. Pouze jeden z nových derivátů se ukázal být vhodným substrátem pro přípravu diosfenolu. Tato látka byla v závěru práce konjugována s PEG linkerem. Vzniklý konjugát pak může být v budoucích pracích využit k biologickým aplikacím, jako je například studium mechanismu účinku přímo v buňce pomocí bioortogonálních reakcí.

**Klíčová slova:** triterpeny, kyselina betulinová, diosfenol, studium oxidace, výše oxidované deriváty

**Počet stran:** 97

**Počet příloh:** 18

**Jazyk:** Čeština

## **Bibliographical information**

**Author:** Bc. Vladimír Horka

**Title:** Study of oxidation of the A ring of lupane triterpenes

**Type of thesis:**

**Workplace:** Department of organic chemistry, institute of molecular and translational medicine

**Leader:** doc. RNDr. Milan Urban, Ph.D.

**Consultant:** doc. RNDr. Milan Urban, Ph.D.

**Year of presentation:** 2021

**Abstract:** This work is focused on summary of an oxidation reactions, which results in to highly oxidated lupane derivatives. Diosphenolic structure motive was previously considered as potential cytotoxic agent. This thesis is primarily focused on optimalization of path, that leads to target molecules. Goal is to find easiest, most comfortable and most effective way to prepare chosen derivatives. Seven highly oxidated lupane precursors were prepared with intend for further oxidation to prepare diosphenol. Only one of these molecules was identified as good substrate and one diosphenol molecule was prepared. Prepared diosphenol was conjugated with PEG linker to provide suitable conjugate. This linked molecule may lead to biological applications in the future, such as studying mechanism of diosphenolic biological target of activity through bioorthogonal reactions.

The financial support provided by Internal Grant Agency of Palacký University (IGA\_PrF\_2021\_024) is gratefully acknowledged.

**Keywords:** triterpenes, betulinic acid, diosphenol, oxidation studies, highly oxidated derivatives

**Number of pages:** 97

**Number of attachments:** 18

**Language:** Czech

## Seznam použitých zkratek

4T1	Buněčná linie karcinomu prsu
A-549	Buněčná linie karcinomu plicního epitelu
Ac <sub>2</sub> O	Acetanhydrid
AcCl	Acylchlorid
AcCoA	Acetylkoenzym A
BAL	Backbone Amide Linker
BJ	Buněčná linie lidského fibroblastu
BJ LD	Buněčná linie lidského fibroblastu
BnBr	Benzylbromid
CCRF-CEM	Standardní leukemická buněčná linie
CEM	Leukemická buněčná linie
DCE	Dichlorethan
DCM	Dichlormethan
DIC	Diizopropylkarbodiimid
DIPEA	Diizopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DU145	Buněčná linie karcinomu prostaty
ECV-304	Buněčná linie karcinomu močového měchýře
EDAR-V370A	Mutovaný ectodisplasínový receptor
EDC	1(3-dimethylaminopropyl)-3-ethyl karbodiimid
ekviv.	Ekvivalent
eq.	Ekvivalent
Et <sub>2</sub> O	Diethyleter
EtOAc	Ethylacetát
EtOH	Ethanol
Fmoc	Fluorenylmethyloxykarbonylchlorid
G2	Buněčná linie karcinomu jater
HCT-116	Buněčná linie karcinomu konečníku
HeLa	Buněčná linie lidských epitelálních buněk
HEp-2	Buněčná linie karcinomu děložního čípku
hex	Hexan
HIV	Human immunodeficiency virus
HOAc	Kyselina octová
HOBt	Hydroxybenzotriazol
HRMS	Hmotnostní spektrometr s vysokým rozlišením
HSV	Herpes simplex virus
HT-29	Buněčná linie karcinomu tlustého střeva
IC <sub>50</sub>	Inhibiční koncentrace, při které dojde k 50% inhibici růstu organismů
IR	Infračervený spektrofotometr / infračervené záření
K-562	Leukemická buněčná linie

KB	Buněčná linie karcinomu lidských fibroblastů
KHMDS	Bis(trimethylsilyl)amid draselný
LAH	Lithium aluminium hydrid
LC-MS	Kapalinová chromatografie s hmotnostním detektorem
lit.	Literatura
MCF7	Buněčná linie karcinomu prsu
MeOH	Methanol
MT-4	Buněčná linie T-lymfocytů
NaOAc	Octan sodný
NMP	N-methylpyrolidon
NMR	Nukleární magnetická rezonance
PC3	Buněčná linie karcinomu prostaty
PCC	Pyridinium chlorchromát
PEG	Polyethylenglykol
pod.	Podobné
rce.	Reakce
rozp.	Rozpustnost
r.t.	Pokožová teplota
RD TE-32	Lidské embrionální buňky
str.	strana
TBAF	Tetra n-butylamonium fluorid
TBDMSCl	Terc-butyldimethylsilyl chlorid
TBDPS	Terc-butyldiphenylsilyl
TBDPSCl	Terc-butyldiphenylsilyl chlorid
t-BHP	Terc-butyl hydroperoxid
<i>t</i> -BuOH	2-Methyl-2-propanol
<i>t</i> -BuOK	2-Methyl-2-propoxid draselný
TEA	Triethylamin
terc	Terciální
THF	Tetrahydrofuran
TLC	Tenkovrstvá chromatografie
tol	Toluen
UV	Ultrafialové záření
WT	Buněčná linie karcinomu konečníku

## Cíle práce

- 1) Provést syntézu vybraných výše oxidovaných derivátů lupanu.
- 2) Identifikovat reakční podmínky pro specifické oxidace A-kruhu vybraných lupanových derivátů za účelem přípravy diosfenolů.
- 3) Optimalizovat vícekrokovou syntézu výše oxidovaných produktů a identifikovat nejvýhodnější, nejpřístupnější a nejefektivnější reakční cestu k cílovým produktům.
- 4) Připravit deriváty diosfenolu tak, aby byly vhodné pro konjugační reakce, které by mohly poskytnout konjugáty aplikovatelné při studiu mechanismů účinku těchto derivátů *in vitro* a *in vivo*.



# Obsah

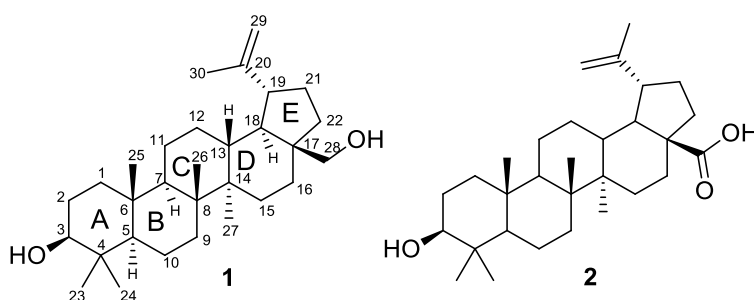
1	Úvod .....	21
2	Literární přehled .....	22
2.1	2-hydroxy-3-oxolup-1(2),20(29)-dien-28-ová kyselina (diosfenol, <b>4</b> ) .....	22
2.2	Derivatizace kruhu A lupanových triterpenů .....	24
2.2.1	Oxidace kruhu A .....	24
2.2.2	Vybrané příklady modifikace A kruhu .....	26
2.3	Konjugace lupanových triterpenů .....	31
2.3.1	Příklady molekul vhodných ke konjugaci s triterpeny .....	31
2.3.2	Příklady konjugačních procesů .....	34
3	Diskuse .....	38
3.1	Příprava výchozích sloučenin .....	38
3.1.1	Příprava dibenzyl 3-oxolup-20(29)-en-28,30-dioátu (Dibenzylester 75) .....	38
3.1.2	Příprava 3-oxolup-20(29)-en-28,30-diové kyseliny (Dikyselina 80) .....	40
3.1.3	Příprava 28-benzylesteru kyseliny 3-oxolup-20(29)-en-28,30-diové (Kyselina 83) .....	42
3.1.4	Příprava 28-(TBDPS)esteru kyseliny 3-oxolup-20(29)-en-28,30-diové (Kyselina 85) a 28-(TBDMS)esteru kyseliny 3-oxolup-20(29)-en-28,30-diové (Kyselina 86) .....	44
3.2	Příprava derivátů diosfenolu <b>4</b> .....	48
3.2.1	Příprava dibenzyl 2-hydroxy-3-oxolup-1(2),20(29)-dien-28,30-dioátu (Diosfenol 91) .....	48
3.2.2	Příprava 2-hydroxy-3-oxolup-1(2),20(29)-dien-28,30-diové kyseliny (Diosfenol 92) .....	49
3.2.3	Příprava 28-benzylesteru kyseliny 2-hydroxy-3-oxolup-1(2),20(29)-dien-28,30-diové (Diosfenol 94) .....	50
3.2.4	Příprava 28-(TBDPS)esteru kyseliny 2-hydroxy-3-oxolup-1(2),20(29)-dien-28,30-diové (Diosfenol 95) .....	52
3.2.5	Příprava 28-(TBDMS)esteru kyseliny 2-hydroxy-3-oxolup-1(2),20(29)-dien-28,30-diové (Diosfenol 96) .....	53
3.2.6	Příprava 2-hydroxy-3,30-dioxolup-1(2),20(29)-dien-28-ové kyseliny (Diosfenol 97) .....	54
3.2.7	Příprava benzyl 2-hydroxy-3,30-dioxolup-1(2),20(29)-dien-28-oátu (Diosfenol 98) .....	56
3.3	Příprava konjugovaných molekul .....	58
3.3.1	Optimalizace syntézy konjugovaného derivátu 102 .....	58
3.3.2	Příprava konjugovaného derivátu 104 .....	60

4	Experimentální část .....	61
4.1	Obecné poznámky k procedurám experimentální části .....	61
4.2	Příprava výchozích sloučenin .....	62
4.2.1	Dibenzylester 75 – dibenzyl 3-oxolup-20(29)-en-28,30-dioát .....	62
4.2.2	Dikyselina 80 – 3-oxolup-20(29)-en-28,30-diová kyseliny .....	67
4.2.3	Kyselina 83 – 28-benzylester 3-oxolup-20(29)-en-28,30-diové kyseliny .....	69
4.2.4	Kyseliny 85 a 86– 28-(TBDPS)ester kyseliny 3-oxolup-20(29)-en-28,30-diové a 28-(TBDMS)ester kyseliny 3-oxolup-20(29)-en-28,30-diové .....	71
4.3	Příprava derivátů diosfenolu 4 .....	78
4.3.1	Diosfenol 91 – dibenzyl 2-hydroxy-3-oxolup-1(2),20(29)-dien-28,30-dioát 78	
4.3.2	Diosfenol 92 – 2-hydroxy-3-oxolup-1(2),20(29)-dien-28,30-diová kyselina 79	
4.3.3	Diosfenol 94 – 28-benzylester kyseliny 2-hydroxy-3-oxolup-1(2),20(29)-dien-28,30-diové.....	80
4.3.4	Diosfenol 95 – 28-(TBDPS)ester kyseliny 2-hydroxy-3-oxolup-1(2),20(29)-dien-28,30-diové .....	81
4.3.5	Diosfenol 96 – 28-(TBDMS)ester kyseliny 2-hydroxy-3-oxolup-1(2),20(29)-dien-28,30-diové .....	82
4.3.6	Diosfenol 97 – 2-hydroxy-3,30-dioxolup-1(2),20(29)-dien-28-ová kyselina 83	
4.3.7	Diosfenol 98 –benzyl 2-hydroxy-3,30-dioxolup-1(2),20(29)-dien-28-oát83	
4.4	Příprava konjugovaných molekul .....	84
4.4.1	Konjugovaný derivát 102.....	84
4.4.2	Konjugovaný derivát 104.....	85
5	Shrnutí .....	87
6	Závěr.....	91
7	Seznam použité literatury .....	92

# 1 Úvod

Izoprenoidy jsou jednou z nejrozšířenějších skupin přírodních látek s velkou škálou biologických aktivit. Proto se mnoho výzkumných skupin zabývá jejich využitím a derivatizací. Jednou z významných tříd izoprenoidů jsou pentacyklické triterpeny, kterým se naše výzkumná skupina dlouhodobě věnuje. Mezi nejvýznamnější biologické aktivity pentacyklických triterpenů patří: antivirotická<sup>1</sup>, antimikrobiální a cytostatická<sup>2</sup> aktivita. Například kyselina betulinová (**2**, obrázek 1) je kvůli svým antimikrobiálním vlastnostem často využívána v kosmetickém průmyslu.

Deriváty lupanu jsou objemné molekuly s několika místy vhodnými pro chemické modifikace nebo pro konjugace s dalšími molekulami. Jednou ze sloučenin, odvozených od lupanu, je betulin (**1**), který je možné modifikovat v polohách C-30, C-28, C-3, C-2 a na dvojnou vazbu mezi uhlíky C-20(29) (Obrázek 1). Modifikací pentacyklických triterpenů může být docíleno zvýšení zvolené biologické aktivity<sup>3,4</sup>, zlepšení farmakologických vlastností<sup>5</sup> nebo cílení molekul na místo účinku<sup>6</sup>, například solidní nádor. Tímto způsobem získáme lepší selektivitu a méně negativních vedlejších účinků.



Obrázek 1: číslovaná molekula betulinu **1** a kyseliny betulinové **2**

Oxidací kruhu A lupanových triterpenoidů vznikají výše oxidované substráty<sup>7</sup>, které jsou často významně cytotoxické<sup>8,9</sup> a navíc byly v minulosti využity pro řadu syntéz sloučenin s vysokou cytotoxickou aktivitou<sup>10,11</sup>, zejména derivátů s heterocyklickým jádrem kondenzovaným ke kruhu A<sup>11,12</sup>, fluorderivátů<sup>13</sup> apod. Tato skupina sloučenin je tak pořád zajímavá a jedním z cílů této diplomové práce je prozkoumat možnosti oxidace A-kruhu lupanových triterpenů do vyšších stupňů, prověřit aktivitu vzniklých sloučenin a případně je využít pro následné syntézy.

## 2 Literární přehled

### 2.1 2-hydroxy-3-oxolup-1(2),20(29)-dien-28-ová kyselina (diosfenol, **4**)

Struktura diosfenolu **4**, což je derivát lupanu, je známá pro svou významnou selektivní cytotoxickou aktivitu na nádorových buněčných liniích. Diosfenol **4** lze připravit z kyseliny betulinové **2** postupem, který byl popsán v lit.<sup>14</sup>. Jedná se o oxidaci na 3-oxokyselinu **3**, která je následně vzdušným kyslíkem v 2-methylpropan-2-olu za přítomnosti báze (nejčastěji *tert*-butoxid draselný) převedena na diosfenol **4**. Při překročení optimální reakční doby dochází ke vzniku látky **5** (Schéma 1).<sup>14,15</sup>

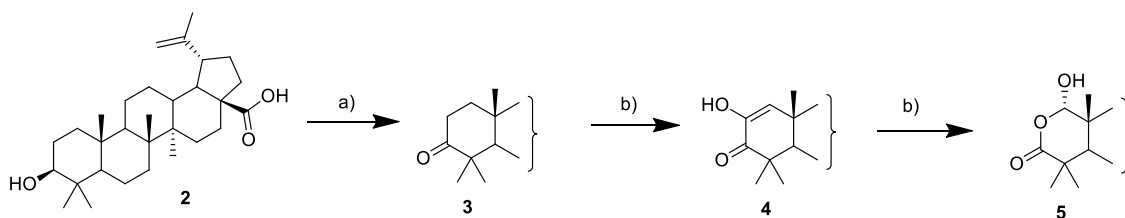
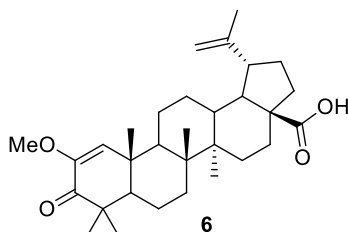


Schéma 1: Příprava diosfenolu **4**. a)  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ,  $\text{NaOAc}$ ,  $\text{HOAc}$ ,  $\text{AcO}_2$ , dioxan<sup>8</sup> ; b) *t*-BuOH, *t*-BuOK, vzduch<sup>15</sup>

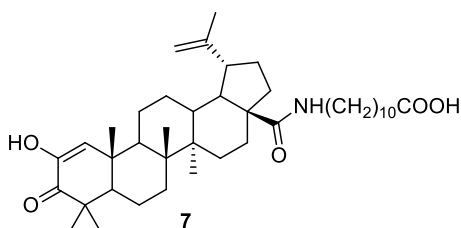
Derivát **4** vykazuje nízkou hodnotu  $\text{IC}_{50}$  u nádorových buněk. Pro karcinom plicního epitelu A-549 bylo stanoveno  $\text{IC}_{50} = 10 \mu\text{mol/l}$ . Na buněčné linii karcinomu prsu MCF7 vykazuje derivát **4**  $\text{IC}_{50} = 14 \mu\text{mol/l}$ . U lidské leukemické linie K-562 se  $\text{IC}_{50}$  derivátu **4** pohybuje mezi 4 – 6  $\mu\text{mol/l}$ . Standardní leukemická linie CCRF-CEM vykazuje inhibiční koncentrace látky **4**  $\text{IC}_{50} = 4 \mu\text{mol/l}$ . Hodnota  $\text{IC}_{50}$  u buněčné linie lidského karcinomu tlustého střeva HT-29 se pohybuje okolo 6  $\mu\text{mol/l}$  a pro buňky PC3, rakoviny prostaty, je  $\text{IC}_{50} = 10 \mu\text{mol/l}$ . Methylovaný derivát **6** (Obrázek 2) vykazuje u linií A-549, HT-29, PC3 a MCF7 podobné hodnoty  $\text{IC}_{50}$  jako diosfenol **4**, avšak u leukemické linie K-562 se jeho  $\text{IC}_{50}$  pohybuje v rozmezí 8 – 60  $\mu\text{mol/l}$ , a u CEM buněk vykazuje derivát **6**  $\text{IC}_{50} = 23 \mu\text{mol/l}$ .<sup>14–16</sup>



Obrázek 2: Struktura **6**

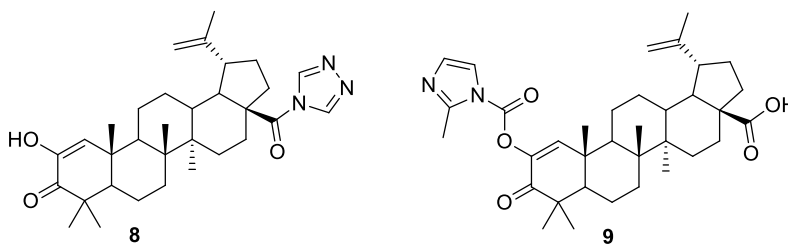
Diosfenol **4** byl také testován jako inhibitor HIV-1 proteázy v porovnání s pepstatinem. Inhibiční koncentrace byl stanoven jako  $IC_{50} = 18.8 \mu\text{mol/l}$ . Tento výsledek byl v lit.<sup>10</sup> vyhodnocen, jako středně aktivní.<sup>10</sup>

Amid diosfenolu **4** s kyselinou 11-aminoundekanovou (**7**, *obrázek 3*) byl testován pro anti-HIV aktivitu, kdy lidské leukemické buňky CEM4 a MT-4 byly inkubovány s látkou **7** a následně infikovány virem HIV-1.  $IC_{50}$  u MT-4 nebyla detekována, u CEM4, byla  $IC_{50} = 3 \mu\text{mol/l}$ . Struktura **7** byla vyhodnocena v lit.<sup>1</sup> jako málo aktivní.<sup>1</sup>



Obrázek 3: Struktura 7

Konjugáty diosfenolu **4** s heterocykly vykazují značnou biologickou aktivitu vůči některým nádorovým buněčným liniím. Deriváty **8** a **9** (*Obrázek 4*) vykazují aktivity na buněčných liniích HeLa ( $IC_{50} = 5.4 - 6.4 \mu\text{mol/l}$ ) a HT-29 ( $IC_{50} = 3.3 - 5.9 \mu\text{mol/l}$ ). U nenádorových linií, například u lidských imortalizovaných fibroblastů BJ vykazuje derivát **8** nízkou toxicitu  $IC_{50} = 27.9 \mu\text{mol/l}$  a derivát **9**  $IC_{50} = 37.2 \mu\text{mol/l}$ . U linie PC3 byla detekována pouze aktivita derivátu **8**  $IC_{50} = 1.8 \mu\text{mol/l}$ .



Obrázek 4: Struktury 6 a 7

## 2.2 Derivatizace kruhu A lupanových triterpenů

Jedním z častých míst pro modifikaci lupanových triterpenů za účelem získání biologicky aktivních molekul je kruh A. U derivátů pozměněných na kruhu A bývá často pozorována mimo jiné cytotoxická<sup>14-16</sup>, antimikrobiální a antivirotická<sup>10</sup> aktivita. V této práci je v praktické části diskutována hlavně modifikace poloh C-3 a C-2 kyseliny betulinové.

### 2.2.1 Oxidace kruhu A

Jednou z nejčastěji prováděných modifikací kyseliny betulinové (**2**) je převedení na kyselinu betulonovou (**3**), kdy je hydroxylová skupina v poloze C-2 podrobena oxidaci na oxoskupinu (Schéma 2). Způsobů je v literatuře popsáno hned několik. Příkladem může být oxidace pomocí PCC nebo pomocí dichromanu sodného.<sup>8,9</sup>

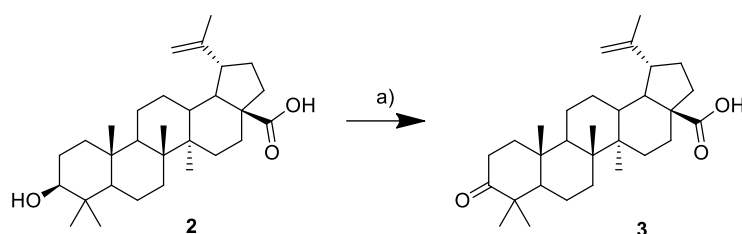


Schéma 2: a)  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ , NaOAc, HOAc,  $\text{AcO}_2$ <sup>8,9</sup>

Příprava dihydroxy derivátu **13** vychází z diosfenolu betulinu **10**, který je nejprve ochráněn TBDMSCl na enolové skupině (**11**). Následně je diosfenol **11** redukován komplexním hydridem (Schéma 3) a deprotektován za vzniku derivátu **13**. Pro vytvoření látky **14** je redukován derivát **12** podroben oxidaci PCC a redukcí pomocí  $\text{Al}(i\text{-PrO})_3$  s následnou deprotekcí za vzniku molekuly **14**.<sup>17</sup>

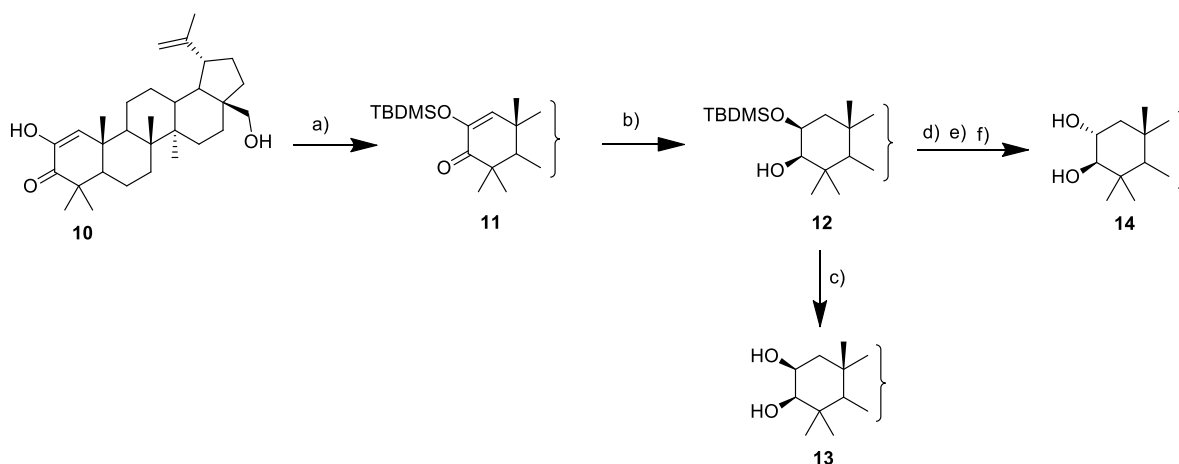


Schéma 3: a) TBDMSCl, imidazol, DMF, 45 °C; b)  $\text{NaBH}_4$ , EtOH, THF; c/f) TBAF, THF, reflux; d) PCC, DCM, 0 °C; e)  $\text{Al}(i\text{-PrO})_3$ , *i*-PrOH,  $\text{AlCl}_3$ , reflux.<sup>17</sup>

Příprava izobetulinu (**16**) zahrnuje víceetapovou syntézu vycházející z derivátu **10** (Schéma 4), který je podroben redukcí komplexním hydridem na sloučeninu **13**. Látka **13** pak reaguje s PCC za vzniku směsi oxidovaných sloučenin, ze které je izolován derivát **15**, který je podroben redukcí komplexním hydridem za vzniku látky **16**.<sup>18,19</sup>

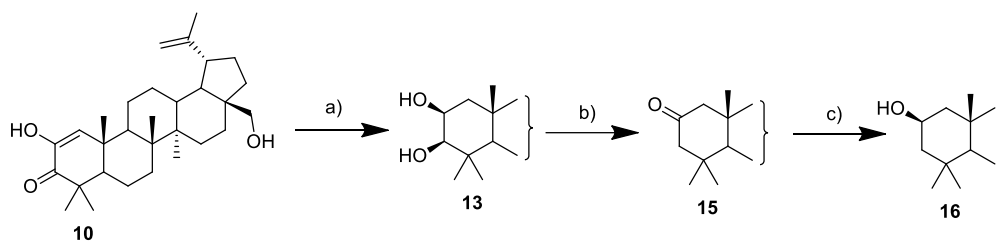
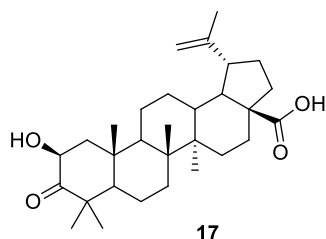


Schéma 4: a)  $\text{NaBH}_4$ , EtOH, THF; b) PCC, DCM,  $0^\circ\text{C}$ ; c)  $\text{NaBH}_4$ , EtOH, THF<sup>18,19</sup>

Příprava 2-hydroxybetulonové kyseliny (**17**, obrázek 5) vychází z kyseliny betulonové (**9**) oxidací pomocí *m*-chlorperoxybenzoové kyseliny.<sup>18</sup>



Obrázek 5: Struktura **17**

Diosfenol **4** lze podrobit oxidaci peroxidem vodíku (Schéma 5) za vzniku trikarboxylové kyseliny **18**, která následně s anhydridem kyseliny octové vytváří deriváty **19** a **20**.<sup>20</sup>

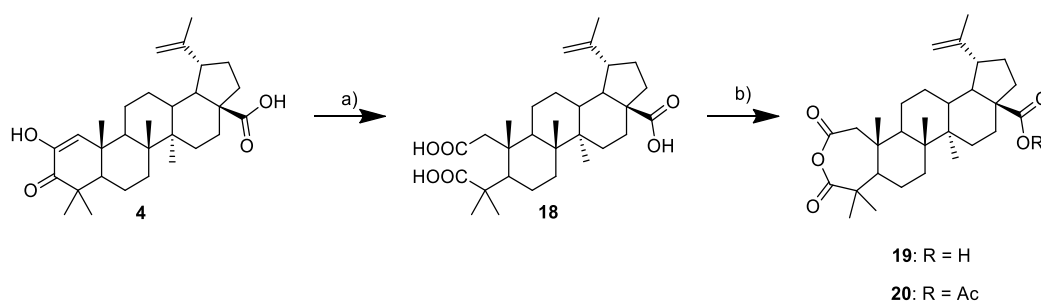
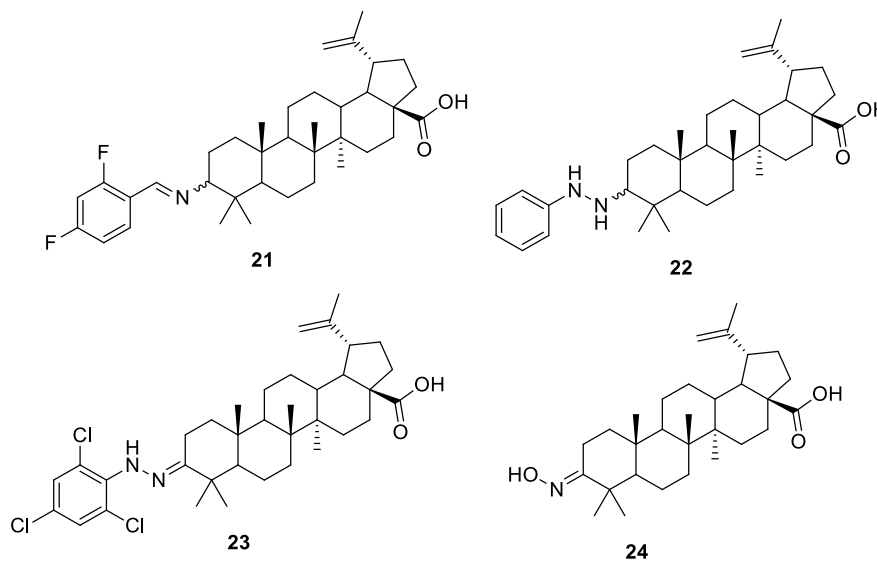


Schéma 5: a)  $\text{H}_2\text{O}_2$ , KOH, MeOH, reflux; b)  $\text{Ac}_2\text{O}$ <sup>20</sup>

## 2.2.2 Vybrané příklady modifikace A kruhu

Kondenzací kyseliny betulonové **3** lze získat hydrazonové deriváty, které podléhají následné redukci za vzniku hydrazinů. Dále pak lze připravit iminy i oxim (**21 – 24**). Na *obrázku 6* jsou uvedeny příklady cytotoxicky neaktivnějších molekul. Připravené deriváty ve většině případů vykazují zanedbatelný účinek na endoteliální buněčné linii A594 a DU145. Avšak pro linii ECV-304 se  $IC_{50}$  pohybuje v rozmezí 0.21 – 0.35  $\mu\text{mol/l}$ .<sup>8,21</sup>



Obrázek 6: Struktury **21**, **22**, **23**, **24**.

Příprava 2-bromderivátu **25** vychází z 3-oxokyseliny (**3**), která je podrobena allylové bromaci v kyselém prostředí (*Schéma 6*). Bromovaný derivát **25** vykazoval  $IC_{50} = 1 \mu\text{mol/l}$  na buněčné linii CEM.<sup>11</sup> Vzniklý derivát je vhodný jako meziproduct následných cyklizačních reakcí, kdy vznikají heterocykly. Například derivát **26**, který vzniká reakcí thiomčoviny s látkou **25** v ethanolu.<sup>22</sup>

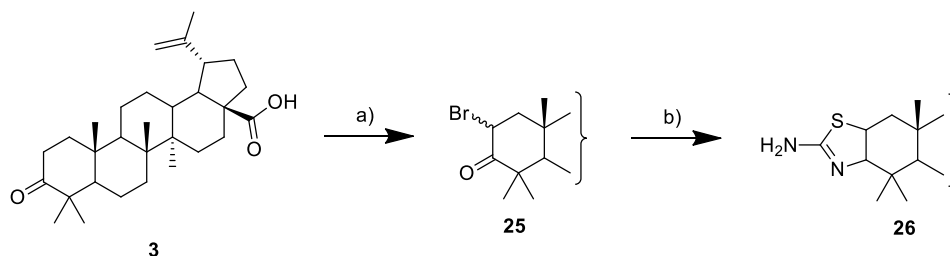


Schéma 6: a)  $\text{Br}_2$ , HOAc, NaOAc<sup>11</sup>; b) EtOH, thiomčovina<sup>22</sup>

Mono fluorované deriváty, např. **27**, je možné připravit reakcí fluorbenzensulfonyl imidu s 3-oxokyselinou **3** v silně bazickém prostředí za snížené teploty (*Schéma 7*).



Antivirotickou aktivitu však vykazují pouze výše derivatizované fluorované deriváty, jako například látka **28** (Obrázek 7) s  $IC_{50} = 0.3 \mu\text{mol/l}$  na HIV infikované buněčné linii NL-4.<sup>13</sup>

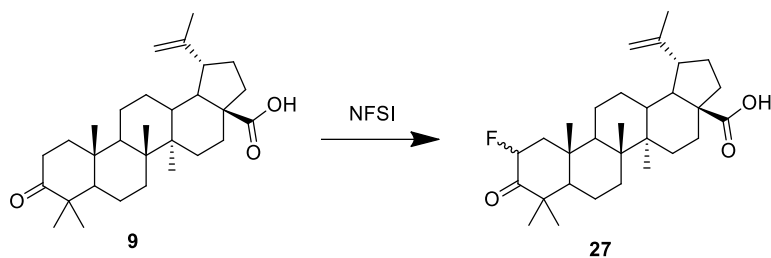
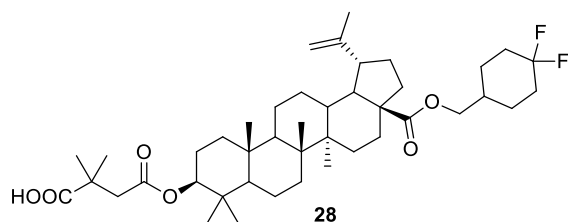


Schéma 7: a) NFSI, THF,  $-78 - 20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ <sup>13</sup>



Obrázek 7: Aktivní derivát **28**

Pro přípravu 2-amino derivátu **29** je možné vyjít z 2-bromderivátu **25**, kdy je nejprve provedena nukleofilní substituce azidem sodným v bazickém prostředí. Vzniklý azid je nestálý a je možné ho redukovat tetrahydridoboritanem sodným za vzniku aminu **29** (Schéma 8). Jako vedlejší produkt reakce vzniká dimer **30**.<sup>23</sup>

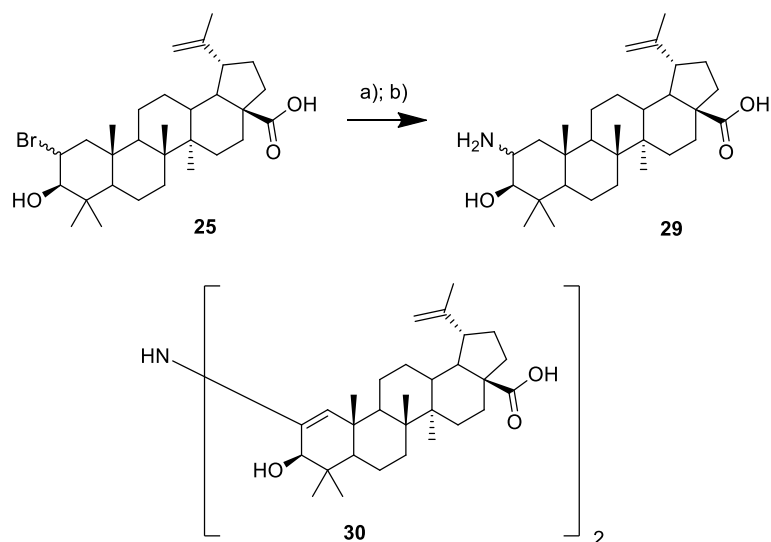


Schéma 8: a)  $\text{NaN}_3$ , NMP, AcOH, r.t.; b) LAH, THF, reflux<sup>23</sup>

Samotná látka **29** však nejeví cytotoxickou aktivitu vůči leukemické linii CCRF-CEM. A ani jeho deriváty uváděné v lit.<sup>23</sup>, nevykazují slibnější hodnoty cytotoxicity.<sup>23</sup>

Thiol **31** vzniká při reakci derivátu **32** a sulfidu sodného v N-methylpyrolidonu (*Schéma 9, reakce a*). Tato sloučenina je nestálá a rozkládá se již při zpracování. Vhodnější je příprava komplexnějších derivátů obsahující heteroatom síry, které vykazují vyšší stabilitu. Například deriváty **33** a **34**. Derivát **33** vzniká reakcí **32** s 2-merkptoethanolem v bazickém prostředí, derivát **34** vzniká při nižších koncentracích merkptoethanolu (*Schéma 9, reakce b*). Ani jeden z derivátů nejevil významnou cytotoxickou aktivitu.<sup>23</sup>

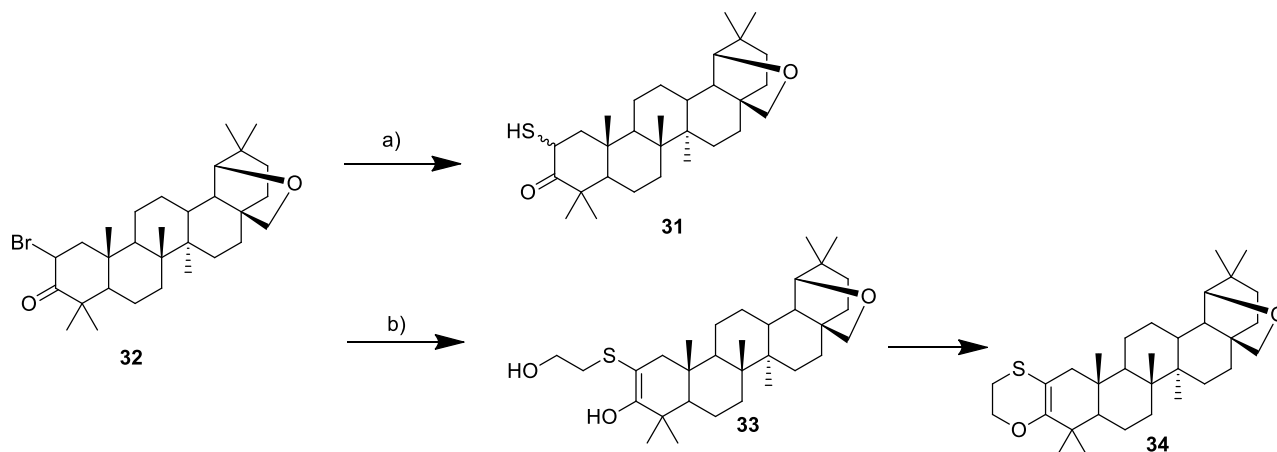


Schéma 9: a)  $\text{Na}_2\text{S}$ , NMP, r.t.; b) merkptoethanol, NaOH, EtOH<sup>23</sup>

Dalším substrátem vhodným pro cyklizační reakce probíhající na A kruhu lupanových derivátů, při nichž vznikají heterocykly, je například enol **35**, který vzniká reakcí 3-oxokyseliny **3** s ethylesterem kyseliny mravenčí v silně bazickém prostředí (*Schéma 10, reakce a*)), sloučenina má  $\text{IC}_{50} = 2.8 \mu\text{mol/l}$  na linii A-594<sup>24</sup>. Stejně vhodný je i derivát **36** vznikající podobným reakčním sledem (*Schéma 10, reakce b*)).<sup>25</sup>

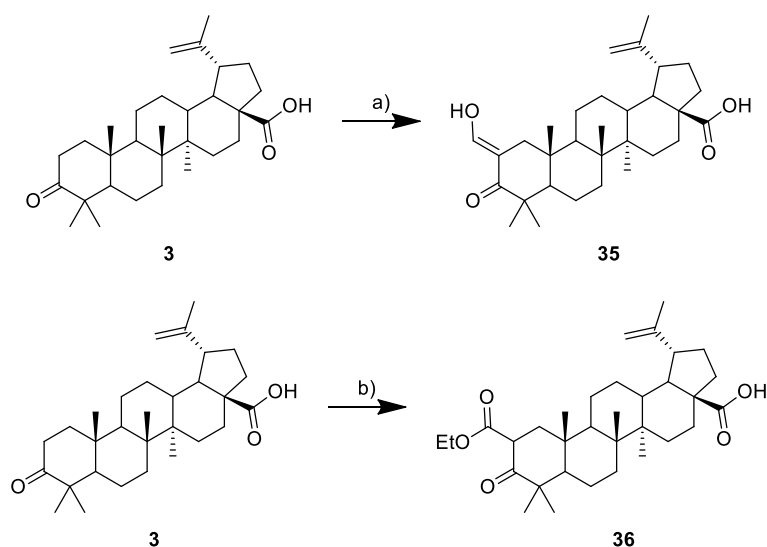


Schéma 10: a)  $\text{HCOOEt}$ , NaH, dioxan, reflux; b)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , NaH, dioxan, reflux<sup>25</sup>

### 2.2.2.1 Cyklizační reakce A kruhu

Vlastní cyklizační reakce pak probíhají dle reakčního schématu 11. Bromovaný derivát **25** podléhá nukleofilní substituci thiomocovinou v morfolinu za varu, vzniká derivát **26**. Deriváty **35** a **37** reagují s hydrazinovými deriváty za vzniku diazolů **38** a **39**. Derivát **40** reaguje s hydroxylaminem za vzniku oxazolů **41** a **42**.<sup>11,12</sup>

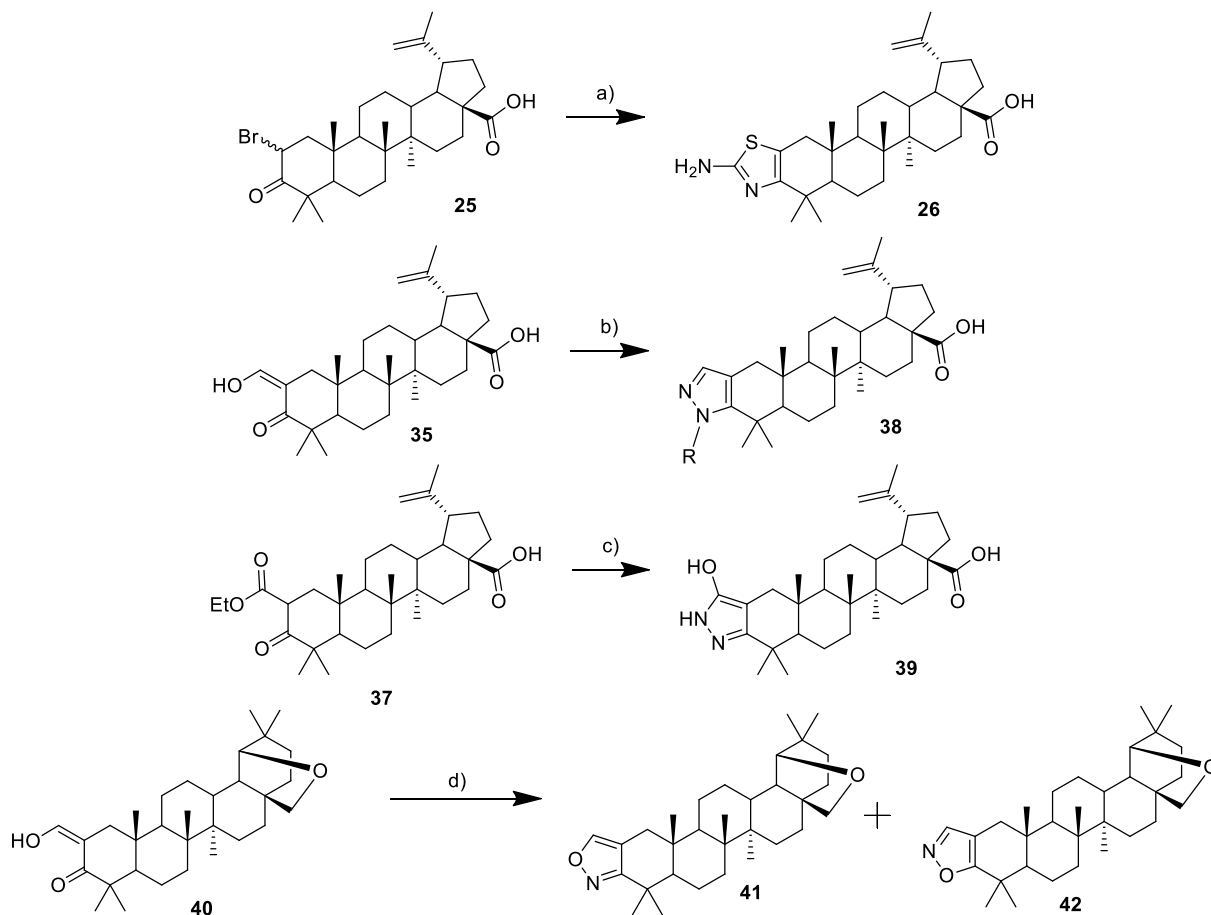


Schéma 11: a) thiomocovina, morfolin, reflux; b) phenylhydrazin, AcOH, reflux; c) hydrazin hydrát, dioxan, reflux; d)  $\text{NH}_2\text{OH}$  hydrochlorid, EtOH, pyridin, reflux<sup>11,12</sup>

Příprava pyrazinového derivátu **43** vychází z 3-oxokyseliny **3**, která je podrobena reakci s ethylendiaminem a sírou v morfolinu při teplotě varu (Schéma 12). Vzniklý derivát vykazuje na nádorové linii CCRF-CEM  $\text{IC}_{50} = 14 \mu\text{mol/l}$ .<sup>4</sup>

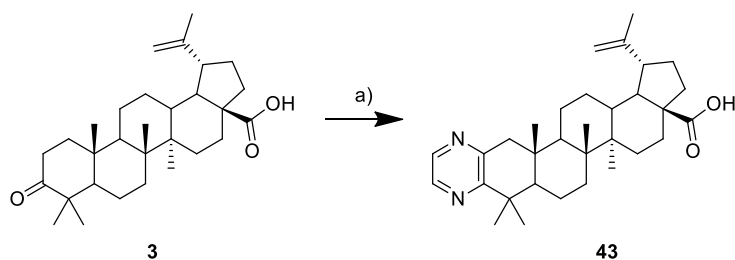


Schéma 12: a) ethylendiamin, morfolin, síra, reflux<sup>4</sup>

Další cyklizační reakcí je příprava derivátu **44**. Jedná se o vícekrokovou syntézu (*Schéma 13*) vycházející z 28-hydroxy-3-oxolup-20(29)-enu (derivát **45**). Prvním krokem je příprava oximu **46** probíhající v 2-methylpropan-2-olu v bazickém prostředí, kde reakčním činidlem je amyl nitrit. Vzniklý oxim **46** je acylován za vzniku aktivního derivátu **44**.<sup>26</sup>

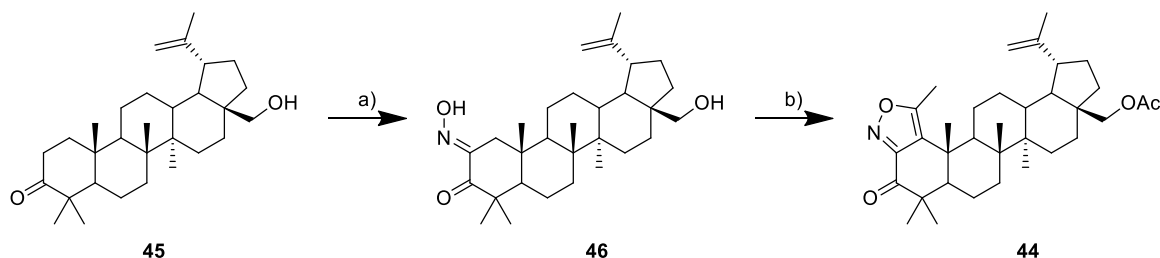


Schéma 13: a) *t*-BuOK, *t*-BuOH, C<sub>5</sub>H<sub>11</sub>ONO; b) AcCl, pyridin<sup>26</sup>

Z derivátu **46** lze připravit triazol **47**, který vzniká reakcí hydrazin hydrátu s kyselinou octovou. Kyselou hydrolyzou lze přetvořit pětičlenný kruh na šestičlenný za vzniku triazinu **48** (*Schéma 14*).<sup>26</sup>

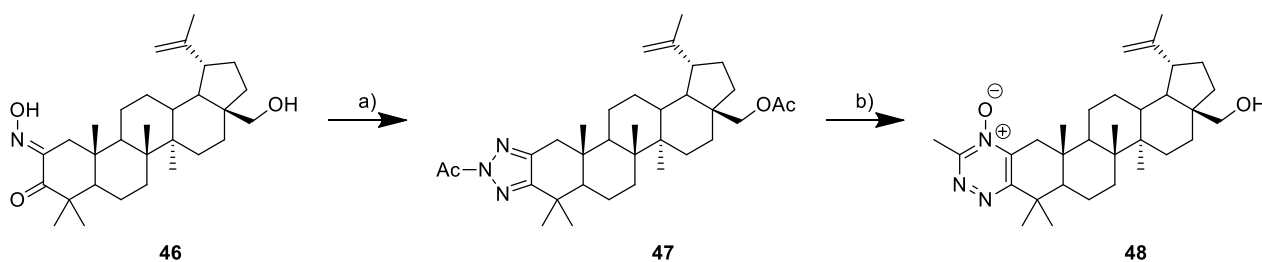


Schéma 14: a) hydrazin hydrát, HOAc; b) EtOH, HCl<sup>26</sup>

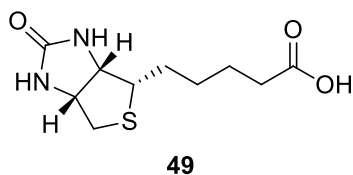
Derivát **46** vykazuje vůči buněčné linii HCT-116 IC<sub>50</sub> = 2.5 μmol/l. Derivát **44** vykazuje v průměru IC<sub>50</sub> 15.5 μmol/l na buněčných liniích HCT-116, RD TE-32, A-549 a HEp-2, hodnoty u jednotlivých buněčných linií se pohybovaly v rozmezí 7 – 22 μmol/l. Derivát **47** nevykazuje na zmíněných liniích významné hodnoty inhibiční koncentrace, avšak deprotektovaná verze tohoto derivátu vykazuje průměrné IC<sub>50</sub> = 4.9 μmol/l u linií HCT-116, RD TE-32 a HEp-2, hodnoty jednotlivých buněčných linií se pohybovaly v rozmezí 2 – 8 μmol/l. Derivát **48** vykazuje vůči linii HEp-2 IC<sub>50</sub> = 4.5 μmol/l.<sup>26</sup>

## 2.3 Konjugace lupanových triterpenů

### 2.3.1 Příklady molekul vhodných ke konjugaci s triterpeny

#### 2.3.1.1 Biotin (49)

Označován jako vitamín H (Obrázek 8) je v živých systémech často vázaný na lyzinové postranní řetězce enzymů podílejících se na karboxylačních reakcích v organismu, jako jsou například pyruvát karboxyláza nebo AcCoA karboxyláza.<sup>27</sup>

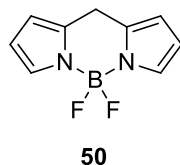


Obrázek 8: Struktura biotinu 49

Konjugáty látek s biotinem jsou často využívány pro studium mechanismu účinku. Ukotvení aktivních biotinilovaných molekul na pevnou fázi modifikovanou avidinem umožní izolovat a charakterizovat proteiny, se kterými tyto molekuly vytváří nekovalentní interakce a které jsou zodpovědné za aktivitu, tzv. molekulární cíle, uspořádání se nazývá pull-down experimenty.<sup>6,28</sup> Znalost molekulárních cílů je pak velmi užitečná při hledání nových inhibitorů pomocí *in silico* metod. Pro přípravu biotinylovaných sloučenin lze použít techniku na pevné fázi s předpřipravenými biotinilovanými linkery.<sup>29</sup> Tato metoda umožňuje spojení studovaných molekul s biotinem např. pomocí n-PEG linkeru.<sup>6</sup>

#### 2.3.1.2 BODIPY (50)

Jedná se o foto stabilní fluorescenční molekuly na bázi fluoridu dipyrromethenboronové kyseliny (Obrázek 9) připravené za účelem konjugace s cílovými molekulami, které potom slouží jako fluorescenční sondy. Díky tomuto spojení mohou být tyto konjugáty trasované a vizualizované fluorescenční mikroskopií.<sup>30</sup>



