

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
Katedra organické chemie



Romana Bajerová

**Derivatizace mitochondriálních fluorescenčních značek
odvozených od Rhodaminu B a studium vlastností
připravených sloučenin**

Bakalářská práce

Studijní obor: Bioorganická chemie a chemická biologie B1407
Vedoucí práce: Mgr. Soňa Křupková, Ph.D.

Olomouc 2018

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Soni Křupkové, Ph.D., a že tato práce nebyla použita k získání jiného vysokoškolského titulu. Veškerá použitá literatura je uvedena na konci bakalářské práce.

V Olomouci dne 21. 5. 2018

.....

Romana Bajerová

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych chtěla poděkovat Mgr. Soni Křupkové, Ph.D., za její velkou pomoc při zpracování závěrečné práce a také ochotu, trpělivost a cenné rady. Dále děkuji všem pracovníkům Katedry organické chemie PříF UP za pomoc v laboratoři.

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autora: Romana Bajerová

Název práce: Derivatizace mitochondriálních fluorescenčních značek odvozených od Rhodaminu B a studium vlastností připravených sloučenin

Typ práce: Bakalářská

Pracoviště: Katedra organické chemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci
Ústav molekulární a translační medicíny, Olomouc

Vedoucí práce: Mgr. Soňa Křupková, Ph.D.

Rok obhajoby: 2018

Abstrakt:

Předložená bakalářská práce je zaměřena na modifikaci pyrimidinových derivátů obsahujících fluorescenční barvivo Rhodamin B fenolickou sloučeninou. Práce je členěna do dvou částí. První, teoretická část, je věnována nejznámějším fluorescenčním značkám a polyfenolům a jejich anti- a prooxidačním vlastnostem. Druhá, experimentální část popisuje reakční podmínky vedoucí k derivátům pyrimidinu a fenolů. Součástí práce je kapitola s fluorescenčními vlastnostmi připravených cílových látek.

Klíčová slova: fluorescence, fluorescenční značky, rhodaminy, Rhodamin B, polyfenoly, mitochondrie

Počet stran: 71

Počet příloh: 0

Jazyk: český

BIBLIOGRAPHIC IDENTIFICATION

Author's first name and surname: Romana Bajerová

Title: Derivatization of Rhodamine B Mitochondrial
Fluorescent Labels and Study of Prepared
Compounds Properties

Type of thesis: Bachelor

Department: Department of Organic Chemistry, Faculty of
Science, Palacký University Olomouc
Institut of Molecular and Translational Medicine,
Olomouc

Supervisor: Mgr. Soňa Křupková, Ph.D.

The year of presentation: 2018

Abstract:

The submitted bachelor thesis is focused on modification of pyrimidine derivatives containing fluorescent label Rhodamin B and fenolic compound. The bachelor thesis is divided into two parts. The first one, theoretical part, is aimed to the most famous fluorescent probes and polyphenols and their anti- and pro-oxidant properties. The second, experimental part, describes the reaction conditions leading to pyrimidine derivatives and phenols. The work includes a chapter with fluorescent properties of target molecules.

Keywords: fluorescence, fluorescent probes, rhodamines, Rhodamine B, polyphenols, mitochondria

Number of pages: 71

Number of appendixes: 0

Language: Czech

SEZNAM ZKRATEK

AMPK	adenosinmonofosfát-protein kináza
ASK1	signální kaskáda regulace apoptózy
ATP	adenosintrifosfát
BODIPY	4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen
COMU	1-[(1-(cyano-2-ethoxy-2-oxoethylideneaminooxy)-dimethylamino-morpholino)]uranium hexafluorofosfát
DCM	dichlormethan
DIC	<i>N,N'</i> -diisopropylkarbodiimid
DIEA	<i>N,N</i> -diisopropylethylenamin
DMAP	4-dimethylaminopyridin
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid
EGCG	epigalokatechin galát
Fmoc	9-fluorenylmethylkarbamát
HATU	1-[bis(dimethylamino)methylen]-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo[4,5- <i>b</i>]pyridinium 3-oxid hexafluorofosfát
H ₂ O	voda
HOBt	1-hydroxybenzotriazol
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
K ₂ CO ₃	uhlíčitán draselný
LC/MS	kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií
LDL	nízkodenzitní lipoproteiny
M	mol.dm ⁻³
MeCN	acetonitril
MeOH	methanol
MS	hmotnostní spektrometrie
NADH	redukovaný nikotinadenindinukleotid
NaOH	hydroxid sodný
NMR	nukleární magnetická rezonance
PyBOP	benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium hexafluorofosfát