Obrázek 9: Základní struktura fluorescenční značky BODIPY 50

Jedna z jejich efektivních příprav vychází z fenyلكarbaldehydu (**51**), který je podroben Wittigově reakci (vznik derivátu **52**), následné redukci a konečnému spojení s dimethylpyrrolkarbaldehydem (reagent **53**) za vzniku konjugovatelné molekuly BODIPY **54** (Schéma 15). Vlastní konjugace s cílovými molekulami může být zprostředkována přímou esterovou vazbou molekuly **54** nebo přes linker na pevné fázi.<sup>31,32</sup>

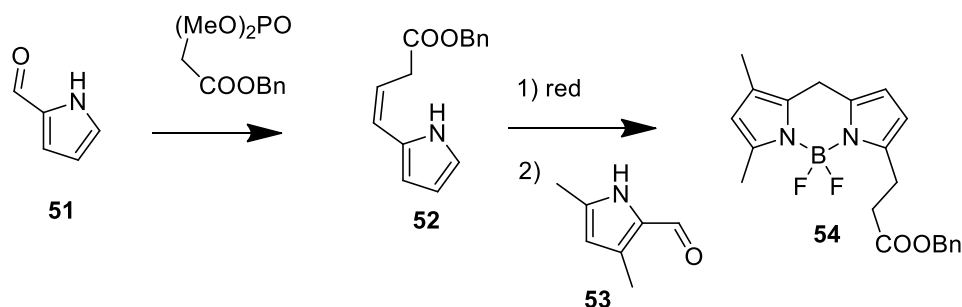
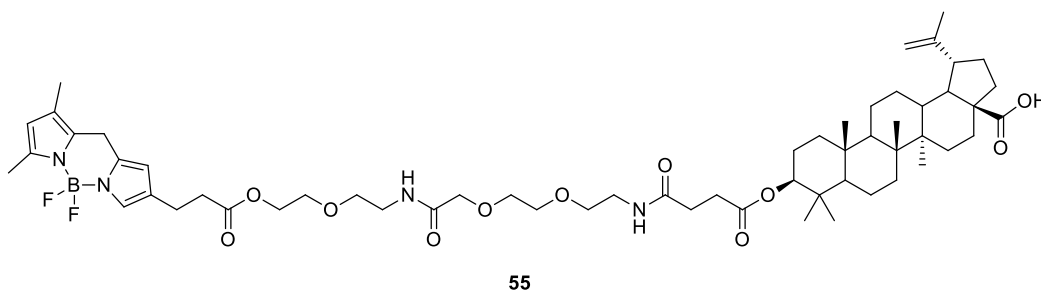


Schéma 15: Schématické znázornění přípravy fluorescenčního značení BODIPY **54**

Konjugáty pentacyklických triterpenů lupanového typu přes PEG linker, jako je například sloučenina **55** (Obrázek 10), vykazují podobné inhibiční aktivity nádorových linií jako vlastní deriváty bez fluorescenčního značení. Avšak deriváty s přímo navázanou značkou na reaktivních skupinách lupanových struktur vykazují zvýšení IC<sub>50</sub> až v desítkách jednotek μmol/l.<sup>31,32</sup>

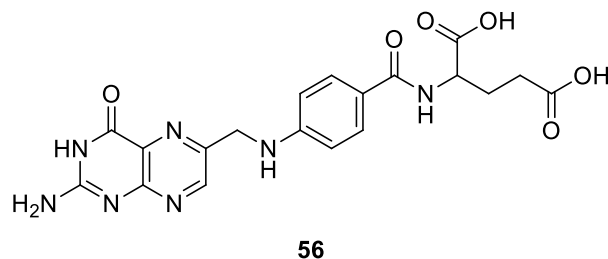


Obrázek 10: Sloučenina **55**

### 2.3.1.3 Kyselina listová (**56**)

Označována jako vitamín B<sub>9</sub> (Obrázek 11), je v organismu využívána zejména pro přenos jednouhlíkatého zbytku. Podílí se na syntéze a modifikaci DNA, proteinů i fosfolipidů. Dostatek kyseliny listové je esenciální v proliferujících buňkách se zrychleným anabolismem.<sup>33</sup> Přisun tohoto kofaktoru do buňky je zprostředkován dvěma typy membránových transportérů (redukováný transportér folátu a folátové receptory). Ve většině nádorových liniích je zvýšená exprese folátových receptorů, což z kyseliny listové činí jednu z významných molekul pro transport cytostatik do nádorových buněk. Molekula kyseliny listové je velmi nepolární, a proto

i velmi málo rozpustná ve vodném prostředí. Její rozpustnost může být zvýšena například modifikací PEG linkery nebo zapouzdřením v dextranových kapsulích.<sup>33–36</sup>

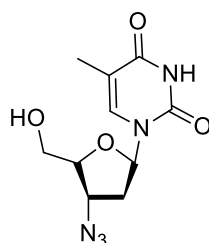


Obrázek 11: Struktura kyseliny listové **56**

#### 2.3.1.4 Antivirotika

V dnešní době zůstávají virová onemocnění rizikem pro člověka. Množství forem genetické informace virů a provázání života virionů s buněčným cyklem hostitelských buněk znesnadňuje přístup pro přípravu vhodných terapeutik cílených na zneškodnění virových částic v organismu.<sup>37</sup> Vývoj léčiv s antivirotickými účinky je proto zaměřen hlavně na povrchové proteiny virionu, čímž je zamezeno šíření viru v organismu nebo na samotnou genetickou informaci viru, která může být blokována, aby tak nedošlo k její replikaci.<sup>37</sup> V případě retrovirových infekcí lze cílit na enzym reverzní transkriptázu. Jedna z metod léčby rychle se adaptujících chorob je použití kombinovaných terapeutik. Aplikací směsí léčiv je docíleno částečné zamezení nebo zpomalení vzniku lékové rezistence. Některá virová onemocnění jsou příčinou oslabení imunitního systému jedince, který je následně náchylnější k získání dalších infekcí způsobených okolními patogeny. Například virus HIV často doprovází HSV viry.<sup>37–39</sup>

Jedním z antivirotik vhodných ke konjugaci s lupanovými triterpeny je azidothymidin (**57**, obrázek 12), komerční anti-HIV terapeutikum fungující na principu inhibice reverzní transkriptázy. Azidothymidin dle literatury vykazuje slabé cytostatické účinky.<sup>3</sup>



**57**

Obrázek 12: Struktura azidothymidinu **57**

Derivatizace probíhá formou 1,3-dipolární cykloadice azidové skupiny nanázané na antivirotikum **57** s 28-propargylesterem kyseliny betulinové (**58**, schéma 16) za vzniku derivátu **59**. Sloučenina **59** vykazuje zvýšení antivirotické aktivity na buněčných liniích infikovaných virem HIV: KB ( $IC_{50} = 5.9 \mu\text{mol/l}$ ) a G2 ( $IC_{50} = 7 \mu\text{mol/l}$ ).<sup>3</sup>

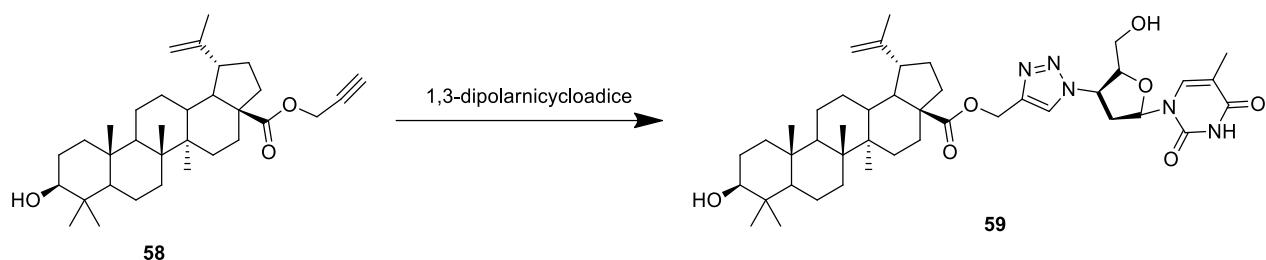


Schéma 16: Příklad 1,3 dipolární cykloadice

### 2.3.2 Příklady konjugačních procesů

Molekuly lze spojovat vícero způsoby, například přímo chemickou vazbou jejich funkčních skupin, vytvořením nové uhlíkové vazby nebo skrze tzv. raménko, které zvýší vzdálenost spojených molekul. Konjugací vícero biologicky aktivních molekul může být vytvořeno například pro-drug, také může být navýšen nebo modifikován požadovaný biologický efekt, popřípadě mohou být modifikovány farmakologické vlastnosti.

Ke spojení látek přímou vazbou dochází například při esterifikaci, například příprava derivátu **60** (Schéma 17), která vychází z kyseliny betulonové (**3**). Kyselina **3** je reagována s propargyl bromidem v THF za přítomnosti uhličitanu draselného jako báze. Dochází ke vzniku látky **60**.<sup>15</sup>

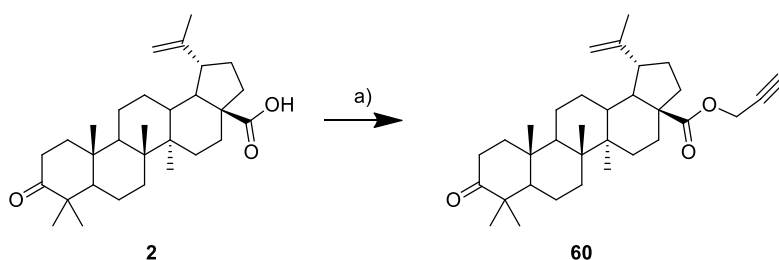


Schéma 17: a) propargylbromid, THF,  $K_2CO_3$ , r.t.<sup>15</sup>

Spojení dvou látek přes raménko (linker) je často využíváno v případě potřeby dvě konjugované molekuly od sebe prostorově oddálit, například ze sterických důvodů. V tomto uspořádání lze s výhodou použít metodiku syntézy na pevné fázi, kdy je linker navázán na pryskyřici a následně jsou derivatizovány jeho funkční skupiny.<sup>6,32</sup> Díky flexibilitě a variabilní délce zvolených linkerů je výhodné tento typ spojení využít ke konjugaci dvou stericky objemných molekul, které by právě kvůli svému prostorovému uspořádání nemohly vytvořit



konjugát nebo by si navzájem blokovaly možnost interakcí s proteiny a jinými biomolekulami. Tento typ spojení se využívá např. ke studiu mechanismu účinku molekul nebo ke studiu specifických proteinových interakcí. Některé polární linkery mohou upravovat i farmakologické vlastnosti léčiva, jako je například jeho biologická dostupnost. Jedním z nejčastějších typů raménka bývá PEG linker zakončený různými funkčními skupinami, jako je například amino-azidový linker. Druhou skupinou látek bývají alkanové řetězce.<sup>6,29,32</sup>

Jedna z metod přípravy těchto konjugátů je uvedena v lit.<sup>32</sup>, kdy je aminomethyl polystyrenová pryskyřice modifikována amidovým linkerem BAL (**61**). Následně je provedena reductivní aminace za vzniku sekundárního aminu **62**, který je ochráněn pomocí Fmoc a je připojena konjugovaná molekula BODIPY za vzniku derivátu **63**. Po deprotekcí Fmoc je aplikováno aktivační činidlo DIC za přítomnosti HOBt a je provedena acylace za vzniku látky **64**, která je následně ochráněna a konjugována s lupanovými triterpeny pomocí volné aminoskupiny (Schéma 18).<sup>32</sup>

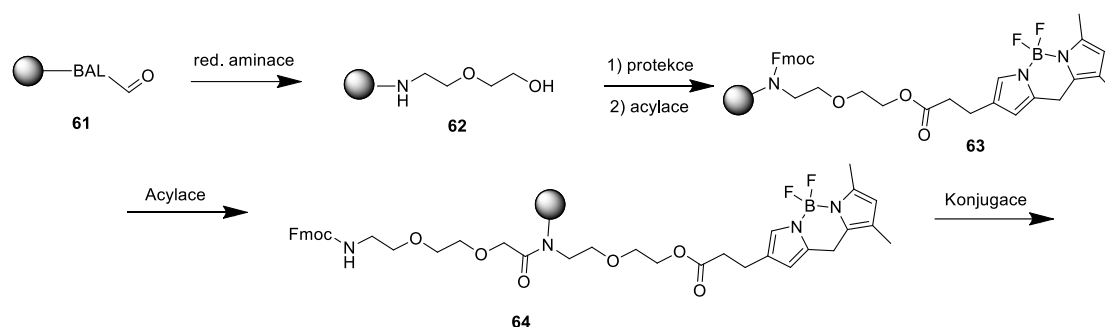
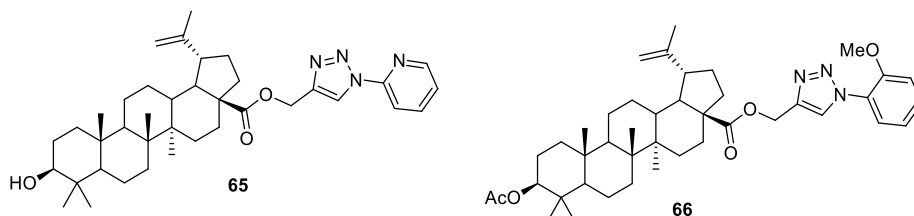


Schéma 18: Schématické znázornění přípravy derivátu **63** na pevné fázi<sup>32</sup>

### 2.3.2.1 1,3-dipolární cykloadice

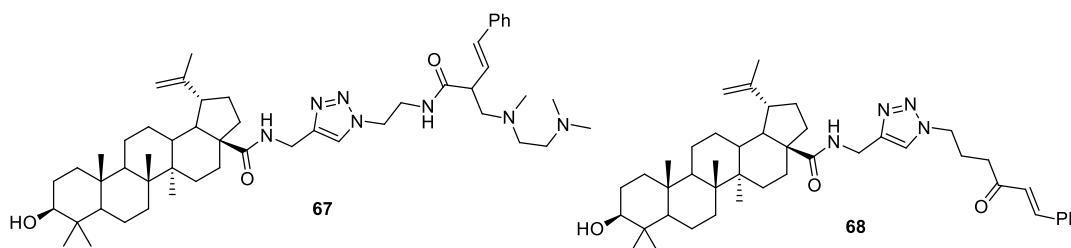
Huisgenova 1,3-dipolární cykloadice je efektivní a jednoduchý způsob spojení dvou molekul a je vhodný i pro přípravu konjugátů lupanových triterpenů. Do reakce vstupuje dipól s dipolarofilem a vzniká cyklický produkt. Obvykle se jedná o reakci azidu s alkyne, která probíhá při 40 °C za přítomnosti měďných iontů produkovaných přímo v reakci a u terpenů je vhodné použít *t*-BuOH jako rozpouštědlo.<sup>40</sup>

Pomocí 1,3-dipolární cykloadice byly připraveny deriváty **65** a **66** (Obrázek 13), které vykazovaly cytotoxickou aktivitu na leukemické linii CCRF-CEM. Pro látku **65** bylo stanoveno  $IC_{50} = 3.3 \mu\text{mol/l}$  a pro derivát **66** bylo stanoveno  $IC_{50} = 8.5 \mu\text{mol/l}$ .<sup>41</sup>



Obrázek 13: Deriváty **65** a **66**

V lit.<sup>42</sup> jsou popsány konjugáty lupanových triterpenů s produkty Baylis-Hilmanovy kondenzace. Vybrané látky **67** a **68** (Obrázek 14) se ukázaly být aktivní na buněčné linii rakoviny prsu 4T1, kdy látka **67** vykazovala  $IC_{50} = 2.4 \mu\text{mol/l}$  a látka **68** vykazovala  $IC_{50} = 2.6 \mu\text{mol/l}$ .<sup>42</sup>



Obrázek 14: Deriváty **66** a **67**

### 2.3.2.2 Cross-coupling

Reakce tohoto typu probíhají podle katalytického cyklu cross-couplingových reakcí. Dochází k interakci organokovových sloučenin s elektrofilu. Reakce bývají katalyzovány komplexy přechodných kovů, hlavně paládia nebo platiny.

Suzuki-Miyaura reakce lze aplikovat i na pentacyklické triterpeny lupanového typu. Cílem vytvoření vazby uhlík-uhlík může být například poloha C-3 jako je například u látky **2**, kde je substituována hydroxylová skupina za vhodnou odstupující skupinu. Může být také modifikována poloha C-2, jako například u látek **25** (Obrázek 6, str. 26) a **31** (Schéma 9, str. 28).<sup>43</sup>

Vlastní reakce zahrnuje několik kroků. Jedná se o oxidativní adici, transmetalaci a redukční eliminaci. Dochází k reakci boronové kyseliny s vhodnou odstupující skupinou, jako je například triflátová nebo halogenová skupina, za katalýzy komplexy paládia. Celý tento proces je nazýván katalytický cyklus cross-couplingové reakce a je detailně popsán v lit.<sup>43</sup>

Jednou z možných využití této reakce může být příprava antivirotických derivátů **71**, **72**, **73** (Obrázek 15) a **74** (Schéma 19). Kyselina betulinová (**2**) je ochráněna a oxidována za vzniku derivátu **69**, který je převeden na triflát **70** a následně podroben Suzuki-Miyaura cross-couplingu a dvoukrokové deprotekcí za vzniku látky **71**. Následně byly provedeny reakce modifikující karboxylovou skupinu v poloze C-30.<sup>39</sup>

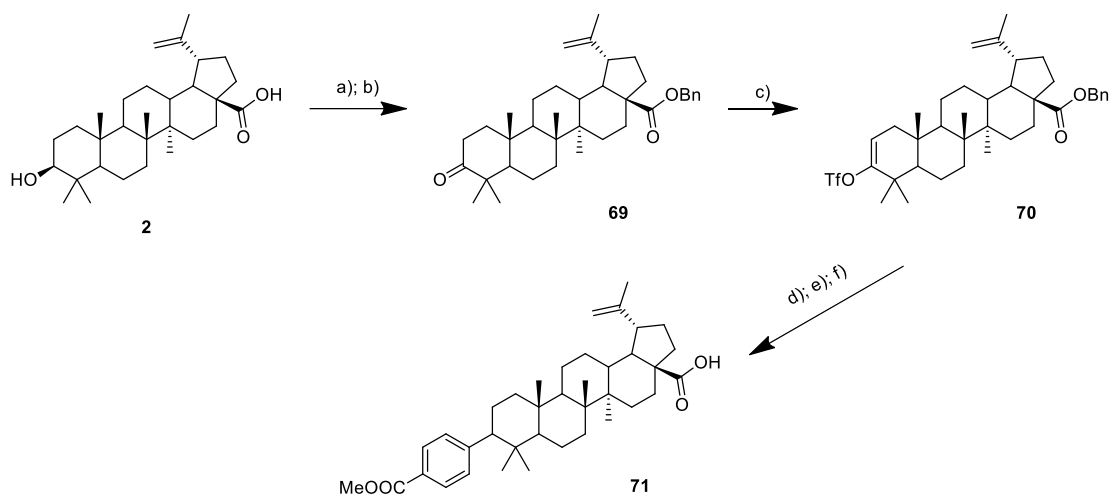
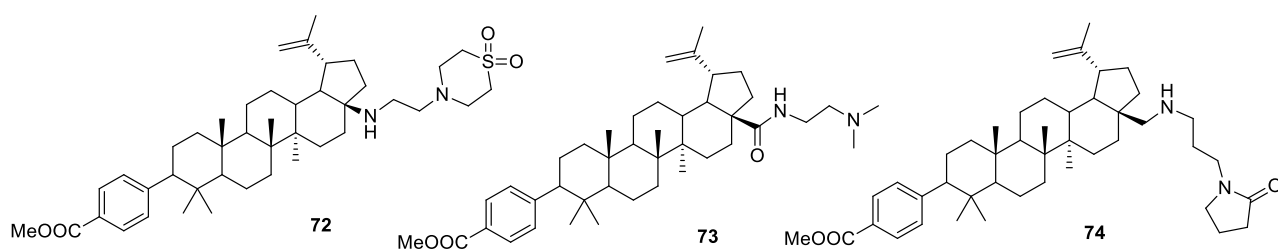


Schéma 19: a) BnBr, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, DMF; b) PCC, DCM; c) KHMDS, PhNTf<sub>2</sub>, THF, -78 °C; d) (4-(methoxycarbonyl)phenyl)boronic acid, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Pd(Ph<sub>3</sub>P)<sub>4</sub>, 1,4-dioxane/*i*-PrOH/H<sub>2</sub>O, reflux; e) TBDMSCl, Pd(OAc)<sub>2</sub>, TEA, DCE, 60 °C; f) TBAF, H<sub>2</sub>O/1,4-dioxane, r.t.<sup>39</sup>

Vzniklá knihovna osmi látek byla testována na buněčných liniích infikovaných virem HIV. Neaktivnějšími látkami byly deriváty **72**, **73** a **74** (Obrázek 15). Derivát **72** vykazoval na buněčné linii WT IC<sub>50</sub> = 1.9 μmol/l. Derivát **73** vykazoval na buněčné linii WT IC<sub>50</sub> = 2.3 μmol/l. Derivát **74** vykazoval na buněčné linii WT IC<sub>50</sub> = 0.7 μmol/l.<sup>39</sup>



Obrázek 15: Sloučeniny **72**, **73** a **74**

## 3 Diskuse

### 3.1 Příprava výchozích sloučenin

#### 3.1.1 Příprava dibenzyl 3-oxolup-20(29)-en-28,30-dioátu

##### (Dibenzylester 75)

Syntéza molekuly **75** (*Schéma 20*) vychází z kyseliny betulinové (**2**), jejíž karboxylová skupina byla v prvním reakčním kroku ochráněna alkylací benzylbromidem<sup>44</sup> v bazickém prostředí  $K_2CO_3$  v THF po dobu 36 h při laboratorní teplotě za vzniku derivátu **76** s výtěžkem po zpracování 86 %. Do reakce bylo po 24 h přidáno nadstandardní množství benzylbromidu, kvůli zvýšení konverze reakce. Následně reagovala látka **76** s oxidem seleničitým v dioxanu při 115 °C po dobu 4 h. Došlo k allylové oxidaci v poloze C-30 a vzniku derivátu **77**.<sup>45</sup> Výtěžek 54 % (po zpracování) byl způsoben vznikem vedlejšího produktu, který nebyl izolován. Zastoupení obou látek je dle TLC analýzy přibližně 1:1. Další reakcí ve schématu je Pinnickova oxidace<sup>46</sup> derivátu **77**. Dochází k reakci látky **77** s chloritanem sodným v prostředí dihydrogenfosforečnanu draselného. Jako rozpouštědlo byla použita směs vody, 2-methylpropan-2-olu a amyleny v poměru 4:2:1.<sup>32</sup> Reakce probíhala 18 h za laboratorní teploty a za intenzivního míchání. Vznikl tak derivát **78** s výtěžkem po zpracování 86 %. Amylen je ve směsi rozpouštědel přítomen kvůli záchytu radikálů vznikajících při oxidaci, intenzivní míchání je nutné kvůli udržení rozpouštědel ve stavu emulze. Dalším krokem syntézy byla ochrana nové karboxylové funkce v poloze C-30. Látka **78** byla alkylována benzylbromidem podobně jako při vzniku látky **76**. Po 18 h reakce došlo pouze k přibližně 50% konverzi (monitorováno pomocí TLC), proto bylo provedeno zpracování formou extrakce a preparativní chromatografie na normální fázi. Nezreagovaný derivát **78** byl opětovně podroben benzylační reakci s benzylbromidem při 40 °C po dobu 48 h. Po spojení obou frakcí vzniklého derivátu **79** byl celkový výtěžek 94 %. Posledním krokem přípravy látky **75** byla oxidace látky **79** v poloze C-3 pomocí dichromanu sodného<sup>8</sup> v dioxanu s přidavkem kyseliny octové, acetanhydridu a octanu sodného. Reakce probíhala za laboratorní teploty po dobu 24 h. Docházelo k postupnému přechodu oranžové barvy dichromanu do tmavě zelené barvy chromitých iontů. Výtěžek reakce byl po zpracování 48 % látky **75**. Nízký výtěžek reakce byl způsoben vznikem velkého množství vedlejších produktů oxidace (monitorováno pomocí TLC).

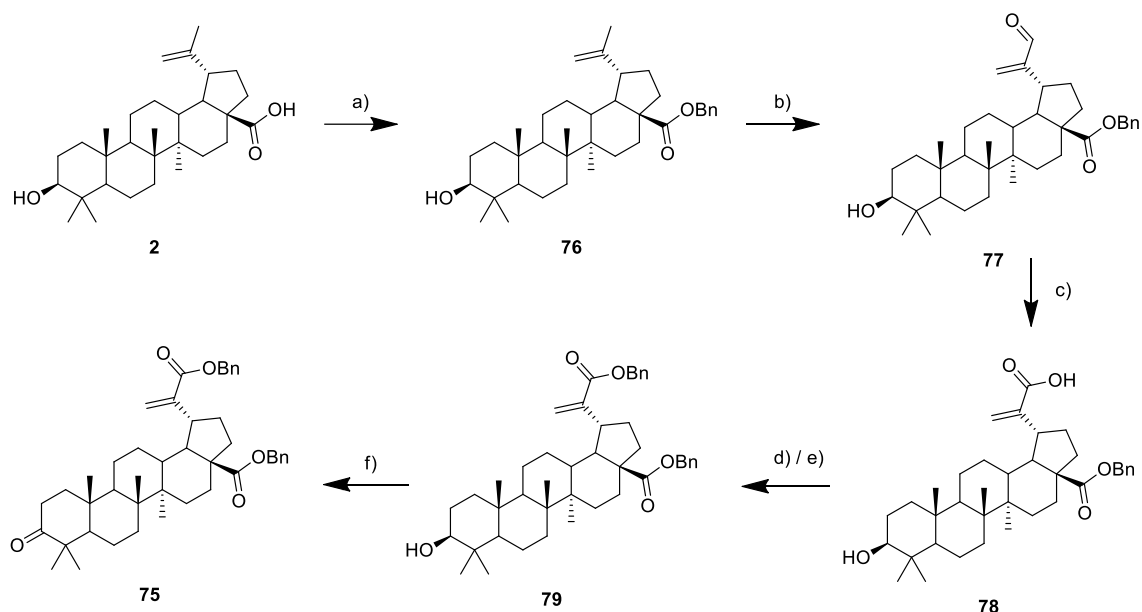


Schéma 20: a) BnBr, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, THF, 36 h, r.t.; b) SeO<sub>2</sub>, dioxan, 4 h, 115 °C; c) NaClO<sub>2</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, voda/*t*-BuOH/amylen (4:2:1), 18 h, r.t.; d) BnBr, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, THF, 18 h, r.t.; e) BnBr, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, THF, 48 h, 40 °C; f) Na<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, NaOAc, HOAc, AcO<sub>2</sub>, dioxan, 24 h, r.t.

Struktury jednotlivých sloučenin byly potvrzeny analýzou spektrálních dat v <sup>1</sup>H NMR experimentu. Sloučeniny **76**, **77**, a **78** jsou popsány, proto byla jejich spektra porovnána s lit.<sup>44</sup> a nebo se standardy látek připravených v naší výzkumné skupině. U látky **75** byla provedena spektrální analýza pomocí HRMS, IR spektra, <sup>1</sup>H a <sup>13</sup>C NMR. V <sup>1</sup>H NMR spektru lze pozorovat multiplet v rozmezí δ 7.29 – 7.38 ppm. Jedná se o deset aromatických vodíků dvou benzylových chránících skupin. Dále jsou zde přítomny singlety geminálních vodíků dvojně vazby H-29 při δ 6.08 ppm (*pro-Z*) a 5.57 ppm (*pro-E*). Benzylové chránící skupiny pak potvrzují přítomnost čtyř dubletů diastereotopních vodíků (AB systém) při δ 5.22 a 5.17 ppm s interakční konstantou J = 12.4 Hz pro 28-benzylester a δ 5.14 a 5.10 ppm s interakční konstantou J = 12.1 Hz pro 30-benzylester. Struktura triterpenu je dále prokázána charakteristickými signály, jako jsou vodík H-19β, který vytváří triplet dubletů při δ 3.35 ppm s interakčními konstantami J<sub>1</sub> = 11.3 Hz a J<sub>2</sub> = 4.3 Hz. Dalším důležitým indikátorem přítomnosti lupanových triterpenů je pět singletových signálů methylových skupin v přibližném rozmezí δ 1.06 – 0.76 ppm. Doplnující informace o struktuře látky **75** byly získány pomocí HRMS analýzy, kdy byl potvrzen molekulový iont produktu a jeho přesný sumární vzorec. V IR spektrometrii, byly ve pozorovány charakteristické pásy pro karbonylovou skupinu při 1716 cm<sup>-1</sup>. Podobným způsobem byly identifikovány i látky které se strukturně blíží diskutované látce **75**.

### 3.1.2 Příprava 3-oxolup-20(29)-en-28,30-diové kyseliny (Dikyselina 80)

Prvním krokem syntézy derivátu **80** (*Schéma 21*) byla příprava látky **81** vycházející z kyseliny betulínové (**2**). Byla provedena allylová oxidace v poloze C-30 pomocí oxidu seleničitého<sup>45</sup> v 2-metoxyethanolu při 140 °C po dobu 1.5 h. Při zpracování preparativní kapalinovou chromatografií nedošlo k dokonalému oddělení vedlejšího produktu reakce, kvůli podobnému retenčnímu času dvou produktů. Výtěžek po zpracování činil 64 %. Druhým krokem reakčního *schématu 21* byla Pinnickova oxidace<sup>46</sup> derivátu **81**. Reakce chloritanu sodného probíhala v prostředí dihydrogenfosforečnanu draselného ve směsi vody, 2-methylpropan-2-olu a amylenu 4:2:1<sup>32</sup> po dobu 18 h při laboratorní teplotě. Produkt byl krystalizován na koloně sloupcové chromatografie pomocí mobilní fáze obsahující hexan, ethylacetát a methanol v poměru 6:2:1, kdy došlo k odmytí nečistot. Následně byl produkt vymyt z kolony pomocí chloroformu. Výtěžek po zpracování byl 80 %. Vzniklý derivát **82** byl oxidován dichromanem sodným<sup>8</sup> ve směsi dioxanu, kyseliny octové a acetanhydridu za přítomnosti octanu sodného po dobu 24 h při laboratorní teplotě. Látka **82** se jevila velmi málo rozpustná ve směsi rozpouštědel, ani po 24 h nebyl veškerý derivát rozpuštěn, byl proto přidán dioxan a teplota zvednuta na 80 °C. V průběhu reakce oranžový roztok měnil barvu přes tmavě modrou, černou až do sytě zelené barvy. Barevný přechod byl způsoben redukcí chromové soli. V reakční směsi vznikalo dle TLC analýzy velké množství vedlejších produktů a ani po 72 h reakce nedošlo k úplné konverzi výchozí látky. Byl izolován derivát **80** s výtěžkem 16 % po zpracování. Nízký výtěžek byl způsoben špatnou rozpustností látky **82** v kyselině, což vedlo k nízké konverzi reakce, spolu se vznikem velkého množství vedlejších produktů oxidace.

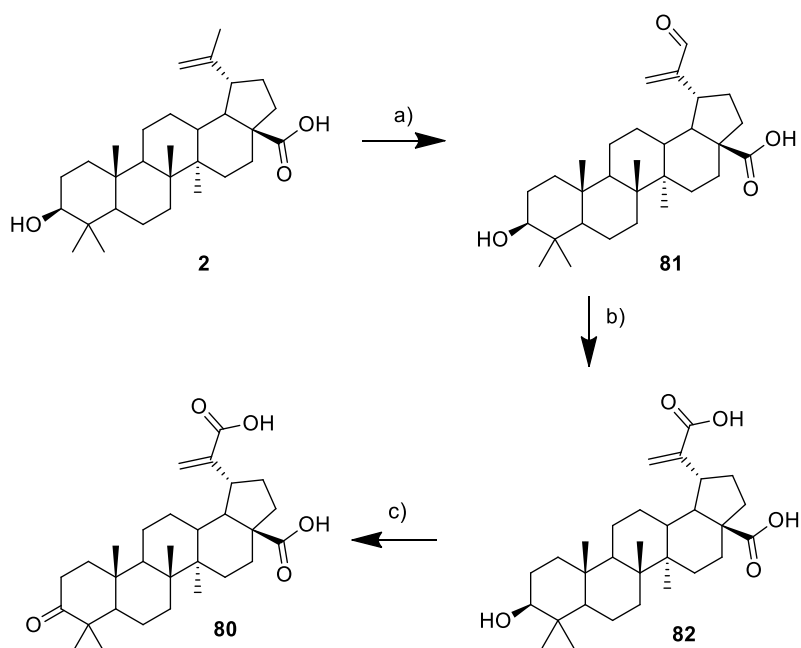


Schéma 21: a)  $\text{SeO}_2$ , 2-metoxiethanol,  $140\text{ }^\circ\text{C}$ , 1,5 h; b)  $\text{NaClO}_2$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , voda/*t*-BuOH/amylen (4:2:1), 18 h, r.t.; c)  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ , NaOAc, HOAc,  $\text{AcO}_2$ , dioxan, 72 h, r.t. –  $80\text{ }^\circ\text{C}$ .

Veškeré deriváty byly podrobeny strukturní analýze pomocí  $^1\text{H}$  NMR spektrometrie. Deriváty **81** a **82** jsou známy a proto byly jejich spektrální údaje porovnány s lit.<sup>32,47</sup>. Derivát **80** byl analyzován pomocí  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR spektrometrie. Strukturní údaje byly doplněny o IR a HRMS analýzy. V  $^1\text{H}$  NMR spektru lze pozorovat geminální singlety protonů dvojně vazby H-29 při  $\delta$  6.28 ppm (*pro-Z*) a 5.70 ppm (*pro-E*). Jejich posun  $\delta$  ukazuje na elektronově bohatou karboxylovou skupinu v poloze C-30. Dále triplet dubletu H-19 $\beta$  při  $\delta$  3.46 ppm s interakčními konstantami  $J_1 = 11.1\text{ Hz}$  a  $J_2 = 5.1\text{ Hz}$ . Další důležitou informací o lupanovém skeletu poskytuje pět singletů methylových protonů v rozmezí  $\delta$  0.92 – 1.07 ppm. Pomocí HRMS analýzy byl nalezen molekulový iont derivátu **80** a byl potvrzen sumární vzorec látky. IR spektrometrie ukázala přítomnost karbonylového uhlíku signálem při  $1683\text{ cm}^{-1}$ . Podobným způsobem byly identifikovány látky strukturně podobné s derivátem **80**.

### 3.1.3 Příprava 28-benzylesteru kyseliny 3-oxolup-20(29)-en-28,30-diové (Kyselina 83)

Prvním krokem přípravy výchozí látky **83** (*Schéma 22*) bylo ochránění funkční karboxylové skupiny kyseliny betulínové (**2**). Látka **2** byla reagována s benzylbromidem<sup>44</sup> v bazickém prostředí uhličitanu draselného v THF. Bylo monitorováno pH reakce pomocí lakmusového pH papírku. Po 24 h reakce bylo pH přibližně 7, proto byl do reakce přidán hydroxid draselný, jako silnější báze, a teplota reakce byla zvýšena na 60 °C. Po 48 h vznikl derivát **76** s 69% výtěžkem po zpracování. Látka **76** byla následně oxidována v allylové poloze C-30 pomocí oxidu seleničitého<sup>45</sup> v 2-metoxyethanolu při 140 °C po dobu 3 h. Výtěžek derivátu **77** byl po zpracování 78 %, snížený výtěžek reakce byl způsoben vznikem neizolovaného vedlejšího produktu. Látka **77** byla oxidována dichromanem sodným<sup>8</sup> v dioxanu za přítomnosti kyseliny octové, acetanhydridu a octanu sodného při laboratorní teplotě po dobu 18 h. Jako jeden z vedlejších produktů reakce byl i derivát **83**, který vznikal v minoritním množství. Při optimalizaci reakčního času nedošlo ke zvýšení poměru produktu **83** oproti ostatním minoritním produktům. Výtěžek látky **84** byl po zpracování 60 %, snížený výtěžek byl způsobený zmíněným vznikem velkého množství vedlejších produktů, které nebyly dále charakterizovány. Posledním krokem z reakčního *schématu 22* byla Pinnickova oxidace<sup>46</sup> látky **84**, kdy došlo k reakci s chloritanem sodným v prostředí dihydrogenfosforečnanu draselného ve směsi vody, 2-methylpropan-2olu a amylenu v poměru 4:2:1.<sup>32</sup> Reakce probíhala při intenzivním míchání po dobu 24 až 48 h. Reakce byla nejprve optimalizována v malém měřítku, kdy byl pomocí TLC analýzy monitorován vliv teploty a poměr oxidačního činidla s pufrem na konverzi výchozí látky v produkt. Výtěžek látky **83** byl po optimalizaci a zpracování 72 %.



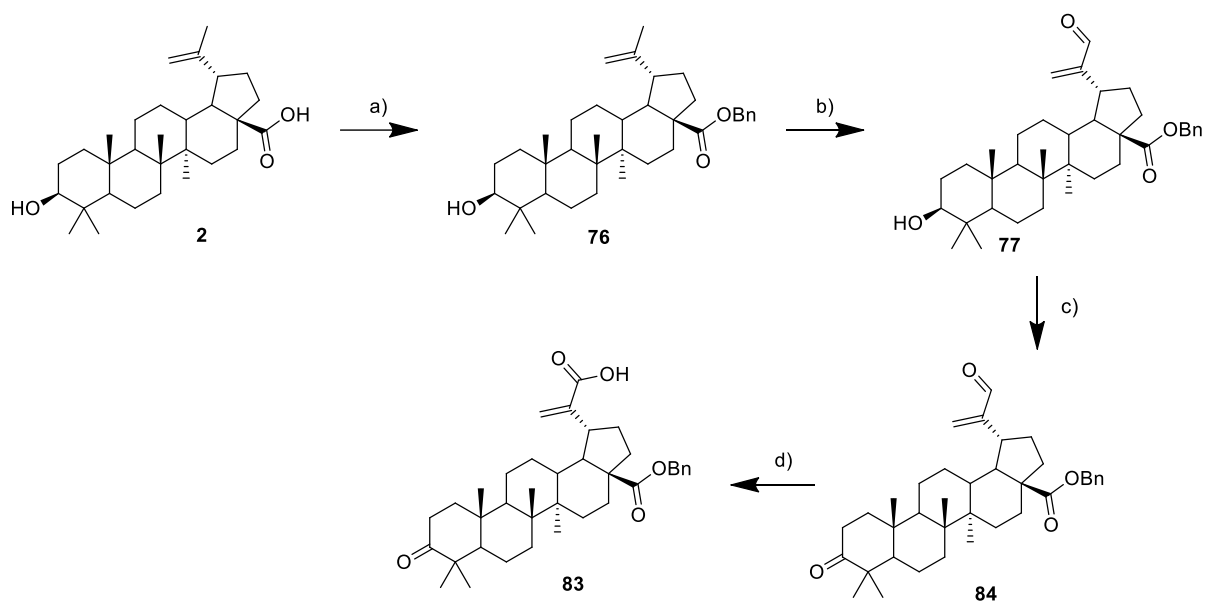
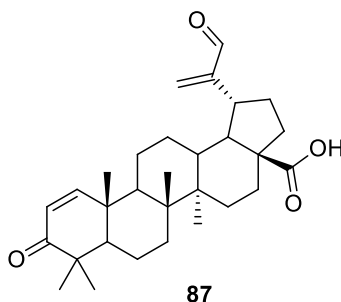


Schéma 22: a) BnBr, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, KOH, THF, 48 h, r.t. – 60 °C; b) SeO<sub>2</sub>, 2-metoxyethanol, 3 h, 140 °C; c) Na<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, NaOAc, HOAc, AcO<sub>2</sub>, dioxan, 18 h, r.t.; d) NaClO<sub>2</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, voda, *t*-BuOH, amylen, 48 h, r.t.

Struktury jednotlivých sloučenin byly potvrzeny analýzou spektrálních dat. Sloučeniny **76** a **77** jsou známy, proto byla jejich spektra porovnána s lit.<sup>44</sup> a nebo se standardy látek připravených v naší výzkumné skupině. U látky **83** a **84** byly provedeny spektrální analýzy pomocí <sup>1</sup>H a <sup>13</sup>C NMR, HRMS a IR spektrometru. V <sup>1</sup>H NMR spektru derivátu **83** lze pozorovat multiplet v rozmezí δ 7.30 – 7.39 ppm. Jedná se o pět aromatických vodíků benzylové chránicí skupiny v poloze C-28. Další výrazný prvek ve spektru jsou dva geminální singlety při δ 6.22 a 5.68 ppm patřící vodíkům H-29 (*pro-Z* a *pro-E*) dokazující přítomnost dvojné vazby mezi atomy C-20(29). Dva signály dubletů v AB systému při δ 5.17 a 5.10 ppm s interakční konstantou  $J = 12.2$  Hz potvrzují přítomnost diastereotopických protonů benzylové chránicí skupiny. Terpenickou strukturu pak dokazují charakteristické prvky lupanového spektra, které jsou H-19β triplet dubletu při δ 3.38 s interakčními konstantami  $J_1 = 11.1$  Hz a  $J_2 = 4.8$  Hz. Dále pak pět singletů methylových skupin v rozmezí δ 1.06 – 0.78 ppm. Doplňující informace o struktuře látky **83** byly získány pomocí HRMS analýzy, kdy byl potvrzen molekulový iont produktu a sumární vzorec látky **83**. IR spektrometrie, ukazuje charakteristické pásy pro karbonylové funkční skupiny při 1686 cm<sup>-1</sup>. Podobným způsobem byly identifikovány i látky, které se strukturně blíží diskutovanému derivátu **83**.

### 3.1.4 Příprava 28-(TBDPS)esteru kyseliny 3-oxolup-20(29)-en-28,30-diové (Kyselina 85) a 28-(TBDMS)esteru kyseliny 3-oxolup-20(29)-en-28,30-diové (Kyselina 86)

Prvním krokem přípravy kyselin **85** a **86** (Schéma 23) byla oxidace kyseliny betulínové **2** na 3-oxokyselinu **3**, která byla provedena dichromanem sodným<sup>8</sup> ve směsi dioxanu, kyseliny octové a acethanhydridu za přítomnosti octanu sodného. Směs byla míchána při 50 °C po dobu 18 h. V průběhu se změnilo zbarvení roztoku reakční směsi z oranžového do tmavě zeleného až černého roztoku. Barevný přechod indikuje redukci chromových solí. Vzniklá látka **3** byla získána s 85% výtěžkem po zpracování. Druhým krokem byla allylová oxidace polohy C-30 pomocí oxidu seleničitého<sup>45</sup> v 2-methoxyethanolu při 140 °C po dobu 3 h. Reakce byla monitorována pomocí TLC analýzy. V reakční směsi vznikaly dva produkty. Po úplné konverzi výchozího derivátu **3** byla reakční směs zpracována a majoritní produkt izolován. Dle <sup>1</sup>H NMR analýzy se jedná o vedlejší produkt reakce **87** (Obrázek 16) s výtěžkem 86 %, produkt bude dále charakterizován v Experimentální části této práce. Minoritní produkt reakce odpovídá dle <sup>1</sup>H NMR spektra derivátu **88**, jehož retenční čas se při preparativní kapalinové chromatografii velice blíží vzniklé látce **87**, proto se podařilo izolovat látku **88** pouze v množství potřebném pro analýzu. Reakce byla dále optimalizována dle lit.<sup>48,49</sup> (Tabulka 1).



Obrázek 16: Derivát 87, vedlejší produkt allylové oxidace

rce.	SeO <sub>2</sub>	t-BHP	rozp.	konverze 24h (TLC)	konverze 48h (TLC)	nečistoty
A	0.3 eq	3 eq	DCM : HOAc / 3:2	50%	75%	Ano
B	0.6 eq	3 eq	DCM : HOAc / 3:2	75%	100%	Ano
C	0.9 eq	3 eq	DCM : HOAc / 3:2	90%	100%	Ano
D	0.3 eq	4 eq	DCM : HOAc / 3:2	50%	75%	Ano
E	0.3 eq	5 eq	DCM : HOAc / 3:2	80%	90%	Ano
F	0.3 eq	6 eq	DCM : HOAc / 3:2	80%	100%	Málo
G	0.3 eq	3 eq	tol. : HOAc / 3:2	30%	50%	Ano
H	0.3 eq	3 eq	1,4-dioxan : HOAc / 3:2	25%	40%	Ano
I	0.3 eq	3 eq	2-methoxyEt. : HOAc / 3:2	10%	10%	Ano
J	0.3 eq	3 eq	MeOH : HOAc / 3:2	0%	0%	Ano
K	0.3 eq	3 eq	DCM : HOAc / 1:5	90%	100%	Málo

Tabulka 1: Tabulka optimalizace přípravy derivátu **88**. V prováděných experimentech bylo optimalizováno množství oxidu seleničitého, t-BHP a poměry rozpouštědel. Konverze je uváděna pouze přibližná dle intenzity skvrn na TLC destičkách. Nečistoty značí přítomnost vedlejších produktů, kdy Ano značí srovnatelnou intenzitu všech vznikajících produktů a Málo značí konverzi ve prospěch produktu **88**.

Optimalizace reakce probíhala v 1 ml roztoku s 20 mg výchozí látky **3** při laboratorní teplotě po dobu 48 h. V průběhu byly reakce monitorovány pomocí TLC. Stupeň konverze byl určen odhadem dle intenzity skvrny na vypálené TLC destičce. Nejlépe probíhaly následující optimalizační kroky: Nejprve reakce **C** (Tab. 1) s 0.9 ekvivalenty oxidu seleničitého, která proběhla zhruba z 90 % již po 24 h reakčního času. V reakční směsi reakce **C** (Tab. 1) byly dle TLC určeny tři minoritní produkty oxidační reakce v intenzitě 10 % každý. Další vhodně probíhajícím optimalizačním krokem byla reakce **F** (Tab. 1). V tomto kroku bylo použito 9 ekvivalentů *tert*-butyl hydroperoxidu, což odpovídalo trojnásobku doporučeného množství<sup>49</sup>. Po 24 hodinách reakčního času byla přibližná konverze 80 %. Nečistoty dle TLC analýzy byly přítomny s velmi malou, téměř nepostřehnutelnou, intenzitou. Při optimalizaci rozpouštědla byl vybrán jako nejefektivnější krok **K** (Tab. 1) s nadbytkem kyseliny octové ve směsi DCM : HOAc. Po 24 h reakčního času byla dle TLC intenzita skvrny produktu přibližně 90 % s velmi malou intenzitou skvrn vedlejších produktů. Totožnost jednotlivých látek byla ověřena standardy z předchozích syntéz. Po 48 h reakčního času byly všechny reakce zpracovány dohromady a byly izolovány produkty **87** a **88**. Jejich totožnost byla ověřena pomocí <sup>1</sup>H NMR analýzy. Jako vhodné reakční podmínky pro syntézu byla zvolena reakce **F** (Tab. 1) pro poměr reagentů a reakce **K** (Tab. 1) pro rozpouštědlo. Reakční doba 24 h, při laboratorní teplotě.

Reakcí oxidu seleničitého s *tert*-butyl hydroperoxidem v kyselině octové s 20 % DCM při r.t. byl po 24 h připraven derivát **88**. Reakce proběhla kvantitativně, v reakční směsi vznikaly, dle analýzy TLC, vedlejší produkty, které byly porovnány s TLC standardy z předchozí optimalizace. Reakční směs byla redukována 1 M roztokem zelené skalice a neutralizována nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného. Vzniklý derivát **88** byl připraven s 34% výtěžkem. Nízký výtěžek byl pravděpodobně způsoben obtížemi při extrakci a vznikem vedlejších produktů reakce.

Látka **88** byla reagována s TBDPSCI<sup>39</sup> za katalýzy Pd(OAc)<sub>2</sub> za přítomnosti triethylaminu v dichlorethanu při 60 °C po dobu 1 h v inertním prostředí dusíku. Vzniklý produkt **89** byl izolován s 55% výtěžkem po zpracování. Nízký výtěžek chránící reakce byl způsoben ztrátou části reakční směsi při nasazování reakce, kdy došlo vlivem přetlaku dusíku k vytlačení suspenze ven z reakční baňky skrze jehlu. Triethylamin v reakci slouží k neutralizaci vznikající kyseliny chlorovodíkové. Derivát **88** byl reagován s TBDMSCI<sup>39</sup> za katalýzy Pd(OAc)<sub>2</sub> v bazickém prostředí triethylaminu v dichlormethanu při 60 °C po dobu 1 h v inertním prostředí dusíku. Produkt **90** byl získán s 78% výtěžkem, vzniklý derivát se samovolně na vzduchu rozkládal za vzniku látky **88**. Z látky **89** a **90** byly připraveny deriváty **85** a **86** pomocí Pinnickovi oxidace<sup>46</sup>. Při reakci chloritanu sodného v prostředí dihydrogenfosforečnanu draselného ve směsi rozpouštědel voda, 2-methylpropan-2olu a amylenu (4:2:1)<sup>32</sup> došlo po 24 h reakce při laboratorní teplotě ke kvantitativní konverzi látky **85** s 81% výtěžkem po zpracování. Derivát **86** byl připraven za stejných podmínek. Výtěžek derivátu **86** činil po zpracování 42 %. Nižší výtěžek produktu byl pravděpodobně způsoben samovolným rozkladem látky **90** a nedokonalou separací na sloupcové chromatografii, kdy byly získány směsné frakce produktu, které nebyly zahrnuty do výpočtu výtěžku.

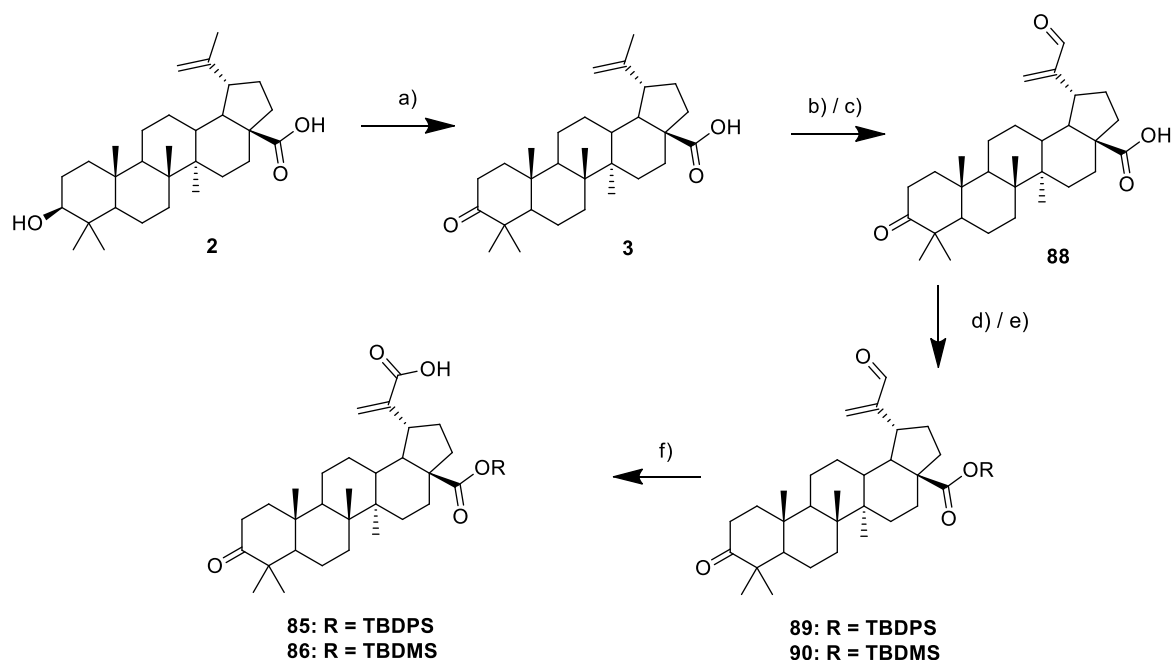


Schéma 23: a)  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ , NaOAc, HOAc,  $\text{AcO}_2$  dioxan, 18 h, r.t.; b)  $\text{SeO}_2$ , 2-metoxyethanol, 3 h, 140 °C; c)  $\text{SeO}_2$ , *t*-BHP, HOAc/DCM, r.t., 24 h; d) TBDPSCl,  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ , DCE, TEA, 1 h, 60 °C; e) TBDMSCl,  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ , DCE, TEA, 1 h, 60 °C; f)  $\text{NaClO}_2$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , voda, *t*-BuOH, amylen, 24 h, r.t.

U derivátu **3** byly porovnány  $^1\text{H}$  NMR spektra s lit.<sup>16,50</sup>. Derivát **89** byl identifikován pomocí  $^1\text{H}$  NMR spektrometrie. Produkty **85**, **86**, **88**, **90** byly dále charakterizovány pomocí  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR, pomocí IR spektrometrie a v hmotnostním spektru HRMS. V  $^1\text{H}$  NMR spektru derivátu **85** lze pozorovat aromatické vodíkové signály při  $\delta$  7.72 – 7.37 ppm prokazující přítomnost TBDPS chránicí skupiny. Dále lze ve spektru najít dva geminální singlety o  $\delta$  6.18 a 5.64 ppm prokazující přítomnost dvojně vazby mezi uhlíky C-20(29). Důkazem terpenického původu látky **85** může být například signál H-19 $\beta$  tvořící triplet dubletů při  $\delta$  3.30 ppm s interakčními konstantami  $J_1 = 12.6$  Hz,  $J_2 = 3.5$  Hz, nebo pět methylových singletů v rozmezí  $\delta$  0.77 – 1.06 ppm. Přítomnost TBDPS může být dále prokázána singletem 2-methylpropan-2-ylových protonů s intenzitou devět při  $\delta$  1.14 ppm. Doplňující informace o struktuře látky **85** byly získány pomocí HRMS analýzy, kdy byl potvrzen molekulový iont produktu a sumární vzorec. V IR spektrometrii, byly ve spektru pozorovány charakteristické pásy pro karbonyl při  $1705\text{ cm}^{-1}$ . Podrobný výpis analýz je uveden v experimentální části této práce. Podobným způsobem byly identifikovány i látky, které se strukturně blíží diskutované látce **85**.

## 3.2 Příprava derivátů diosfenolu 4

### 3.2.1 Příprava dibenzyl 2-hydroxy-3-oxolup-1(2),20(29)-dien-28,30-dioátu (Diosfenol 91)

Derivát **75** byl oxidován pomocí vzdušného kyslíku, zaváděného do reakce jehlou, v 2-methylpropan-2-olu a v bazickém prostředí *tert*-butoxidu draselného. Reakce byla dále optimalizována.

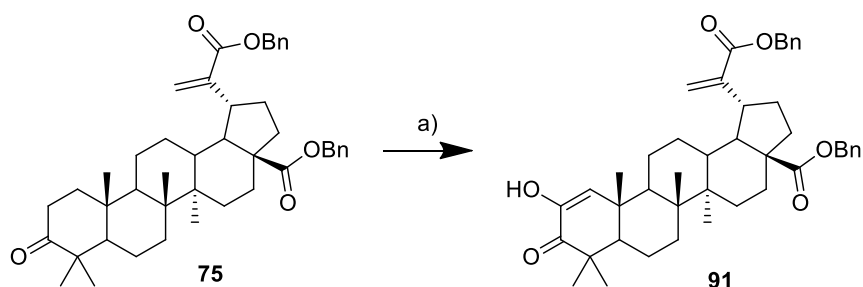
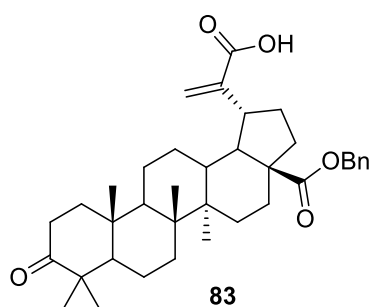


Schéma 24: a) *t*-BuOH, *t*-BuOK, vzduch

Nejprve byla reakce provedena dle postupu v lit.<sup>16</sup> pro přípravu obdobného diosfenolu **4**. Kyselina **75** byla oxidována vzdušným kyslíkem při 40 °C po dobu 2 h s dvěma ekvivalenty báze (Schéma 24). Reakce byla monitorována pomocí TLC analýzy. Po první hodině reakce se začaly objevovat vedlejší produkty, přičemž výchozí látka nebyla kvantitativně zreagována. Po 2 h reakce došlo k úplnému doreagování výchozí látky **75** a reakční směs byla zpracována. Byl izolován hlavní produkt reakce, který byl následně charakterizován pomocí <sup>1</sup>H NMR analýzy. Po vyhodnocení spektra byl produkt identifikován jako debenzylovaný derivát **83** (Obrázek 17).



Obrázek 17: Vzniklý deprotektovaný derivát **83** dle.

První pokus o optimalizaci přípravy diosfenolu **91** spočíval v prodloužení reakčního času z 2 h na 4 h a zdvojnásobení množství báze na 4 ekvivalenty s předpokladem, že odchránění polohy C-30 není v následujícím reakčním sledu nedostatkem a že změnou těchto podmínek by již měl diosfenol **90** vzniknout. Dle TLC analýzy v první 0.5 h začal

vznikat stejný produkt jako v prvním pokusu (tedy debenzylovaný derivát **83**) s neúplnou konverzí výchozí látky. Po 1.5 h začaly v reakční směsi vznikat minoritní produkty reakce. Po uplynutí 4 h byla reakce zpracována a majoritní produkt izolován preparativní kapalinovou chromatografií. Dle  $^1\text{H}$  NMR je majoritním produktem opět látka **83**.

Při další reakci derivátu **75** byla jehla přivádějící vzduch do reakční směsi připojena na centrální přívod vzduchu. Aktuální optimalizační krok spočíval opět v navýšení reakční doby ze 4 h na 6 h. Do reakční směsi byl každou hodinu přidáván 1 ekvivalent báze. Bylo totiž předpokládáno, že vzdušná vlhkost může hydrolyzovat *tert*-butoxid draselný na hydroxid draselný a 2-mehtylpropan-2-ol, a že oxid uhličitý ze vzduchu může s *tert*-butoxidem reagovat až na uhličitán draselný.  $^1\text{H}$  NMR spektrum vzniklého produktu opět odpovídalo deprotektovanému derivátu **83**, minoritní produkty nebyly, kvůli jejich malému zastoupení, izolovány.

Po těchto třech pokusech o optimalizaci přípravy derivátu **89** byl výchozí dibenzylester **75** spotřebován a vzhledem k problémům s debenzylací byla pro následující optimalizace připravena kyselina **80** (Schéma 21, str. 41).

### 3.2.2 Příprava 2-hydroxy-3-oxolup-1(2),20(29)-dien-28,30-diové kyseliny (Diosfenol 92)

Kyselina **80** byla připravena ve velmi malém množství, kvůli problémům s rozpustností, proto byl proveden pouze jeden pokus o přípravu diosfenolu.

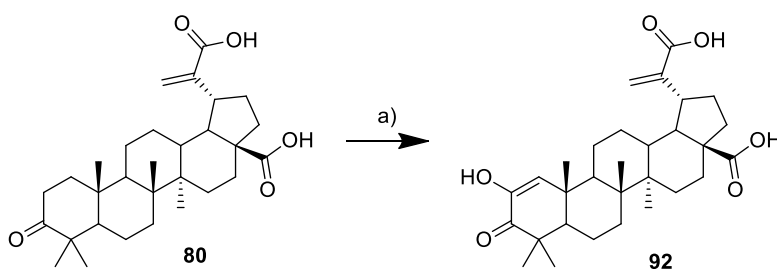


Schéma 25: a) *t*-BuOH, *t*-BuOK, vzduch

Látka **80** byla oxidována (Schéma 25) pomocí vzdušného kyslíku zaváděného do reakční směsi jehlou skrze balónek v 2-methylpropan-2-olu v bazickém prostředí *tert*-butoxidu draselného. Po 8 hodinách reakce při 40 °C byla dle TLC analýzy stále přítomna výchozí látka bez náznaku produktu. Do reakční směsi bylo přidáno nadstandardní množství báze. Reakce byla za zvýšeného tlaku ponechána reagovat do druhého dne. Dle TLC analýzy došlo ke kvantitativnímu zreagování výchozí látky. Vzniklý produkt se však nepodařilo

izolovat v čisté formě. Proto byla vzniklá směs rozpuštěna v tetrahydrofuranu a za přítomnosti uhličitanu draselného byl do směsi přidán methylodid (Schéma 26).

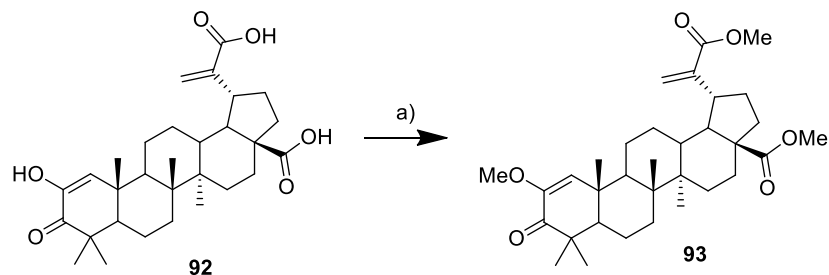


Schéma 26: a) MeI, THF, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, r.t., 18 h

Po 24 hodinách reakce při laboratorní teplotě byla reakční směs zpracována a pomocí sloupcové chromatografie byly izolovány dva znečištěné produkty. Z <sup>1</sup>H NMR analýzy nebyla prokázána přítomnost látky **93**. Dle LC-MS analýzy nebyl připraven derivát **93**.

Po tomto pokusu o přípravu derivátu **91** bylo shledáno, že ani dikyselina není vhodný substrát pro přípravu diosfenolu, zejména kvůli obtížnému přísunu výchozí sloučeniny **80** a nízké rozpustnosti v rozpouštědlech využitelných při chromatografii, pro další pokus o optimalizaci přípravy diosfenolu tak byl zvolen monobenzylovaný derivát **83**.

### 3.2.3 Příprava 28-benzylesteru kyseliny 2-hydroxy-3-oxolup-1(2),20(29)-dien-28,30-diové (Diosfenol **94**)

Derivát **83** byl oxidován pomocí vzdušného kyslíku (Schéma 27) foukaného na intenzivně míchaný roztok látky **83** s *tert*-butoxidem draselným v 2-methylpropan-2-olu. Reakce byla dále optimalizována.

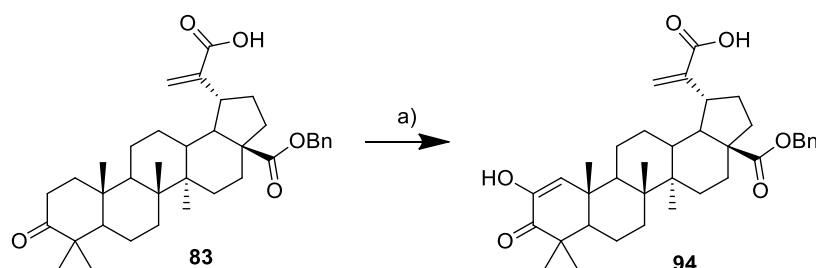


Schéma 27: a) *t*-BuOH, *t*-BuOK, vzduch



První reakcí byly otestovány podmínky využití při pokusech o optimalizaci přípravy derivátu **92**. Reakční směs byla míchána při 40 °C a s dvěma ekvivalenty báze po dobu 6 h. Vzdušný kyslík byl do reakce přiváděn skrze jehlu s balónkem. Reakce byla monitorována pomocí TLC analýzy. Reakce neproběhla, izolována byla pouze výchozí látka **83** (Obrázek 17, str. 48).

Při druhém pokusu o optimalizaci reakce byl upraven přívod vzduchu tak, aby byl vzduch foukán přímo na intenzivně míchanou reakční směs. V průběhu reakce bylo měřeno pH roztoku pomocí pH lakmusových papírku. Osm ekvivalentů báze bylo postupně přidáváno do reakce tak, aby bylo udrženo pH mezi hodnotami 9 – 10. Přiváděný vzduch vyfoukal veškeré rozpouštědlo z reakční směsi po 1 h. Izolovaná látka byla pomocí <sup>1</sup>H NMR analýzy identifikována jako výchozí látka **83**.

Při dalším optimalizačním pokusu byla reakce zahřívána na teplotu 50 °C, vzduch byl foukán na intenzivně míchaný roztok a pH reakce bylo udržováno nad hodnotu 9 postupným přidávkem osmi ekvivalentů báze. V průběhu reakce bylo doplňováno rozpouštědlo tak, aby se objem roztoku v bance pohyboval mezi 5 a 15 ml. Reakce byla monitorována pomocí TLC analýzy. Po 6 h došlo ke kvantitativnímu zreagování výchozí látky **83**. Izolovaný majoritní produkt byl identifikován pomocí <sup>1</sup>H NMR analýzy jako derivát **94** s výtěžkem 20 % po zpracování. Pravděpodobně dochází k rozkladu produktu **94** dlouhým reakčním časem a nadbytkem báze.

Finálním krokem optimalizace bylo snížení reakční teploty na 40 °C a snížení množství přidávané báze na 5 ekvivalentů v průběhu reakce tak, aby bylo pH udrženo nad hodnotou 9. Vzduch byl opět foukán přímo na intenzivně míchaný roztok. Reakce byla monitorována pomocí TLC analýzy a byla přerušena po 3 h na úkor absolutní konverze látky **83** v moment, kdy začaly vedle skvrny hlavního produktu **94** vznikat i skvrny vedlejších produktů. Po zpracování byl výtěžek látky **94** roven 56 %. Produkt byl identifikován pomocí <sup>1</sup>H NMR analýzy. Ve spektru lze pozorovat multiplet s intenzitou pěti protonů v rozmezí  $\delta$  7.30 – 7.40 ppm patřící aromatickým vodíkům chránící benzylové skupiny, dále signály geminálních vodíků H-29 při  $\delta$  6.40 ppm (*pro-E*) a při 5.68 ppm (*pro-Z*). Přítomnost dvojné vazby mezi uhlíky C-1 a C-2 je potvrzena singletem H-1 při  $\delta$  6.23 ppm a diosfenolový hydroxyl je identifikován přítomností širokého singletu jednoho protonu při  $\delta$  5.87 ppm. Doplňující informací o benzylové chránící skupině podávají dva dublety diastereotopických vodíků AB systému při  $\delta$  5.16 a 5.11 ppm s interakční konstantou  $J = 12.3$  Hz. Informaci, že se jedná o terpenický skelet poskytuje signál tripletu dubletů H-19 $\beta$  při  $\delta$  3.39 ppm s interakčními

konstantami  $J_1 = 11.1$  Hz a  $J_2 = 5.1$  Hz. Dále pak pět methylových singletů na lupanovém skeletu v rozmezí  $\delta$  0.80 – 1.18 ppm. Doplňující informace o struktuře látky byly získány pomocí HRMS, kde byl identifikován hledaný molekulový iont a byl potvrzen sumární vzorec derivátu **94**. V IR spektrometrii byl nalezen signál karboxylové funkční skupiny při  $1721\text{ cm}^{-1}$  a hydroxylový signál při  $3429\text{ cm}^{-1}$ .

Byl připraven diosfenol **94**, jehož syntéza byla optimalizována. Tento derivát je vhodný pro použití k dalším konjugacím skrze volnou kyselinu v poloze C-30. Benzylová chránící skupina se ukázala být nevhodnou chránící skupinou karboxylových funkcí C-28 kvůli náročnosti jejího odchránění a případným vedlejšími reakcím vedoucími k rozkladu derivátů konjugovaných v poloze C-30. Proto bylo rozhodnuto, zvolit novou chránící skupinu. Vhodnou vlastností nově zvolené protektivní skupiny měla být selektivita, a hlavně jednoduchost odchránění. Proto byl vybrán *tert*-butyldiphenylsilylový skelet (Schéma 23), který je častější pro chránění alkoholů, avšak jsou známy aplikace, kdy je tato skupina vázaná na karboxylové funkci (lit.<sup>39</sup>).

### 3.2.4 Příprava 28-(TBDPS)esteru kyseliny 2-hydroxy-3-oxolup-1(2),20(29)-dien-28,30-diové (Diosfenol 95)

Derivát **85** byl oxidován pomocí vzdušného kyslíku (Schéma 28) foukaného přímo na intenzivně míchaný roztok 2-methylpropan-2-olu. Reakce byla provedena v bazickém prostředí *tert*-butoxidu draselného, přidávaného do roztoku tak, aby bylo pH udrženo nad hodnotou 9, celkem bylo do reakční směsi přidáno 10 ekviv. báze. Ke směsi byl v průběhu reakce přiléván 2-methylpropan-2-ol tak, aby nedošlo k úplnému vysušení směsi vlivem přívodu vzduchu.

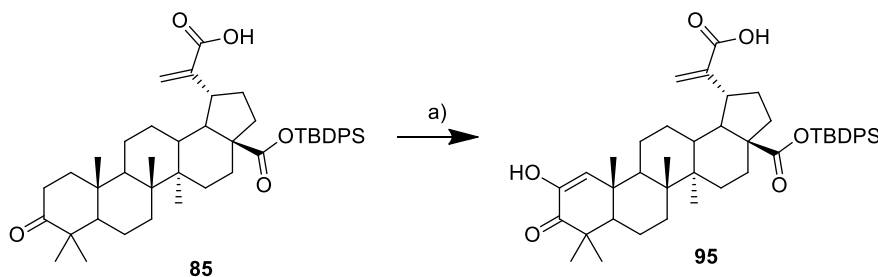
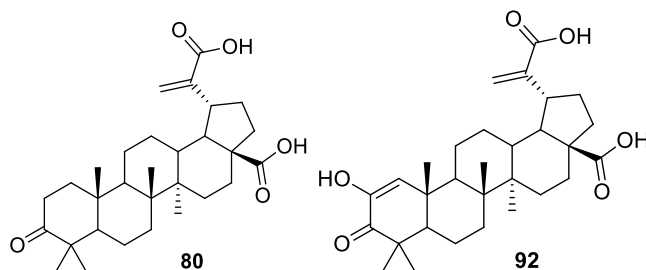


Schéma 28: a) *t*-BuOH, *t*-BuOK, vzduch

Po 3 h reakce došlo dle TLC analýzy ke kvantitativnímu zreagování výchozí látky **85**. Byl izolován majoritní produkt reakce, který byl dle  $^1\text{H}$  NMR analýzy identifikován jako derivát **80** (Obrázek 18). Minoritním produkt se pomocí sloupcové chromatografie

nepodařilo izolovat čistý, avšak dle HRMS analýzy směsi po zpracování lze nalézt molekulový iont derivátu **92** (Obrázek 18).



Obrázek 18: Deriváty **80** a **92**

Při druhém pokusu o přípravu derivátu **95** byly do reakční směsi látky **85** a 2-methylpropan-2-olu přidány pouze 3 ekvivalenty báze, aby bylo předejito rychlé deprotekcí *tert*-butyldiphenylsilylové chránicí skupiny. Do roztoku byla zavedena jehla připojená na přívod vzduchu. Roztok byl probubláván 4 h při 40 °C. Reakční směs byla neutralizována nasyceným roztokem chloridu amonného. Izolovaný produkt byl identifikován pomocí <sup>1</sup>H NMR analýzy jako derivát **80**

Paralelně s pokusy o přípravu derivátu **95** byla prováděna optimalizace přípravy derivátu **96**.

### 3.2.5 Příprava 28-(TBDMS)esteru kyseliny 2-hydroxy-3-oxolup-1(2),20(29)-dien-28,30-diové (Diosfenol **96**)

Látka **86** byla oxidována pomocí vzdušného kyslíku (Schéma 29) v 2-methylpropan-2-olu za přítomnosti *tert*-butoxidu draselného. Báze byla přidávána do reakce postupně, aby nedošlo k deprotekcí chránicí skupiny karboxylové funkce C-28, celkem byly do reakce přidány 4 ekvivalenty *tert*-butoxidu. Ke směsi byl v průběhu reakce přidáván 2-methylpropan-2-ol aby nedošlo k vysušení rozpouštědla vlivem zaváděného vzduchu.

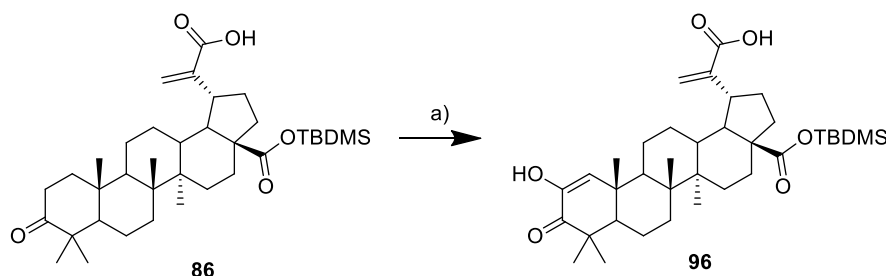
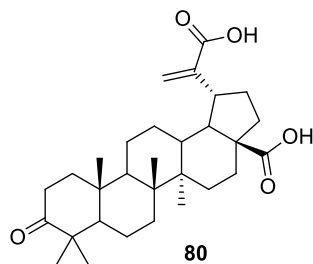


Schéma 29: a) *t*-BuOH, *t*-BuOK, vzduch

Po 4 h reakce došlo dle TLC analýzy ke kvantitativnímu zreagování výchozí látky. Izolovaný produkt byl identifikován pomocí  $^1\text{H}$  NMR analýzy jako derivát **80** (Obrázek 19).



Obrázek 19: Vznikající derivát **80**

Deriváty **85** a **86** (Schémata 28, 29) se ukázaly být nevhodnými substráty pro přípravu diosfenolů **95** a **96**. Důvodem je labilita silylových chránících skupin v bazickém prostředí.

### 3.2.6 Příprava 2-hydroxy-3,30-dioxolup-1(2),20(29)-dien-28-ové kyseliny (Diosfenol **97**)

Bylo zjištěno, že *tert*-butyldiphenylsilylová chránící skupina nepodléhá deprotekcí při pinnicově oxidaci. Nevydrží však silně bazické prostředí při přípravě diosfenolu. Proto bylo rozhodnuto, že bude nejprve připraven diosfenol **97** (Schéma 30), který bude posléze derivatizován pomocí *tert*-butyldiphenylsilylové skupiny, která projevila vyšší stabilitu při následných reakcích než *tert*-butyldimethylsilylová skupina.

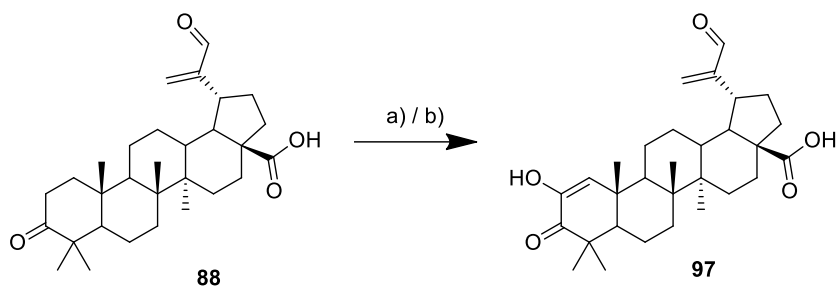


Schéma 30: a) *t*-BuOH, *t*-BuOK, vzduch; b) THF, *t*-BuOK, vzduch

Při prvním pokusu o přípravu derivátu **97** byla látka **88** oxidována pomocí vzdušného kyslíku v 2-methylpropan-2-olu v prostředí *tert*-butoxidu draselného. Vzduch byl přiváděn na intenzivně míchanou směs při 40 °C. V průběhu reakce bylo pH roztoku udržováno nad hodnotu 9. Celkem bylo přidáno do reakční směsi 6 ekvivalentů báze. Po 2 h reakce došlo dle TLC k zreagování veškeré výchozí látky **88**. Produkt se nepodařilo izolovat. Získaná látka dle  $^1\text{H}$  NMR spektra neodpovídá lupanovému skeletu. Produkt měl pravděpodobně velmi nízký  $R_f$  a zůstal adsorbovaný na silikagelu.

Při druhém pokusu o přípravu derivátu **97** byl derivát **88** oxidován vzdušným kyslíkem v 2-methylpropan-2-olu za přítomnosti 6 ekvivalentů *tert*-butoxidu draselného. Po 3 h reakce při 40 °C byla dle TLC analýzy konverze výchozí látky úplná. Reakční směs byla extrahována a odpařena do sucha. Odparek byl rozpuštěn v dichlormethanu a za inertních podmínek byla provedena reakce s *tert*-butyldimethylsilylchloridem v bazickém prostředí triethylaminu s octanem paladnatým. Po 2 h byla reakce zpracována, produkt se nepodařilo izolovat čistý. Dle LC-MS analýzy, ve které byly objeveny molekulové ionty  $m/z = 528, 523$  a 459. LC-MS analýza neposkytla potřebné informace pro identifikaci struktur a v HRMS analýze byl identifikován molekulový iont  $m/z = 282$ . Nejedná se tedy o derivát **97**.

Při třetím pokusu o přípravu derivátu **97** byl využit postup přípravy diosfenolu dle lit.<sup>51</sup>. Derivát **88** byl rozpuštěn v tetrahydrofuranu, byl přidán *tert*-butoxid draselný a směs byla podchlazena na – 10 °C. Do reakční směsi byl zaveden přívod vzduchu. Po 9 h reakce dle TLC analýzy nedošlo k významnému úbytku výchozí látky. Vznikly dva produkty v minoritním množství, které byly separovány od výchozí látky **88**. Žádný z těchto produktů nebyl dle <sup>1</sup>H NMR analýzy identifikován jako lupanový derivát.

Čtvrtým pokusem o přípravu látky **97** byla reakce derivátu **88**, který byl oxidován vzdušným kyslíkem v 2-methylpropan-2-olu za přítomnosti 4 ekvivalentů *tert*-butoxidu draselného. Po 3 h reakce při 40 °C byla směs extrahována a odparek byl rozpuštěn v DCE. Do roztoku byl přidán octan paladnatý s triethylaminem a baňka byla inertizována dusíkem. Následně byl přidán TBDMSCl. Po 1 h reakce při 60 °C byla reakční směs zpracována. Nepodařilo se izolovat čistý produkt reakce. V LC-MS analýze byly identifikovány  $m/z = 453, 274, 481$ . LC-MS analýza neposkytla potřebné informace pro identifikaci struktur, nejedná se tedy o derivát **97**.

Posledním pokusem o přípravu derivátu **97** byla reakce derivátu **88** s 3 ekvivalenty *tert*-butoxidu draselného v 2-methylpropan-2-olu. Vzduch byl do reakce přiváděn jehlou skrze septum. Po 4 h reakce při 40 °C byla dle TLC analýzy konverze výchozí látky zhruba 80 %. Produkt reakce se svým  $R_f$  blížil výchozímu derivátu **88**. Po zpracování nebyl pomocí LC-MS nalezen hledaný molekulový iont. <sup>1</sup>H NMR spektrum izolovaného produktu neposkytlo validní informaci, signál rozpouštědla je přítomen s vysokou účinností, signály produktu vzniklého reakcí vykazují vysoký stupeň rozmytí s velmi nízkou účinností.

Nepodařilo se připravit derivát **97**, pravděpodobně kvůli volné karboxylové funkci uhlíku C-28, která vytváří v bazickém prostředí sole. Vznikající deriváty se nepodařilo izolovat čisté. Ze spektrálních dat nebyly vyvozeny potencionální struktury vznikajících derivátů. Jako vhodný substrát pro přípravu diosfenolu byl zvolen derivát **84**, který disponuje benzylovou chránicí skupinou na karboxylové skupině uhlíku C-28.

### 3.2.7 Příprava benzyl 2-hydroxy-3,30-dioxolup-1(2),20(29)-dien-28-oátu (Diosfenol **98**)

Výchozí látka **84** byla zvolena za předpokladu, že u vzniklého diosfenolu **99** bude substituována benzylová chránicí skupina za *tert*-butyldiphenylsilylovou skupinu dle postupu v lit.<sup>39</sup>. Vzniklá látka **99** by byla následně podrobena pinnicově oxidaci za vzniku cílového derivátu **95**. V průběhu chránění může dojít ke stabilizaci diosfenolového enolátu vznikem derivátu **100**, následnou oxidací by pak měl vzniknout derivát **101** nebo **95** (Schéma 31).

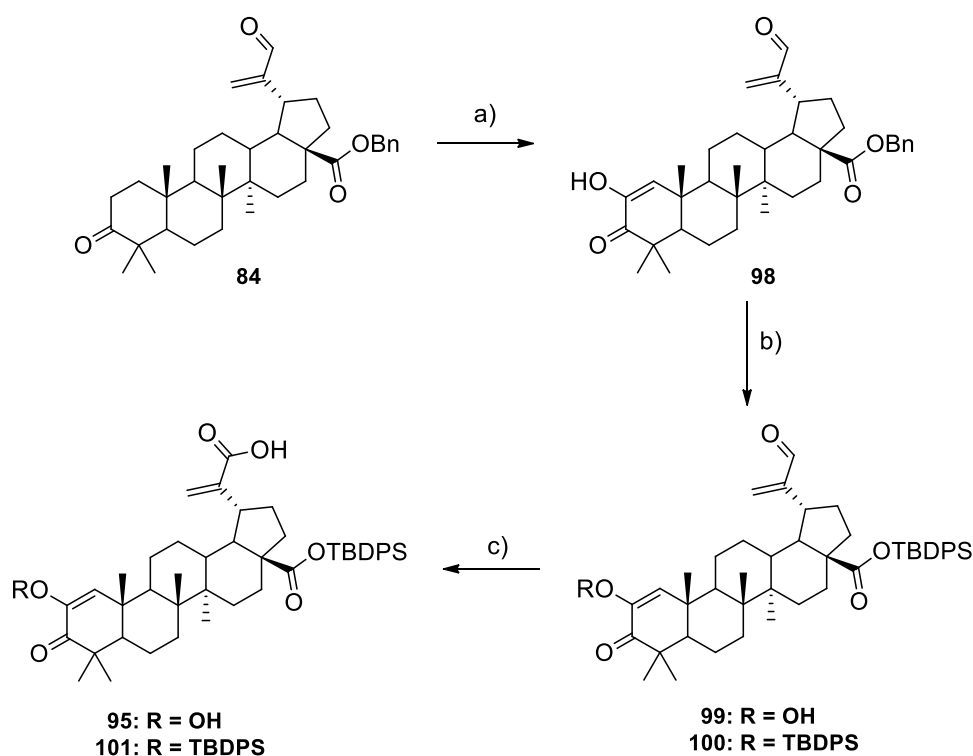


Schéma 31: Myšlenkový postup přípravy derivátů **95** nebo **101**. a) *t*-BuOH, *t*-BuOK, vzduch; b) TBDPSCl, Pd(OAc)<sub>2</sub>, DCE, TEA, 1 h, 60 °C; c) NaClO<sub>2</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, voda/ *t*-BuOH/ amylene (4:2:1), 18 h, r.t.

Při prvním pokusu o přípravu derivátu **98** byla provedena oxidace látky **84** vzdušným kyslíkem v přítomnosti *tert*-butoxidu draselného v 2-methylpropan-2-olu. Vzduch byl přiveden proudem na intenzivně míchaný roztok. Do reakce byly přidány 3 ekvivalenty báze a po 4 h došlo k úplnému zreagování výchozí látky za vzniku dvou produktů. Ani jeden

izolovaný produkt nebyl identifikován jako derivát **98**. Při LC-MS analýze byly identifikovány kladné ionty dvou látek o  $m/z = 454$  a  $m/z = 680$ . LC-MS analýza neposkytla potřebné informace pro identifikaci struktur.

U druhé reakce látky **84** bylo použito 6 ekvivalentů báze při zvýšené teplotě 50 °C. Po 4 h reakce došlo k úplnému zreagování výchozí látky. Byl izolován majoritní produkt reakce. LC-MS analýza neposkytla potřebné informace pro identifikaci struktur. Nejedná se o diosfenol **95**.  $^1\text{H}$  NMR spektrum izolovaného produktu neposkytlo validní informaci, signál rozpouštědla je přítomen s vysokou účinností, signály produktu vzniklého reakcí vykazují vysoký stupeň rozmytí s velmi nízkou účinností.

Při následujícím pokusu byl derivát **84** oxidován vzdušným kyslíkem zavedeným do reakce jehlou v prostředí dvou ekvivalentů báze při 50 °C. V průběhu reakce musel být přidáván 2-methylpropan-2ol kvůli jeho odfoukávání z reakce. Po 1.5 h došlo k zreagování výchozí látky za vzniku směsi produktů. Reakce byla zpracována a směs látek rozpuštěna v dichlorethanu. Baňka byla uzavřena septem a promyta proudem dusíku. Do baňky byl přidán octan paladnatý, trimethylamin a TBDPSCl. Směs byla míchána při 60 °C po dobu 2 h. Následně byla reakce zpracována a byly izolovány tři hlavní produkty. V  $^1\text{H}$  NMR spektrech těchto látek jsou pozorovatelné široké neúčinné signály produktů. Nejedná se o derivát **99** ani **100**. Identifikovatelný je pouze AB systém benzylové chránicí skupiny a pět benzylových protonů. Ve spektrech chybí informace o dvojně vazbě. LC-MS analýza neposkytla potřebné informace pro identifikaci struktur.

### 3.3 Příprava konjugovaných molekul

#### 3.3.1 Optimalizace syntézy konjugovaného derivátu 102

Byla optimalizována příprava derivátu **102** (Schéma 32) z důvodu lepší dostupnosti výchozího derivátu **78**, který je meziproduktem přípravy jednoho z výchozích derivátů (Schéma 20).

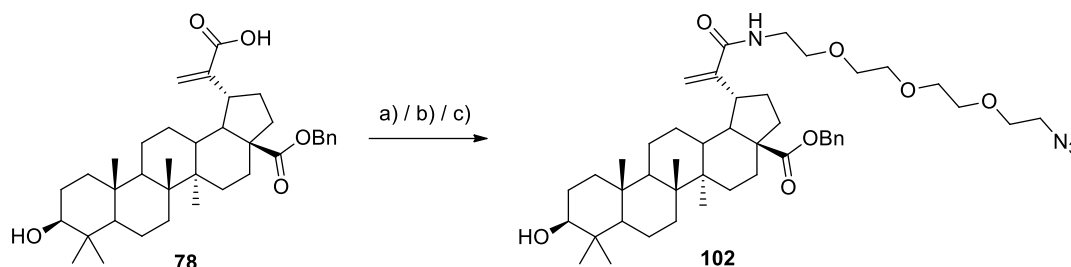
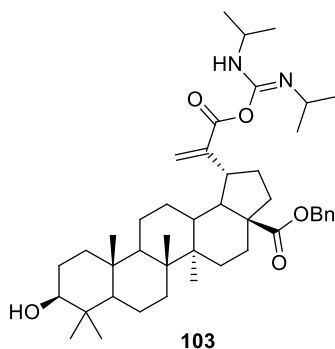


Schéma 32: a) DIC, 11-azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amin, DMF : DCM (1:1), r.t., 18 h; b) DIC, HOBT, 11-azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amin, DMF : DCM (1:1), r.t., 18 h; c) EDC, HOBT, DIPEA, DMF, 11-azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amin, r.t., 18 h

Nejprve byla látka **78** nechána reagovat se dvěma ekvivalenty 11-azido-3,6,9-trioxaundecyl-1-aminem za přítomnosti diizopropylkarbodiiminu ve směsi DMF s DCM (1:1) při laboratorní teplotě. Reakce byla po 24 h zpracována a byl izolován majoritní produkt. Dle  $^1\text{H}$  NMR analýzy se jedná o látku **103** (Obrázek 20), která vznikla reakcí výchozí látky s DIC, který je do reakce přidáván, kvůli aktivaci volné karboxylové funkce v poloze C-30.



Obrázek 20: Vznikající intermediát **103**



Při druhém pokusu o přípravu derivátu **102** byla do reakční směsi přidán hydroxybenzotriazol. Po 24 h reakce provedena TLC analýza. Vznikl opět produkt **103**, proto byly přidány další dva ekvivalenty 11-azido-3,6,9-trioxaundecan-1-aminu a reakce byla ponechána reagovat do dalšího dne. Celkem po 48 h reakce byly izolovány produkty **103** a minoritně přítomný derivát **102**.

Následně byly pro reakci vybrány nové reakční podmínky, kdy k látce **78** bylo přidáno 1.5 ekvivalentu 1-(3,3-dimethylaminopropyl)-3-ethyl karbodiimidu s 1.5 ekvivalenty hydroxybenzotriazolu pro aktivaci karboxylové funkce. Po půl hodině intenzivního míchání byl přidán diizopropylethylamin jako báze a 2 ekvivalenty 11-azido-3,6,9-trioxaundecan-1-aminu. Reakce byla míchána při laboratorní teplotě do druhého dne. Po zpracování činil výtěžek derivátu **102** 34 %. Dle  $^1\text{H}$  NMR analýzy byla potvrzena struktura látky **102**. Ve spektru je prokázána lupanová struktura přítomností pěti methylových singletů v rozmezí  $\delta$  0.75 – 0.95 ppm, dále typické signály pro H-19 $\beta$  a H-3 $\beta$  o  $\delta$  3.18 ppm. Přítomnost dvojné vazby mezi uhlíky C-20(29) je potvrzena dvěma geminálními singlety při  $\delta$  5.24 a 5.39 ppm. Benzylová chránící skupina lze identifikovat pomocí dvou dubletů AB systému diastereotopických protonů při  $\delta$  5.09 a 5.13 s interakční konstantou  $J = 12.3$  Hz a pěti aromatickými vodíky v multipletu při  $\delta$  7.29 – 7.38 ppm. Signály linkeru lze identifikovat jako triplet azidového uhlíku při  $\delta$  3.38 ppm s interakční konstantou  $J = 4.9$  Hz, multiplet 3-PEG řetězce v rozmezí  $\delta$  3.49 – 3.69 ppm a tripletem amidového protonu při  $\delta$  6.25 s interakční konstantou  $J = 5.6$  Hz.

Byla úspěšně optimalizována příprava derivátu **102**, díky tomuto souboru reakcí bylo možné aplikovat získané poznatky o reaktivitě 11-Azido-3,6,9-trioxaundecan-1-aminu při přípravě derivátu **104**.

### 3.3.2 Příprava konjugovaného derivátu 104

Výchozí derivát **94** byl aktivován pomocí DIC a HOBT a po půl hodině intenzivního míchání byla přidána báze s 11-azido-3,6,9-trioxaundecan-1-aminem. Reakce proběhla do druhého dne a po zpracování činil výtěžek 23 % (Schéma 33). Nízký výtěžek byl pravděpodobně způsoben ztrátami produktu při zpracování extrakcí, při preparativní kapalinové chromatografii a z důvodu nižší stability derivátu **94**.

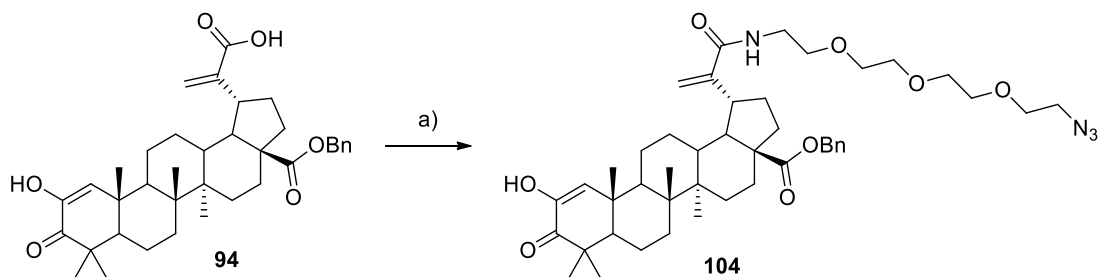


Schéma 33: a) EDC, HOBT, DIPEA, DMF, 11-azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amin, r.t., 18 h

Dle  $^1\text{H}$  NMR analýzy se jedná o produkt **104**, kdy ve spektru lze pozorovat oproti spektru výchozí molekuly **94** signály patřící ethylenglykolovému řetězci linkeru při  $\delta$  3.36 – 3.67 ppm s celkovou intenzitou čtrnácti protonů. Dále posun dvou geminálních singletů protonů H-29 $\beta$  dvojně vazby vlivem amidové vazby na  $\delta$  5.09 a 5.13 ppm s interakční konstantou  $J = 12.3$  Hz. Signály patřící diosfenolové části molekuly se pak nacházejí při  $\delta$  6.30 ppm pro hydroxylový proton a 6.38 ppm pro H-1. Dále byly pomocí IR spektrometrie identifikovány charakteristické pásy karbonylové funkční skupiny skupiny při  $1720\text{ cm}^{-1}$  a interakce dusíků azidové skupiny při  $2101\text{ cm}^{-1}$ . Sumární vzorec látky **104** byl potvrzen HRMS analýzou, kde byl nalezen hledaný molekulový iont.

## 4 Experimentální část

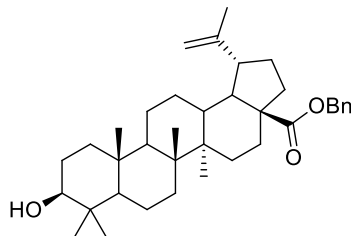
### 4.1 Obecné poznámky k procedurám experimentální části

TLC analýza byla prováděna pomocí TLC hliníkových fólií Silica gel 60 F254 (Merck). Detekce skvrn byla realizována UV zářením při vlnové délce 254 nm a následně ponořením TLC desky do 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a zahřátím na 200 – 220 °C. Izolace látek byla prováděna extrakcí, kdy byl k reakční směsi přilít 5 – 10 násobek nasyceného roztoku chloridu sodného. Roztok byl extrahován ethylacetátem. Spojené podíly ethylacetátu byly promyty vodou a sušeny bezvodým síranem hořečnatým. Odpařování organických rozpouštědel bylo prováděno na rotační vakuové odparce Rotovapor R-210 (Büchi). Čištění látek bylo prováděno pomocí preparativní sloupcové chromatografie na přímé fázi. Jako stacionární fáze byl použit Silikagel 60, high purity, 40 – 63 μm (Fluka). Sloučeniny byly charakterizovány pomocí NMR, IR a MS analýz. Měření <sup>1</sup>H NMR a <sup>13</sup>C NMR bylo prováděno na přístroji JEOL s frekvencemi 500 MHz převážně v roztoku CDCl<sub>3</sub> za laboratorní teploty. Posuny δ byly srovnány se zbytkovým CHCl<sub>3</sub> při δ 7.260 ppm. Interakční konstanty *J* i chemické posuny δ byly stanoveny dle analýzy prvního řádu a zaokrouhleny (interakční konstanty na jedno desetinné místo, chemické posuny na dvě desetinná místa). Ke zpracování dat bylo využito programů JEOL Delta v5.0.2 a MestReNova v6.0. IR spektra byla měřena pomocí FTIR spektrometru Nicolet iS50 (Thermo Scientific) ve střední oblasti 400 – 4000 cm<sup>-1</sup>. Zpracování dat bylo provedeno v programu OMNIC 8.3. V experimentální části budou dále místo desetinných čárek používány v souladu s anglosaskou literaturou desetinné tečky. Je to zejména kvůli přehlednosti výpisů spektrálních dat. Také pojmenování strukturních motivů ve výpisech spekter bude zčásti v anglickém jazyce kvůli snadnějšímu převedení této práce do publikovatelné formy. U popisu experimentů, které nevedly k požadovanému produktu, je vzorec cílové sloučeniny přeškrtnut, aby bylo pro čtenáře hned patrné, že daný postup nevedl k cíli.

## 4.2 Příprava výchozích sloučenin

### 4.2.1 Dibenzylester 75 – dibenzyl 3-oxolup-20(29)-en-28,30-dioát

#### 4.2.1.1 Příprava benzyl 3 $\beta$ -hydroxylup-20(29)-en-28-oát (Benzylester 76)



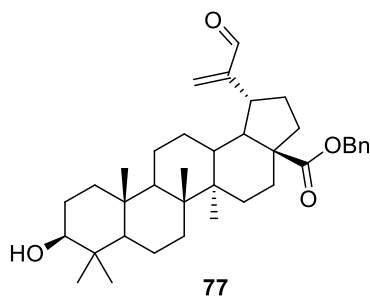
76

Obrázek 21: Benzylester 76

K roztoku kyseliny betulinové (**2**, 5 g, 10.9 mmol) v tetrahydrofuranu (110 ml) byl přidán uhličitan draselný (3.83 g, 27.3 mmol, 2.5 ekviv.) a benzylobromid (3.85 ml, 21.8 mmol, 2 ekviv.). Reakce byla míchána za laboratorní teploty po dobu 18 h. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC ve směsi hex : EtOAc (4:1). Kvůli nízkému stupni konverze byl do reakce přidán nadbytek benzylobromidu (3.85 ml, 21.8 mmol, 2 ekviv.). Reakce byla míchána za laboratorní teploty po dobu 18 h. Reakční směs byla zpracována extrakcí ethylacetátem z nasyceného roztoku chloridu sodného a sloupcovou chromatografií na 300 ml silikagelu (15 cm sloupec) v mobilní fázi hex : EtOAc (5:1). Bylo získáno 5.15 g (9.4 mmol, 86 %) bílého krystalického produktu **76**, krystalizovaného z hexanu. Spektrální data odpovídají lit.<sup>44</sup>.

<sup>1</sup>H NMR  $\delta$  [ppm]: 0.75 (3H, s, CH<sub>3</sub>); 0.76 (3H, s, CH<sub>3</sub>); 0.80 (3H, s, CH<sub>3</sub>); 0.94 (3H, s, CH<sub>3</sub>); 0.96 (3H, s, CH<sub>3</sub>); 1.68 (3H, s, CH<sub>3</sub> – C-30); 2.18 (1H, td, J<sub>1</sub> = 13.1 Hz, J<sub>2</sub> = 4.1 Hz); 2.28 (1H, dt, J<sub>1</sub> = 12.3 Hz, J<sub>2</sub> = 3.6 Hz); 3.01 (1H, td, J<sub>1</sub> = 11.2 Hz, J<sub>2</sub> = 4.9 Hz, H-19 $\beta$ ); 3.17 (1H, dd, J<sub>1</sub> = 6.2 Hz, J<sub>2</sub> = 5.1 Hz, H-3 $\alpha$ ); 4.59 (1H, s, H-29 *pro-E*); 4.72 (1H, s, H-29 *pro-Z*); 5.9 (1H, d, J = 12.4 Hz, CH<sub>2</sub>-benzylester); 5.14 (1H, d, J = 12.2 Hz, CH<sub>2</sub>-benzylester); 7.29 – 7.38 (5H, m, CH aromatické)

#### 4.2.1.2 Příprava benzyl 3 $\beta$ -hydroxylup-30-oxo-20(29)-en-28-oát (Benzylester 77)

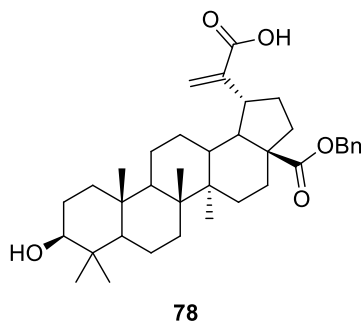


Obrázek 22: Benzylester **77**

Benzylester **76** (5 g, 9.0 mmol) byl rozpuštěn v dioxanu (200 ml). Do roztoku byl přidán oxid seleničitý (2.5 g, 22.5 mmol, 2.5 ekviv.) a směs byla zahřívána na 140 °C pod refluxem po dobu 3 h. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC ve směsi hex : EtOAc (4:1). Reakční směs byla zpracována nalitím do nasyceného roztoku chloridu sodného a extrahována ethylacetátem. Produkt byl izolován sloupcovou chromatografií na 300 ml silikagelu (15 cm sloupec) v gradientu mobilní fáze hex : EtOAc (z 3:1 na 2:1). Bylo získáno 3.9 g (7.0 mmol, 78 %) bílého, amorfního, tuhého odparku látky **77**. Spektrální data odpovídají standardům.

$^1\text{H}$  NMR  $\delta$  [ppm]: 0.73 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ); 0.74 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ); 0.78 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ); 0.90 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ); 0.93 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ); 2.16 (1H, td,  $J_1 = 12.6$  Hz,  $J_2 = 3.7$  Hz); 2.30 (1H, dt,  $J_1 = 13.0$  Hz,  $J_2 = 3.4$  Hz); 3.16 (1H, dd,  $J_1 = 11.4$  Hz,  $J_2 = 4.9$  Hz, H-3 $\alpha$ ); 3.34 (1H, td,  $J_1 = 11.1$  Hz,  $J_2 = 4.7$  Hz, H-19 $\beta$ ); 5.11 (1H, d,  $J = 12.3$  Hz,  $\text{CH}_2$ -AB systém); 5.15 (1H, d,  $J = 12.3$  Hz,  $\text{CH}_2$ -AB systém); 5.88 (1H, s, H-29 *pro-E*); 6.25 (1H, s, H-29 *pro-Z*); 7.29 – 7.39 (5H, m, CH aromatické); 9.51 (1H, s, H-30 aldehyd)

#### 4.2.1.3 Příprava 28-benzylesteru kyseliny 3 $\beta$ -hydroxylup-20(29)-en-28,30-diové (Dikyselina 78)

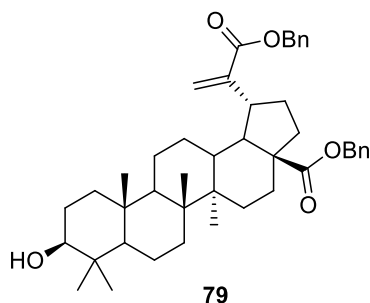


Obrázek 23: Dikyselina 78

Benzylester **77** (2.96 g, 5.3 mmol) byl rozpuštěn v 2-methylpropan-2-olu (40 ml) a amylenu (20 ml). Do roztoku byl přisypán chloritan sodný (2.5 g, 27.6 mmol, 5 ekviv.), dihydrogenfosforečnan draselný (3.7 g, 27.2 mmol, 5 ekviv.) a směs byla zalita vodou (80 ml). Emulze byla intenzivně míchána po 18 h při laboratorní teplotě. Reakce byla monitorována pomocí TLC ve směsi hex : EtOAc (3:1). Reakční směs byla zpracována extrakcí ethylacetátem z nasyceného roztoku chloridu sodného a produkt byl izolován sloupcovou chromatografií na 200 ml silikagelu (10 cm sloupec) v gradientu mobilní fáze hex : EtOAc (z 3:1 na 2:1). Bylo získáno 2.6 g (4.5 mmol, 86 %) bílého, amorfního, tuhého odparku produktu **78**.