RNS	reaktivní dusíkové radikály
ROS	reaktivní kyslíkové radikály
rt	room temperature = laboratorní teplota
SOD	superoxiddismutáza
TFA	kyselina trifluoroctová
TLC	tenkovrstevná chromatografie
TMSOK	trimethylsilanolát draselný
U-HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie

Obsah

1	ÚVOD.....	10
2	CÍL BAKALÁŘSKÉ PRÁCE.....	12
3	TEORETICKÁ ČÁST	14
3.1	Luminiscence.....	14
3.1.1	Fluorescence	14
3.1.2	Fosforescence	15
3.1.3	Fluorescenční značky.....	16
3.2	Polyfenoly.....	23
3.2.1	Příbuznost s vitamíny	25
3.2.2	Účinky polyfenolů na lidský organismus	25
3.2.3	Vlastnosti hydroxylových skupin	28
3.2.4	Funkce prevence rakoviny.....	29
3.3	Mitochondrie	30
4	VÝLEDKY A DISKUZE.....	32
4.1	Příprava pyrimidinového prekurzoru na pevné fázi.....	35
4.2	Modifikace fenolických sloučenin	39
4.2.1	4-fenoxybutanová kyselina	40
4.2.2	4-(3-methoxyfenoxy)butanová kyselina	44
4.2.3	4-(2,6-dimethoxyfenoxy)butanová kyselina	47
4.3	Finální acylace pyrimidinových prekurzorů.....	51
4.4	Fluorescenční vlastnosti látek	55
4.4.1	Emisní spektra	55
4.4.2	pH závislost.....	56
4.4.3	Fotostabilita	57
5	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	58
5.1	Analytické metody	58
5.2	Stanovení loadingu.....	58
5.3	Syntetické postupy.....	59
5.3.1	Modifikace fenolických sloučenin	59
5.3.2	Syntéza pyrimidinového prekurzoru.....	62
5.3.3	Finální acylace pyrimidinových prekurzorů.....	63
5.4	Analytická data	64

6	ZÁVĚR	67
7	SEZNAM LITERATURY	68

1 ÚVOD

Fluorescenční mikroskopie je v současnosti velmi rozšířená metoda využívaná v moderní buněčné biologii ke studiu buněčných struktur, organel a dynamických procesů uvnitř živých buněk. Jednou z organel podávajících mnoho informací o fyziologických změnách buňky je mitochondrie, která se nachází ve většině eukaryotických buněk. Mitochondrie se mimo jiné podílí na procesech jako je regulace buněčného cyklu, růst nebo apoptóza buňky.

V souvislosti s poslední zmíněnou funkcí se staly předmětem mnoha studií látky, které jsou schopny funkci mitochondrií ovlivnit. Působení látek s destruktivním účinkem na mitochondrie pak vede k cílené apoptóze buňky. Cytotoxický účinek těchto sloučenin je pak využíván při léčbě některých druhů rakoviny.

Rozsáhlou skupinou takových sloučenin jsou fenolické a polyfenolické látky. Ty jsou známy zejména pro své antioxidační vlastnosti a jejich využití v prevenci vzniku různých onemocnění jako jsou kardiovaskulární choroby, zánětlivá a imunitní poškození, onemocnění gastrointestinálního traktu (GIT), onemocnění mozku př. Parkinsonova choroba, dále pak poruchy předčasného stárnutí a nádorové bujení. Za určitých podmínek se sloučeniny s antioxidačními vlastnostmi mohou projevat naopak jako prooxidanty a mít toxický účinek na mitochondrie a buňky. Mohou se tak uplatnit při léčbě zhoubných nádorů.

V posledních letech byla na naší katedře vyvinuta syntéza fluorescenčních značek využívající trisubstituovaný pyrimidin jako centrální molekulu spojující peptid a fluorescenční barvivo. Sloučeniny této struktury jsou schopny penetrovat přes buněčnou membránu a akumulovat se v mitochondriích a mohou být proto využity k vizualizaci těchto organel. Struktura těchto derivátů umožňuje zavedení další složky do molekuly. Vzhledem k tomu, že cílem těchto sloučenin jsou mitochondrie, nabízí se možnost zanést do systému substituent ovlivňující jejich funkci. Tímto spojením by mohly vzniknout sloučeniny s potenciální biologickou aktivitou a zároveň vizualizační funkcí.

Jak bylo zmíněno výše, fenolické a polyfenolické sloučeniny mimo jiné poškozují mitochondrie a buňky produkcí reaktivních forem kyslíku (ROS) a jsou tak schopny

zahájit apoptózu buňky. Rozhodli jsme se proto substituovat pyrimidinové fluorescenční značky sloučeninami tohoto charakteru. Pro začátek byly vybrány jednoduché fenolické deriváty, na kterých bude vyvinuta metoda aplikovatelná pro složitější polyfenolické sloučeniny.