$^1\text{H}$  NMR  $\delta$  [ppm]: 0.74 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ); 0.74 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ); 0.78 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ); 0.91 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ); 0.93 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ); 2.16 (1H, td,  $J_1 = 12.0$  Hz,  $J_2 = 3.4$  Hz); 2.29 (1H, dt,  $J_1 = 9.8$  Hz,  $J_2 = 3.1$  Hz); 3.17 (1H, dd,  $J_1 = 11.1$  Hz,  $J_2 = 5.1$  Hz, H-3 $\alpha$ ); 3.35 (1H, td,  $J_1 = 11.1$  Hz,  $J_2 = 4.8$  Hz, H-19 $\beta$ ); 5.08 (1H, d,  $J = 12.2$  Hz,  $\text{CH}_2$ -AB systém); 5.15 (1H, d,  $J = 12.3$  Hz,  $\text{CH}_2$ -AB systém); 5.59 (1H, s, H-29 *pro-E*); 6.14 (1H, s, H-29 *pro-Z*); 7.29 – 7.38 (5H, m, CH aromatické)

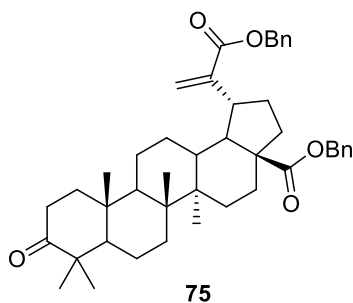
#### 4.2.1.4 Příprava dibenzyl 3 $\beta$ -hydroxylup-20(29)-en-28,30-dioátu (Benzylester 79)



Obrázek 24: Benzylester **79**

Derivát **78** (2.6 g, 4.5 mmol) byl rozpuštěn v tetrahydrofuranu (110 ml). Do roztoku byl přidán uhličitan draselný (2 g, 14.5 mmol, 3 ekviv.) a benzylobromid (2 ml, 11.3 mmol, 2.5 ekviv.). Reakční směs byla míchána za laboratorní teploty po dobu 18 h. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC ve směsi hex : EtOAc (4:1). Kvůli nízkému stupni konverze byla reakční směs zpracována extrakcí ethylacetátem z nasyceného roztoku chloridu sodného a směs byla separována sloupcovou chromatografií na 250 ml silikagelu (12 cm sloupec) v gradientu mobilní fáze hex : EtOAc (z 4:1 na 3:1). Izolovaný derivát **78** (1.56 g, 2.7 mmol) byl rozpuštěn v tetrahydrofuranu (60 ml). Do roztoku byl přidán uhličitan draselný (2 g, 14.5 mmol, 5 ekviv.) a benzylobromid (2 ml, 11.3 mmol, 4 ekviv.). Reakce byla míchána 40 °C po dobu 48 h. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC ve směsi hex : EtOAc (4:1). Reakční směs byla zpracována extrakcí ethylacetátem z nasyceného roztoku chloridu sodného a produkt byl izolován sloupcovou chromatografií na 250 ml silikagelu (12 cm sloupec) v mobilní fázi hex : EtOAc (4:1). Celkem bylo získáno 2.82 g (4.2 mmol, 93 %) bílého, amorfního, tuhého odparku látky **79**.

#### 4.2.1.5 Příprava dibenzyl 3-oxolup-20(29)-en-28,30-dioátu (Dibenzylester 75)



Obrázek 25: Dibenzylester 75

Benzylester **79** (2.07 g, 3.1 mmol) byl rozpuštěn v dioxanu (50 ml). Následně byla přidána kyselina octová (25 ml) a acetanhydrid (13 ml). Do roztoku byl přisypán dichroman sodný, dihydrát (1.83 g, 6.1 mmol, 2 ekviv.) a octan sodný, trihydrát (0.88 g, 6.4 mmol, 2 ekviv.). Směs byla míchána za laboratorní teploty po dobu 24 h. Reakce byla monitorována pomocí TLC ve směsi hex : EtOAc (4:1). Reakční směs byla extrahována ethylacetátem z nasyceného roztoku chloridu sodného a produkt byl izolován sloupcovou chromatografií na 200 ml silikagelu (10 cm sloupec) v mobilní fázi hex : EtOAc (5:1). Bylo získáno 1.34 g (2 mmol, 65 %) tuhého, amorfního odparku látky **75**. IR:  $\bar{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2942, 2868, 1716 (C=O). HRMS (ESI)  $m/z$  vypočteno pro C<sub>44</sub>H<sub>56</sub>O<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup> 655.4201, nalezeno 655.4207.

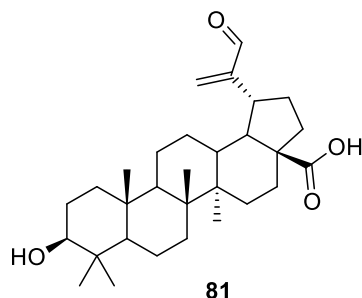
<sup>1</sup>H NMR  $\delta$  [ppm]: 0.76 (3H, s, CH<sub>3</sub>); 0.84 (3H, s, CH<sub>3</sub>); 0.89 (3H, s, CH<sub>3</sub>); 1.01 (3H, s, CH<sub>3</sub>); 1.06 (3H, s, CH<sub>3</sub>); 2.18 (1H, td, J<sub>1</sub> = 12.7 Hz, J<sub>2</sub> = 3.7 Hz); 2.27 (1H, dt, J<sub>1</sub> = 12.8 Hz, J<sub>2</sub> = 3.8 Hz); 2.41 (1H, dd, J<sub>1</sub> = 7.6 Hz, J<sub>2</sub> = 4.4 Hz); 2.47 (1H, ddd, J<sub>1</sub> = 15.8 Hz, J<sub>2</sub> = 9.7 Hz, J<sub>3</sub> = 7.6 Hz); 3.35 (1H, td, J<sub>1</sub> = 11.3 Hz, J<sub>2</sub> = 4.3 Hz, H-19 $\beta$ ); 5.10 (1H, d, J = 12.1 Hz, CH<sub>2</sub> 28-benzylester); 5.14 (1H, d, J = 12.1 Hz, CH<sub>2</sub> 28-benzylester); 5.17 (1H, d, J = 12.4 Hz, CH<sub>2</sub> 30-benzylester); 5.22 (1H, d, J = 12.4 Hz, CH<sub>2</sub> 30-benzylester); 5.57 (1H, s, H-29 *pro-E*); 6.08 (1H, s, H-29 *pro-Z*); 7.29 – 7.38 (10H, m, CH aromatické)

<sup>13</sup>C NMR  $\delta$  [ppm]: 14.62; 15.73; 16.02; 19.77; 21.17; 21.49; 26.75; 27.06; 29.62; 32.02; 33.72; 34.27; 36.59; 37.01; 38.20; 39.76; 40.66; 42.52; 47.46; 49.84; 55.11; 56.66; 65.91; 66.36; 128.22; 128.31; 128.42; 128.64; 128.68; 136.28; 136.58; 167.18; 175.85; 218.16



## 4.2.2 Dikyselina 80 – 3-oxolup-20(29)-en-28,30-diová kyseliny

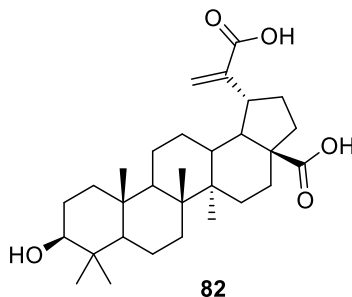
### 4.2.2.1 Příprava 3 $\beta$ -hydroxy-30-oxolup-20(29)-en-28-ové kyseliny (Kyselina 81)



Obrázek 26: Kyselina 81

Kyselina betulinová (**2**, 4.5 g, 9.9 mmol) byla rozpuštěna v 2-methoxyethanolu (50 ml). Do roztoku byl přisypán oxid seleničitý (2.5 g, 22.7 mmol, 2.3 ekviv.) a směs byla míchána 1.5 h při 140 °C pod refluxem. Reakce byla monitorována pomocí TLC ve směsi hex : EtOAc (4:1). Reakční směs byla extrahována ethylacetátem z nasyceného roztoku chloridu sodného a produkt by izolován sloupcovou chromatografií v gradientu mobilní fáze hex : EtOAc (z 4:1 na 2:1) na 200 ml silikagelu (10 cm sloupec). Byly izolovány 2 g (4.2 mmol, 42 %) bílého, amorfního, tuhého odparku látky **81**, spektrální data odpovídají lit.<sup>46</sup>.

### 4.2.2.2 Příprava 3 $\beta$ -hydroxylup-20(29)-en-28,30-diové kyseliny (Kyselina 82)

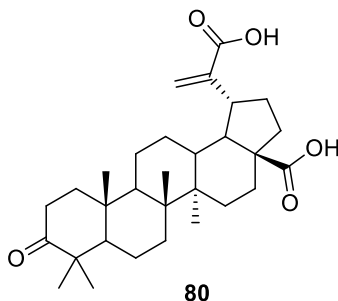


Obrázek 27: Kyselina 82

K roztoku kyseliny **81** (1.5 g, 3.2 mmol), ve směsi 2-methylpropan-2-olu (75 ml) a amylenu (25 ml), byly přidány dihydrogenfosforečnan draselný (2.6 g, 19.1 mmol, 6 ekviv.) a chloritan sodný (1.73 g, 19.1 mmol, 6 ekviv.). Do směsi byla přilita voda (150 ml). Emulze byla intenzivně míchána při laboratorní teplotě po 18 h. V průběhu byla reakce monitorována pomocí TLC ve směsi hex : EtOAc (4:1). Reakce byla zpracována extrakcí ethylacetátem z nasyceného roztoku chloridu sodného a produkt byl izolován sloupcovou chromatografií na 100 ml silikagelu (5 cm sloupec) ve dvou mobilních fázích. Nejprve byla použita mobilní fáze hex : EtOAc : MeOH (6:2:1), posléze byl jako mobilní fáze použit chloroform. Výtěžek

látky **82**, činil po zpracování 1.25 g (2.6 mmol, 81 %) bílého, amorfního, tuhého odparku. Spektrální data odpovídají lit.<sup>31</sup>.

#### 4.2.2.3 Příprava 3-oxolup-20(29)-en-28,30-diové kyseliny (Kyselina **80**)



Obrázek 28: Kyselina **80**

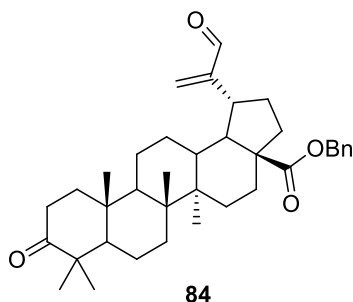
Kyselina **82** (200 mg, 0.41 mmol) byla suspendována ve směsi dioxanu (15 ml), kyseliny octové (10 ml) a acetanhydridu (5 ml). K reakční směsi byl přidán trihydrát octanu sodného (250 mg, 1.83 mmol, 4 ekviv.) a dihydrát dichromanu sodného (25 mg, 0.85 mmol, 2 ekviv.). Reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě po dobu 24 h. Reakce byla monitorována pomocí TLC ve směsi hex : EtOAc (3:1). Po prvním dni reakce nedošlo k úplnému rozpuštění výchozí látky, proto byl přidán dioxan (30 ml) a reakční směs byla míchána při 80 °C po 48 h. Po 72 h reakce nedošlo k úplné konverzi výchozí látky, proto byla reakční směs zpracována extrakcí ethylacetátem z nasyceného roztoku chloridu sodného a majoritní produkt byl izolován sloupcovou chromatografií na 150 ml silikagelu (12 cm sloupec) v mobilní fázi hex : EtOAc (3:1) s 0.1 % DCM pro lepší rozpustnost. Výtěžek látky **80** činil po zpracování 31 mg (0.066 mmol, 16 %) ve formě bílého, amorfního, tuhého odparku. IR:  $\bar{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2926, 2868, 1709, 1683 (C=O), 1609. HRMS (ESI) *m/z* vypočteno pro C<sub>30</sub>H<sub>44</sub>O<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup> 485.3262, nalezeno 485.3263 a [M-H]<sup>-</sup> 483.3105, nalezeno 483.3118.

<sup>1</sup>H NMR δ [ppm]: 0.92 (3H, s, CH<sub>3</sub>); 0.98 (6H, s, 2x CH<sub>3</sub>); 1.01 (3H, s, CH<sub>3</sub>); 1.07 (3H, s, CH<sub>3</sub>); 2.21 (1H, td, J<sub>1</sub> = 12.5 Hz, J<sub>2</sub> = 3.0 Hz); 2.32 (1H, dt, J<sub>1</sub> = 12.7 Hz, J<sub>2</sub> = 3.0 Hz); 2.41 (1H, dd, J<sub>1</sub> = 7.5 Hz, J<sub>2</sub> = 4.4 Hz); 2.49 (1H, ddd, J<sub>1</sub> = 15.9 Hz, J<sub>2</sub> = 9.8 Hz, J<sub>3</sub> = 7.6 Hz); 3.46 (1H, td, J<sub>1</sub> = 11.1 Hz, J<sub>2</sub> = 5.1 Hz, H-19β); 5.70 (1H, s, H-29 *pro-E*); 6.28 (1H, s, H-29 *pro-Z*)

<sup>13</sup>C NMR δ [ppm]: 14.74; 15.98; 16.08; 19.77; 21.19; 21.57; 26.73; 27.60; 29.76; 29.84; 32.08; 33.32; 34.26; 36.84; 37.06; 38.60; 39.79; 40.79; 42.57; 47.51; 49.87; 55.16; 56.58; 146.41; 172.87; 182.79; 218.25

## 4.2.3 Kyselina 83 – 28-benzylester 3-oxolup-20(29)-en-28,30-diové kyseliny

### 4.2.3.1 Příprava benzyl 3,30-dioxolup-20(29)-en-28-oátu (Benzylester 84)



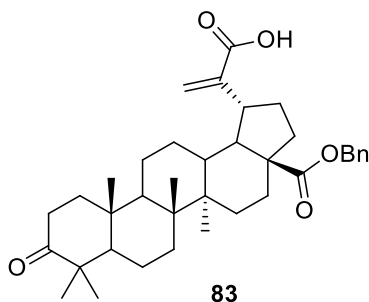
Obrázek 29: Benzylester **84**

Benzylester **77** (2 g, 3.6 mmol) byl rozpuštěn ve směsi dioxanu (50 ml), kyseliny octové (25 ml) a acethydridu (10 ml). Do roztoku byl přisypán trihydrát octanu sodného (300 mg, 2.2 mmol, 0.6 ekviv.) a dihydrát dichromanu sodného (920 mg, 3.1 mmol, 0.8 ekviv.). Reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě po dobu 18 h. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC ve směsi hex : EtOAc (4:1). Po uplynutí reakční doby byla směs zpracována extrakcí ethylacetátem z nasyceného roztoku chloridu sodného a produkt byl izolován pomocí sloupcové chromatografie na 300 ml silikagelu (15 cm sloupec) v mobilní fázi hex : EtOAc (4:1). Bylo získáno 0.97 g (1.7 mmol, 48 %) benzylesteru **84** ve formě žlutohnědého oleje. IR:  $\bar{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2957, 2934, 2865, 1716 (C=O), 1678 (C=O). HRMS (ESI) *m/z* vypočteno pro C<sub>37</sub>H<sub>50</sub>O<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup> 559.3782, nalezeno 559.3788.

<sup>1</sup>H NMR δ [ppm]: 0.76 (3H, s, CH<sub>3</sub>); 0.88 (3H, s, CH<sub>3</sub>); 0.91 (3H, s, CH<sub>3</sub>); 1.00 (3H, s, CH<sub>3</sub>); 1.06 (3H, s, CH<sub>3</sub>); 2.19 (1H, td, J<sub>1</sub> = 12.4 Hz, J<sub>2</sub> = 4.5 Hz); 2.31 (1H, dt, J<sub>1</sub> = 13.0 Hz, J<sub>2</sub> = 3.4 Hz); 2.39 (1H, dd, J<sub>1</sub> = 7.6 Hz, J<sub>2</sub> = 4.4 Hz); 2.47 (1H, ddd, J<sub>1</sub> = 15.9 Hz, J<sub>2</sub> = 9.7 Hz, J<sub>3</sub> = 7.6 Hz); 3.35 (1H, td, J<sub>1</sub> = 11.0 Hz, J<sub>2</sub> = 4.7 Hz, H-19β); 5.10 (1H, d, J = 12.4 Hz, CH<sub>2</sub>-AB systém); 5.15 (1H, d, J = 12.3 Hz, CH<sub>2</sub>-AB systém); 5.89 (1H, s, H-29 *pro-E*); 6.26 (1H, s, H-29 *pro-Z*); 7.29 – 7.39 (5H, m, CH aromatické); 9.51 (1H, s, H-30 aldehyd)

<sup>13</sup>C NMR δ [ppm]: 14.64; 15.73; 16.04; 19.77; 21.18; 21.52; 26.76; 29.63; 32.00; 32.08; 33.74; 34.26; 36.88; 37.01; 38.31; 39.77; 40.69; 42.53; 47.47; 49.88; 55.11; 56.76; 65.97; 121.25; 128.26; 128.49; 128.67; 136.56; 175.72; 195.02; 218.13

#### 4.2.3.2 Příprava 28-benzylesteru kyseliny 3-oxolup-20(29)-en-28,30-diové (Dikyselina 83)



Obrázek 30: Dikyselina **83**

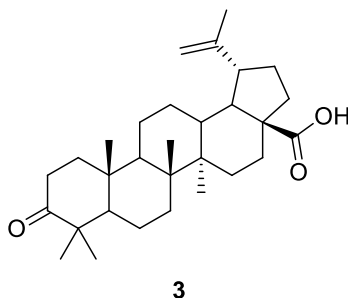
Benzylester **84** (1.2 g, 2.1 mmol) byl rozpuštěn v 2-methylpropan-2olu (50 ml) a byl přidán amylen (25 ml). Do roztoku byl přisypán dihydrogenfosforečnan draselný (4, 29.4 mmol, 14 ekviv.) a chloritan sodný (2.6 g, 28.8 mmol, 13.5 ekviv.), které byly spláchnuty vodou (75 ml). Emulze byla intenzivně míchána při laboratorní teplotě po dobu 48 h. Reakce byla v průběhu monitorována pomocí TLC ve směsi tol : Et<sub>2</sub>O (6:1). Reakční směs byla zpracována extrakcí ethylacetátem z nasyceného roztoku chloridu sodného a produkt byl izolován sloupcovou chromatografií na 170 ml silikagelu (15 cm sloupec) v mobilní fázi tol : Et<sub>2</sub>O (6:1). Bylo získáno 885 mg (1.5 mmol, 73 %) bílého, amorfního odparku dikyseliny **83**. IR:  $\bar{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2925, 2868, 1686 (C=O). HRMS (ESI) *m/z* vypočteno pro C<sub>37</sub>H<sub>50</sub>O<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup> 575.3731, nalezeno 575.3731 a [M-H]<sup>-</sup> 573.3575, nalezeno 573.3594.

<sup>1</sup>H NMR δ [ppm]: 0.78 (3H, s, CH<sub>3</sub>); 0.89 (3H, s, CH<sub>3</sub>); 0.94 (3H, s, CH<sub>3</sub>); 1.01 (3H, s, CH<sub>3</sub>); 1.06 (3H, s, CH<sub>3</sub>); 2.21 (1H, td, J<sub>1</sub> = 12.5 Hz, J<sub>2</sub> = 3.3 Hz); 2.31 (1H, dt, J<sub>1</sub> = 13.0 Hz, J<sub>2</sub> = 3.1 Hz); 2.40 (1H, dd, J<sub>1</sub> = 7.5 Hz, J<sub>2</sub> = 4.3 Hz); 2.48 (1H, ddd, J<sub>1</sub> = 15.7 Hz, J<sub>2</sub> = 9.8 Hz, J<sub>3</sub> = 7.6 Hz); 3.38 (1H, td, J<sub>1</sub> = 11.1 Hz, J<sub>2</sub> = 4.8 Hz, H-19β); 5.10 (1H, d, J = 12.2 Hz, CH<sub>2</sub>-AB systém); 5.17 (1H, d, J = 12.2 Hz, CH<sub>2</sub>-AB systém); 5.68 (1H, s, H-29 *pro-E*); 6.22 (1H, s, H-29 *pro-Z*); 7.30 – 7.39 (5H, m, CH aromatické)

<sup>13</sup>C NMR δ [ppm]: 14.72; 15.75; 16.06; 19.79; 21.18; 21.59; 26.79; 27.32; 29.66; 29.85; 32.10; 33.76; 34.26; 36.65; 37.03; 38.27; 39.75; 40.71; 42.57; 47.47; 49.88; 55.10; 56.73; 66.00; 128.27; 128.46; 128.64; 129.47; 130.35; 133.92; 171.95; 172.57; 175.84; 218.37

#### 4.2.4 Kyseliny 85 a 86– 28-(TBDPS)ester kyseliny 3-oxolup-20(29)-en-28,30-diové a 28-(TBDMS)ester kyseliny 3-oxolup-20(29)-en-28,30-diové

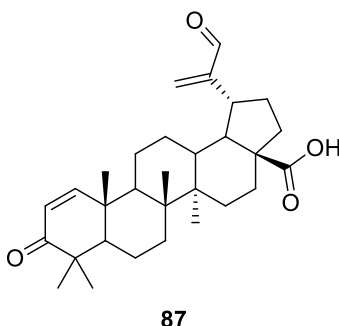
##### 4.2.4.1 Příprava 3-oxolup-20(29)-en-28-ové kyseliny (Kyseliny betulonové 3)



Obrázek 31: Kyselina betulonová 3

Kyselina betulonová (**2**, 11 g, 24 mmol) byla rozpuštěna ve směsi dioxanu (300 ml), kyseliny octové (150 ml) a acetanhydridu (75 ml). Do roztoku byl přidán trihydrát octanu sodného (2.42 g, 17.8 mmol, 0.75 ekviv.) a dihydrát dichromanu sodného (13.2 g, 44.3 mmol, 1.8 ekviv.). Reakční směs byla míchána při 50 °C po dobu 18 h. Reakce byla monitorována pomocí TLC ve směsi hex : EtOAc (4:1). Směs byla zpracována extrakcí ethylacetátem z nasyceného roztoku chloridu sodného, odparek byl rozdělen na tři části a produkt byl izolován z každé části sloupcovou chromatografií na 300 ml silikagelu v mobilní fázi hex : EtOAc (4:1) s 0.1 % kyseliny octové. Výtěžek po zpracování činil 9.3 g (20.5 mmol, 85 %) bílé krystalické látky **3**, krystalizováno z hexanu. Spektrální data byla porovnána se standardem dostupným v laboratoři a s lit.<sup>16,50</sup>.

#### 4.2.4.2 Příprava 3,30-dioxolup-1(2),20(29)-dien-28-ové kyseliny (Kyselina 87)



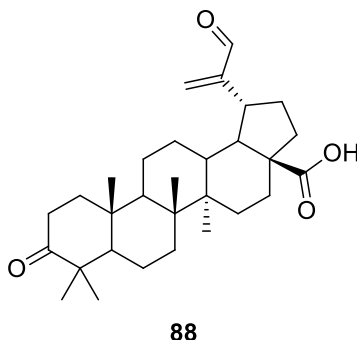
Obrázek 32: Kyselina 87

Derivát **3** (2g, 4.4 mmol) byl rozpuštěn v 2-methoxyethanolu (50 ml) a byl přidán oxid seleničitý (1 g, 16.1 mmol, 2 ekviv.). Reakce byla zahřívána na 130 °C pod refluxem po dobu 3 h. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC ve směsi hex : EtOAc (4:1). Reakční směs byla zpracována extrakcí ethylacetátem z nasyceného roztoku chloridu sodného a majoritní produkt byl izolován pomocí sloupcové chromatografie na 400 ml silikagelu (20 cm sloupec) v mobilní fázi hex : EtOAc (4:1) s 0.1 % kyseliny octové. Bylo získáno 1.77 g (3.8 mmol, 86 %) bílého, amorfního, tuhého odparku látky **87**. IR:  $\bar{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2923, 2853, 1683 (C=O), 1456 (C=C). HRMS (ESI) *m/z* vypočteno pro C<sub>30</sub>H<sub>42</sub>O<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup> 467.3156, nalezeno 467.3161.

<sup>1</sup>H NMR δ [ppm]: 0.96 (3H, s, CH<sub>3</sub>); 1.01 (3H, s, CH<sub>3</sub>); 1.05 (3H, s, CH<sub>3</sub>); 1.07 (3H, s, CH<sub>3</sub>) 1.12 (3H, s, CH<sub>3</sub>); 2.27 (1H, ddd, J<sub>1</sub> = 24.9 Hz, J<sub>2</sub> = 12.3 Hz, J<sub>3</sub> = 3.6 Hz); 2.33 (1H, dt, J<sub>1</sub> = 9.6 Hz, J<sub>2</sub> = 2.9 Hz); 3.36 (1H, td, J<sub>1</sub> = 11.1 Hz, J<sub>2</sub> = 4.8 Hz, H-19β); 5.78 (1H, d, J = 10.3 Hz, H-1); 5.94 (1H, s, H-29 *pro-E*); 6.30 (1H, s, H-29 *pro-Z*); 7.06 (1H, d, J = 10.3 Hz, H-2), 9.54 (1H, s, H-30 aldehyd)

<sup>13</sup>C NMR δ [ppm]: 14.63; 16.58; 19.10; 19.29; 21.29; 21.53; 27.90; 29.68; 37.05; 38.59; 39.69; 41.72; 42.77; 44.52; 44.79; 53.61; 56.60; 59.12; 65.44; 72.04; 125.35; 159.71; 118.79; 195.04; 205.49

#### 4.2.4.3 Příprava 3,30-dioxolup-20(29)-en-28-ové kyseliny (Kyselina 88)



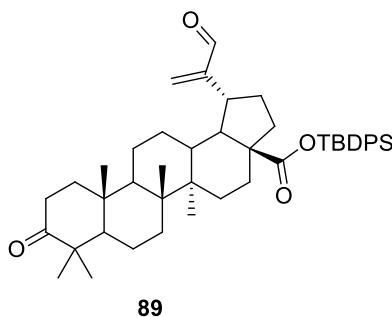
Obrázek 33: Kyselina 88

Derivát **3** (2g, 4.4 mmol) byl rozpuštěn ve směsi kyseliny octové (10 ml) a dichlormethanu (2 ml). Do roztoku byl přidán oxid seleničitý (130 mg, 1.3 mmol, 0.3 ekviv.) a *tert*-butyl hydroperoxid (3.28 ml, 26.4 mmol, 6 ekviv.). Reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě po dobu 18 h. Reakce byla monitorována pomocí TLC ve směsi hex : EtOAc (3:1). Reakční směs byla zpracována extrakcí ethylacetátem z nasyceného roztoku chloridu sodného. Extrakt byl promyt 1M roztokem heptahydrátu síranu železnatého (278 g v 1 l vody) a nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného (48 g v 0.5 l vody). Produkt byl izolován sloupcovou chromatografií na 450 ml silikagelu (30 cm sloupec) v mobilní fázi hex : EtOAc (4:1). Bylo získáno 710 mg (1.5 mmol, 34 %) bílého, tuhého odparku derivátu **87**. IR:  $\bar{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2932, 2868, 1682 (C=O). HRMS (ESI) *m/z* vypočteno pro C<sub>30</sub>H<sub>44</sub>O<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup> 469.3312, nalezeno 469.3315 a [M-H]<sup>-</sup> 467.3156, nalezeno 467.3169.

<sup>1</sup>H NMR δ [ppm]: 0.92 (3H, s, CH<sub>3</sub>); 0.95 (3H, s, CH<sub>3</sub>); 0.96 (3H, s, CH<sub>3</sub>); 1.01 (3H, s, CH<sub>3</sub>); 1.06 (3H, s, CH<sub>3</sub>); 2.22 (1H, td, J<sub>1</sub> = 12.4 Hz, J<sub>2</sub> = 3.1 Hz); 2.31 (1H, dt, J<sub>1</sub> = 12.1 Hz, J<sub>2</sub> = 3.1 Hz); 2.4 (1H, dd, J<sub>1</sub> = 7.5 Hz, J<sub>2</sub> = 4.3 Hz); 2.48 (1H, ddd, J<sub>1</sub> = 16.1 Hz, J<sub>2</sub> = 9.8 Hz, J<sub>3</sub> = 7.6); 3.34 (1H, td, J<sub>1</sub> = 11.2 Hz, J<sub>2</sub> = 4.7 Hz, H-19β); 5.92 (1H, s, H-29 *pro-E*); 6.29 (1H, s, H-29 *pro-Z*); 9.53 (1H, s, H-30 aldehyd).

<sup>13</sup>C NMR δ [ppm]: 12.21; 13.08; 14.67; 15.95; 16.05; 16.13; 19.76; 21.16; 21.50; 26.77; 27.32; 29.76; 32.00; 33.75; 34.25; 37.05; 38.52; 39.74; 40.74; 42.57; 47.48; 49.83; 54.90; 55.10; 56.60; 162.99; 181.59; 195.07; 218.14

#### 4.2.4.4 Příprava (TBDPS)ester kyseliny 3,30-dioxolup-20(29)-en-28-ové (Kyselina 89)



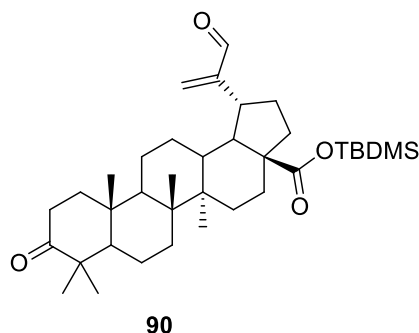
Obrázek 34: Kyselina 89

Látka **88** (600 mg, 1.3 mmol) byla rozpuštěna v dichlorethanu (10 ml) a byl přidán octan paladnatý (63 mg, 0.3 mmol, 0.25 ekviv.). Baňka byla uzavřena septem a inertizována proudem dusíku. Byl přidán trimethylamin (520  $\mu$ l, 3.8 mmol, 3 ekviv.) s *tert*-butyldiphenylsilyl chloridem (1.33 ml, 5 mmol, 4 ekviv.). Reakce byla míchána při 60 °C po dobu 1 h. Průběh reakce byl monitorován TLC analýzou ve směsi hex : EtOAc (3:1). Směs byla zfiltrována a zpracována extrakcí ethylacetátem z nasyceného roztoku chloridu sodného. Produkt byl izolován sloupcovou chromatografií na 150 ml silikagelu (10 cm sloupec) v mobilní fázi hex : EtOAc (6:1). Byl izolován bílý, amorfní, tuhý odparek s výtěžkem 499 mg (0.74 mmol, 56 %). Spektrální analýzy potvrdily přítomnost kyseliny **89**.

$^1\text{H}$  NMR  $\delta$  [ppm]: 0.76 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ); 0.87 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ); 0.92 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ); 1.01 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ); 1.06 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ); 1.14 (9H, s, *t*-Bu); 2.27 (1H, td,  $J_1 = 12.5$  Hz,  $J_2 = 3.4$  Hz); 2.39 (1H, dd,  $J_1 = 7.5$  Hz,  $J_2 = 4.8$  Hz); 2.46 (1H, ddd,  $J_1 = 16.1$  Hz,  $J_2 = 9.8$  Hz,  $J_3 = 7.6$  Hz); 3.26 (1H, td,  $J_1 = 11.0$  Hz,  $J_2 = 4.8$  Hz, H-19 $\beta$ ); 5.85 (1H, s, H-29 *pro-E*); 6.21 (1H, s, H-29 *pro-Z*); 7.35 – 7.39 (4H, m, CH aromatické); 7.41 – 7.45 (2H, m, CH aromatické); 7.66 (1H, d,  $J = 1.4$  Hz, CH aromatické); 7.67 (1H, t,  $J = 1.3$  Hz, CH aromatické); 7.70 (1H, d,  $J = 1.4$  Hz, CH aromatické); 7.71 (1H, t,  $J = 1.4$  Hz, CH aromatické); 9.49 (1H, s, H-30 aldehyd)



#### 4.2.4.5 Příprava (TBDMS)ester kyseliny 3,30-dioxolup-20(29)-en-28-ové (Kyselina 90)



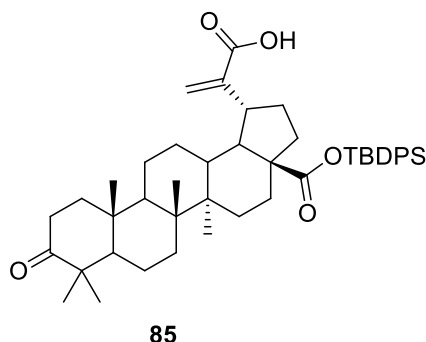
Obrázek 35: Kyselina 90

Látka **88** (287 mg, 0.61 mmol) byla rozpuštěna v dichlorethanu (10 ml) a byl přidán octan paladnatý (34 mg, 0.15 mmol, 0.25 ekviv.). Baňka byla uzavřena septem a inertizována proudem dusíku. Byl přidán trimethylamin (330  $\mu$ l, 2.45 mmol, 4 ekviv.) s *tert*-butyldimethylsilyl chloridem (370  $\mu$ l, 2.45 mmol, 4 ekviv.). Reakce byla míchána při 60 °C po dobu 1 h. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC ve směsi hex : EtOAc (4:1). Následně byla směs zfiltrována a zpracována extrakcí ethylacetátem z nasyceného roztoku chloridu sodného. Produkt **90** byl izolován pomocí sloupcové chromatografie v mobilní fázi hex : EtOAc (5:1) na 150 ml silikagelu (10 cm sloupec). Byl získán tuhý odparek látky **90** s výtěžkem 280 mg (0.48 mmol, 78 %). IR:  $\bar{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 2948, 2931, 2859, 1697 (C=O), 860 – 791 (TBDMS). HRMS (ESI)  $m/z$  vypočteno pro  $\text{C}_{36}\text{H}_{58}\text{O}_4\text{Si}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  583.4177, nalezeno 583.4179.

$^1\text{H}$  NMR  $\delta$  [ppm]: 0.28 (6H, s, 2xSi- $\text{CH}_3$ ); 0.91 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ); 0.91 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ); 0.94 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ); 0.96 (9H, s, *t*-Bu); 1.01 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ); 1.06 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ); 2.40 (1H, dd,  $J_1 = 7.6$  Hz,  $J_2 = 4.4$  Hz); 2.47 (1H, ddd,  $J_1 = 15.9$  Hz,  $J_2 = 9.8$  Hz,  $J_3 = 7.6$  Hz); 3.36 (1H, td,  $J_1 = 11.1$  Hz,  $J_2 = 4.7$  Hz, H-19 $\beta$ ); 5.89 (1H, s, H-29 *pro-E*); 6.26 (1H, s, H-29 *pro-Z*); 9.52 (1H, s, H-30 aldehyd)

$^{13}\text{C}$  NMR  $\delta$  [ppm]: 13.86; 14.66; 15.94; 16.09; 17.81; 19.77; 21.16; 21.58; 25.72; 25.80; 26.79; 27.35; 29.78; 32.29; 33.77; 34.26; 36.94; 37.05; 38.47; 39.79; 40.80; 42.62; 47.47; 49.93; 55.12; 57.81; 176.78; 195.03; 218.16

#### 4.2.4.6 Příprava 28-(TBDPS)esteru kyseliny 3-oxolup-20(29)-en-28,30-diové (Kyselina 85)



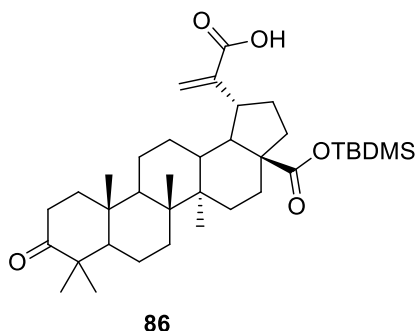
Obrázek 36: Kyselina **85**

Derivát **89** (100 mg, 0.14 mmol) byl rozpuštěn v 2-methylpropan-2-olu (5 ml). K roztoku byl přidán amylen (2.5 ml), dihydrogenfosforečnan draselný (115 mg, 0.85 mmol, 6 ekviv.) a chloritan sodný (76 mg, 0.85 mmol, 6 ekviv.). Směs byla zalita vodou (7 ml) a intenzivně míchána při laboratorní teplotě po dobu 24 h. Reakce byla monitorována pomocí TLC ve směsi hex : EtOAc (3:1). Reakční směs byla zpracována extrakcí ethylacetátem z nasyceného roztoku chloridu sodného a produkt byl izolován sloupcovou chromatografií na 150 ml silikagelu (10 cm sloupec) v mobilní fázi hex : EtOAc (6:1). Byl získán produkt **85** (94 mg, 0.13 mmol, 93 %) ve formě průhledného, amorfního, tuhého odparku. IR:  $\bar{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 2933, 2862, 1705 (C=O), 1617. HRMS (ESI)  $m/z$  vypočteno pro C<sub>46</sub>H<sub>62</sub>O<sub>5</sub>Si [M-H]<sup>-</sup> 721.4283, nalezeno 721.4307.

<sup>1</sup>H NMR δ [ppm]: 0.77 (3H, s, CH<sub>3</sub>); 0.88 (3H, s, CH<sub>3</sub>); 0.94 (3H, s, CH<sub>3</sub>); 1.02 (3H, s, CH<sub>3</sub>); 1.06 (3H, s, CH<sub>3</sub>); 1.14 (9H, s, *t*-Bu); 2.28 (1H, td, J<sub>1</sub> = 12.6 Hz, J<sub>2</sub> = 3.5 Hz); 2.36 – 2.50 (3H, m); 3.30 (1H, td, J<sub>1</sub> = 11.1 Hz, J<sub>2</sub> = 4.6 Hz, H-19β); 5.46 (1H, s, H-29 *pro-E*); 6.18 (1H, s, H-29 *pro-Z*); 7.37 (4H, td, J<sub>1</sub> = 7.6 Hz, J<sub>2</sub> = 1.6 Hz, CH-aromatické); 7.42 – 7.45 (2H, m, CH-aromatické); 7.66 (1H, d, J = 1.3 Hz, CH-aromatické); 7.68 (1H, s, CH-aromatické); 7.70 (1H, d, J = 1.3 Hz, CH-aromatické); 7.72 (1H, široký s, CH-aromatické).

<sup>13</sup>C NMR δ [ppm]: 14.18; 14.61; 15.75; 16.07; 19.39; 19.73; 21.09; 22.73; 26.76; 27.13; 29.77; 29.92; 31.66; 32.00; 32.29; 33.78; 34.18; 36.96; 37.80; 39.73; 40.71; 42.66; 47.38; 49.87; 55.04; 57.87; 127.77; 130.08; 132.15; 132.21; 138.38; 135.52; 175.21; 218.22

#### 4.2.4.7 Příprava 28-(TBDMS)esteru kyseliny 3-oxolup-20(29)-en-28,30-diové (Kyselina 86)



Obrázek 37: Kyselina 86

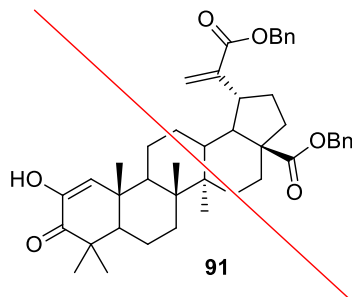
Látka **90** (280 mg, 0.48 mmol) byla rozpuštěna v 2-methylpropan-2-olu (10 ml). K roztoku byl přidán amylen (5 ml), dihydrogenfosforečnan draselný (392 mg, 2.88 mmol, 6 ekviv.) a chloritan sodný (260 mg, 2.88 mmol, 6 ekviv.). Ke směsi byla přidána voda (15 ml) a intenzivně míchána při laboratorní teplotě po dobu 24 h. Reakce byla monitorována pomocí TLC ve směsi hex : EtOAc (2:1) s 0.1 % kyseliny octové. Směs byla zpracována extrakcí ethylacetátem z nasyceného roztoku chloridu sodného a produkt byl izolován sloupcovou chromatografií na 300 ml silikagelu (20 cm sloupec) v mobilní fázi hex : EtOAc (3:1) s 0.1 % kyseliny octové. Produkt **86** byl získán s výtěžkem 120 mg (0.20 mmol, 42 %) ve formě nažloutlého oleje. IR:  $\bar{\nu}$  [ $\text{cm}^{-1}$ ]: 2952, 2931, 2863, 1708 (C=O), 1621, 864 – 792 (TBDMS). HRMS (ESI)  $m/z$  vypočteno pro  $\text{C}_{36}\text{H}_{58}\text{O}_5\text{Si}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  599.4126, nalezeno 599.4131 a  $[\text{M}-\text{H}]^-$  597.3970, nalezeno 597.3992.

$^1\text{H}$  NMR  $\delta$  [ppm]: 0.29 (6H, s, 2xSi- $\text{CH}_3$ ); 0.91 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ); 0.96 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ); 0.96 (9H, s, *t*-Bu); 0.97 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ); 1.01 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ); 1.06 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ); 2.27 (1H, td,  $J_1 = 11.4$  Hz,  $J_2 = 3.4$  Hz); 2.41 (1H, dd,  $J_1 = 7.7$  Hz,  $J_2 = 4.5$  Hz); 2.48 (1H, ddd,  $J_1 = 16.0$  Hz,  $J_2 = 9.6$  Hz,  $J_3 = 7.6$  Hz); 3.40 (1H, td,  $J_1 = 11.2$  Hz,  $J_2 = 4.7$  Hz, H-19 $\beta$ ); 5.68 (1H, s, H-29 *pro-E*); 6.22 (1H, s, H-29 *pro-Z*)

$^{13}\text{C}$  NMR  $\delta$  [ppm]: 14.51; 15.73; 16.06; 19.39; 19.72; 21.09; 21.43; 26.74; 27.13; 27.21; 29.90; 32.18; 33.75; 34.17; 36.85; 36.94; 37.85; 39.72; 40.69; 42.64; 47.38; 49.85; 55.02; 57.92; 127.77; 130.08; 132.21; 135.38; 135.52; 175.11; 194.99; 218.10

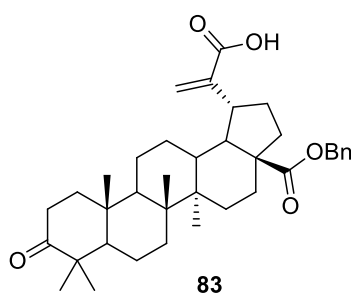
## 4.3 Příprava derivátů diosfenolu 4

### 4.3.1 Diosfenol 91 – dibenzyl 2-hydroxy-3-oxolup-1(2),20(29)-dien-28,30-dioát



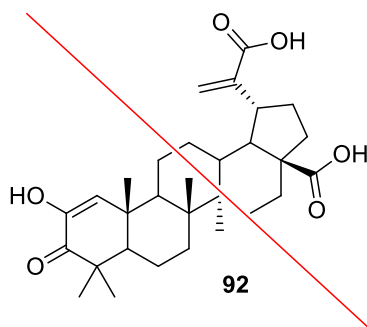
Obrázek 38: Diosfenol **91**, který nebyl připraven

Derivát **75** (130 mg, 0.24 mmol) byl rozpuštěn v 2-methylpropan-2-olu (10 ml). Reakční směs byla zahřívána na 40 °C a byl přidán první ekvivalent *tert*-butoxidu draselného (27 mg, 0.24 mmol). Následně byl do reakce skrze septum jehlou zaveden vzduch z balónku. Každou hodinu byl do reakce přidán další ekvivalent báze. Po 6 h byla reakce ukončena, celkem bylo přidáno 7 ekvivalentů *tert*-butoxidu draselného (188 mg, 1.7 mmol). V průběhu byla reakce monitorována pomocí TLC ve směsi hex : EtOAc (4:1). Po ukončení reakce byla směs zpracována extrakcí ethylacetátem z nasyceného roztoku chloridu sodného a majoritní produkt izolován sloupcovou chromatografií na 25 ml silikagelu (15 cm sloupec) v mobilní fázi hex : EtOAc (4:1). Bylo získáno 51 mg produktu. Dle <sup>1</sup>H NMR analýzy se jedná o derivát **83** (0.089 mmol, 37 %).



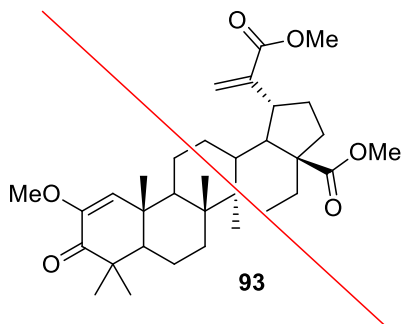
Obrázek 39: Dikyselina **83**, identifikovaný produkt reakce

### 4.3.2 Diosfenol **92** – 2-hydroxy-3-oxolup-1(2),20(29)-dien-28,30-diová kyselina



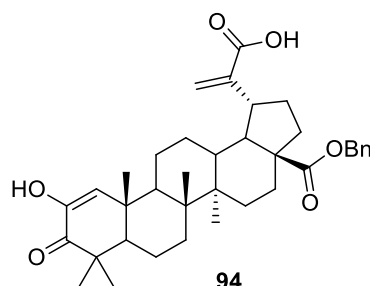
Obrázek 40: Diosfenol **92**, který nebyl připraven

Derivát **80** (30 mg, 0.062 mmol) byl rozpuštěn v 2-methylpropan-2-olu (10 ml). Ke směsi byl přisypán *tert*-butoxid draselný (28 mg, 0.25 mmol, 4 ekviv.), baňka byla zahřáta na 40 °C a skrze jehlu byl přímo do roztoku zaváděn vzduch ze zdroje. Reakce byla monitorována pomocí TLC analýzy ve směsi hex : EtOAc (2:1). Po 2 h reakce byl přidán *tert*-butoxid draselný (42 mg, 0.37 mmol, 6 ekviv.). Po 8 h došlo ke kvantitativnímu zreagování výchozí látky. Reakční směs byla zpracována extrakcí ethylacetátem z nasyceného roztoku chloridu amonného. Směs produktů byla rozpuštěna v tetrahydrofuranu (10 ml), do roztoku byl přisypán uhličitan draselný (43 mg, 0.31 mmol, 5 ekviv.), reakční baňka byla uzavřena septem a inertizována proudem dusíku. Do roztoku byl skrze septum přidán methyliodid (25  $\mu$ l, 0.40 mmol, 6.5 ekviv.). Reakce byla ponechána míchat 18 h při laboratorní teplotě. Následně byla zpracována extrakcí ethylacetátem z nasyceného roztoku chloridu sodného a produkty byly izolovány pomocí sloupcové chromatografie v mobilní fázi hex : EtOAc (3:1) na 8 ml silikagelu (8 cm sloupec). Produkty neposkytly validní  $^1\text{H}$  NMR spektra, v LC-MS analýze nebyl identifikován molekulární iont produktu. Nebyla prokázána přítomnost derivátu **93**



Obrázek 41: Diosfenol **93**, který nebyl připraven

### 4.3.3 Diosfenol 94 – 28-benzylester kyseliny 2-hydroxy-3-oxolup-1(2),20(29)-dien-28,30-diové



Obrázek 42: Diosfenol **94**

Derivát **83** (400 mg, 0.70 mmol) byl rozpuštěn v 2-methylpropan-2-olu (25 ml). Reakční směs byla zahřívána na 40 °C a byl přidán první ekvivalent *tert*-butoxidu draselného (78 mg, 0.70 mmol). Na intenzivně míchanou reakční směs byl foukán vzduch přímo ze zdroje po dobu 3 h. Při reakci byly přidány celkem 3 ekvivalenty (314 mg, 2.8 mmol) báze tak, aby bylo pH reakční směsi udrženo nad hodnotou 9. V průběhu reakce muselo být doplňováno rozpouštědlo. Reakce byla monitorována pomocí TLC, ošetřeným dusičnanem stříbrným, ve směsi hex : EtOAc (3:1). Po uplynutí reakční doby byl roztok zpracován extrakcí ethylacetátem z nasyceného roztoku chloridu sodného a majoritní produkt byl izolován sloupcovou chromatografií v gradientu mobilní fáze hex : EtOAc (z 3:1 na 2:1). Bylo získáno 230 mg (0.39 mmol, 56 %) derivátu **94** ve formě nažloutlého oleje. IR:  $\bar{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3429 (C–O), 2941, 2869, 1721 (C=O), 1689, 1667, 1646. HRMS (ESI) *m/z* vypočteno pro C<sub>37</sub>H<sub>48</sub>O<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup> 589.3524, nalezeno 589.3525 a [M–H]<sup>–</sup> 587.3367, nalezeno 587.3382.

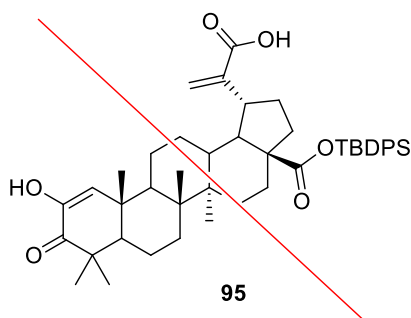
Cell Line	IC50 (μM)
A549	36,92
BJ	48,36
BJ LD	>50
CCRF-CEM	5,25
HCT116	12,83
K562	29,69

Tabulka 2: Biologické aktivity derivátu **94**

<sup>1</sup>H NMR δ [ppm]: 0.80 (3H, s, CH<sub>3</sub>); 0.92 (3H, s, CH<sub>3</sub>); 1.09 (6H, s, 2x CH<sub>3</sub>); 1.18 (3H, s, CH<sub>3</sub>); 2.22 (1H, td, J<sub>1</sub> = 12.7 Hz, J<sub>2</sub> = 3.7 Hz); 2.32 (1H, dt, J<sub>1</sub> = 12.9 Hz, J<sub>2</sub> = 3.2 Hz); 3.39 (1H, td, J<sub>1</sub> = 11.1 Hz, J<sub>2</sub> = 5.1 Hz, H-19β); 5.11 (1H, d, J = 12.3 Hz, CH<sub>2</sub>-AB systém); 5.16 (1H, d, J = 12.3 Hz, CH<sub>2</sub>-AB systém); 5.68 (1H, s, H-29 *pro-E*); 5.87 (1H, s, 2-OH diosfenol); 6.23 (1H, s, H-1); 6.40 (1H, s, H-29 *pro-Z*); 7.30 – 7.40 (5H, m, CH aromatické).

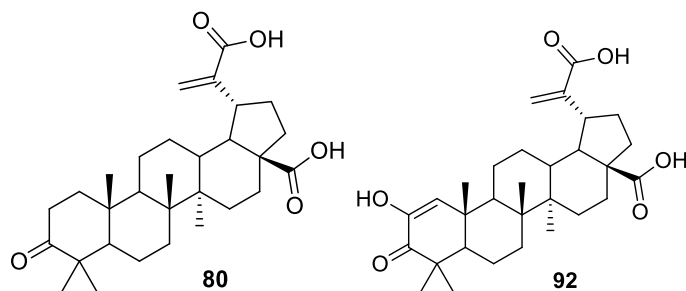
$^{13}\text{C}$  NMR  $\delta$  [ppm]: 14.96; 16.42; 18.86; 20.29; 21.29; 21.74; 27.13; 27.75; 29.55; 32.12; 32.46; 34.10; 36.63; 38.27; 38.76; 41.60; 42.83; 44.10; 45.73; 50.95; 54.16; 56.71; 66.01; 126.02; 128.28; 128.48; 128.67; 128.96; 136.54; 144.05; 145.83; 171.53; 175.81; 201.32

#### 4.3.4 Diosfenol 95 – 28-(TBDPS)ester kyseliny 2-hydroxy-3-oxolup-1(2),20(29)-dien-28,30-diové



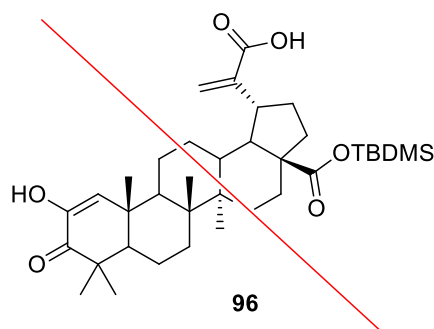
Obrázek 43: Diosfenol **95**, který nebyl připraven

Derivát **85** (94 mg, 0.13 mmol) byl rozpuštěn v 2-methylpropan-2-olu (20 ml). Roztok byl zahříván na 40 °C. Do reakční směsi byly přidány 2 ekvivalenty *tert*-butoxidu draselného (29 mg, 0.26 mmol). Na intenzivně míchanou reakční směs byl foukán vzduch přímo ze zdroje po dobu 3 h. V průběhu reakce bylo udržováno pH nad hodnotou 9, celkem bylo přidáno 8 ekvivalentů *tert*-butoxidu draselného (116 mg, 1.04 mmol). Kvůli vysoušení roztoku bylo do reakce přidáváno rozpouštědlo. Reakce byla monitorována pomocí TLC, ošetřeným dusičnanem stříbrným, ve směsi hex : EtOAc (3:1). Po uplynutí reakční doby byl roztok zpracován extrakcí ethylacetátem z nasyceného roztoku chloridu amonného a majoritní produkt byl izolován sloupcovou chromatografií v mobilní fázi hex : EtOAc (2:1). Bylo získáno 36 mg produktu. Dle  $^1\text{H}$  NMR analýzy se jedná o derivát **80** (0.074 mmol, 57 %). Při HRMS analýze byl v surové směsi před zpracováním objeven molekulový iont derivátu **92**  $m/z = 499.3047$ . Izolace minoritního produktu se však nepodařila.



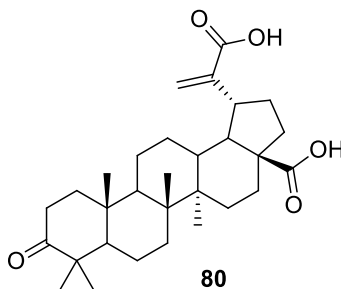
Obrázek 44: Vznikající deriváty **80** a **92**

### 4.3.5 Diosfenol **96** – 28-(TBDMS)ester kyseliny 2-hydroxy-3-oxolup-1(2),20(29)-dien-28,30-diové



Obrázek 45: Diosfenol **96**, který nebyl připraven

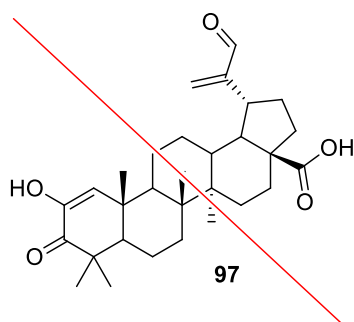
Derivát **86** (80 mg, 0.13 mmol) byl rozpuštěn v 2-methylpropan-2-olu (10 ml). Do roztoku byl přidán *tert*-butoxid draselný (30 mg, 0.27 mmol, 2 ekvív.) a reakční směs byla zahřáta na 40 °C. Na intenzivně míchanou reakční směs byl foukán vzduch ze zdroje. Reakce byla monitorována pomocí TLC analýzy ve směsi hex : EtOAc (4:1) s 0.1 % kyseliny octové. Po 2 h reakce byl přidán další *tert*-butoxid draselný (30 mg, 0.27 mmol, 2 ekvív.). Po 4 h byla reakce zpracována extrakcí ethylacetátem z nasyceného roztoku chloridu amonného a produkt byl izolován sloupcovou chromatografií na 8 ml silikagelu (8 cm sloupec) v mobilní fázi hex : EtOAc (2:1) s 0.1 % kyseliny octové. Bylo získáno 21 mg (0.043 mmol, 33 %) bílého amorfního odparku. Dle <sup>1</sup>H NMR analýzy se jedná o derivát **80**.



Obrázek 46: Vznikající derivát **80**



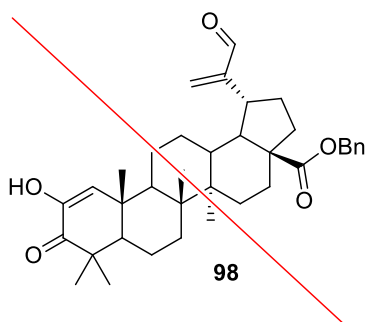
#### 4.3.6 Diosfenol **97** – 2-hydroxy-3,30-dioxolup-1(2),20(29)-dien-28-ová kyselina



Obrázek 47: Diosfenol **97**, který nebyl připraven

Derivát **88** (50 mg, 0.11 mmol) byl rozpuštěn v 2-methylpropan-2-olu (15 ml). Do roztoku byl přidán *tert*-butoxid draselný (30 mg, 0.27 mmol, 3 ekviv.) a reakční směs byla zahřáta na 40 °C. Na intenzivně míchanou reakční směs byl foukán vzduch ze zdroje. Do reakční směsi byl po 2 h reakce přidán další *tert*-butoxid draselný (30 mg, 0.27 mmol, 3 ekviv.). Reakce byla monitorována pomocí TLC analýzy ve směsi hex : EtOAc (4:1) s 0.1 % kyseliny octové. Po 4 h došlo k úplné konverzi výchozí látky. Reakční směs byla zpracována extrakcí ethylacetátem z nasyceného roztoku chloridu amonného. Izolace produktů reakce proběhla pomocí sloupcové chromatografie na 10 ml silikagelu (20 cm sloupec) v mobilní fázi hex : EtOAc (3:1) s 0.1 % kyseliny octové. Byly izolovány dva majoritní produkty, ani jeden neodpovídal dle spektrálních analýz produktu **97**.

#### 4.3.7 Diosfenol **98** –benzyl 2-hydroxy-3,30-dioxolup-1(2),20(29)-dien-28-oát



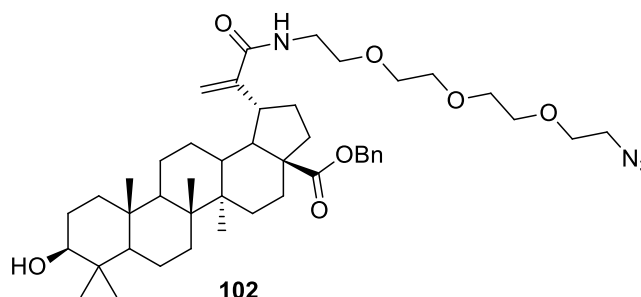
Obrázek 48: Diosfenol **98**, který nebyl připraven

Derivát **84** (90 mg, 0.16 mmol) byl rozpuštěn v 2-methylpropan-2-olu (15 ml). Do roztoku byl přidán *tert*-butoxid draselný (108 mg, 0.96 mmol, 6 ekviv.) a reakční směs byla zahřáta na 40 °C. Na intenzivně míchanou reakční směs byl foukán vzduch ze zdroje. Reakce byla monitorována pomocí TLC analýzy ve směsi hex : EtOAc (3:1). Po 4 h došlo k úplné konverzi výchozí látky a reakční směs byla zpracována pomocí extrakce ethylacetátem

z nasyceného roztoku chloridu sodného. Produkt reakce byl izolován pomocí sloupcové chromatografie na 20 ml silikagelu (8 cm sloupec) v mobilní fázi hex : EtOAc (3:1) s 0.1 % kyseliny octové. Bylo získáno 27 mg bílého krystalického produktu, z  $^1\text{H}$  NMR analýzy nebylo možné vyčíst požadovanou strukturu diosfenolu, ve spektru chybí informace o dvojné vazbě a přítomnosti diosfenolových protonů, avšak jsou přítomny multiplet aromatických benzylových vodíků a multiplet AB systému benzylové skupiny.

## 4.4 Příprava konjugovaných molekul

### 4.4.1 Konjugovaný derivát 102

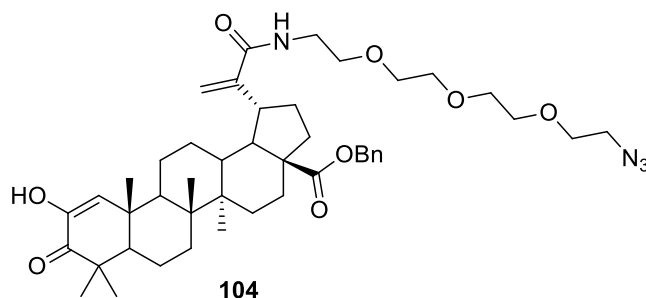


Obrázek 49: Derivát **102**

Derivát **78** (50 mg, 0.086 mmol) byl rozpuštěn v DMF (0.5 ml). Do reakční směsi byl přidán EDCI (25 mg, 0.13 mmol, 1.5 ekviv.) a HOBT (18 mg, 0.13 mmol, 1.5 ekviv.). Reakční směs byla ponechána míchat při laboratorní teplotě po dobu 0.5 h a následně byl přidán diizopropylethylamin (23  $\mu\text{l}$ , 0.13 mmol, 1.5 ekviv.) a 11-Azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amin (20  $\mu\text{l}$ , 0.16 mmol, 2 ekviv.). Reakční směs byla ponechána míchat za laboratorní teploty do druhého dne. Dle TLC analýzy, ve směsi hex : EtOAc (2:1), došlo ke kvantitativnímu zreagování výchozího derivátu. Reakční směs byla zpracována extrakcí ethylacetátem z nasyceného roztoku chloridu sodného. Produkt byl izolován sloupcovou chromatografií na 20 ml silikagelu (10 cm sloupec) v mobilní fázi hex : EtOAc (2:1). Bylo získáno 23 mg (0.030 mmol, 34 %) produktu **102** ve formě průsvitného oleje.

$^1\text{H}$  NMR  $\delta$  [ppm]: 0.75 (6H, s, 2x  $\text{CH}_3$ ); 0.79 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ); 0.91 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ); 0.95 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ); 2.17 (1H, td,  $J_1 = 12.6$  Hz,  $J_2 = 3.6$  Hz); 2.28 (1H, dt,  $J_1 = 12.6$  Hz,  $J_2 = 3.2$  Hz); 3.18 (2H, m, H-19 $\beta$  a H-3 $\alpha$ ); 3.38 (2H, t,  $J = 4.9$  Hz,  $\text{CH}_2\text{-N}_3$ ); 3.49 – 3.69 (14H, m, linker); 5.09 (1H, d,  $J = 12.3$  Hz,  $\text{CH}_2\text{-AB}$  systém); 5.14 (1H, d,  $J = 12.3$  Hz,  $\text{CH}_2\text{-AB}$  systém); 5.24 (1H, s, H-29 *pro-E*); 5.39 (1H, s, H-29 *pro-Z*); 6.25 (1H, t,  $J = 5.6$  Hz, NH-amid); 7.29 – 7.38 (5H, m, CH-benzylester)

#### 4.4.2 Konjugovaný derivát 104



Obrázek 50: Derivát **104**

Derivát **94** (120 mg, 0.20 mmol) byl rozpuštěn v DMF (2 ml). Do reakční směsi byl přidán EDCI (78 mg, 0.41 mmol, 2 ekvív.) a HOBt (42 mg, 0.31 mmol, 1.5 ekvív.). Reakční směs byla ponechána míchat při laboratorní teplotě po dobu 0.5 h a následně byl přidán diizopropylethylamin (54  $\mu$ l, 0.31 mmol, 1.5 ekvív.) a 11-Azido-3,6,9-trioxaundecan-1-amin (90  $\mu$ l, 0.45 mmol, 2.25 ekvív.). Reakční směs byla ponechána míchat za laboratorní teploty do druhého dne. Dle TLC analýzy, ve směsi toluen : Et<sub>2</sub>O (1:1), došlo ke kvantitativnímu zreagování výchozího derivátu. Reakční směs byla zpracována extrakcí ethylacetátem z nasyceného roztoku chloridu sodného. Produkt byl izolován sloupcovou chromatografií na 30 ml silikagelu (15 cm sloupec) v mobilní fázi toluen : Et<sub>2</sub>O (1:1). Bylo získáno 52 mg (0.066 mmol, 33 %) bílého, tuhého odparku látky **104**. IR:  $\bar{\nu}$  [cm<sup>-1</sup>] = 3391 (C–O), 2940, 2868, 2101 (N=N), 1720 (C=O), 1662 (N–C), 1615. HRMS (ESI)  $m/z$  vypočteno pro C<sub>37</sub>H<sub>48</sub>O<sub>6</sub> [M+H]<sup>+</sup> 789.4797, nalezeno 789.4804.

Cell Line	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
A549	26,46
BJ	29,91
BJ LD	43,80
CCRF-CEM	4,70
HCT116	9,59
K562	22,05

Tabulka 3: Biologické aktivity derivátu **104**

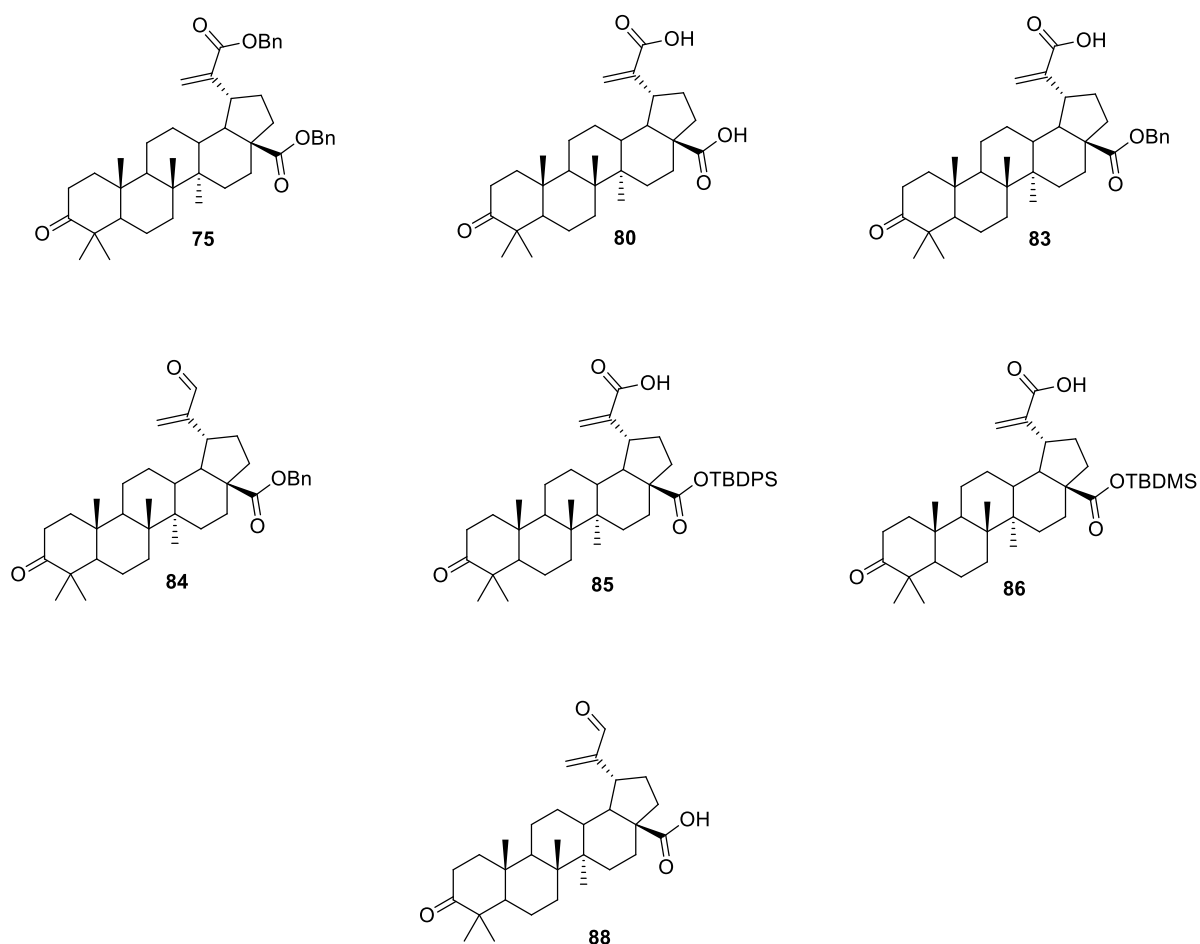
<sup>1</sup>H NMR  $\delta$  [ppm]: 0.78 (3H, s, CH<sub>3</sub>); 0.88 (3H, s, CH<sub>3</sub>); 1.08 (6H, s, 2x CH<sub>3</sub>); 1.17 (3H, s, CH<sub>3</sub>); 2.19 (1H, td, J<sub>1</sub> = 13.5 Hz, J<sub>2</sub> = 3.9 Hz); 2.28 (1H, dt, J<sub>1</sub> = 13.0 Hz, J<sub>2</sub> = 3.3 Hz); 3.19 (1H, td, J<sub>1</sub> = 15.7 Hz, J<sub>2</sub> = 4.5 Hz, H-19 $\beta$ ); 3.36 (2H, t, J = 5.3 Hz, CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>); 3.42 – 3.67 (14H, m, linker); 5.09 (1H, d, J = 12.3 Hz, CH<sub>2</sub>-AB systém); 5.13 (1H, d, J = 12.3 Hz, CH<sub>2</sub>-AB systém); 5.24 (1H, s, H-29 *pro-E*); 5.38 (1H, s, H-29 *pro-Z*); 5.87 (1H, s, 2-OH diosfenol); 6.26 (1H, t, J = 5.5 Hz, NH-amid) 6.38 (1H, s, H-1); 7.28 – 7.38 (5H, m, CH-benzylester).

$^{13}\text{C}$  NMR  $\delta$  [ppm]: 14.70; 16.40; 18.83; 20.25; 21.26; 21.71; 27.19; 29.56; 31.91; 32.18; 36.63; 38.15; 38.73; 39.20; 41.56; 42.84; 44.08; 45.89; 50.22; 50.81; 54.18; 56.70; 70.20; 70.75; 70.80; 70.83; 116.24; 125.63; 128.21; 128.42; 128.63; 128.82; 136.58; 144.02; 152.03; 169.62; 175.91; 201.27

## 5 Shrnutí

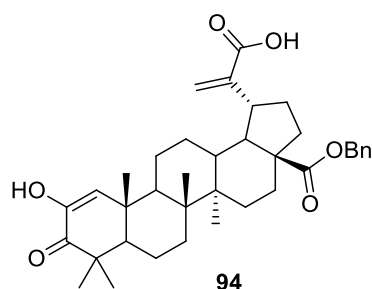
Tato diplomová práce se zabývá přípravou derivátů lupanu oxidovaných do vyšších stupňů. Hlavní motivací tohoto díla bylo připravit derivatizovaný diosfenol kyseliny betulinové konjugovaný v poloze C-30 tak, aby byla molekula dále aplikovatelná pro biologické studie. Prvním z dílčích cílů bylo vybrat a připravit výše oxidované deriváty kyseliny betulinové tak, aby mohly být použity pro přípravu odvozených diosfenolů. Druhým cílem bylo identifikovat nejsnazší a nejefektivnější cestu vedoucí k diosfenolům. A nakonec vytvořit konjugáty připravených diosfenolů.

Byly připraveny výše oxidované deriváty **75**, **80**, **83**, **84**, **85**, **86** a **88**, odvozené od kyseliny betulinové. Tyto molekuly byly zvoleny jako prekurzory pro přípravu diosfenolových derivátů na základě strukturní podobnosti s diosfenolem **4** (*Schéma 1*, str. 22).



Obrázek 51: Připravené prekurzory diosfenolů.

Byly provedeny optimalizace přípravy diosfenolů ze zmíněných prekurzorů. Derivát **94** byl připraven vzdušnou oxidací látky **83** v *t*-BuOH v protředí *t*-BuOK (Schéma 27, str. 50). Zbylé prekurzory neposkytly požadovanou sloučeninu.



Obrázek 52: Připravený derivát diosfenolu **94**

U jednotlivých reakčních sledů byly porovnány a sumarizovány výhody a nevýhody každého z použitých postupů.

Připravovaný derivát:	<b>75</b>	<b>80</b>	<b>83</b>	<b>84</b>	<b>85</b>	<b>86</b>	<b>88</b>
Konečný výtěžek:	18%	8%	23%	32%	17%	11%	34%
Byl z derivátu připraven diosfenol?	NE	NE	<b>ANO</b>	NE	NE	NE	NE
Průměrný výtěžek [%]:	74%	53%	69%	69%	68%	61%	62%
Počet reakčních kroků:	5	3	4	3	4	4	2
Nejnižší výtěžek v reakčním sledu:	48%	16%	60%	60%	40%	40%	40%

Tabulka 4: Tabulka porovnávající reakční sledy příprav jednotlivých prekurzorů.

Příprava derivátu **75** proběhla s celkovým výtěžkem 18 % po pěti krocích syntézy (Schéma 20, str. 39). Problematickým krokem reakčního sledu byla oxidace hydroxylové funkční skupiny uhlíku C-3 dichromanem sodným, kdy pravděpodobně kvůli nespecifitě oxidačního činidla docházelo k oxidacím i na jiných částech molekuly. Minoritní produkty oxidací nebyly izolovány. Další překážkou v použití tohoto reakčního schématu byl vyšší počet reakčních kroků, což vedlo ke snížení celkového výtěžku prekurzoru. Při pokusech o přípravu diosfenolu **91** (Schéma 24, str. 48) z derivátu **75** došlo při optimalizaci reakčních podmínek k selektivnímu ochránění benzylové skupiny v poloze C-30.

Příprava derivátu **80** (Schéma 21, str. 41) byla problematická z důvodu špatné rozpustnosti vznikajících derivátů v rozpouštědlech používaných při reakcích i chromatografii. Látka **80** byla připravena s celkovým výtěžkem 8 % po třech krocích syntézy. Ve finálním kroku nedošlo ke kvantitativní konverzi reaktantů. Důvodem byla vznikající sraženina, kterou se nepodařilo rozpustit při zvýšení reakční teploty, ani po přidání nadbytečného rozpouštědla.

Příprava derivátu **83** proběhla s celkovým výtěžkem 23 % po čtyřech reakčních krocích (*Schéma 22*, str. 43). V průběhu reakčního sledu nebyly pozorovány žádné zásadní nedostatky, které by negativně ovlivnily hodnocení tohoto reakčního přístupu. Průměrný výtěžek jednotlivých reakcí je roven 69 %, nejnižší dosažený výtěžek činí 60 %. Jedinou nevýhodou, která byla pro tento pracovní postup sledována, je problematika ochrání benzylové chránicí skupiny modifikovaných lupanových konjugátů.

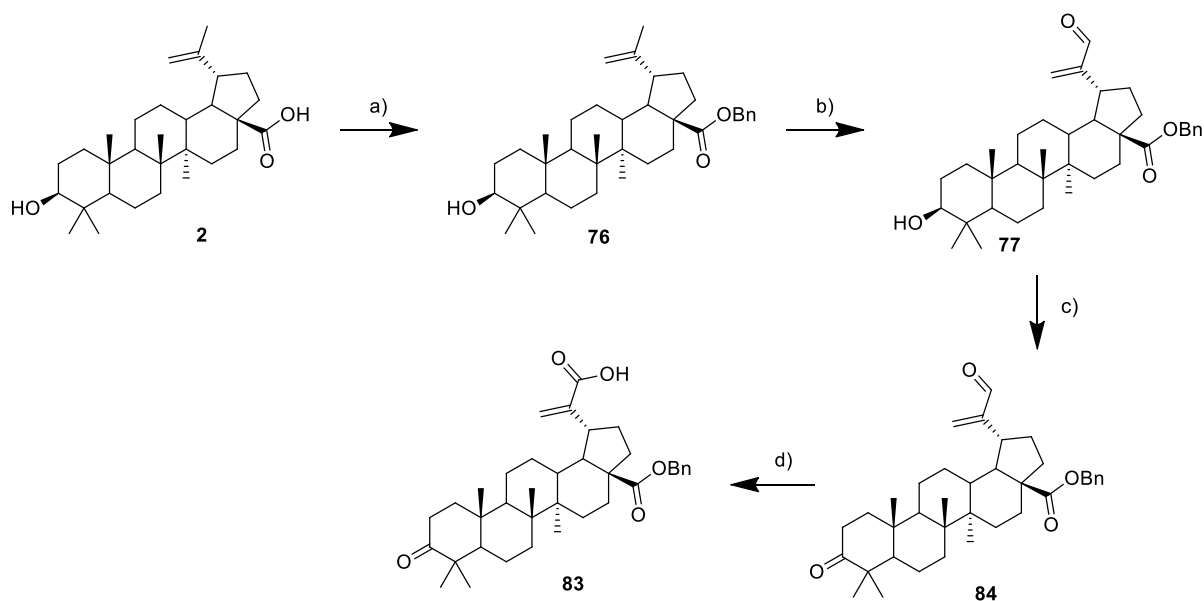


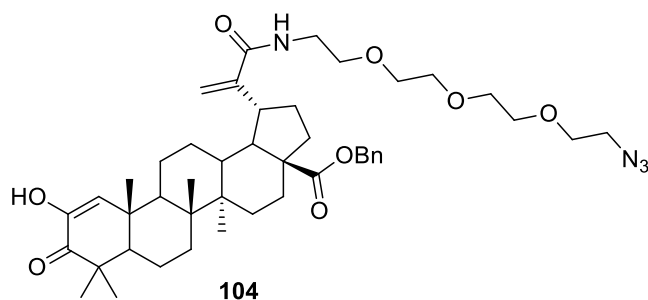
Schéma 34: nejefektivnější použitá cesta při přípravě derivátů diofenolů: a) BnBr, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, KOH, THF, 48 h, r.t. – 60 °C; b) SeO<sub>2</sub>, 2-metoxyethanol, 3 h, 140 °C; c) Na<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, NaOAc, HOAc, AcO<sub>2</sub>, dioxan, 18 h, r.t.; d) NaClO<sub>2</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, voda, *t*-BuOH, amylen, 48 h, r.t.

Deriváty **85** a **86** byly navrženy tak, aby je po konjugaci s linkerem bylo snadné ochránit a připravit tak konjugát volné kyseliny. Po optimalizaci dílčích reakčních kroků byly připraveny deriváty **85** a **86** (*Schéma 23*, str. 47) s celkovými výtěžky 17 % a 11 % po čtyřech reakčních krocích. Pro tuto syntézu byl zvolen obrácený postup, při kterém byla nejprve oxidována poloha C-3 a až po vzniku ketonu byla zaměřena pozornost na oxidaci uhlíku C-30. Při oxidaci allylové polohy C-30 oxidem seleničitým došlo k souběžné oxidaci uhlíků C-1 a C-2. Vznikající derivát byl izolován a charakterizován, jako kyselina **87** (*Obrázek 16*, str. 44). Silylové chránicí skupiny se ukázaly být stabilní při pinnicově oxidaci, avšak v silně bazickém prostředí při přípravě diosfenolu došlo v obou případech k rychlé deprotekcí před vznikem požadovaného produktu (*Schémata 28 a 29*, str.: 52, 53). Hlavní nevýhodou tohoto syntetického postupu je vznik majoritního vedlejšího produktu **87** a labilita látek **85** a **86** v silně bazickém prostředí při přípravě diosfenolu.

Derivát **88** je meziproduktem syntézy silylovaných prekurzorů **85** a **86**. Pokusy o optimalizaci syntézy diosfenolu skončily neúspěšně (*Schéma 30*, str. 54). Látka **88** byla zvolena tak, aby byl diosfenol připraven před chránícím krokem. Pokud by byla příprava diosfenolu úspěšná, následovalo by ochránění volné karboxylové funkce silylovou chránící skupinou a pinnicova oxidace karbonylu C-30.

Derivát **84** je meziproduktem syntézy látky **83**. Pokusy o optimalizaci syntézy diosfenolu skončily neúspěšně (*Schéma 31*, str. 56). Látka **84** byla zvolena, jako náhrada derivátu **88**. Pokud by byla příprava diosfenolu úspěšná následoval by reakční sled popsany ve *schématu 31*.

Po optimalizaci reakčních podmínek na jednodušším substrátu **87** byl reakcí derivátu **94** s 11-azido-3,6,9-trioxaundecan-1-aminem (3PEG amido-azidový linker) připraven finální konjugát **104** (*Schéma 33*, str. 59).



Obrázek 53: Připravený konjugát **104**



## 6 Závěr

- 1) Byly připraveny výše oxidované prekurzory diosfenolových derivátů kyseliny betulinové: molekuly **75**, **80**, **83**, **84**, **85**, **86** a **88**. Nově vzniklé deriváty byly charakterizovány pomocí  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR analýzy, v HRMS analýze se jejich molekulové ionty a byly identifikovány charakteristické vibrace významných vazeb pomocí IR spektrometrie.
- 2) Po optimalizaci byl připraven diosfenol **94** s 56% výtěžkem po zpracování. Nově vzniklá molekula byla charakterizována pomocí  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR analýzy, byl určen molekulový iont a sumární vzorec pomocí HRMS analýzy, byly změřeny specifické vibrace vazeb v IR spektrometrii. Derivát byl zaslán na měření biologických aktivit. Nejnižší hodnotu inhibiční koncentrace vykázal diosfenol **94** na buněčnou linii CCRF-CEM s  $\text{IC}_{50} = 5.25 \text{ mmol/l}$ .
- 3) Jako nejvhodnější reakční postup pro přípravu prekurzorů diosfenolu byl identifikován reakční sled přípravy derivátu **83** (*Schéma 22*, str. 43). Jednotlivé reakce vykazovaly dobré výtěžky pohybující se okolo 69 % po zpracování. Jedná se také o jediný prekurzor, ze kterého se podařilo připravit derivát diosfenolu **94**.
- 4) Byl připraven konjugát **104** s 23% výtěžkem po zpracování. Derivát byl charakterizován pomocí HRMS,  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR analýzy. Byly změřeny charakteristické vibrace vazeb v IR spektrometrii. Látka byla zaslána na měření biologických aktivit. Nejnižší hodnotu inhibiční koncentrace vykázal derivát **104** pro buněčnou linii CCRF-CEM s  $\text{IC}_{50} = 4.70 \text{ mmol/l}$

## 7 Seznam použité literatury

- (1) Evers, M., Poujade, C., Soler, F., Ribeill, Y., James, C., Lelièvre, Y., Dereu, N. Betulinic Acid Derivatives: A New Class of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Specific Inhibitors with a New Mode of Action. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 1056. <https://doi.org/10.1021/jm950670t>.
- (2) Pisha, E., Chai, H., Lee, I. S., Chagwedera, T. E., Farnsworth, N. R., Cordell, G. A., Beecher, C. W. W., Fong, H. H. S., Kinghorn, A. D., Brown, D. M., Wani, M. C., Wall, M. E., Hieken, T. J., Gupta, T. K. D., & Pezzuto, J. M. Discovery of Betulinic Acid as a Selective Inhibitor of Human Melanoma That Functions by Induction of Apoptosis. *Nat. Med.* **1995**, *1*, 1046. <https://doi.org/10.1038/nm1095-1046>.
- (3) Dang Thi, T. A.; Kim Tuyet, N. T.; Pham The, C.; Thanh Nguyen, H.; Ba Thi, C.; Doan Duy, T.; D'hooghe, M.; Van Nguyen, T. Synthesis and Cytotoxic Evaluation of Novel Ester-Triazole-Linked triterpenoid–AZT Conjugates. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 5190. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.09.079>.
- (4) Urban, M.; Sarek, J.; Kvasnica, M.; Tislerova, I.; Hajduch, M. Triterpenoid Pyrazines and Benzopyrazines with Cytotoxic Activity. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 526. <https://doi.org/10.1021/np060436d>.
- (5) Spivak, A. Y.; Nedopekina, D. A.; Khalitova, R. R.; Gubaidullin, R. R.; Odinokov, V. N.; Bel'skii, Y. P.; Bel'skaya, N. V; Khazanov, V. A. Triphenylphosphonium Cations of Betulinic Acid Derivatives: Synthesis and Antitumor Activity. *Med. Chem. Res.* **2017**, *26*, 518. <https://doi.org/10.1007/s00044-016-1771-z>.
- (6) Soral, M.; Hodon, J.; Dickinson, N. J.; Sidova, V.; Gurska, S.; Dzubak, P.; Hajduch, M.; Sarek, J.; Urban, M. Preparation of Conjugates of Cytotoxic Lupane Triterpenes with Biotin. *Bioconjug. Chem.* **2015**, *26*, 2563. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00567>.
- (7) Macías, F. A.; Simonet, A. M.; Galindo, J. C. G.; Pacheco, P. C.; Sánchez, J. A. Bioactive Polar Triterpenoids from *Melilotus Messanensis*. *Phytochemistry* **1998**, *49*, 709. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(98\)00167-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(98)00167-8).

- (8) Mukherjee, R., et. al. Betulinic Acid and Its Derivatives as Anti-Angiogenic Agents. *Bioorg MedChem* **2004**, *14*, 2181. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2004.02.044>.
- (9) Hata, K.; Hori, K.; Takahashi, S. Differentiation- and Apoptosis-Inducing Activities by Pentacyclic Triterpenes on a Mouse Melanoma Cell Line. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 645. <https://doi.org/10.1021/np0104673>.
- (10) Wei, Y.; Ma, C.-M.; Hattori, M. Synthesis and Evaluation of A-Seco Type Triterpenoids for Anti-HIV-1protease Activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 4112. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2009.05.002>.
- (11) Urban, M.; Vlk, M.; Dzubak, P.; Hajduch, M.; Sarek, J. Cytotoxic Heterocyclic Triterpenoids Derived from Betulin and Betulinic Acid. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 3666. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.03.066>.
- (12) Kumar, V.; Rani, N.; Aggarwal, P.; Sanna, V. K.; Singh, A. T.; Jaggi, M.; Joshi, N.; Sharma, P. K.; Irchhaiya, R.; Burman, A. C. Synthesis and Cytotoxic Activity of Heterocyclic Ring-Substituted Betulinic Acid Derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 5058. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.08.003>.
- (13) Li, J.; Goto, M.; Yang, X.; Morris-Natschke, S. L.; Huang, L.; Chen, C.-H.; Lee, K.-H. Fluorinated Betulinic Acid Derivatives and Evaluation of Their Anti-HIV Activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26*, 68. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.11.029>.
- (14) Endova, M. Preparation of 2,3-secodiacids of the lupane series. *ChemComm* **1994**, *59*, 1420. <https://doi.org/10.1135/cccc19941420>.
- (15) Urban, M.; Sarek, J.; Tislerova, I.; Dzubak, P.; Hajduch, M. Influence of Esterification and Modification of A-Ring in a Group of Lupane Acids on Their Cytotoxicity. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 5527. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2005.07.011>.
- (16) Urban, M.; Sarek, J.; Klinot, J.; Korinkova, G.; Hajduch, M. Synthesis of A-Seco Derivatives of Betulinic Acid with Cytotoxic Activity. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 1100. <https://doi.org/10.1021/np049938m>.
- (17) Jia Hao, et. al. Efficient Access to Isomeric 2,3-Dihydroxy Lupanes: First Synthesis of Alphitolic Acid. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *65*, 7975. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2009.07.047>.

- 18) Borkova L., et. al. Synthesis of Betulinic Acid Derivatives with Modified A-Rings and Their Application as Potential Drug Candidates. *AsianJOC* **2018**, *7*, 1542. <https://doi.org/10.1002/ajoc.201800163>.
- (19) Hao, J.; Zhang, P.; Wen, X.; Sun, H. Efficient Access to 2-Isobetulinic Acid, 2-Isooleanolic Acid, and 2-Isoursolic Acid. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 7405. <https://doi.org/10.1021/jo801232s>.
- (20) Urban M., et. al. Influence of Esterification and Modification of A-Ring in a Group of Lupane Acids on Their Cytotoxicity. *Bioorg MedChem* **2005**, *13*, 5527. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2005.07.011>.
- (21) Mukherjee, R.; Jaggi, M.; Rajendran, P.; Srivastava, S. K.; Siddiqui, M. J. A.; Vardhan, A.; Burman, A. C. Synthesis of 3-O-acyl/3-benzylidene/3-hydrazone/3-hydrazine/17-Carboxyacryloyl Ester Derivatives of Betulinic Acid as Anti-Angiogenic Agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 3169. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2004.04.010>.
- (22) Borková, L.; Frydrych, I.; Jakubcová, N.; Adámek, R.; Lišková, B.; Gurská, S.; Medvedíková, M.; Hajdúch, M.; Urban, M. Synthesis and Biological Evaluation of Triterpenoid Thiazoles Derived from Betulonic Acid, Dihydrobetulonic Acid, and Ursonic Acid. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *185*, 111806. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111806>.
- (23) Borkova, L.; Gurska, S.; Dzubak, P.; Burianova, R.; Hajduch, M.; Sarek, J.; Popa, I.; Urban, M. Lupane and 18 $\alpha$ -Oleanane Derivatives Substituted in the Position 2, Their Cytotoxicity and Influence on Cancer Cells. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *121*, 120. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.05.029>.
- (24) You, Y.-J.; Kim, Y.; Nam, N.-H.; Ahn, B.-Z. Synthesis and Cytotoxic Activity of A-Ring Modified Betulinic Acid Derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 3137. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(03\)00724-8](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(03)00724-8).
- (25) Klinot, J, Svetly, J, Kudlackova, D. Preparation of 2-methyl-3-oxo triterpenoids of 18t-oleanane series and the conformation of ring A. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1979**, *44*, 211. <https://doi.org/10.1135/cccc19790211>.

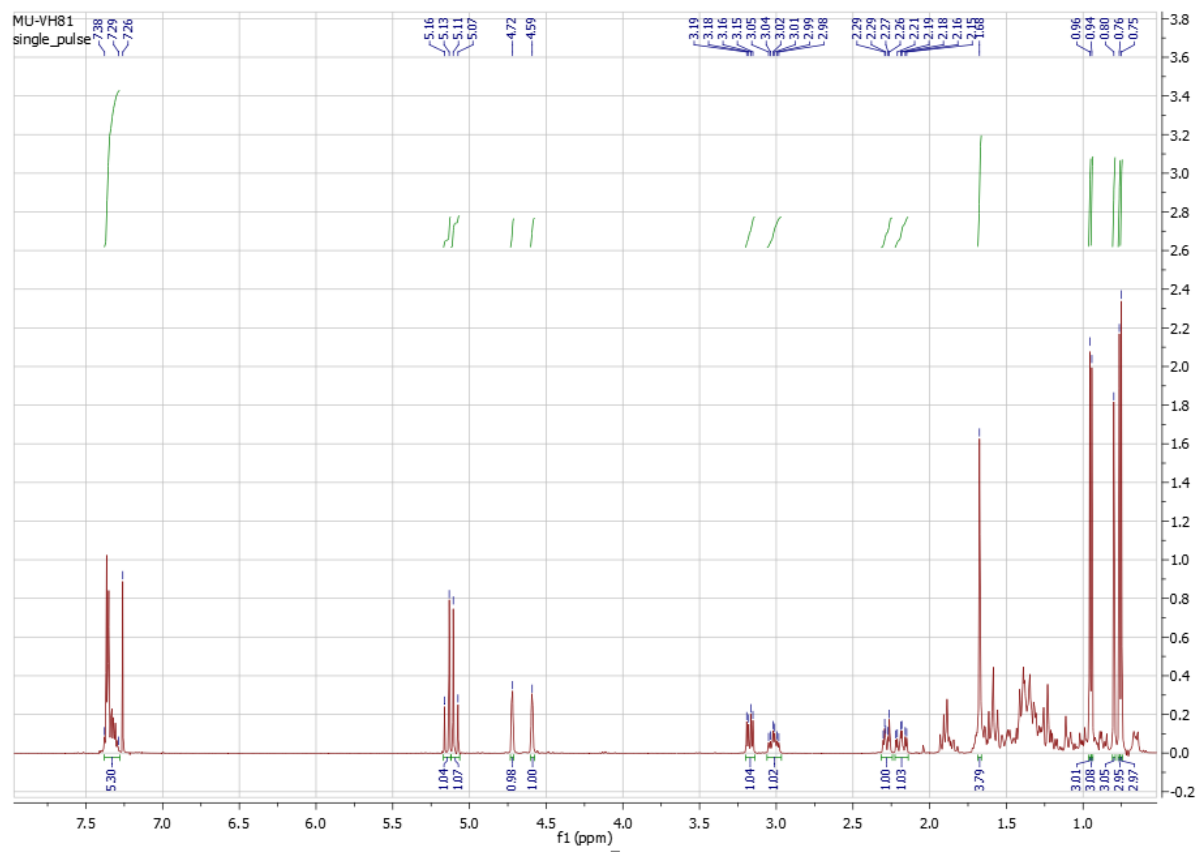
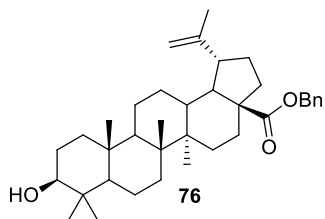
- (26) Grishko, V. V.; Tolmacheva, I. A.; Nebogatikov, V. O.; Galaiko, N. V.; Nazarov, A. V.; Dmitriev, M. V.; Ivshina, I. B. Preparation of Novel Ring-A Fused Azole Derivatives of Betulin and Evaluation of Their Cytotoxicity. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *125*, 629. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.09.065>.
- (27) Koolman, J. *Barevný Atlas Biochemie*; Grada Publishing a.s., Philipps University Marburg, Německo, 2009.
- (28) Sakamoto, S.; Hatakeyama, M.; Ito, T.; Handa, H. Tools and Methodologies Capable of Isolating and Identifying a Target Molecule for a Bioactive Compound. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 1990. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bmc.2011.12.022>.
- (29) Cankarova, N.; Funk, P.; Hlavac, J.; Soural, M. Novel Preloaded Resins for Solid-Phase Biotinylation of Carboxylic Acids. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 5782. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2011.08.115>.
- (30) Kang, R. [US], Haugland Hee C. [US]. Chemically Reactive Dipyrrometheneboron Difluoride Dyes. US4774339A, 1987.
- (31) Brandes, B.; Hoenke, S.; Fischer, L.; Csuk, R. Design, Synthesis and Cytotoxicity of BODIPY FL Labelled Triterpenoids. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *185*, 111858. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111858>.
- (32) Krajcovicova S., Stankova J., Dzubak P., Hajduch M., Soural M., Urban M. Synthetic Approach for the Rapid Preparation of BODIPY Conjugates and Their Use in Imaging of Cellular Drug Uptake and Distribution. *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 4957. <https://doi.org/10.1002/chem.201706093>.
- (33) Sang-Woon Choi, J. B. M. Folate and Carcinogenesis: An Integrated Scheme. *J.N.* **2000**, *130*, 129. <https://doi.org/10.1093/jn/130.2.129>.
- (34) Antony, A. C. The Biological Chemistry of Folate Receptors. *Blood* **1992**, *79*, 2807. <https://doi.org/10.1182/blood.V79.11.2807.2807>.
- (35) Parker, N.; Turk, M. J.; Westrick, E.; Lewis, J. D.; Low, P. S.; Leamon, C. P. Folate Receptor Expression in Carcinomas and Normal Tissues Determined by a Quantitative Radioligand Binding Assay. *Anal. Biochem.* **2005**, *338*, 284. [/https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.12.026](https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.12.026).

- (36) Yuxiang Tang, Yihui Li, Rong Xu, Si Li, a Hang Hu, Chen Xiao, Honglian Wu, Lin Zhu, Jiaxiong Ming, Zhiqin Chu, Huibi Xu. Self-Assembly of Folic Acid Dextran Conjugates for Cancer Chemotherapy. *Nanoscale* **2018**, *10*, 17265. <https://doi.org/10.1039/C8NR04657C>.
- (37) Balzarini, J., Andrei, G., Balestra, E., Huskens, D., Vanpouille, C., Introini, A., Zicari, S., Liekens, S., Snoeck, R., Holý, A., Perno, C.-F., Margolis, L., Schols, D. . A Multi-Targeted Drug Candidate with Dual Anti-HIV and Anti-HSV Activity. *PLoS Pathog.* **2013**, *9*. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003456>.
- (38) Rumlová, M.; Ruml, T. In Vitro Methods for Testing Antiviral Drugs. *Biotechnol. Adv.* **2018**, *36*, 557. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.12.016>.
- (39) Regueiro-Ren, A.; Liu, Z.; Chen, Y.; Sin, N.; Sit, S.-Y.; Swidorski, J. J.; Chen, J.; Venables, B. L.; Zhu, J.; Nowicka-Sans, B.; Protack, T.; Lin, Z.; Terry, B.; Samanta, H.; Zhang, S.; Li, Z.; Beno, B. R.; Huang, X. S.; Rahematpura, S.; Parker, D. D.; Haskell, R.; Jenkins, S.; Santone, K. S.; Cockett, M. I.; Krystal, M.; Meanwell, N. A.; Hanumegowda, U.; Dicker, I. B. Discovery of BMS-955176, a Second Generation HIV-1 Maturation Inhibitor with Broad Spectrum Antiviral Activity. *ACS Med. Chem. Lett.* **2016**, *7*, 568. <https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.6b00010>.
- (40) Huisgen, R. Kinetics and Mechanism of 1,3-Dipolar Cycloadditions. *Angew. Chemie Int. Ed. English* **1963**, *2*, 633. <https://doi.org/10.1002/anie.196306331>.
- (41) Sidova, V.; Zoufaly, P.; Pokorny, J.; Dzubak, P.; Hajduch, M.; Popa, I.; Urban, M. Cytotoxic Conjugates of Betulinic Acid and Substituted Triazoles Prepared by Huisgen Cycloaddition from 30-Azidoderivatives. *PLoS One* **2017**, *12*, e0171621. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171621>.
- (42) Suman, P.; Patel, A.; Solano, L.; Jampana, G.; Gardner, Z. S.; Holt, C. M.; Jonnalagadda, S. C. Synthesis and Cytotoxicity of Baylis-Hillman Template Derived Betulinic Acid-Triazole Conjugates. *Tetrahedron Lett.* **2017**, *73*, 4214. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2016.11.056>.
- (43) Suzuki, N. M. Palladium-Catalyzed Cross-Coupling Reactions of Organoboron Compounds. *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 2457. <https://doi.org/10.1021/cr00039a007>.

- (44) Hashimoto, F.; Kashiwada, Y.; Cosentino, L. M.; Chen, C.-H.; Garrett, P. E.; Lee, K.-H. Anti-AIDS agents—XXVII. Synthesis and Anti-HIV Activity of Betulinic Acid and Dihydrobetulinic Acid Derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 2133. [https://doi.org/10.1016/S0968-0896\(97\)00158-2](https://doi.org/10.1016/S0968-0896(97)00158-2).
- (45) Hajduch Marian [CZ]; Sarek Jan [CZ] +. Triterpenoid derivatives. WO 01/90046 A1, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(98\)00295-9](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(98)00295-9).
- (46) Bal, B. S.; Childers, W. E.; Pinnick, H. W. Oxidation of  $\alpha,\beta$ -Unsaturated Aldehydes. *Tetrahedron Lett.* **1981**, *37*, 2091. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)97963-3](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)97963-3).
- (47) Bar, F. M. A.; Khanfar, M. A.; Elnagar, A. Y.; Liu, H.; Zaghloul, A. M.; Badria, F. A.; Sylvester, P. W.; Ahmad, K. F.; Raisch, K. P.; El Sayed, K. A. Rational Design and Semisynthesis of Betulinic Acid Analogues as Potent Topoisomerase Inhibitors. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 1643. <https://doi.org/10.1021/np900312u>.
- (48) Lie Ken Jie, M. S. F.; Khysar Pasha, M.; Shahin Alam, M. Oxidation Reactions of Acetylenic Fatty Esters with Selenium Dioxide/*tert*-Butyl Hydroperoxide. *Lipids* **1997**, *32*, 1119. <https://doi.org/10.1007/s11745-997-0144-7>.
- (49) Bachořík, M. J. Selenium Dioxide Regeneration via TBHP, [ústní sdělení]. (sdělení se zabývá metodikou allylové oxidace lupanových derivátů).
- (50) Kuroyanagi, M.; Shiotsu, M.; Ebihara, T.; Kawai, H.; Ueno, A.; Fukushima, S. Chemical Studies on Viburnum Awabuki K.KOCH. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **1986**, *34*, 4012. <https://doi.org/10.1248/cpb.34.4012>.
- (51) Yang, Z. Method of Preparing Anti-Tumor Lead Compound Tagalsin C by Utilizing Tagalsin E and Tagalsin G. CN103373912, 2013. <https://doi.org/CN20121012230320120425>.