Derivatizací fluorescenčního systému může dojít ke změnám jeho fluorescenčních vlastností, proto bude také nutné prostudovat nově vzniklé deriváty z tohoto pohledu. Vedle fluorescence může být ovlivněna i schopnost penetrace látek buněčnou a mitochondriální membránou. Získané poznatky pak budou využity a porovnány s deriváty odvozenými od složitějších polyfenolů.

2 CÍL BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Cílem předložené bakalářské práce je příprava derivátu Rhodaminu B **1** a následná derivatizace volné aminoskupiny fenolickou sloučeninou za vzniku cílových látek **2**. Prekurzor **1** bude připraven podle vyvinuté metody využívající syntézu na pevné fázi. Následující substituce bude testována se čtyřmi hydroxysloučeninami, které musí být před samotným navázáním na rhodaminový derivát opatřeny funkční skupinou schopnou reagovat s aminy (Schéma 1). U připravených sloučenin pak budou změřena fluorescenční spektra, bude ověřena jejich chemická stabilita, fotostabilita a schopnost penetrace buněčnou membránou.

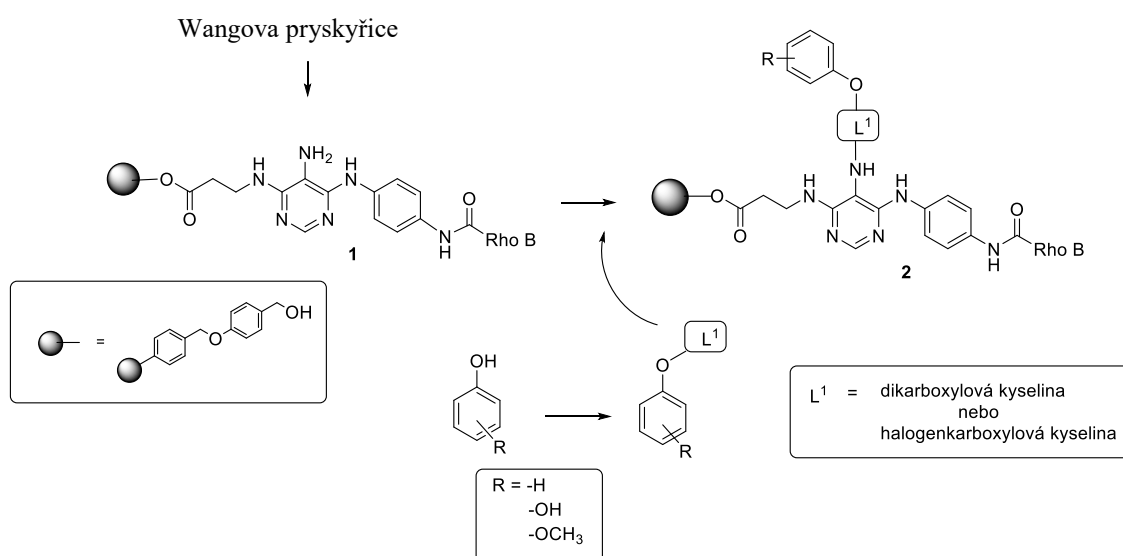


Schéma 1: Obecné schéma syntetické cesty

Dílčí cíle práce lze shrnout v následujících bodech:

- Příprava fluorescenčního derivátu odvozeného od Rhodaminu B a pyrimidinu na Wangově pryskyřici
- Modifikace hydroxyskupiny fenolických sloučenin za vzniku derivátů s karboxylovou skupinou

- Měření fluorescenčních vlastností připravených derivátů
- Příprava vzorků na testování jejich schopnosti penetrovat přes buněčnou membránu

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Luminiscence

Luminiscence je velmi významný jev, který se odehrává v přírodě. Je to záření, které emituje pozorovaná látka po předchozím přijetí energie. Luminiscence může být vyvolána různými způsoby. Látka například může přijmout světelnou energii a následně emitované záření se nazývá fotoluminiscence. Další záření může být emitováno díky chemické reakci, která probíhá uvnitř zkoumané látky, jde tedy o chemiluminiscenci. Dále pak bioluminiscence, která vzniká pomocí energie uvolněné při biologických pochodech probíhajících v látce. Elektrické pole může vyvolat elektroluminiscenci. Dále můžeme zmínit mechanoluminiscenci, která vzniká poškozením krystalové struktury látky. Existují i další typy luminiscence.¹

Nejvýznamnější kategorií luminiscence je bezpochyby fotoluminiscence. Mezi fotoluminiscenci řadíme fluorescenci a fosforescenci. Princip jejich vzniku a využití v praxi bude vysvětlen dále.