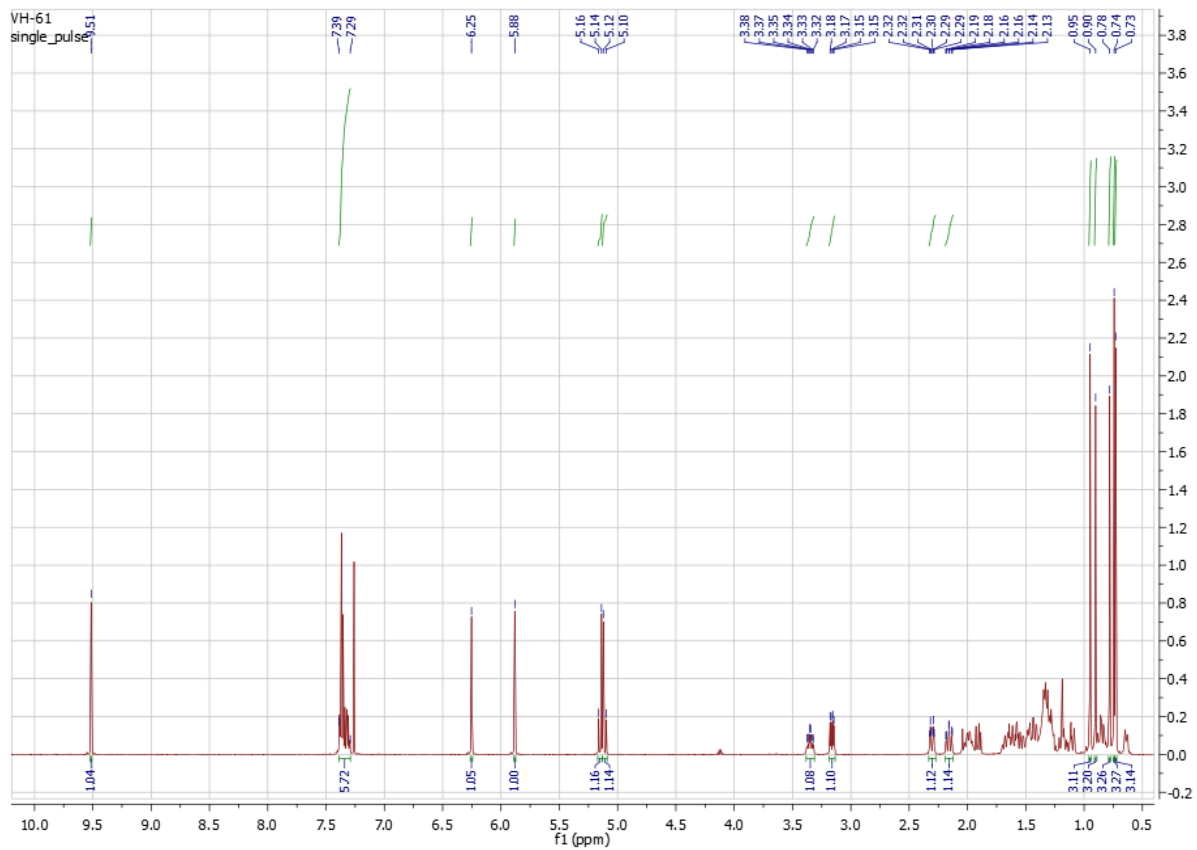
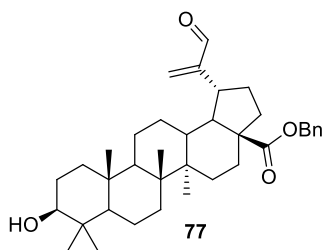
# Přílohy

## Příloha 1: Benzylester **76** (str. 62): $^1\text{H}$ NMR

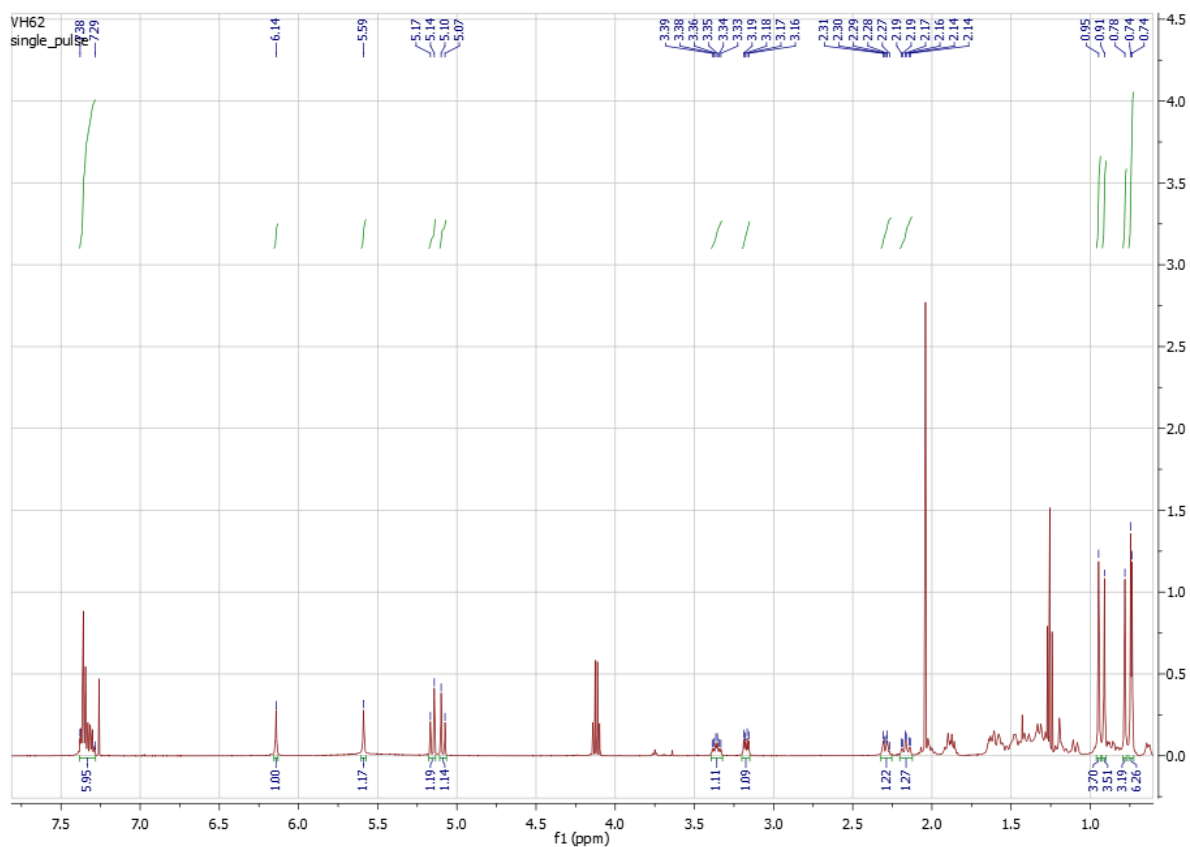
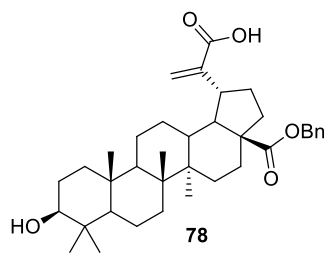




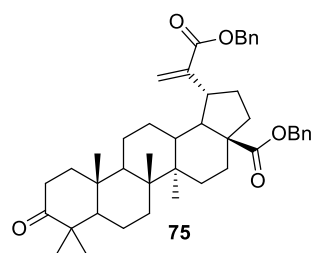
**Příloha 2: Benzylester 77 (str. 63):  $^1\text{H}$  NMR**



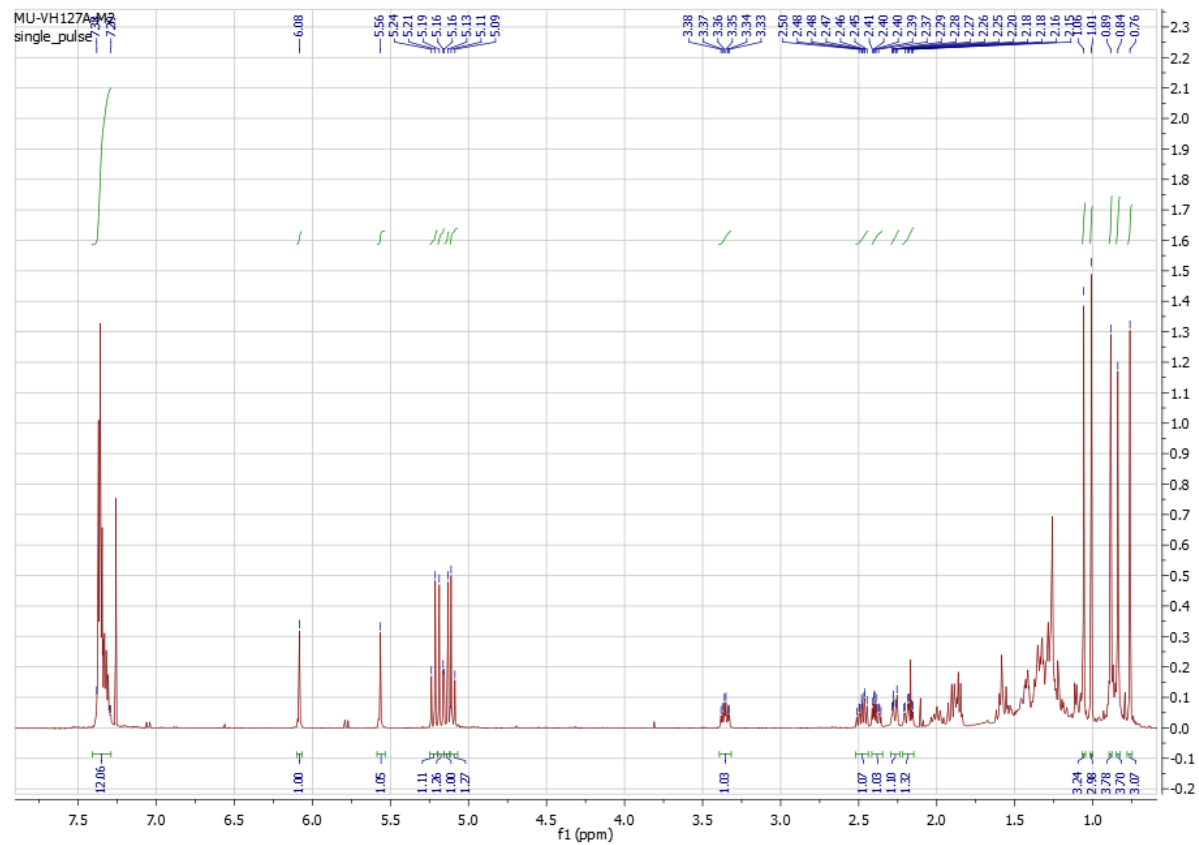
**Příloha 3:** Dikyselina **78** (str. 64):  $^1\text{H}$  NMR (ethylacetát ve spektru –  $\delta$  [ppm]: 1.2; 2.0; 4.1)



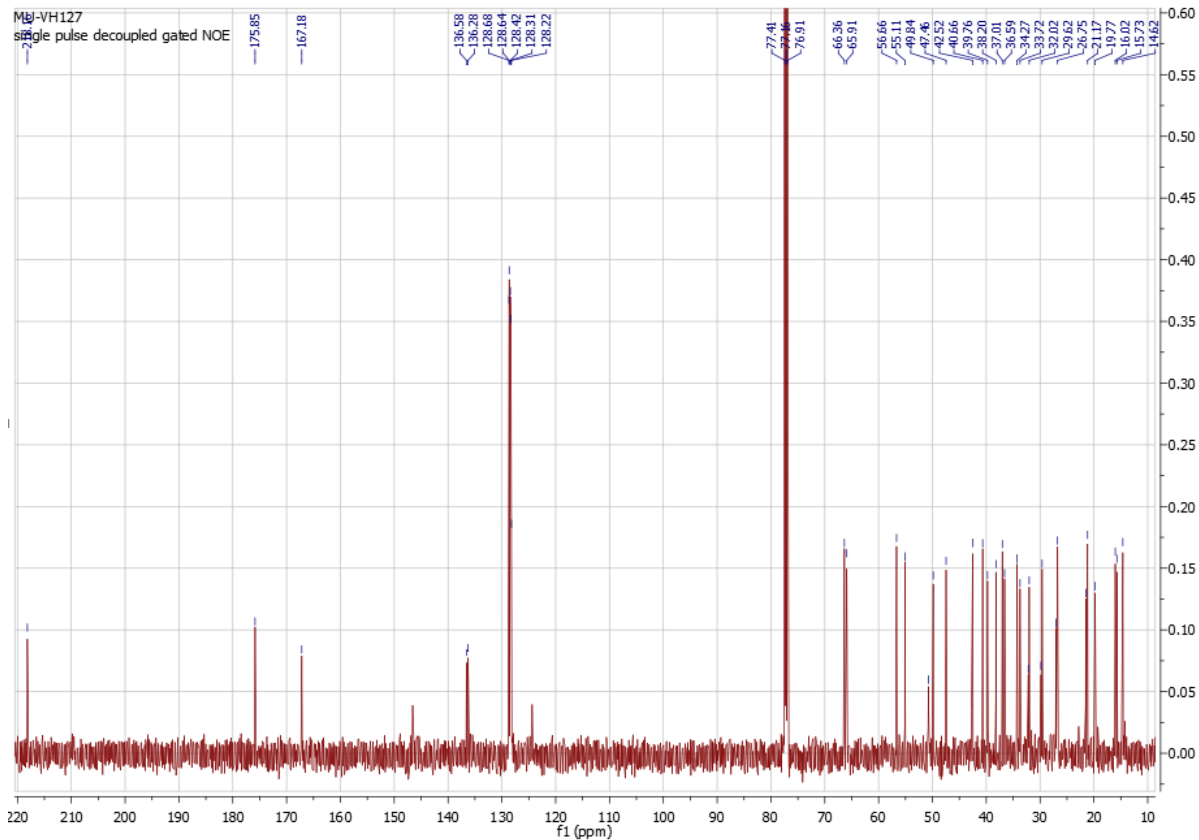
**Příloha 4: Dibenzylester **75** (str. 66):**



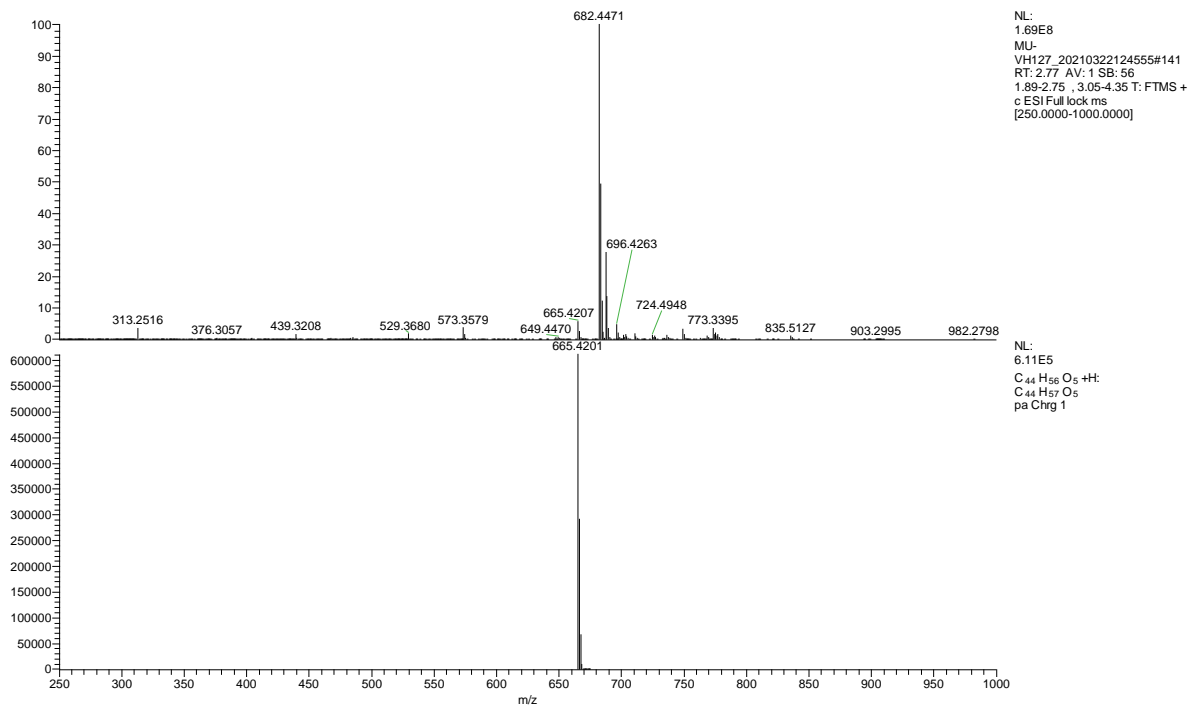
**<sup>1</sup>H NMR**



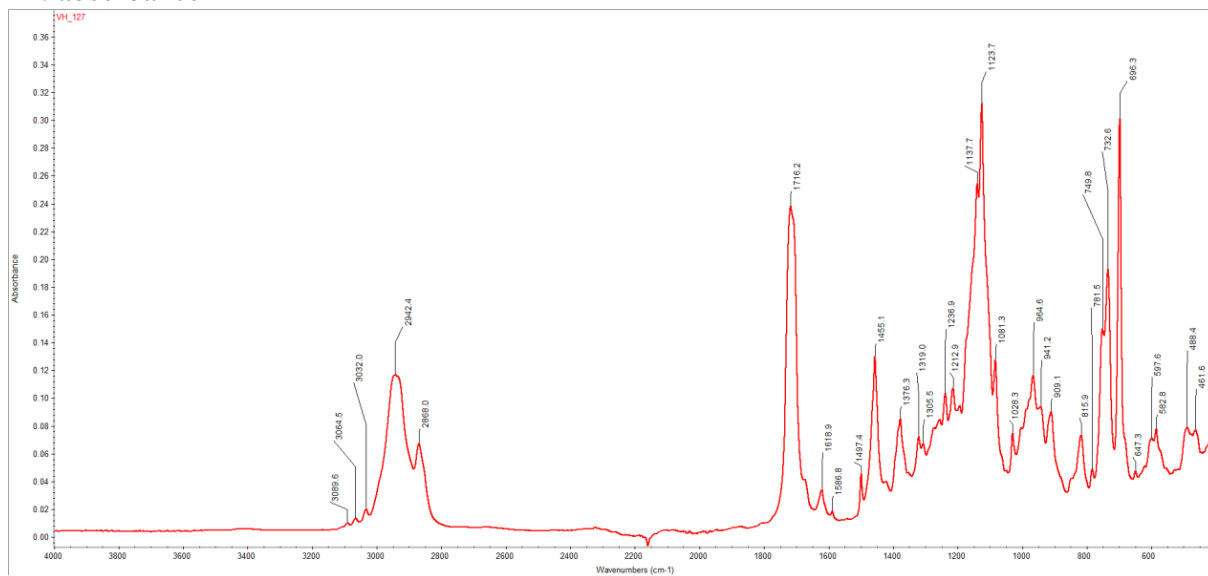
# <sup>13</sup>C NMR



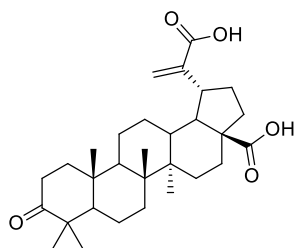
# HRMS: ESI+



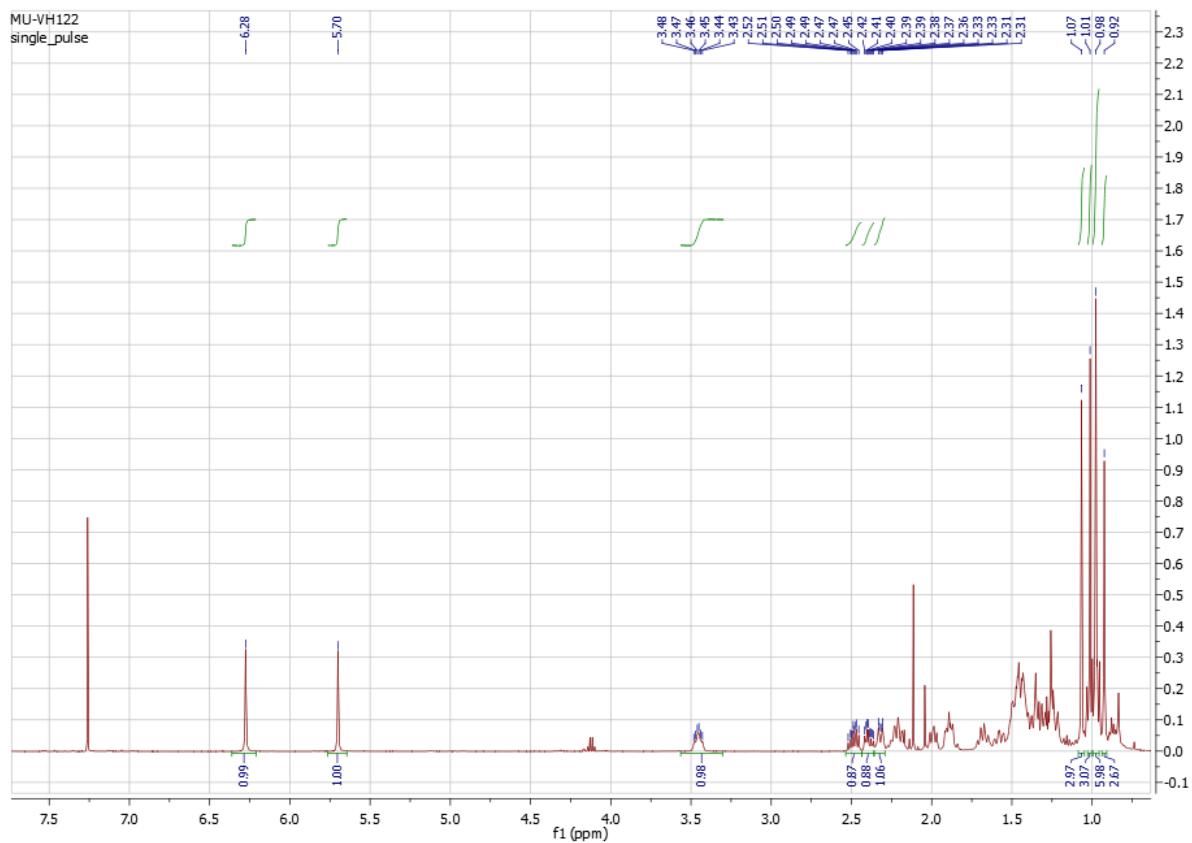
# IR: absorbance



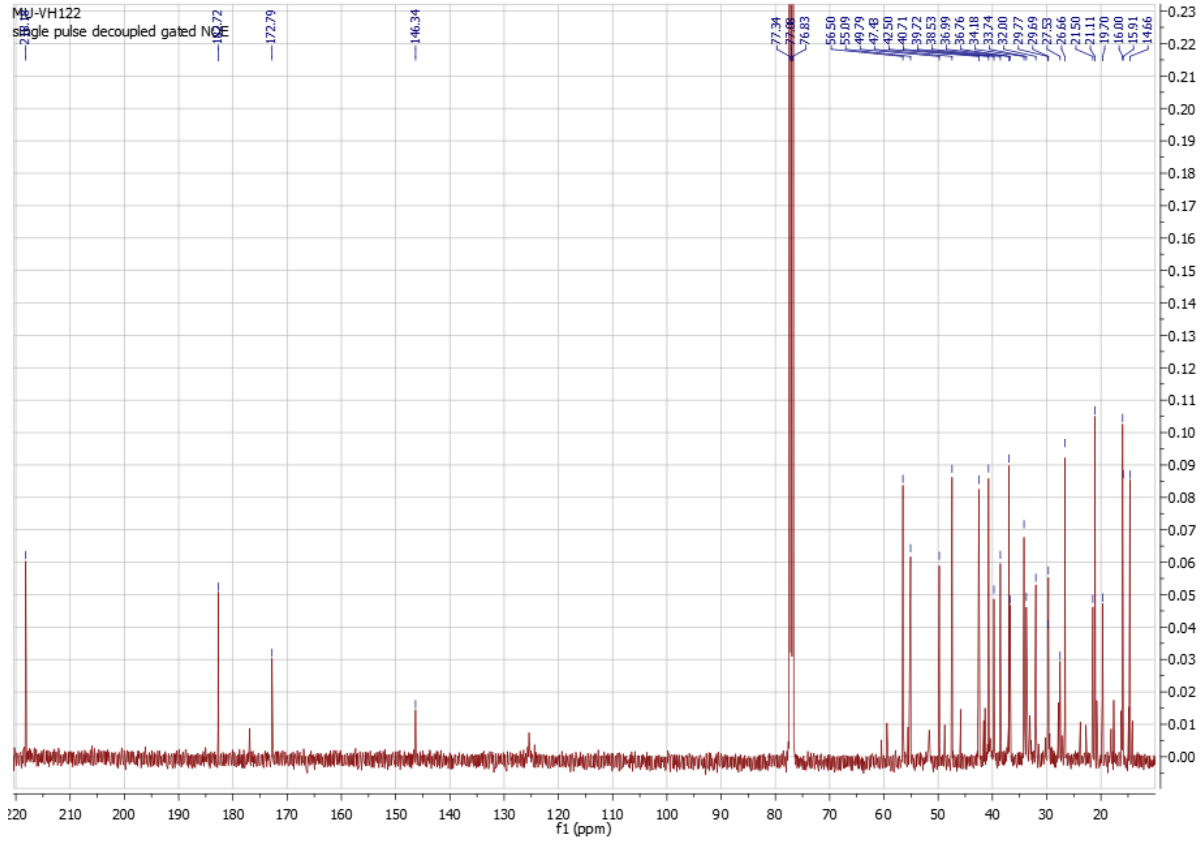
**Příloha 5: Dikyselina 80 (str. 68):**



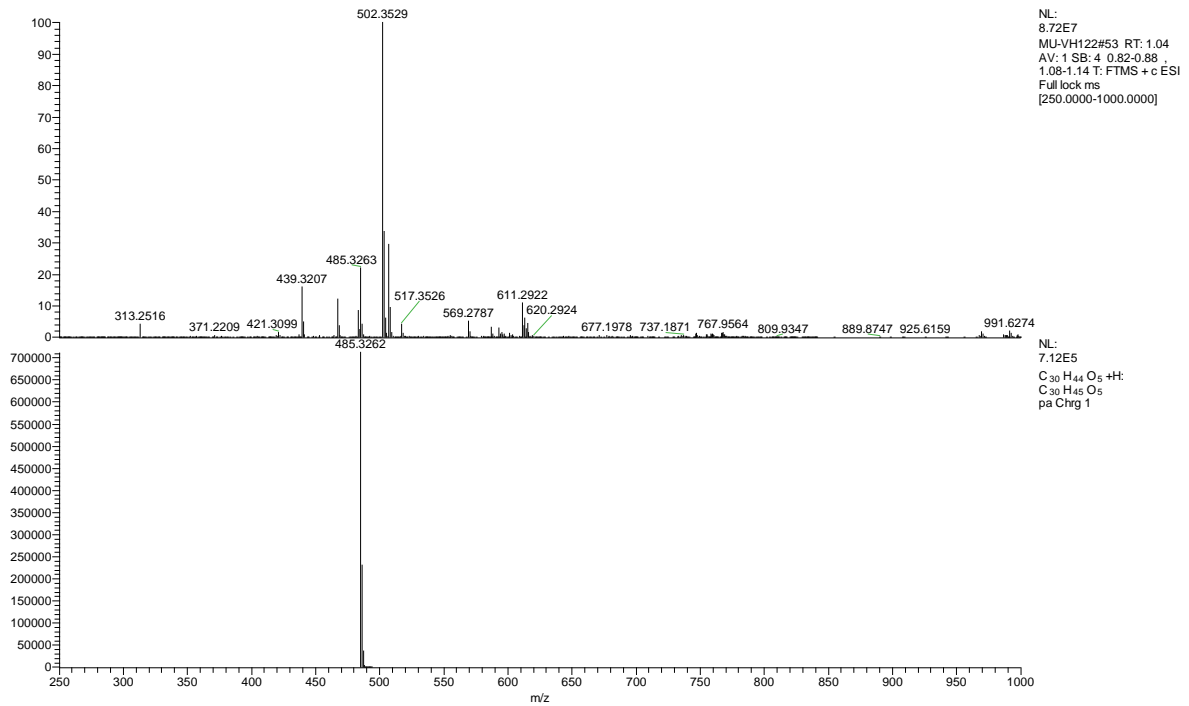
**<sup>1</sup>H NMR**



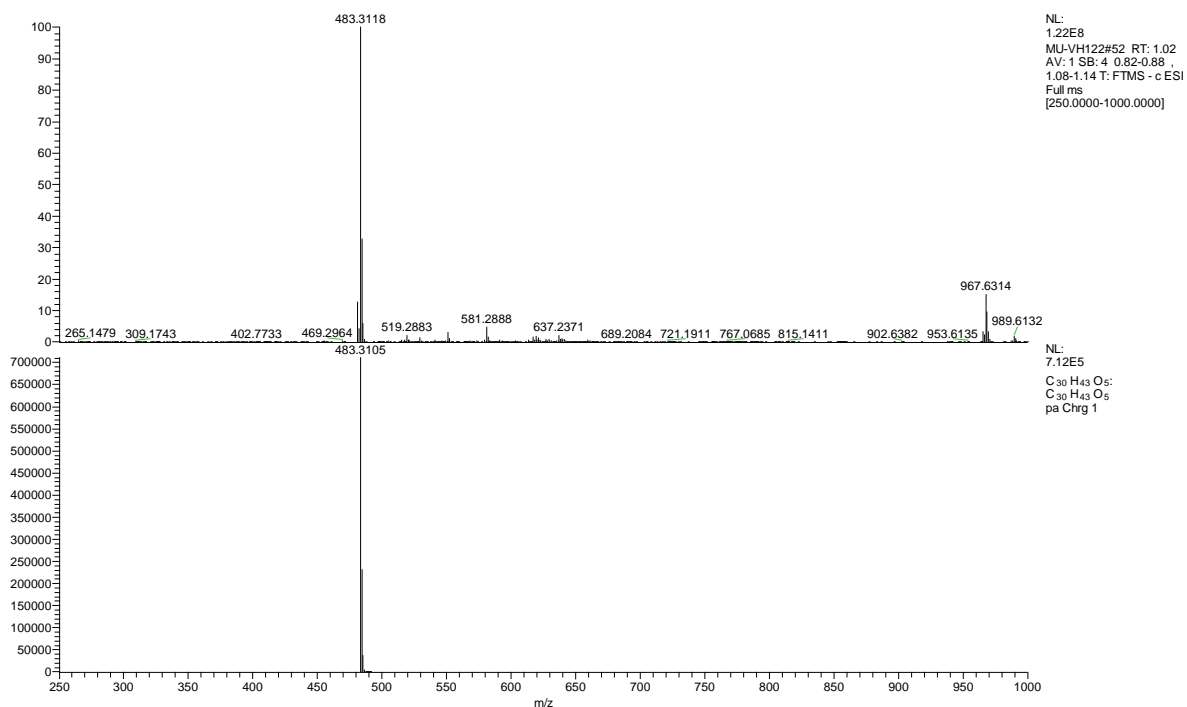
# <sup>13</sup>C NMR



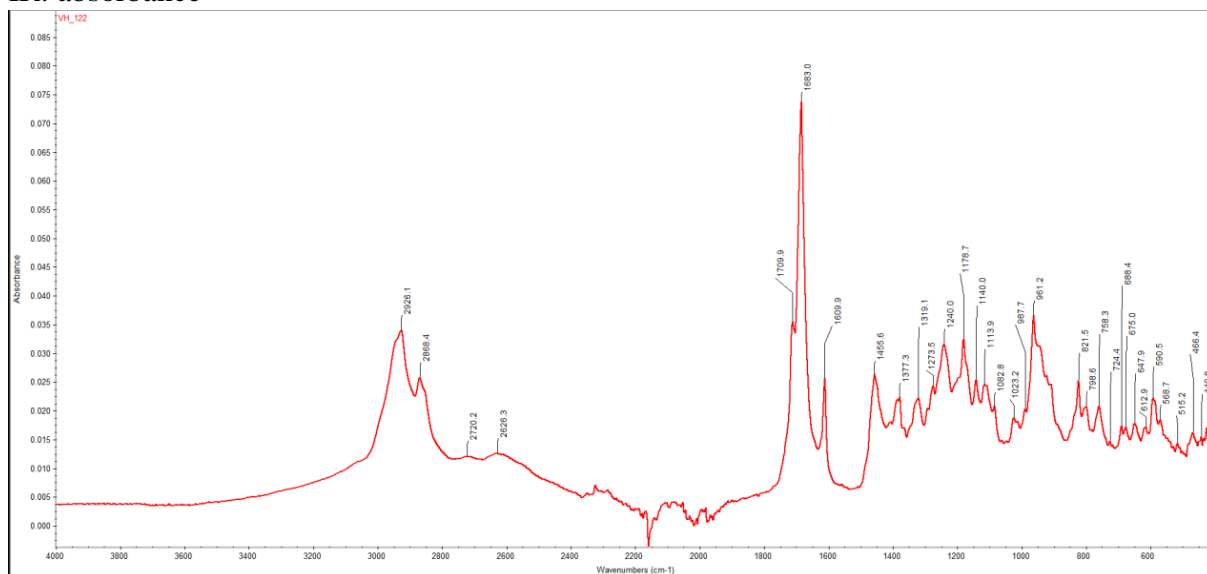
# HRMS: ESI+



# HRMS: ESI-

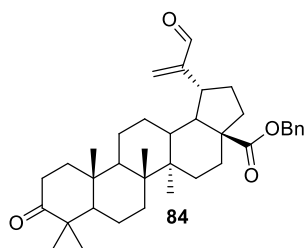


# IR: absorbance

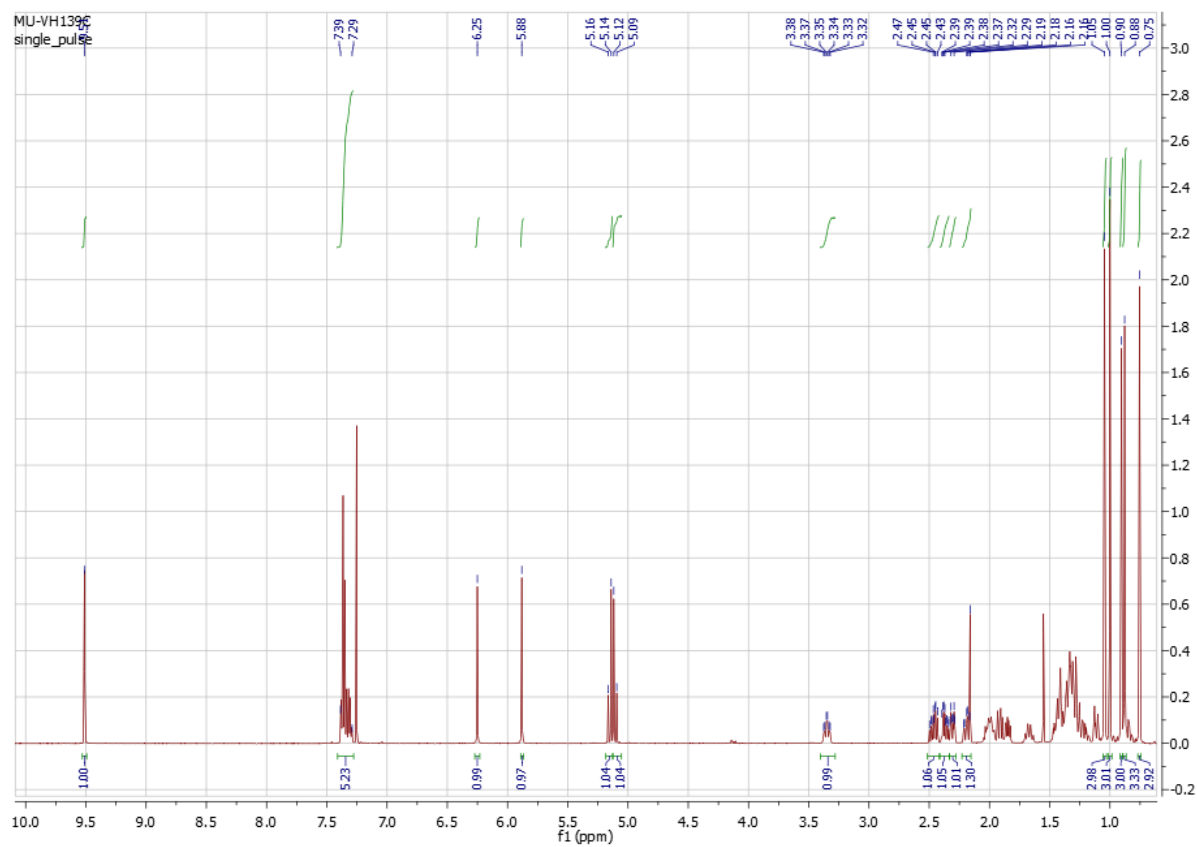




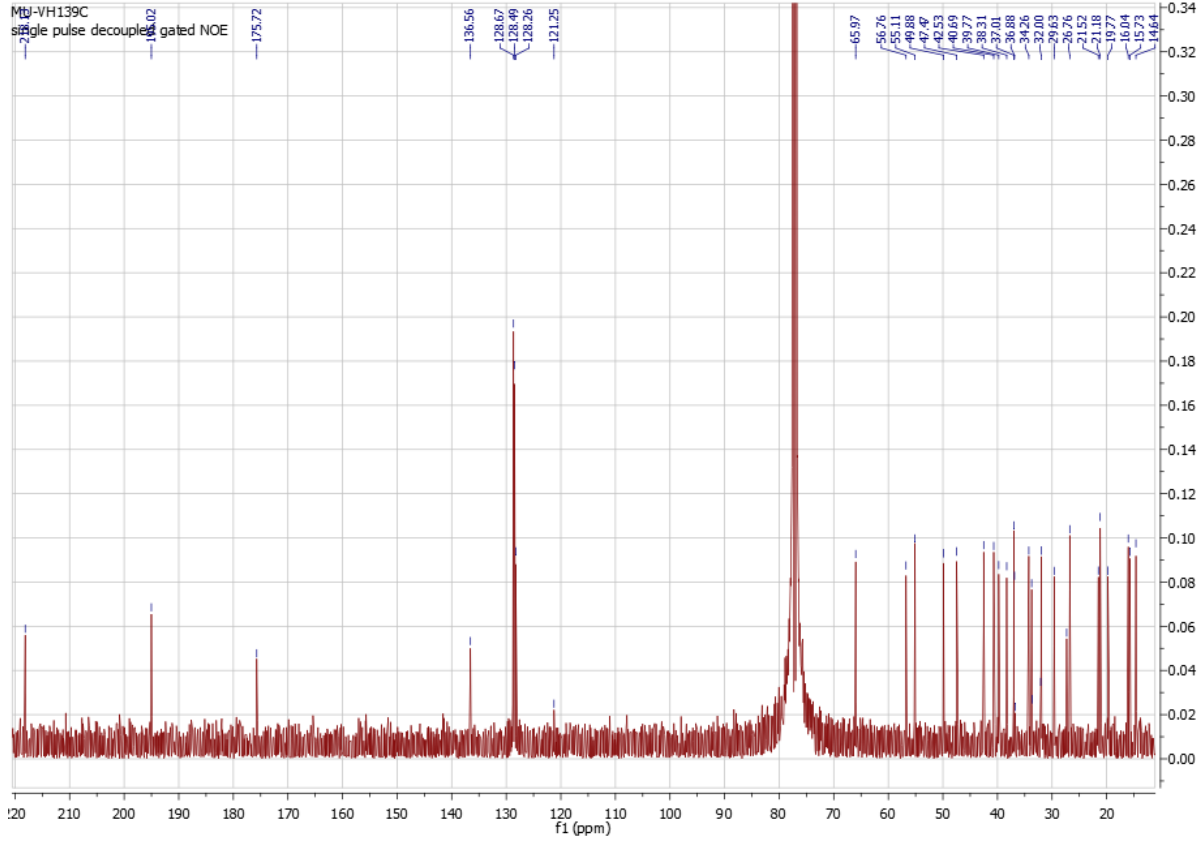
**Příloha 6: Benzylester 84 (str. 69)**



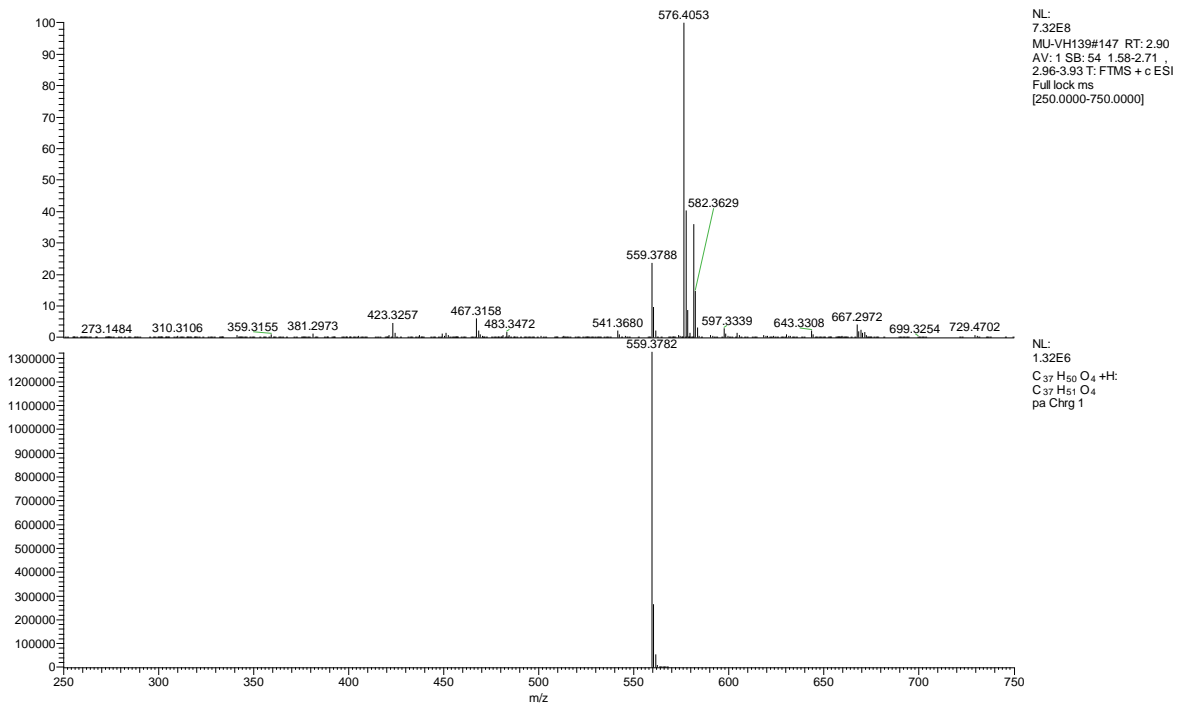
**<sup>1</sup>H NMR**



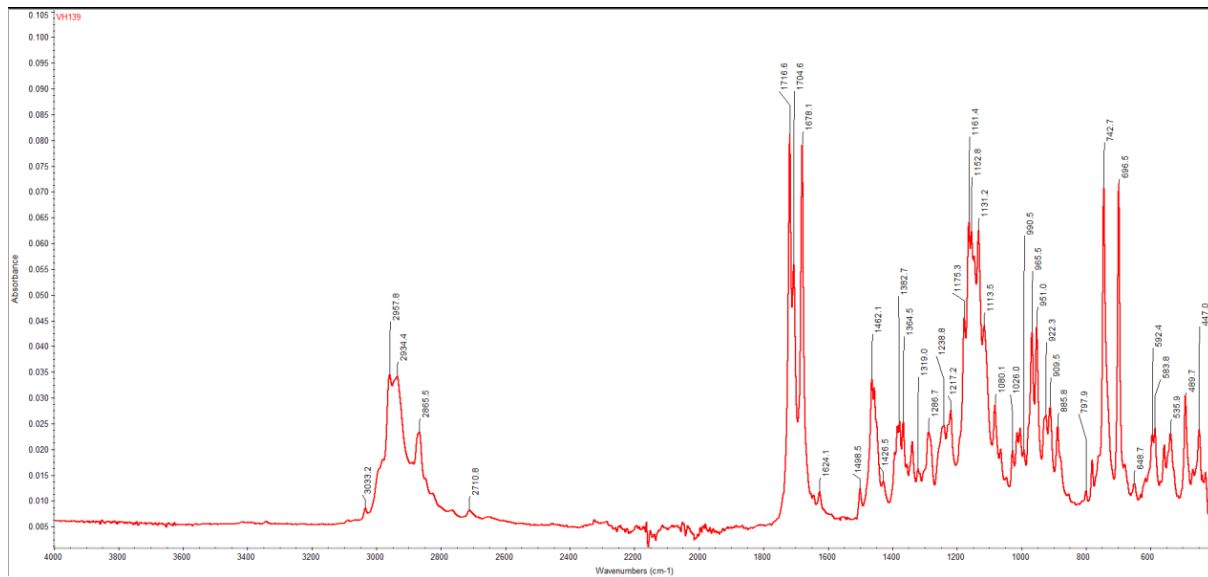
# <sup>13</sup>C NMR



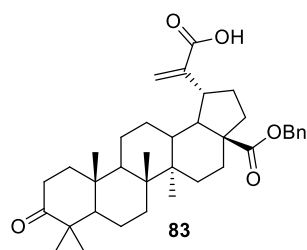
# HRMS: ESI+



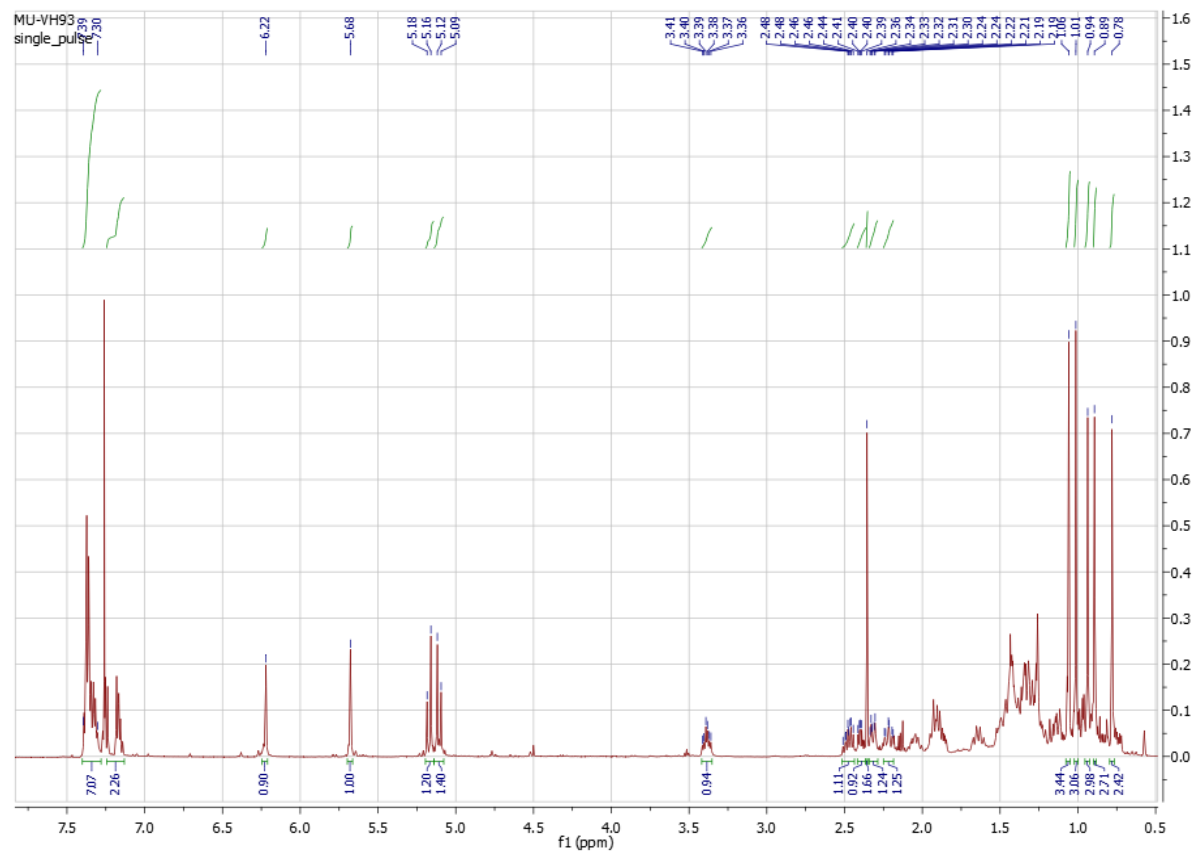
# IR: absorbance



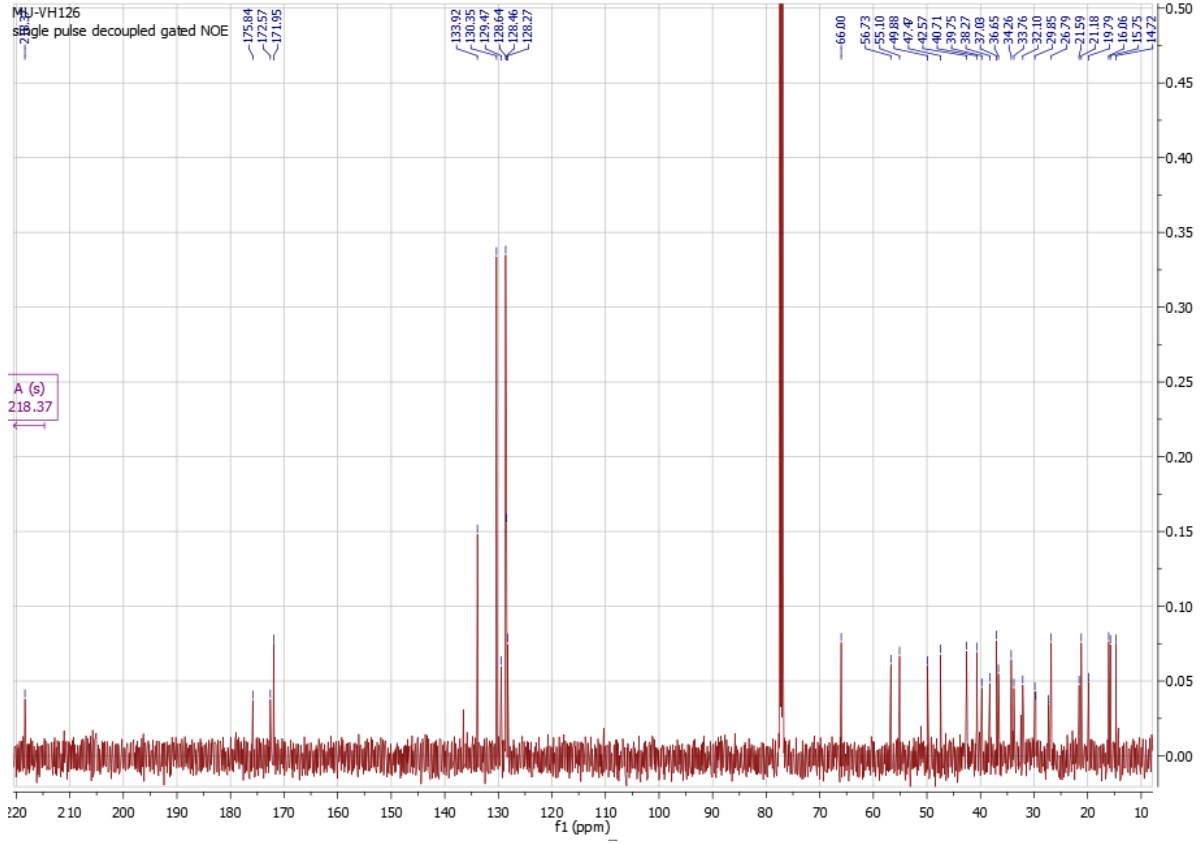
**Příloha 7: Kyselina 83 (str. 70)**



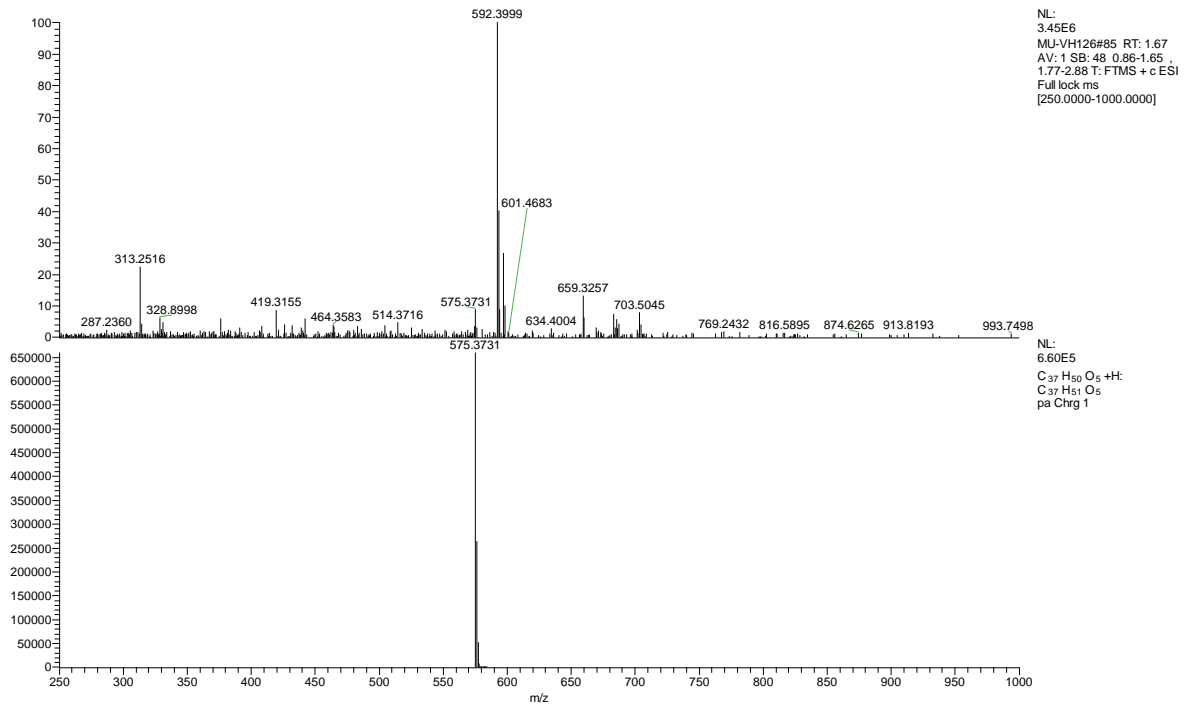
**<sup>1</sup>H NMR**



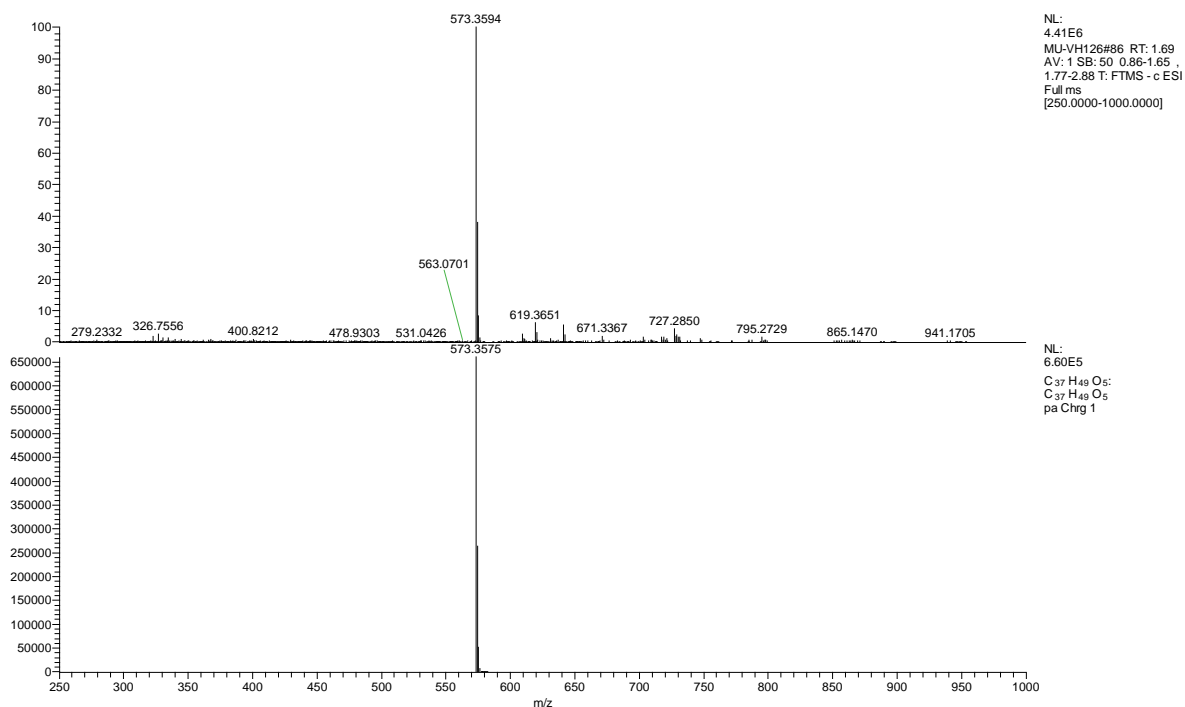
# <sup>13</sup>C NMR



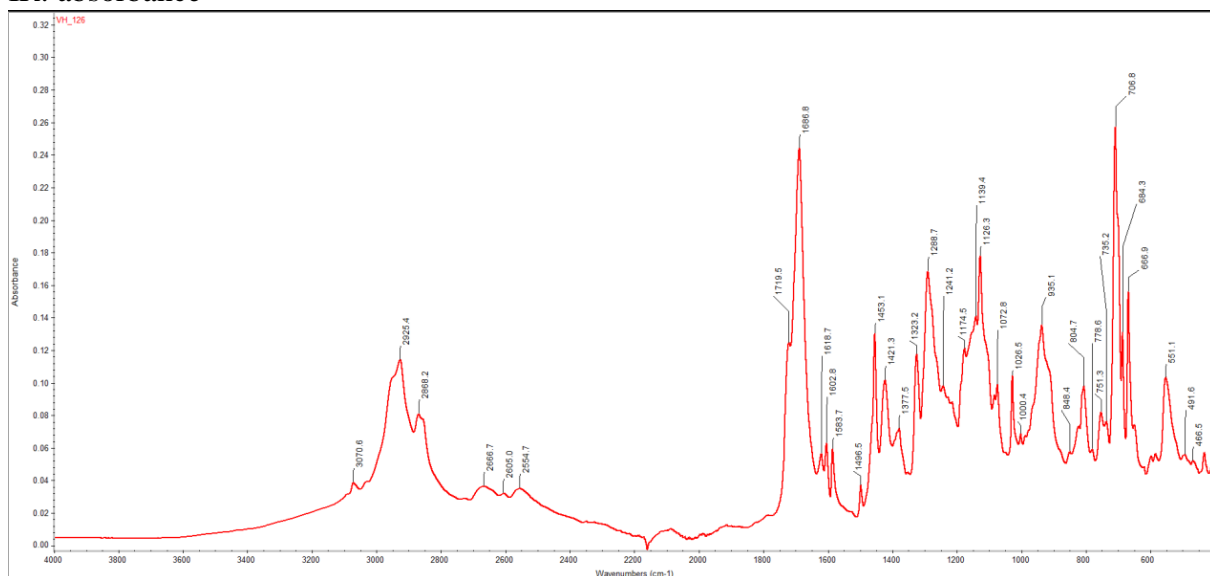
# HRMS: ESI+



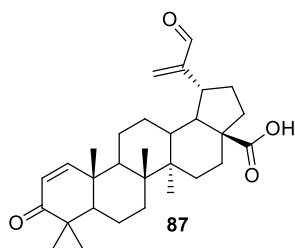
# HRMS: ESI-



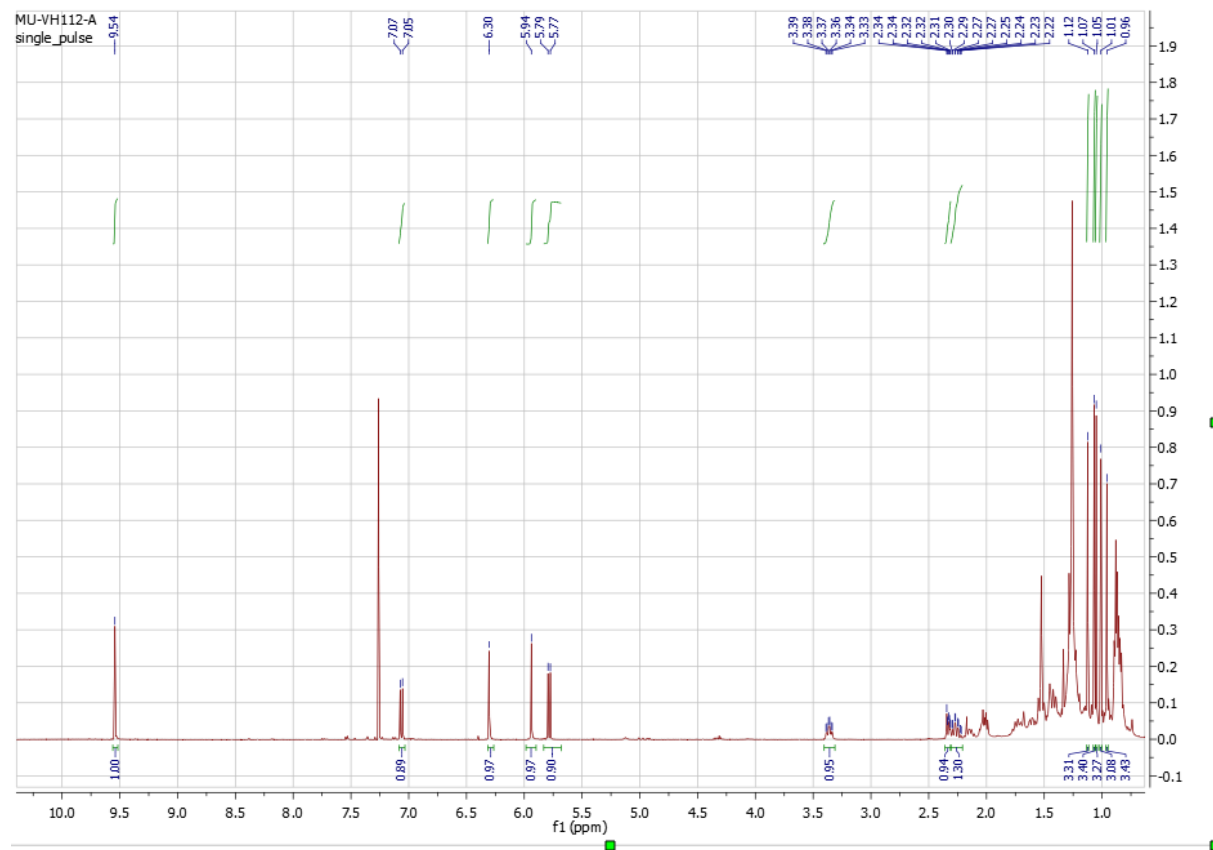
# IR: absorbance



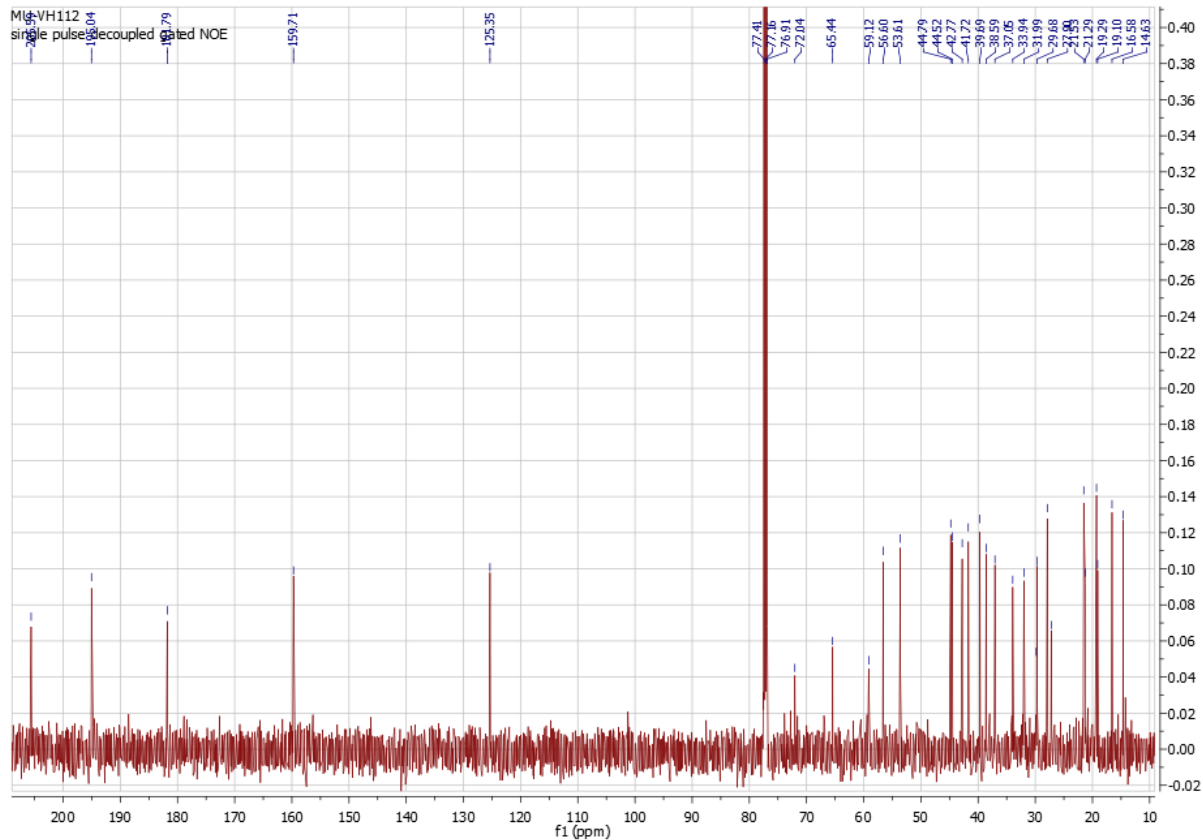
**Příloha 8: Kyselina 87 (str. 72)**



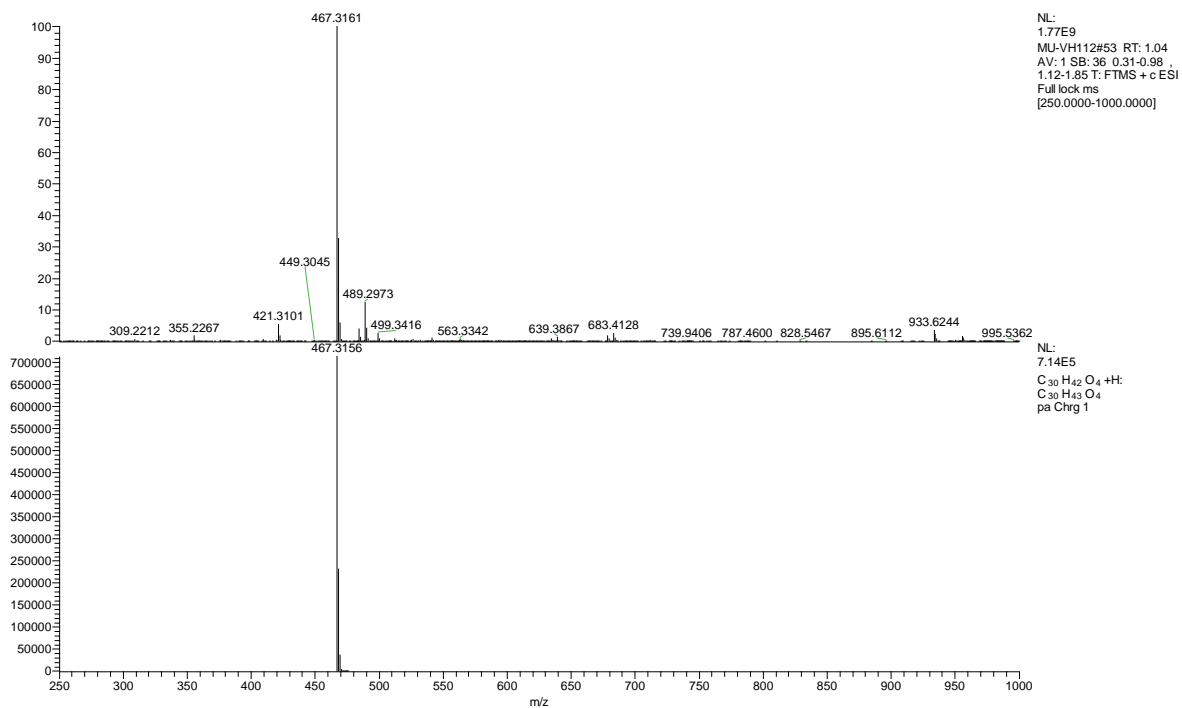
**<sup>1</sup>H NMR**



# <sup>13</sup>C NMR

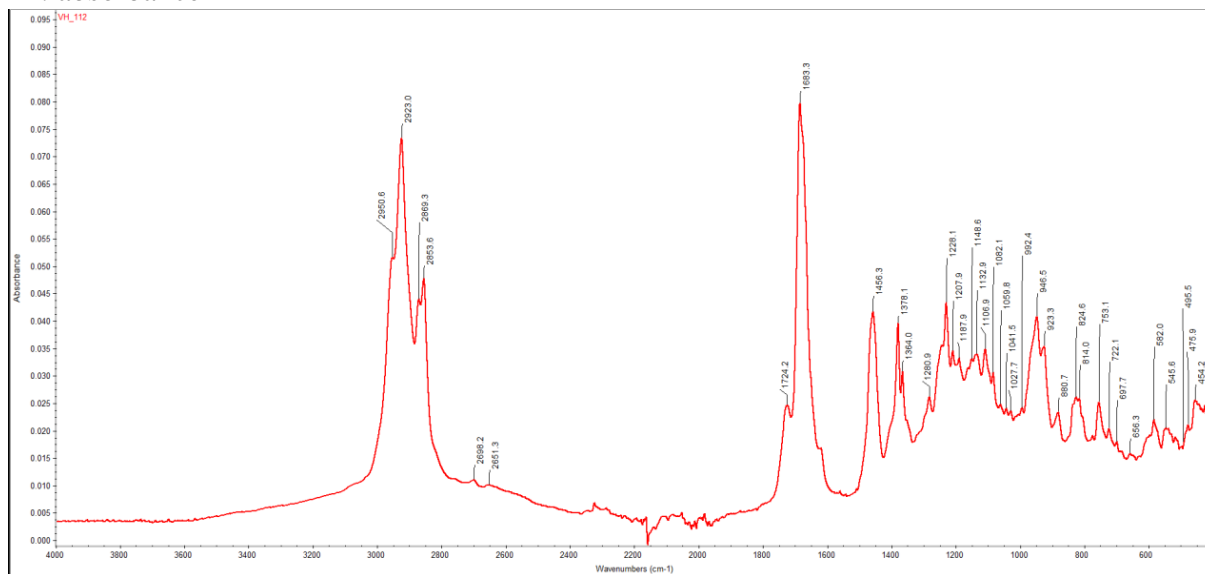


# HRMS: ESI+

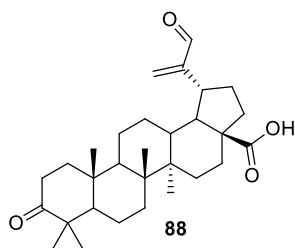




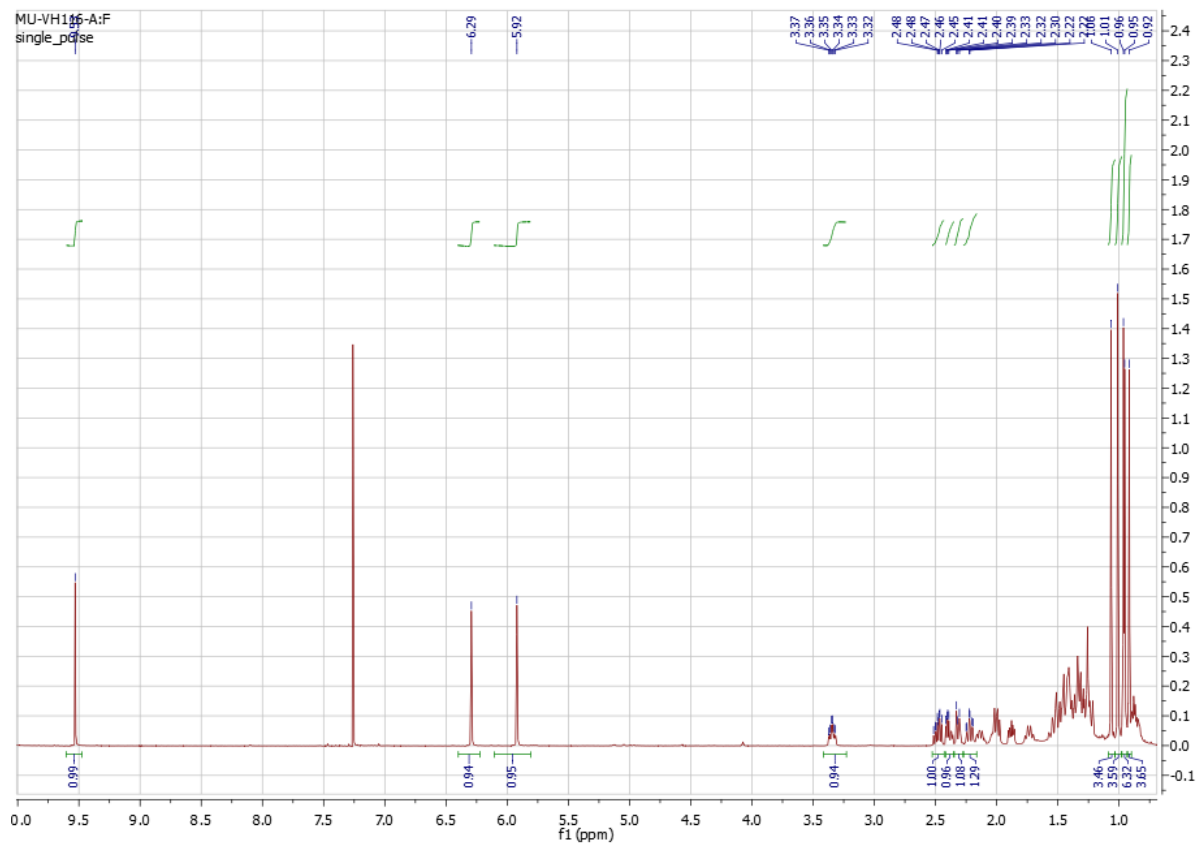
# IR: absorbance



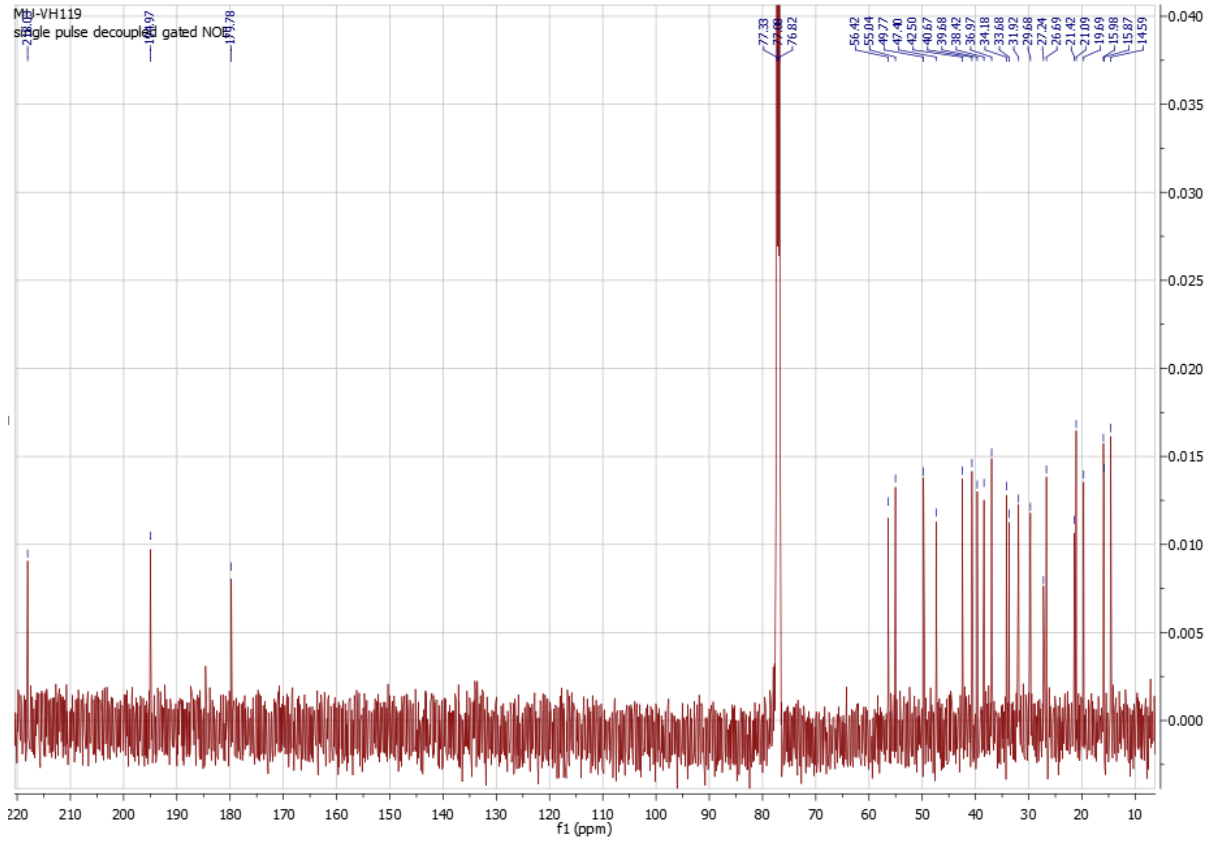
Příloha 9: Kyselina **88** (str. 73)



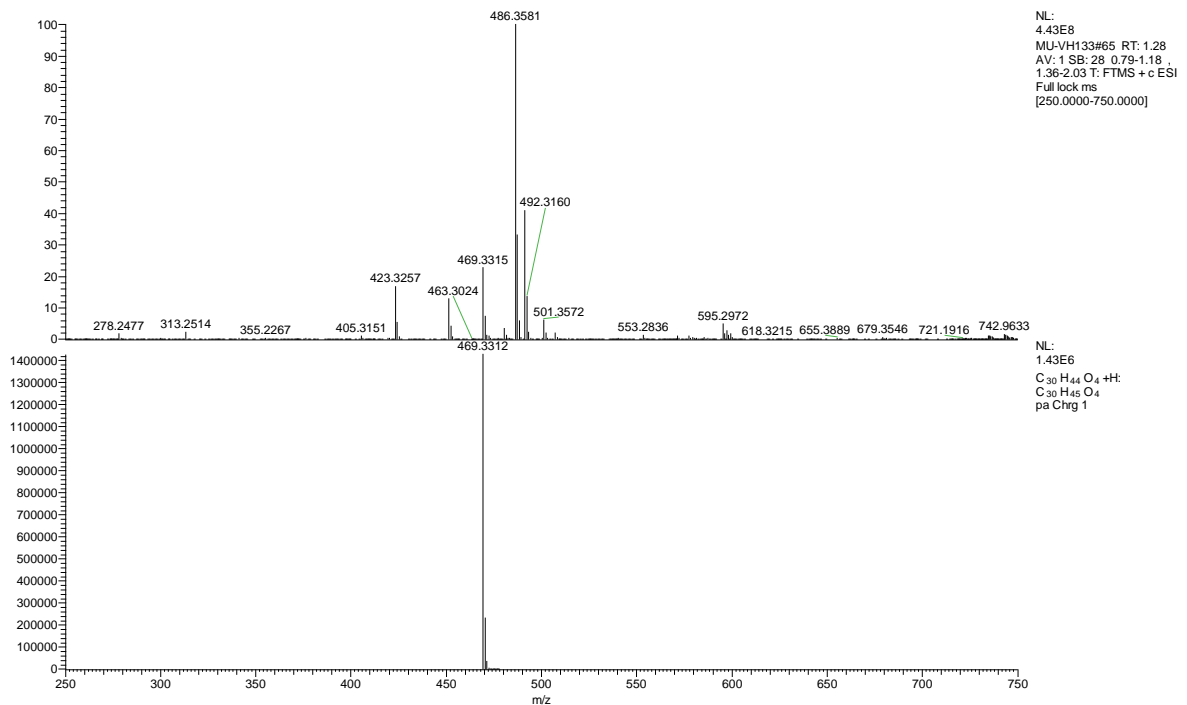
<sup>1</sup>H NMR



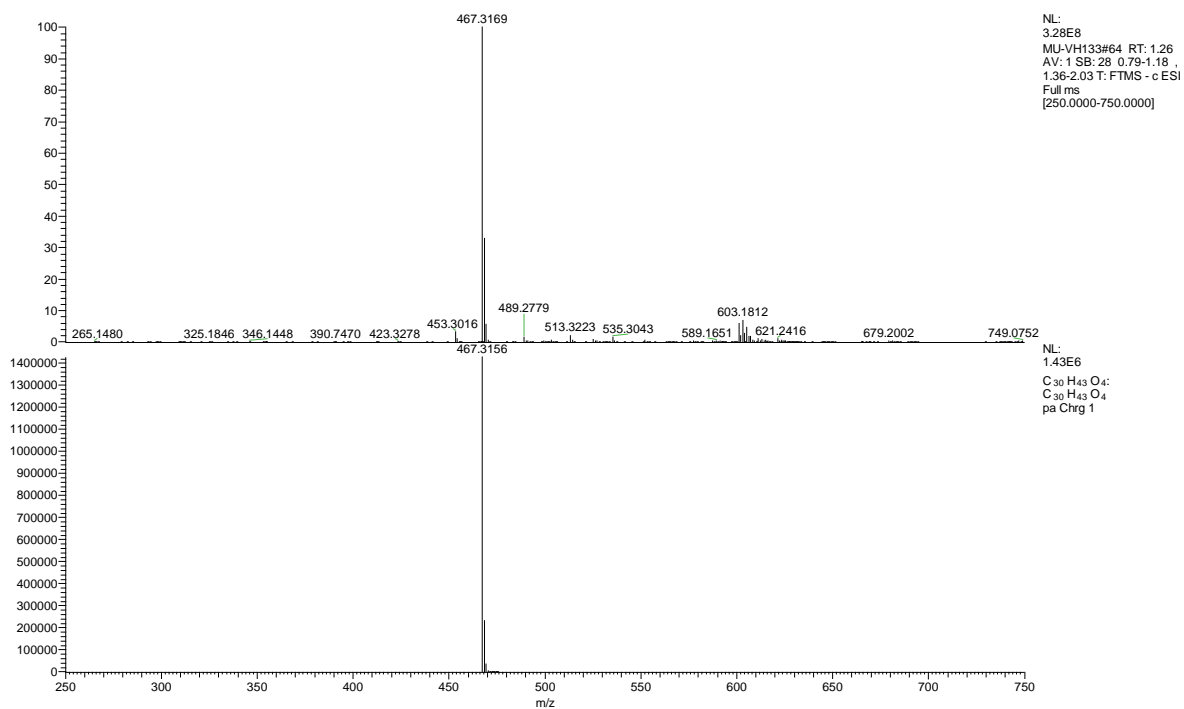
# <sup>13</sup>C NMR



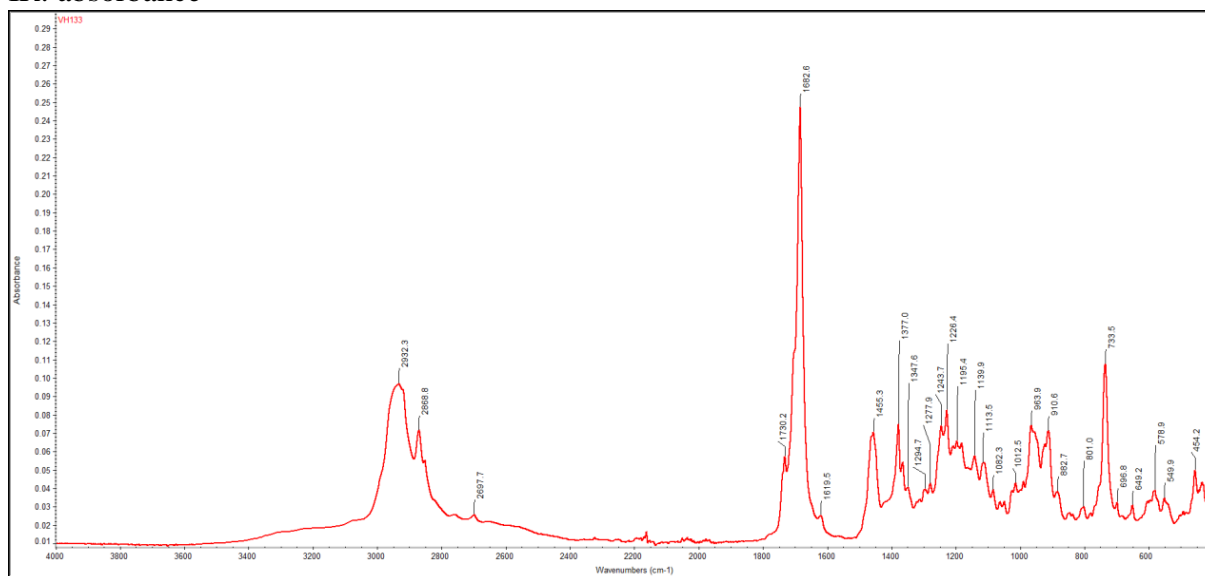
# HRMS: ESI+



# HRMS: ESI-



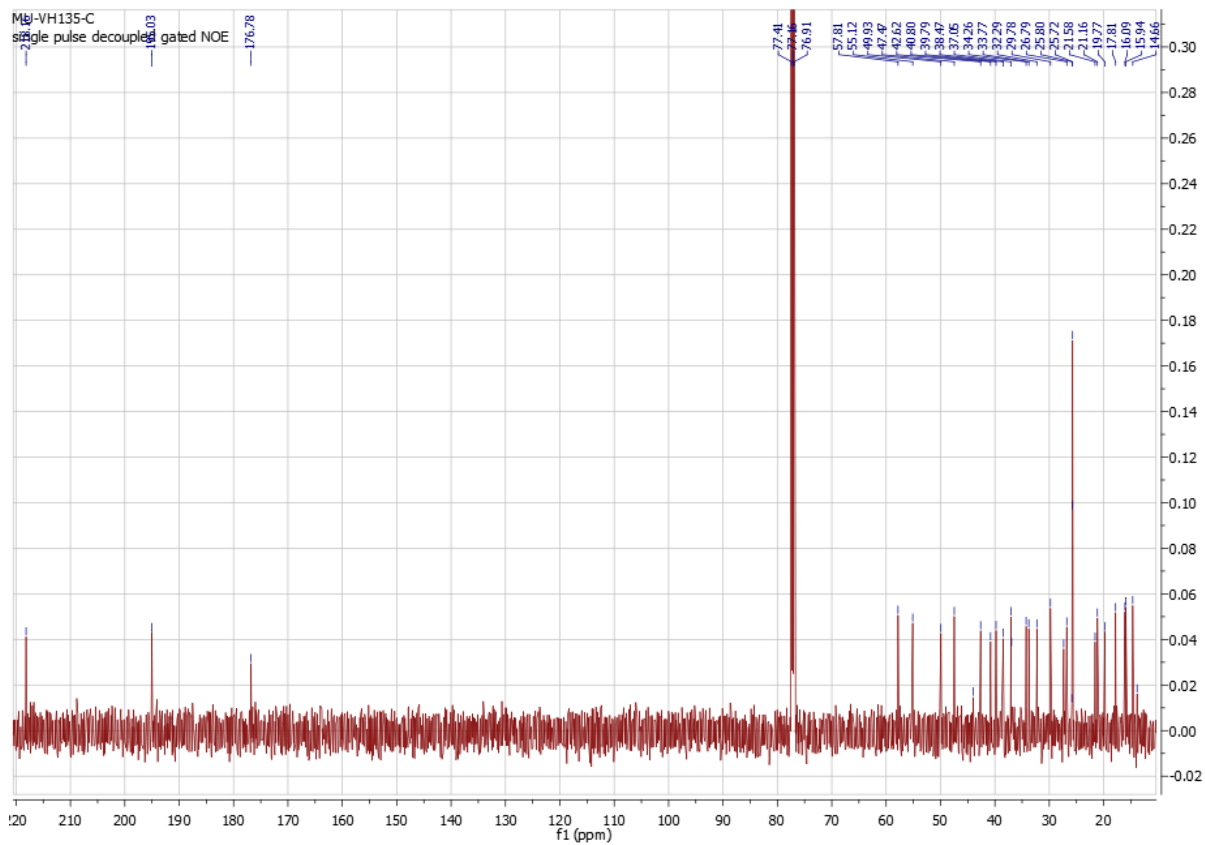
# IR: absorbance



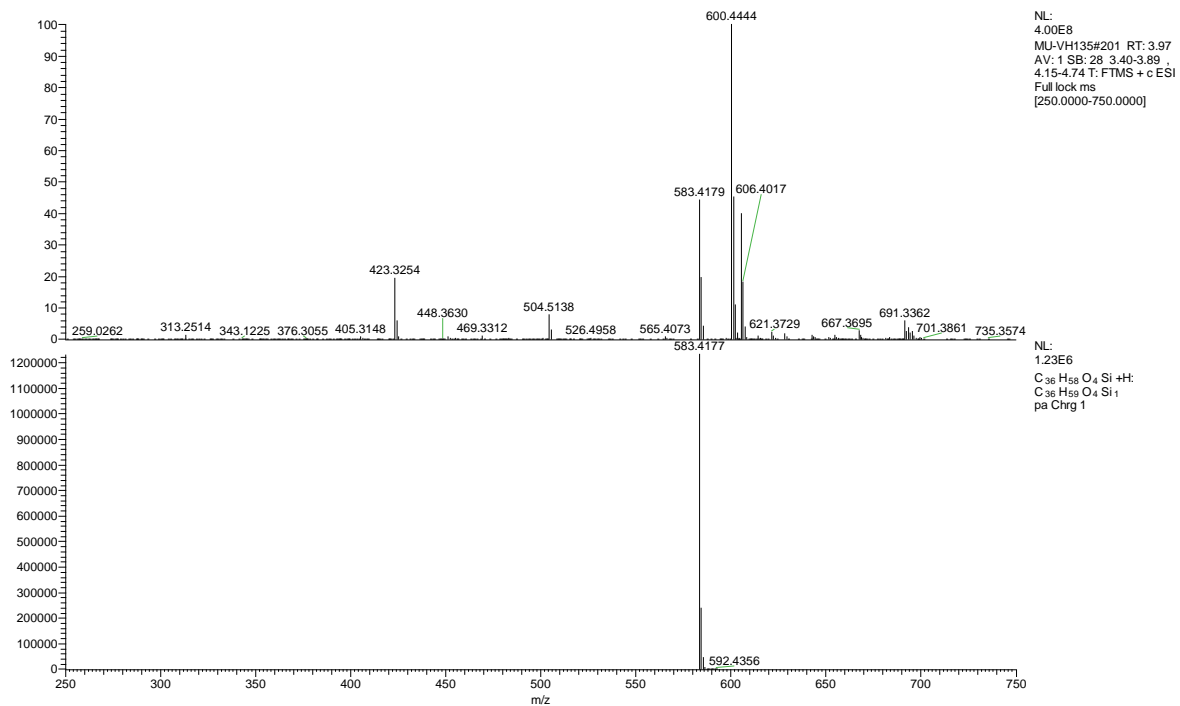




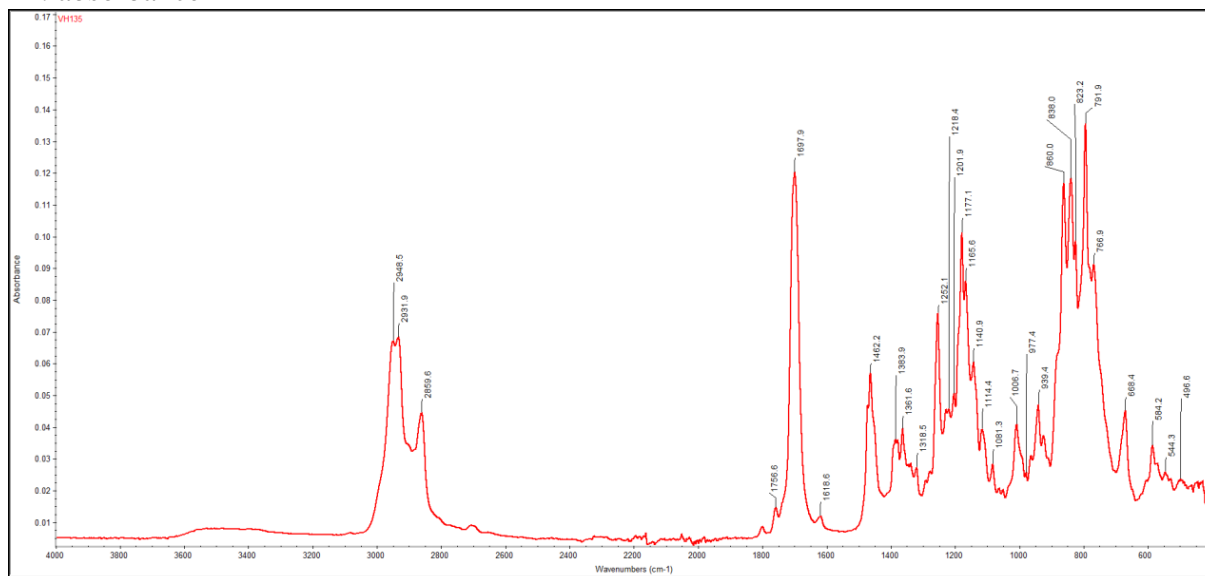
# <sup>13</sup>C NMR



# HRMS: ESI+

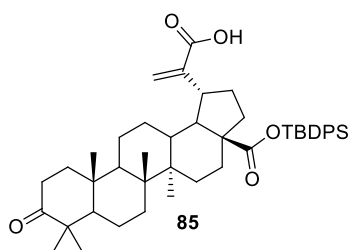


# IR: absorbance

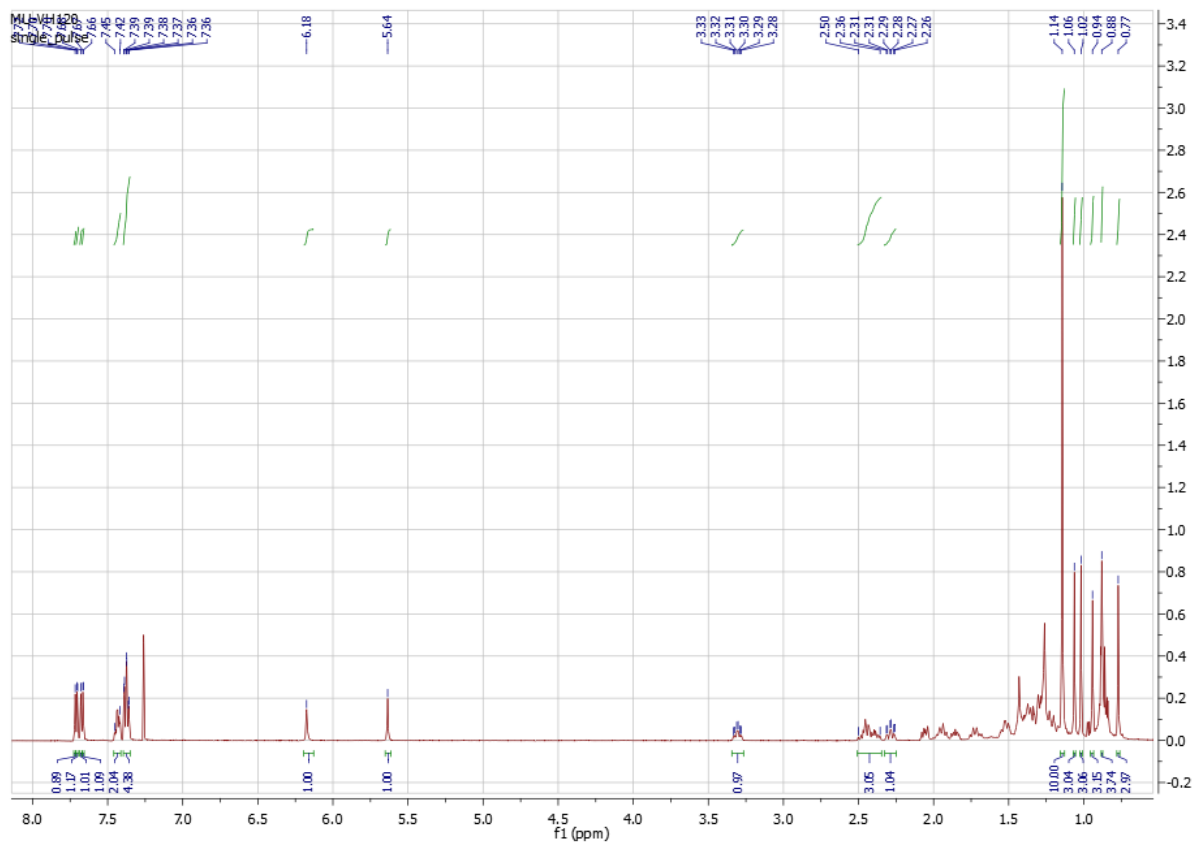




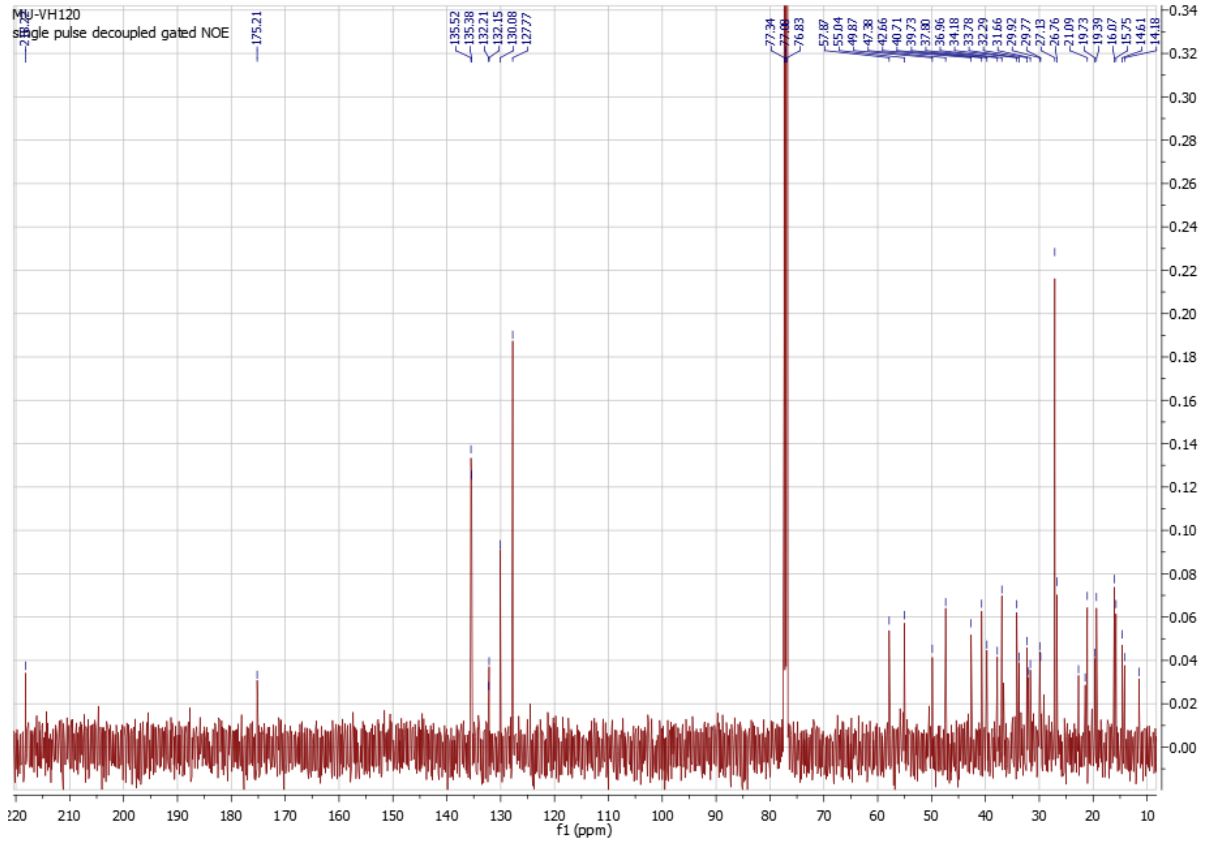
**Příloha 12: Dikyselina 85 (str. 76)**



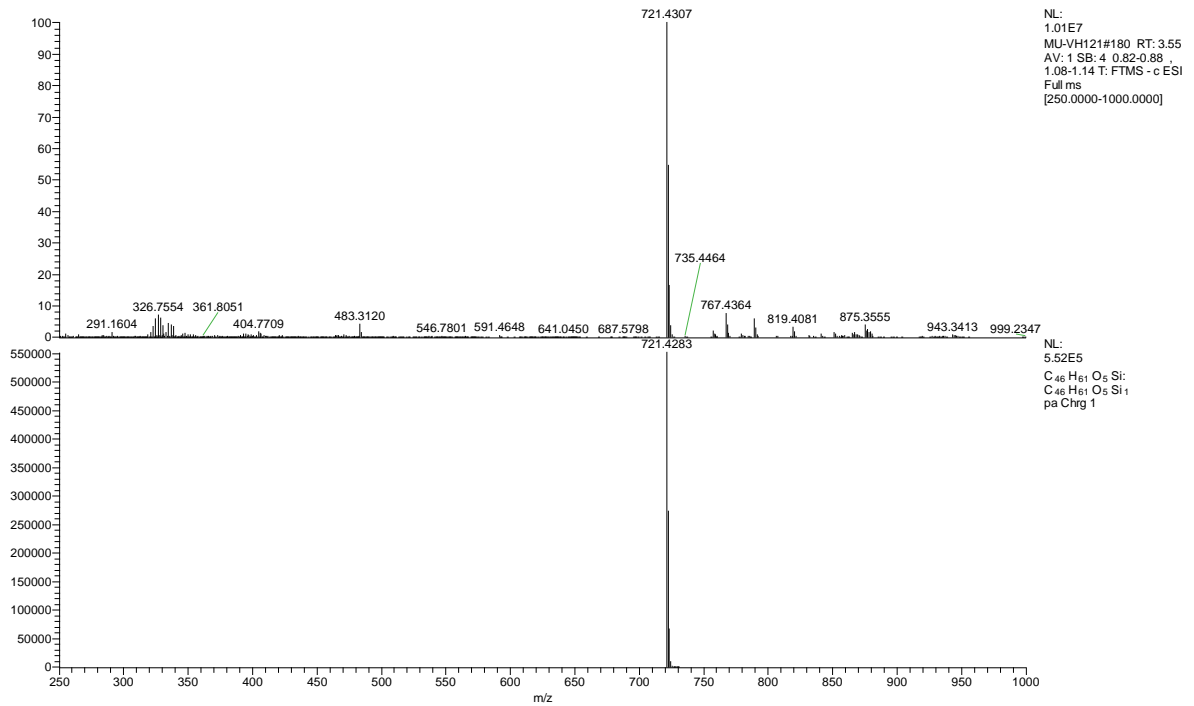
**<sup>1</sup>H NMR**



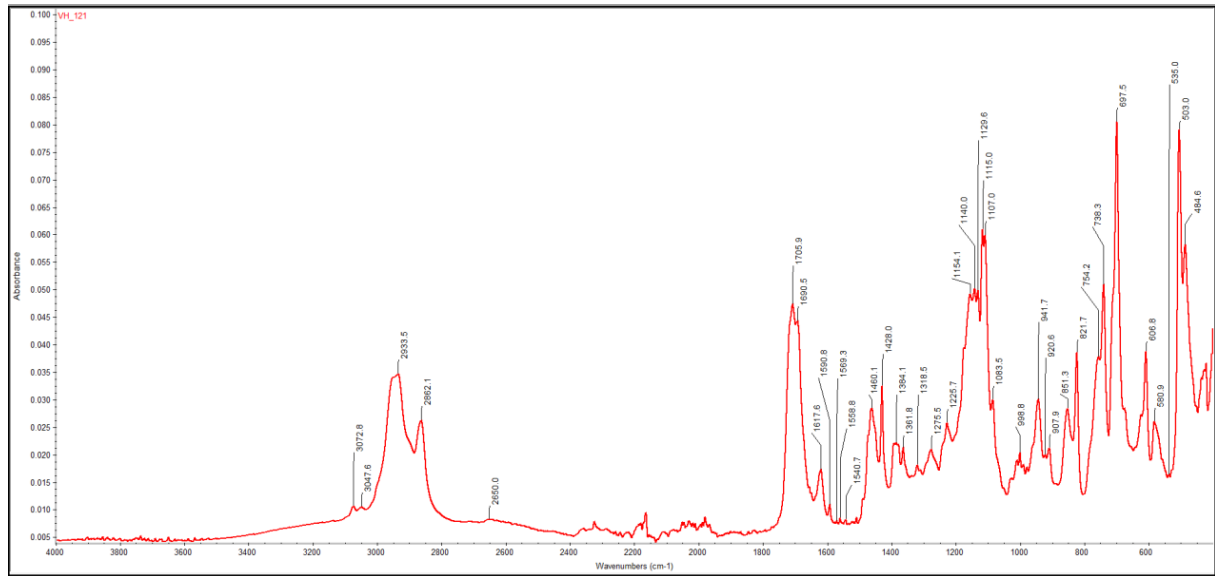
# <sup>13</sup>C NMR



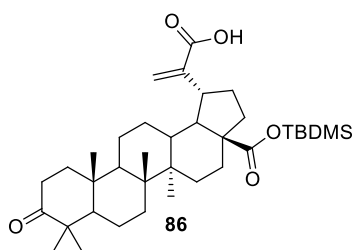
# HRMS: ESI-



# IR: absorbance

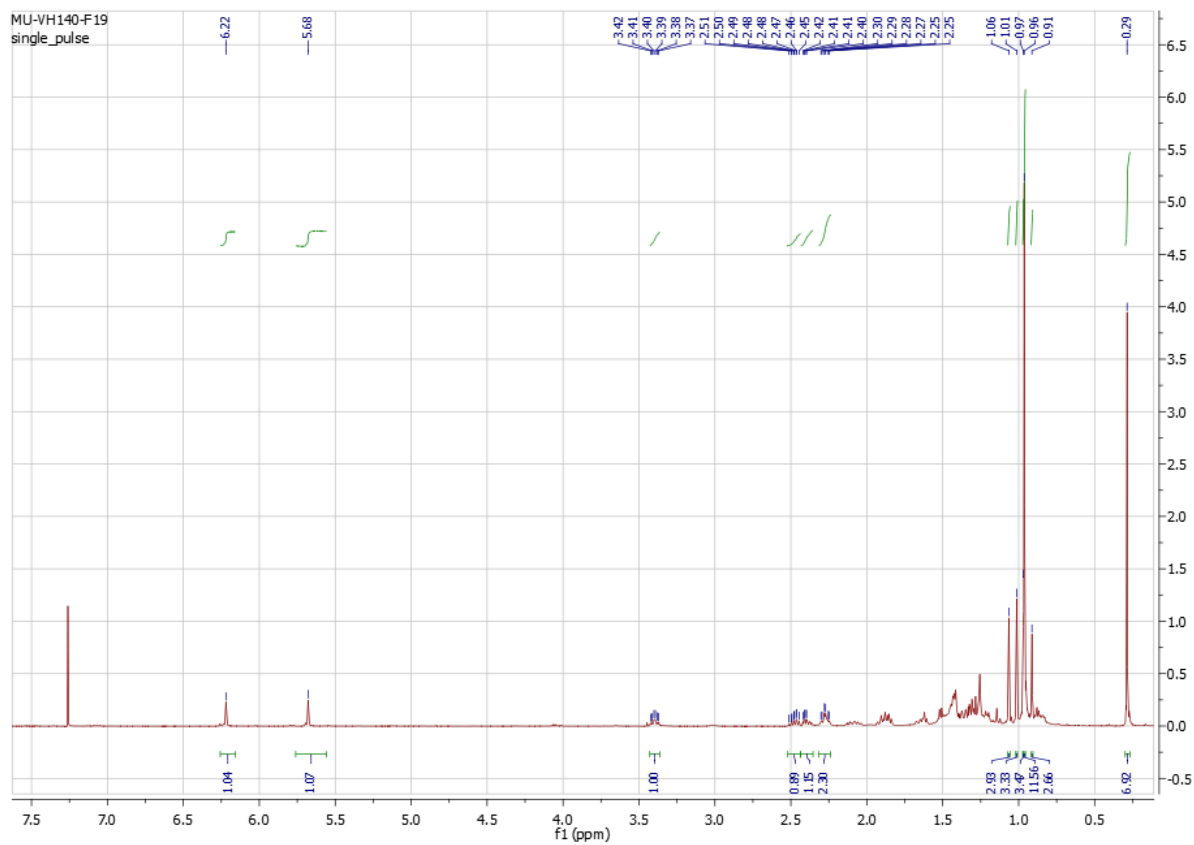


**Příloha 13: Dikyselina 86 (str. 77)**

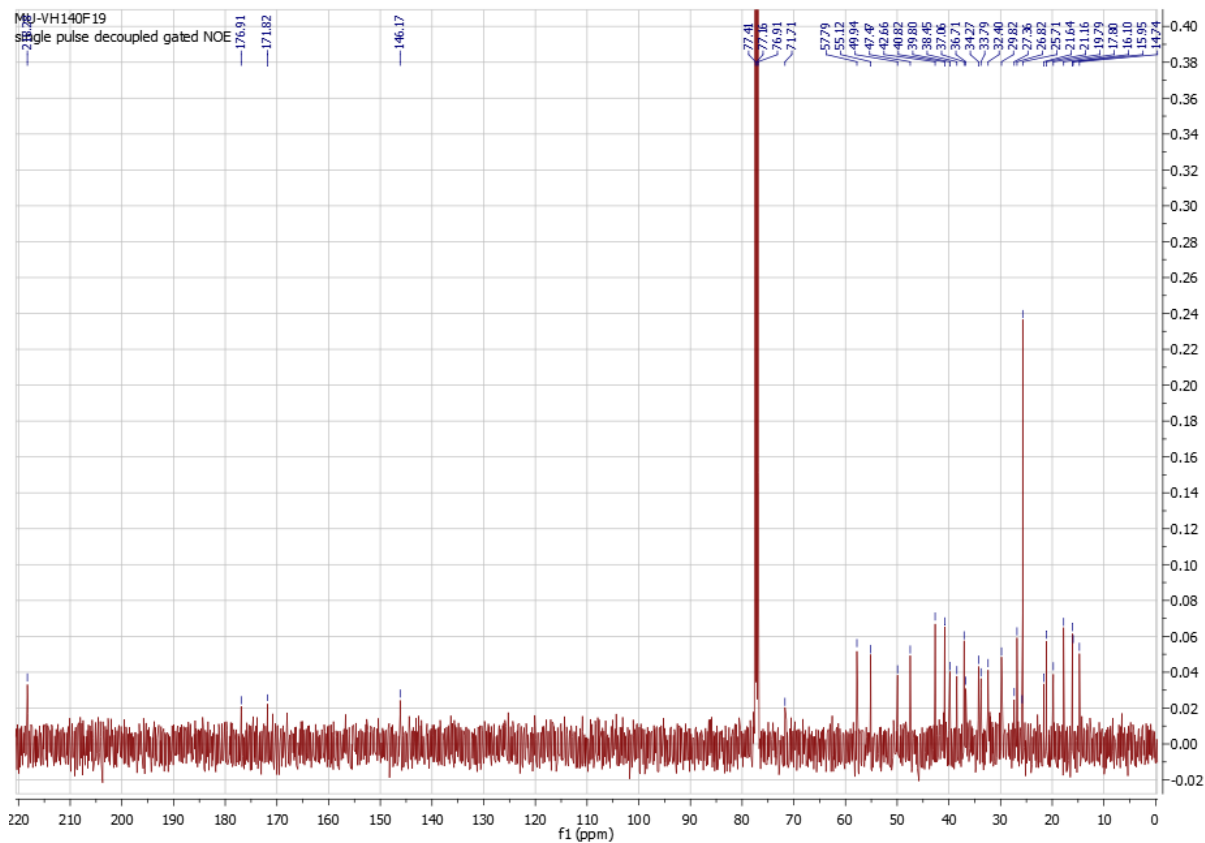


**<sup>1</sup>H NMR**

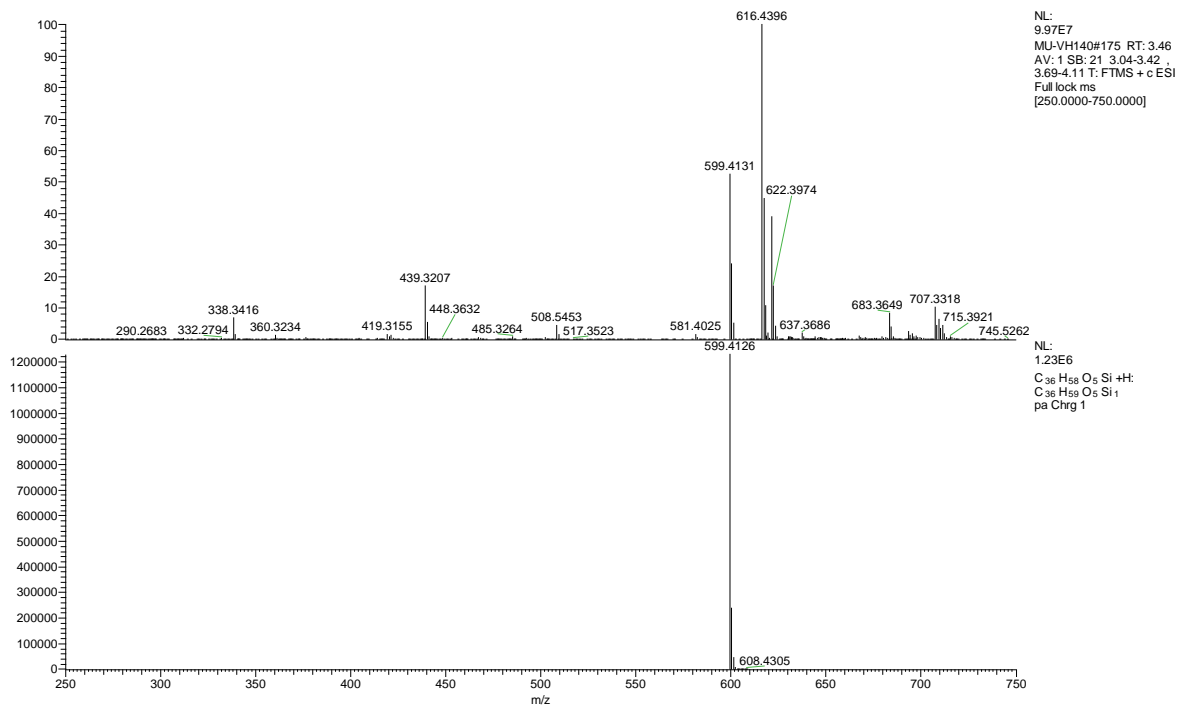
MU-VH140-F19  
single\_pulse



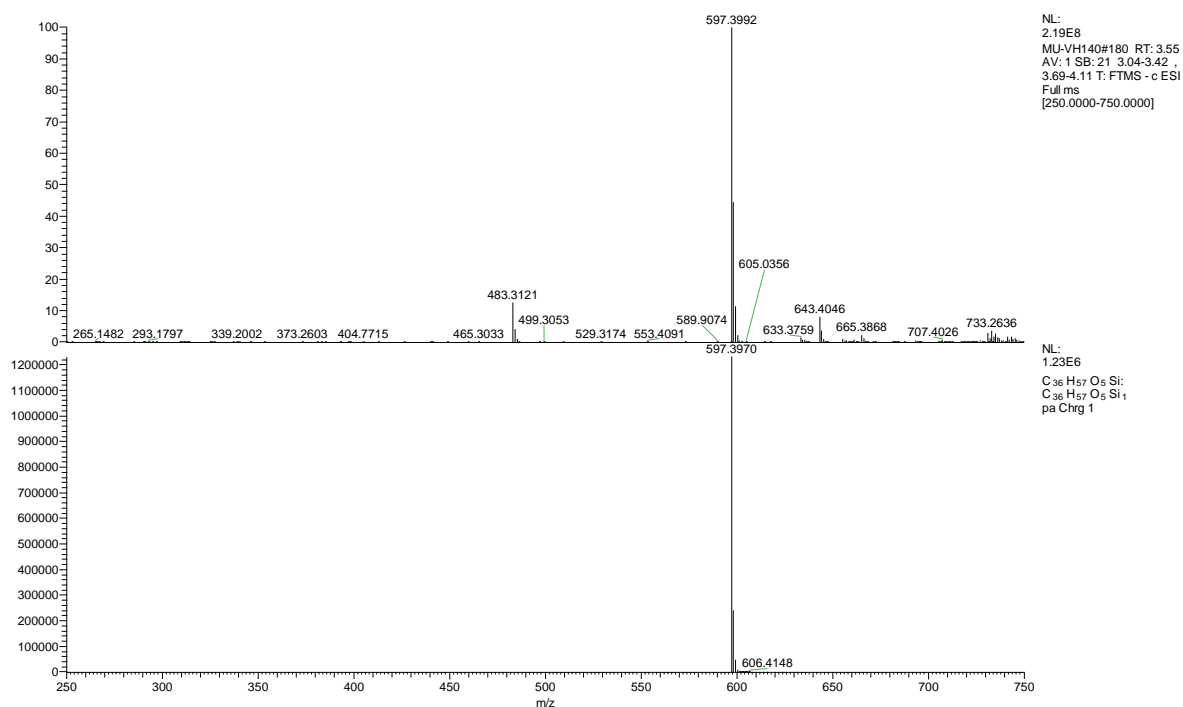
# <sup>13</sup>C NMR



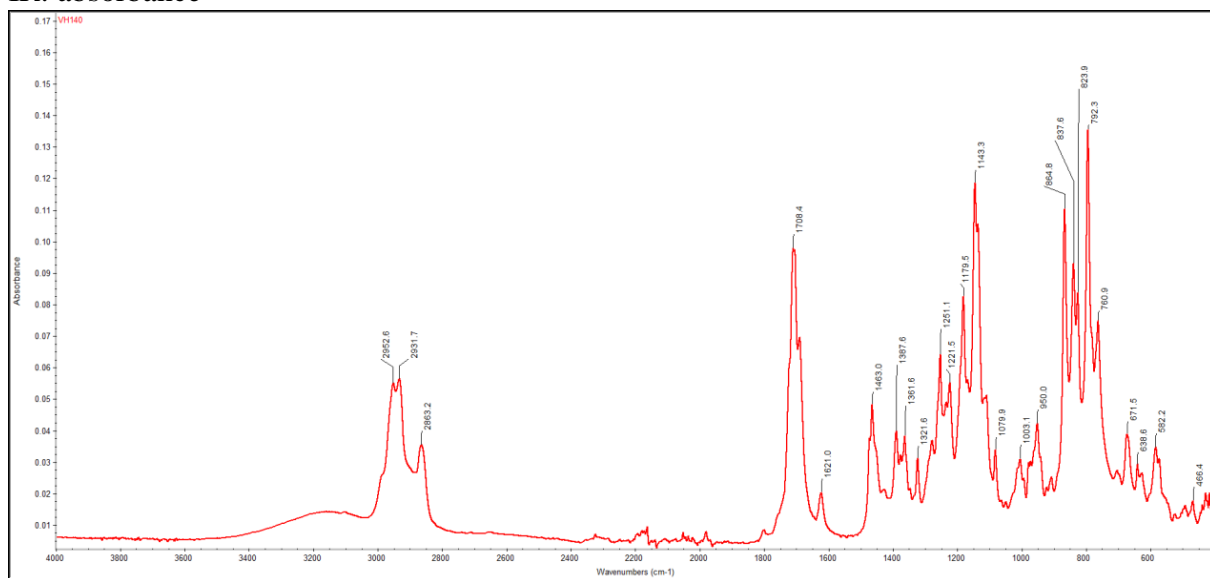
# HRMS: ESI+



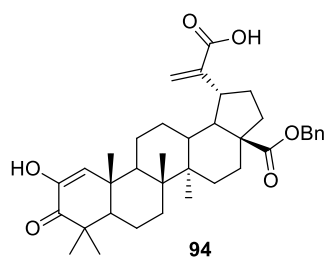
# HRMS: ESI-



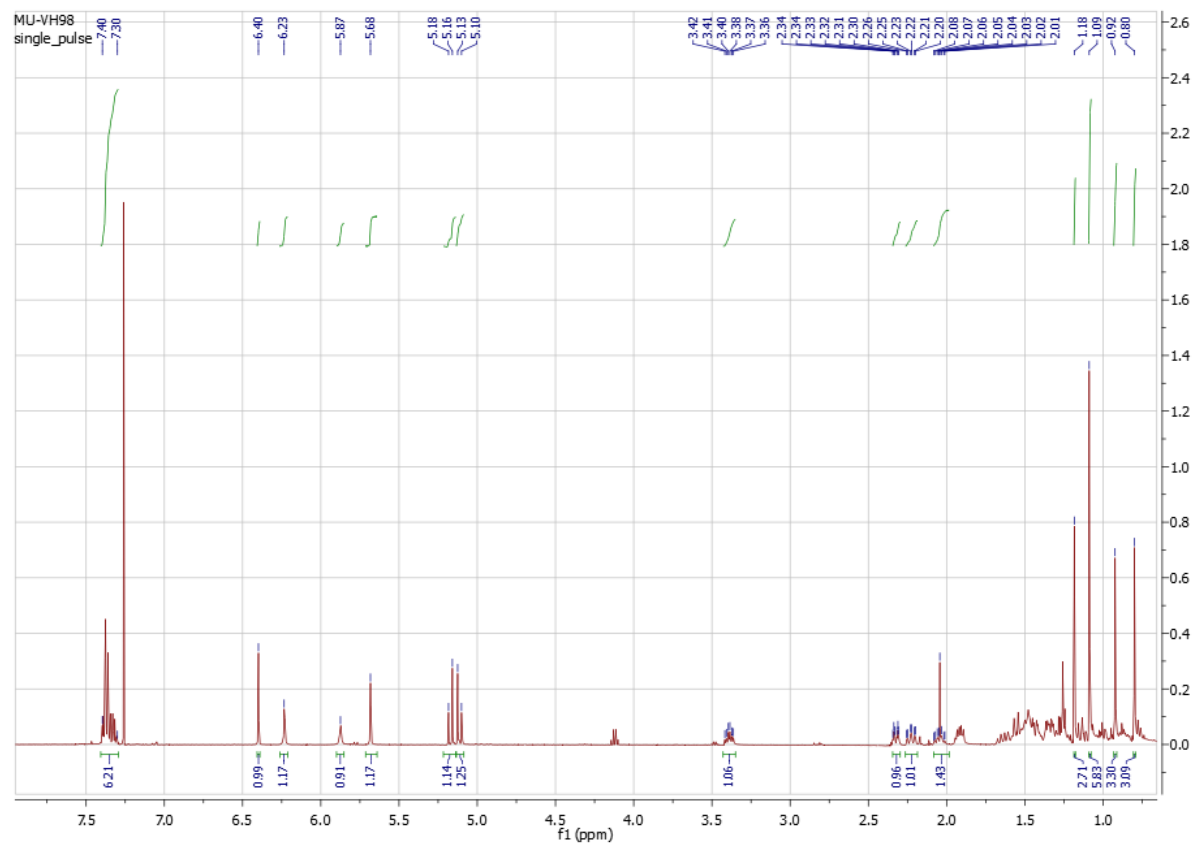
# IR: absorbance



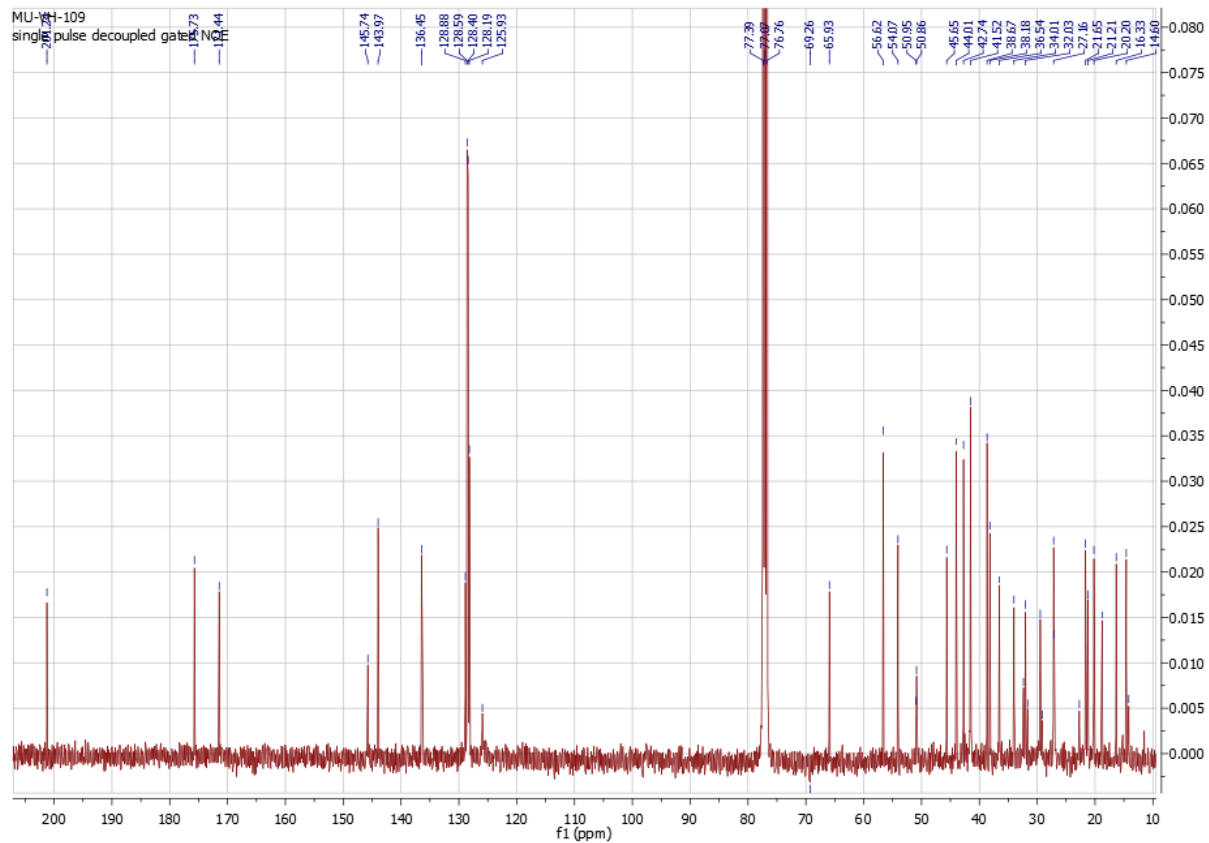
**Příloha 14: Diosfenol 94 (str. 80)**



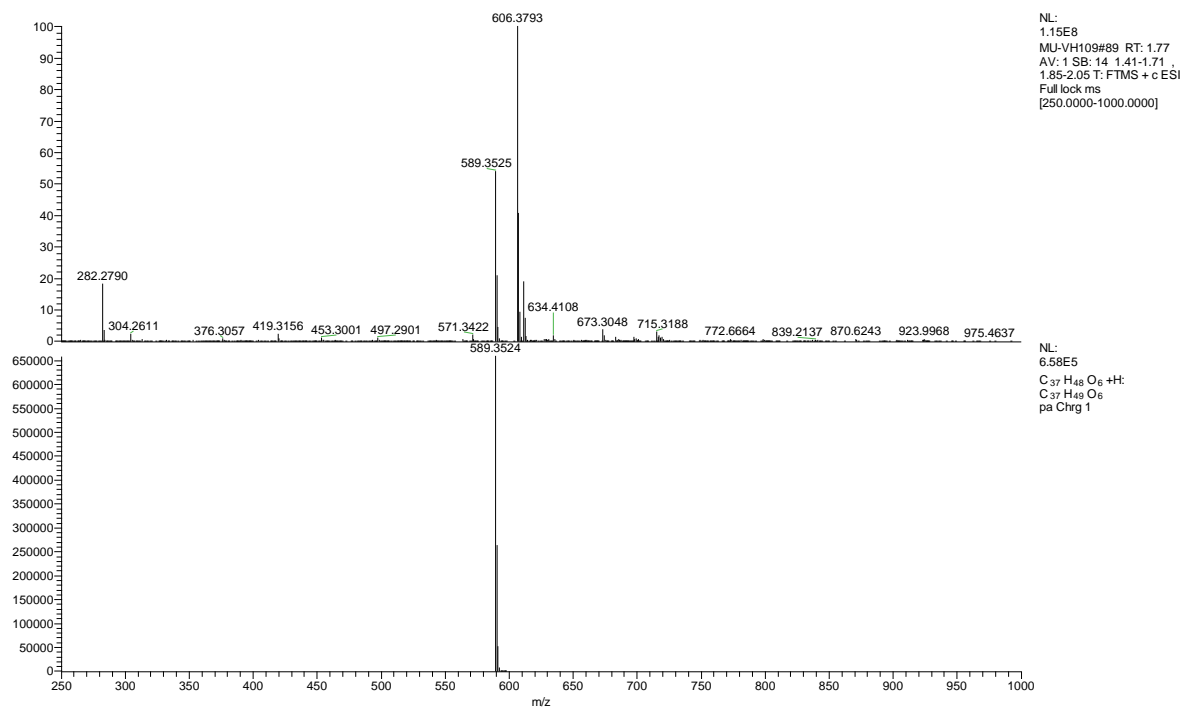
**<sup>1</sup>H NMR**



# <sup>13</sup>C NMR

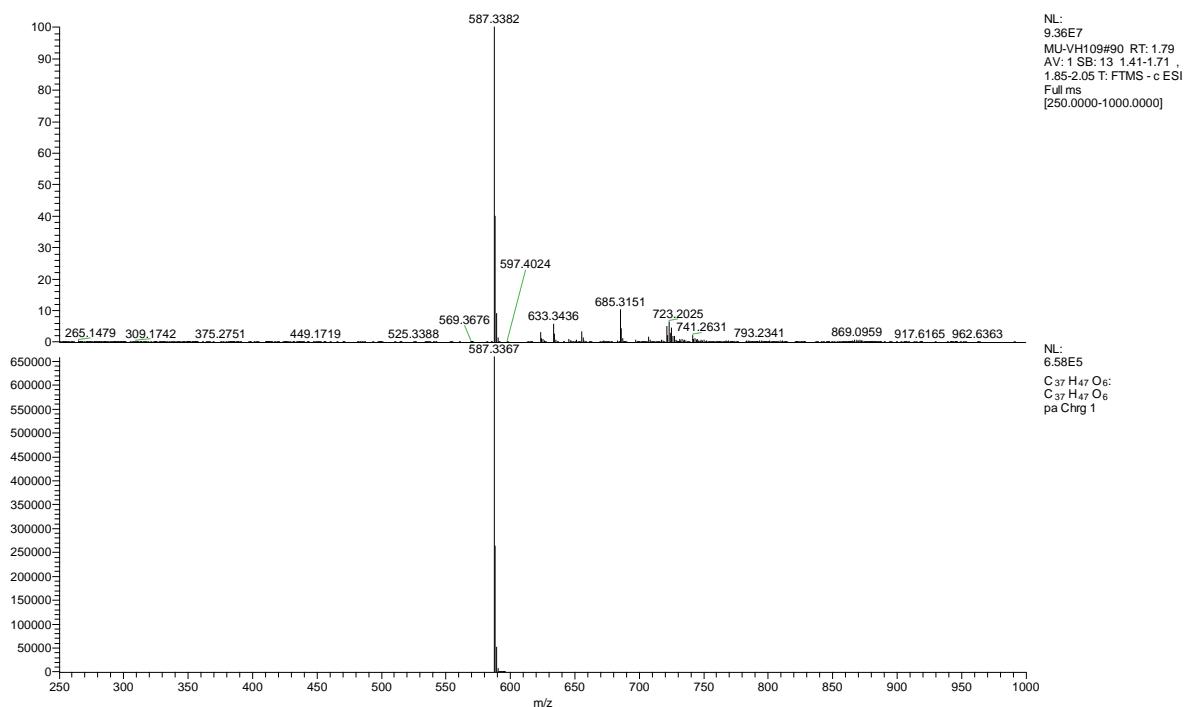


# HRMS: ESI+

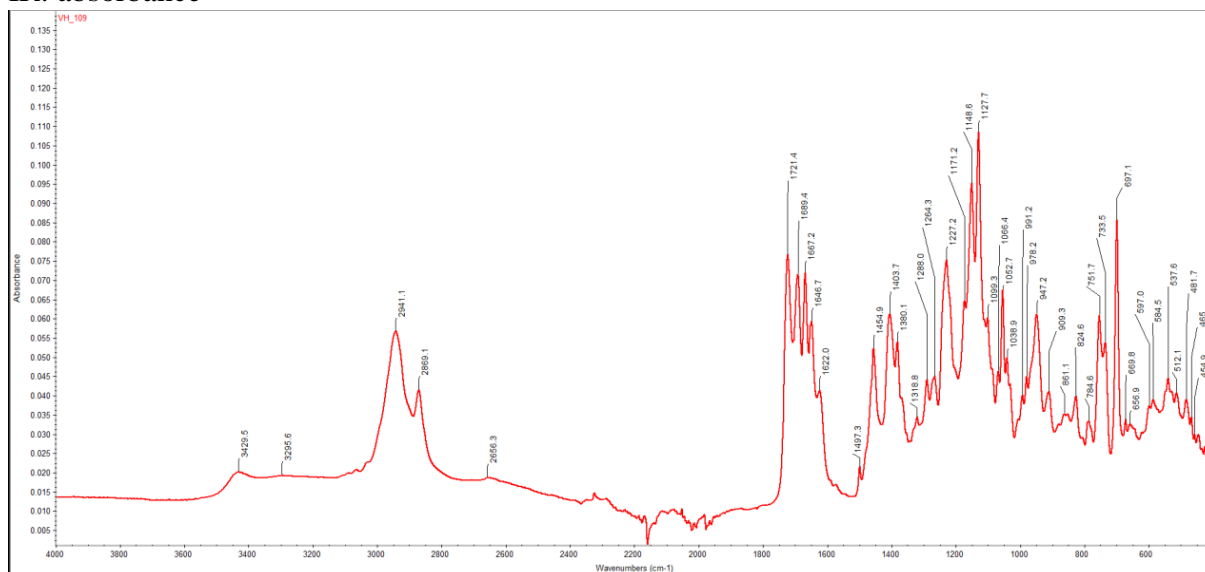




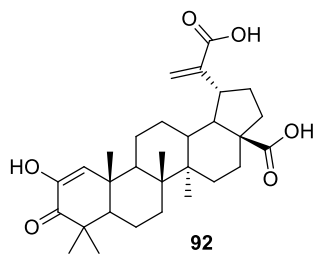
# HRMS: ESI-



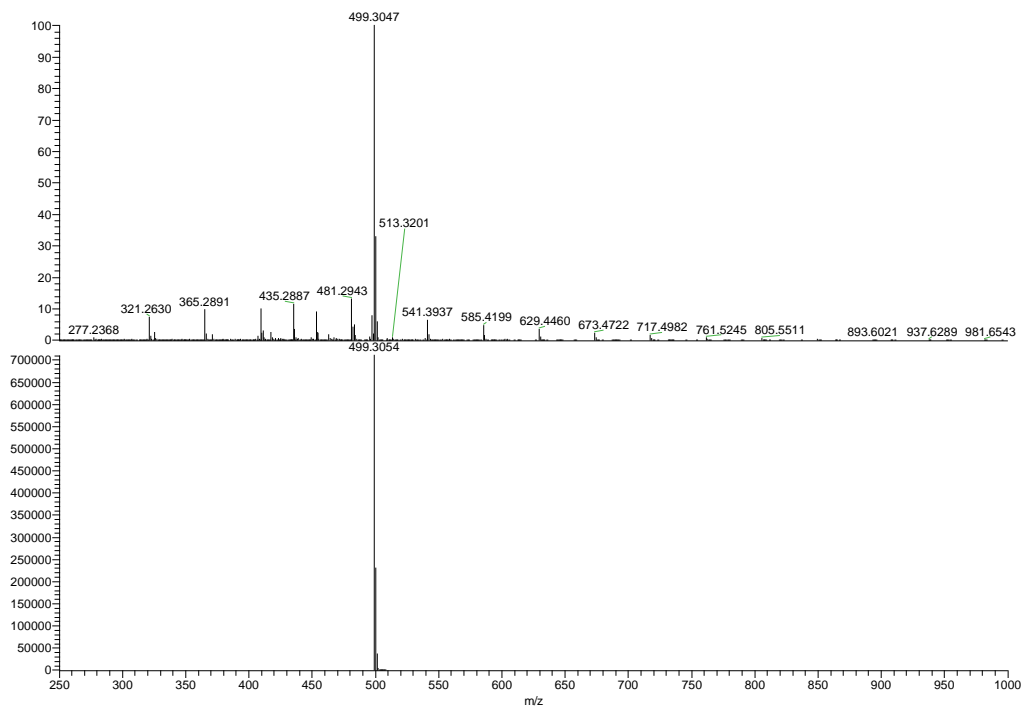
# IR: absorbance



**Příloha 15: Derivát 92 (str. 81)**



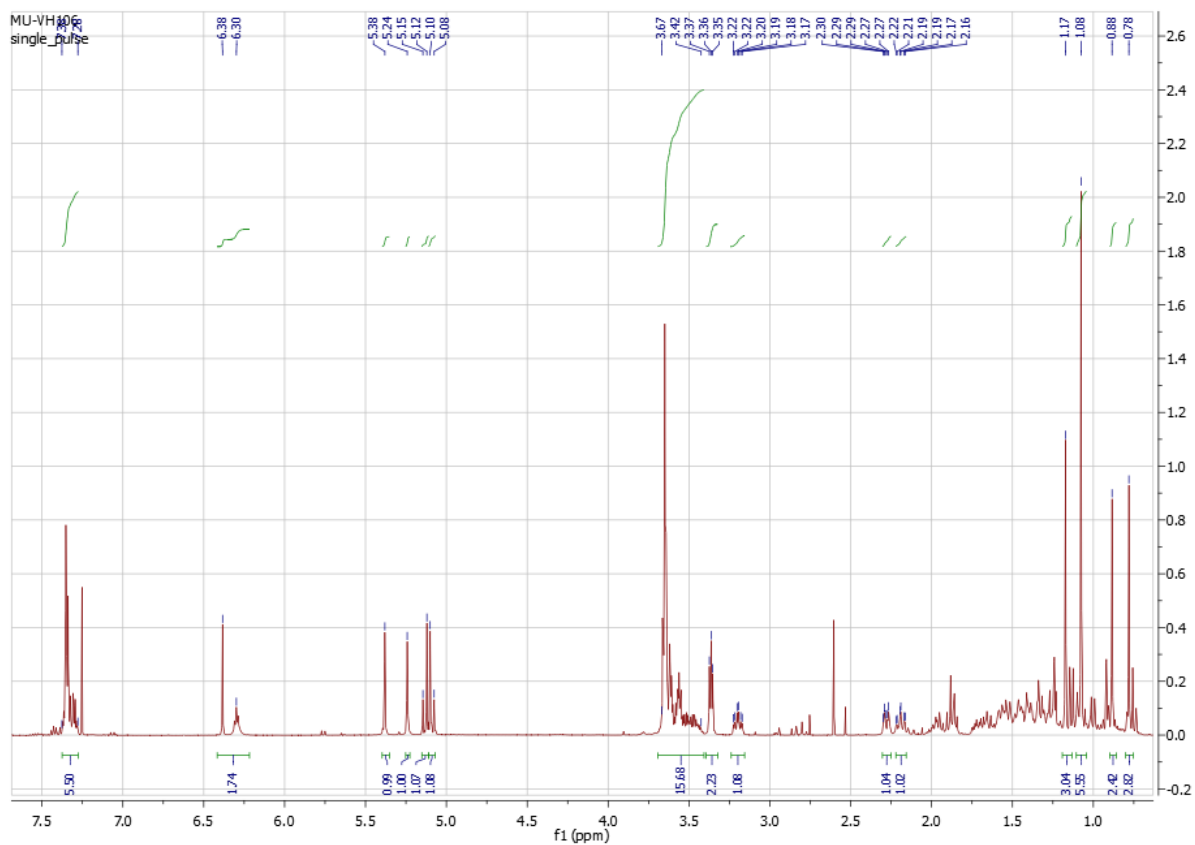
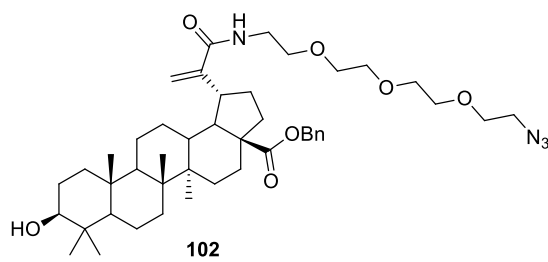
**HRMS:APCI+**



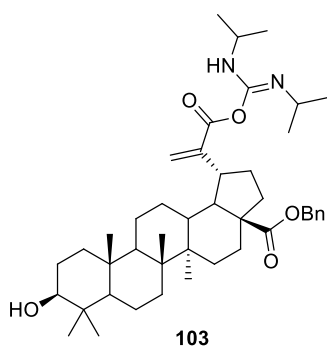
NL:  
3.32E9  
MU-VH-123-APC#31 RT:  
0.69 AV: 1 SB: 4 0.81-0.87 ,  
1.09-1.15 T: FTMS + c APCI  
corona Full ms  
[250.0000-1000.0000]

NL:  
7.10E5  
C<sub>30</sub>H<sub>42</sub>O<sub>6</sub> +H:  
C<sub>30</sub>H<sub>43</sub>O<sub>6</sub>  
př Chrg 1

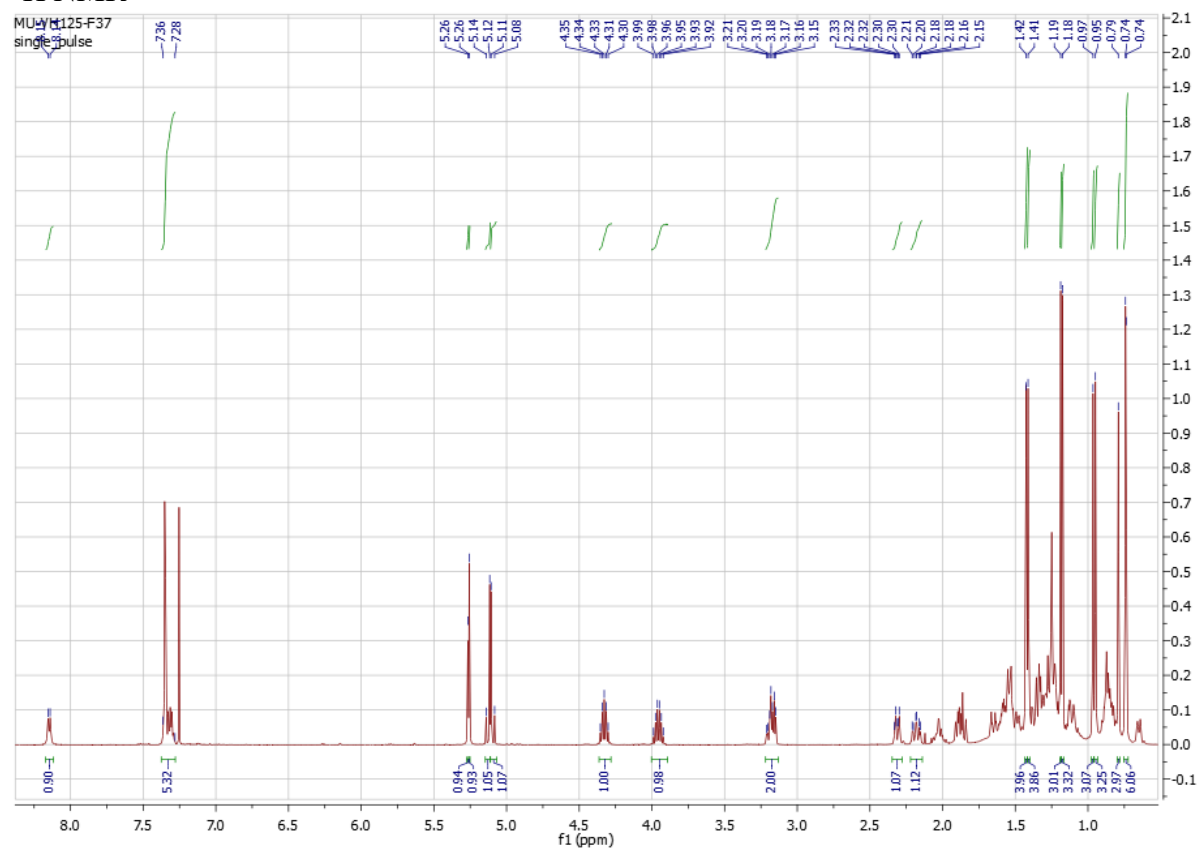
**Příloha 16: Derivát 102 (str. 84): <sup>1</sup>H NMR**



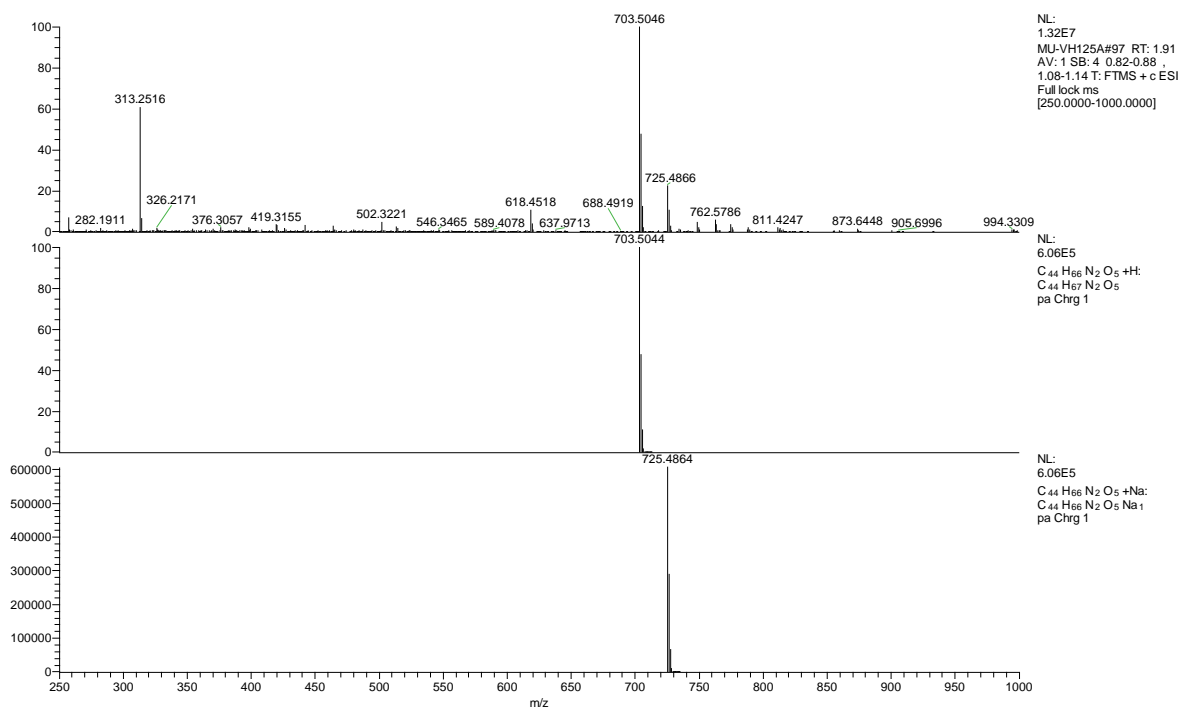
Příloha 17: Derivát **103** (str. 58)



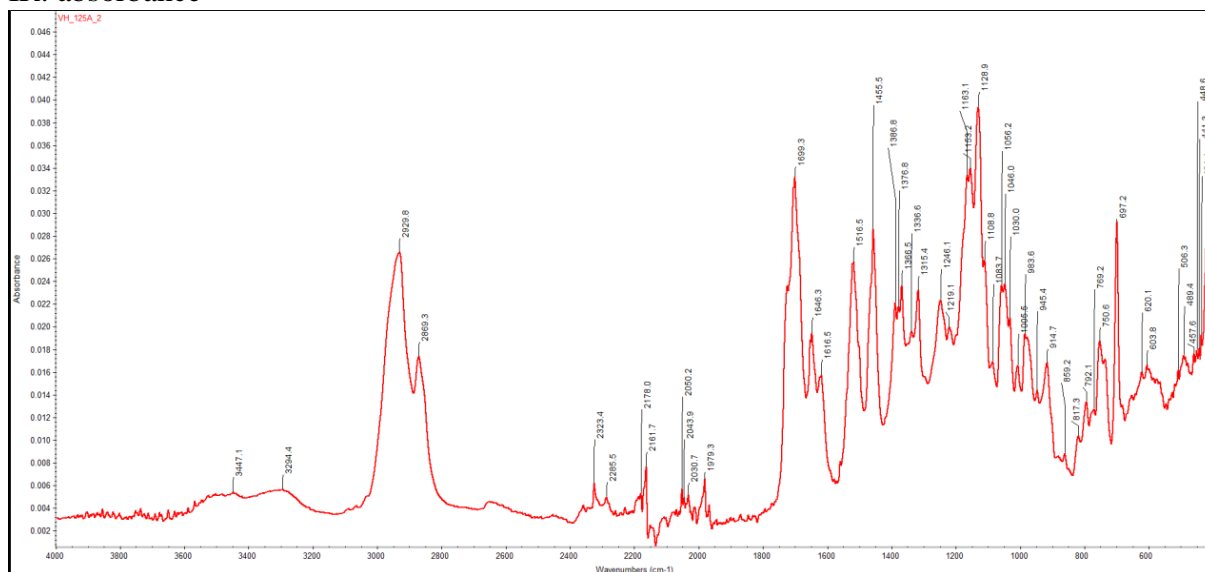
$^1\text{H}$  NMR



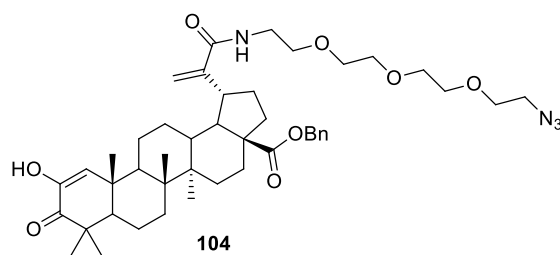
# HRMS: ESI+



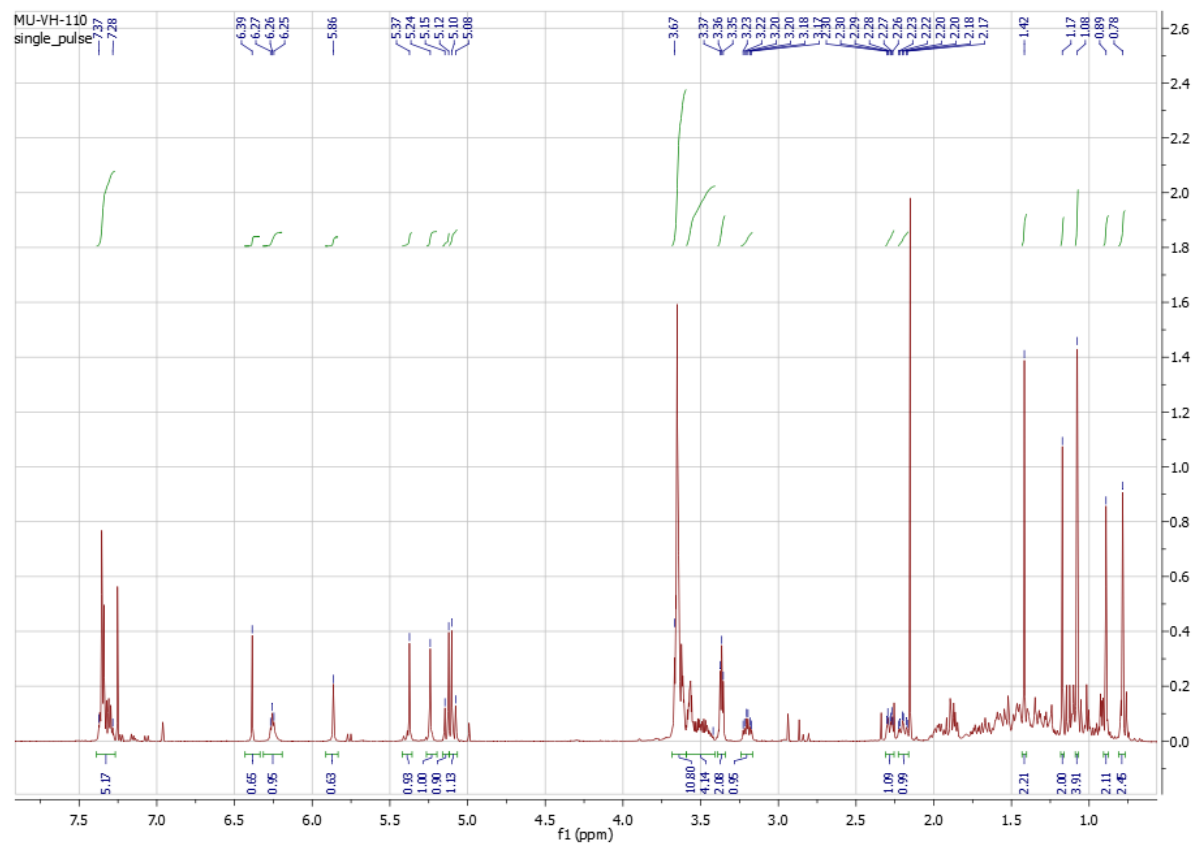
# IR: absorbance



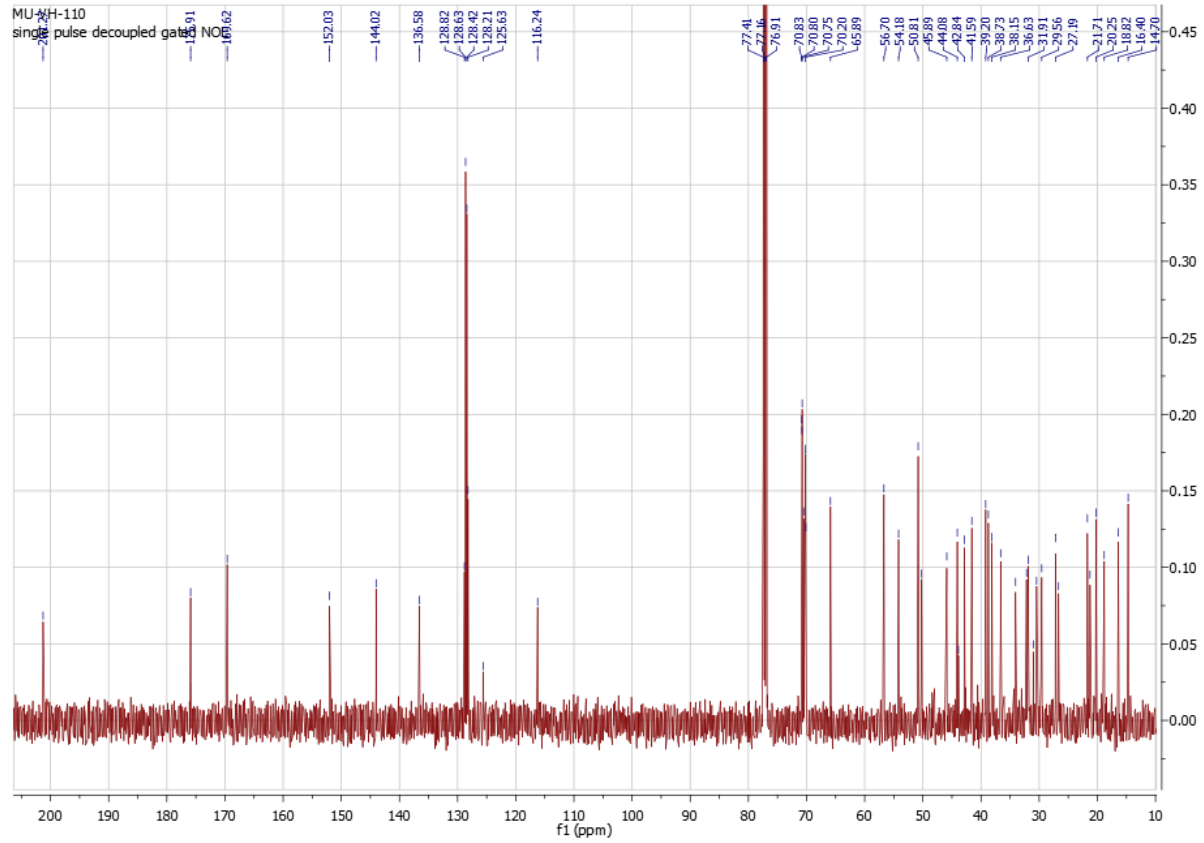
**Příloha 18: Derivát 104 (str. 85)**



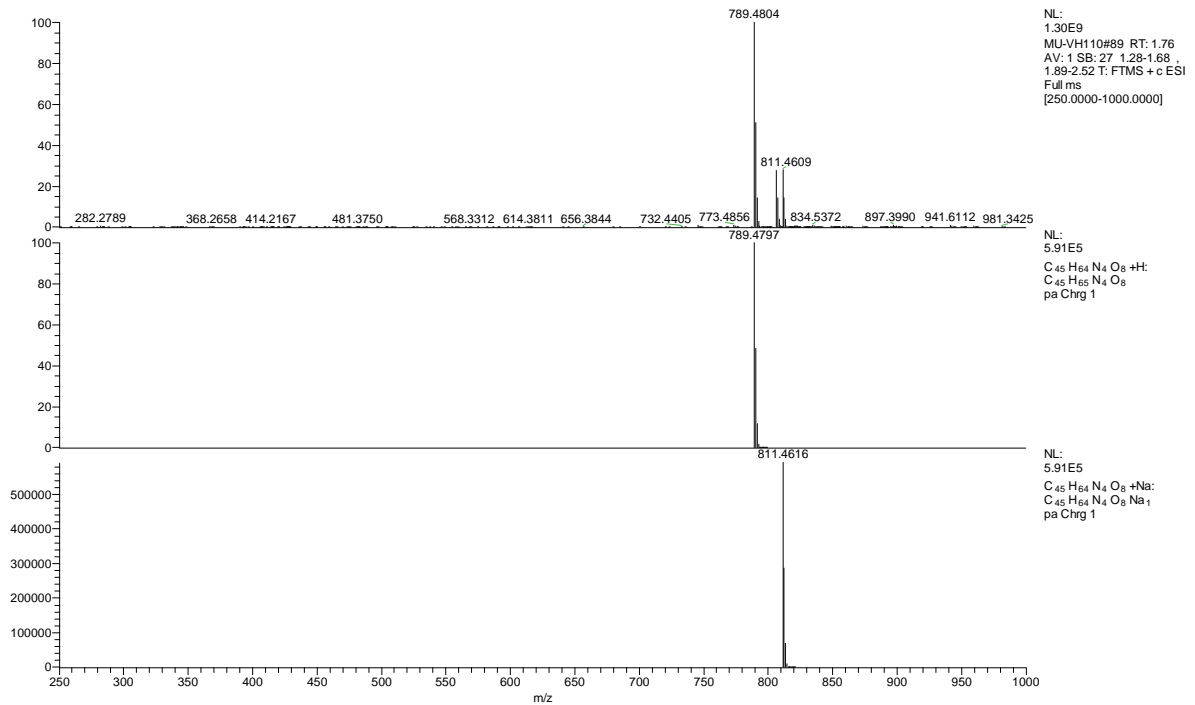
**<sup>1</sup>H NMR**



# <sup>13</sup>C NMR



# HRMS: ESI+



# IR: absorbance