3.1.1 Fluorescence

Fluorescence je velmi významnou formou luminiscence. Nachází využití v mnoha disciplínách vědy, v chemii, biologii, medicíně, materiálovém inženýrství, nanotechnologiích atd. Důležitým předpokladem pro vznik fluorescence je to, aby zkoumaná látka měla takovou molekulovou strukturu, která je schopna absorbovat záření. Čím větší je absorpce, tím intenzivnější je fluorescence dané látky. Fluorescenci lze očekávat v molekulách, které mají rozsáhlý systém konjugovaných dvojných vazeb.

K fluorescenci dochází po absorpci fotonů a jejich energie. Tím molekula přejde do vyššího elektronového stavu, tzv. excitovaného stavu elektronů. Absorpcí energie přejde molekula z nejnižší vibrační hladiny základního stavu S_0 na jakoukoliv vibrační hladinu singletového excitovaného stavu S_1 , na každém orbitale se mohou usadit dva elektrony s opačným spinem. Z vyšších vibračních hladin excitovaného stavu mohou elektrony přejít na nižší vibrační hladiny tzv. nezářivým přechodem, čímž ztrácí energii. K emisi záření dochází teprve až při přechodu z nejnižší vibrační hladiny prvního

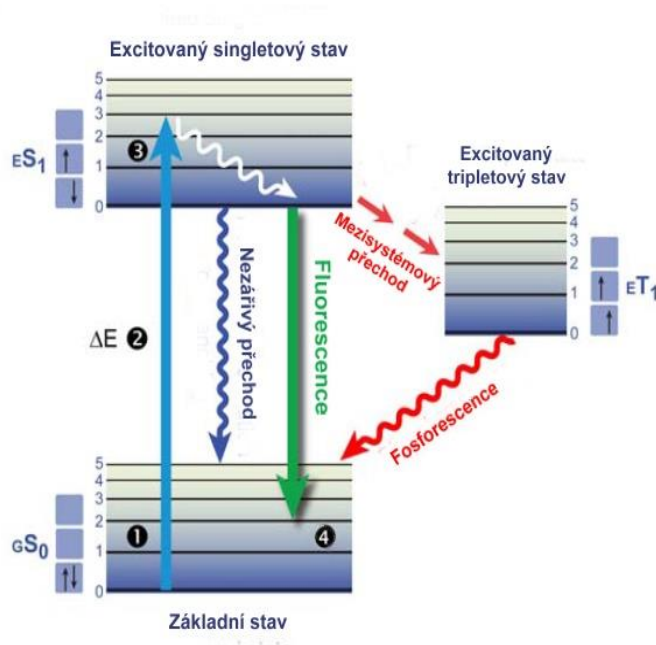
excitovaného stavu S_1 do základního stavu S_0 . Proto má vyzářené světlo nižší energii (vyšší vlnovou délku) než světlo absorbované.²

Tento jev poprvé popsal Sir George Stokes ve své publikaci z roku 1852 a od té doby je nazýván Stokesovým posunem.³

3.1.2 Fosforescence

Fosforescence je další formou luminiscence. Má delší trvání, může trvat několik minut až hodin, na rozdíl od fluorescence. Fosforescence vzniká absorpcí fotonů, čímž vzniká excitovaný singletový stav jako u fluorescence. Navíc ale dochází k mezisystémovému přechodu za vzniku excitovaného tripletového stavu, kdy mají elektrony souhlasné spiny. Navrácením na základní energetickou hladinu dochází k fosforescenci. Toto navrácení elektronů do normálního stavu je kvantově zakázaný přechod, proto fosforescence trvá déle.²

Přechody mezi energetickými hladinami popisuje obrázek, tzv. Jablonského diagram (Obr. 1).



Obr. 1: Jablonského diagram.²

Jevu fluorescence se využívá u nedestruktivních a vysoce citlivých analytických metod jako fluorescenční spektroskopie, fluorescenční mikroskopie nebo průtoková cytometrie. Dále se fluorescence zaměřuje na měření intracelulárního pH pomocí fluorescenčních barviv.

3.1.3 Fluorescenční značky

Nejznámějšími fluorescenčními značkami neboli barvivy (fluorofory) jsou pH indikátory fenolftalein, lakmus, methylořanž nebo methylčerven. Tyto indikátory se ale nedají použít pro měření intracelulárního pH. Efektivní fluorescenční sondy pro sledování změn intracelulárního pH musí splňovat několik přísných požadavků jako je dobrá selektivita, vysoká citlivost, dobrá fotostabilita, schopnost pracovat v příslušném rozsahu pH a samozřejmě musí být nedestruktivní pro buněčný systém. Výsledky reakce pak vyhodnocujeme pomocí spektrálních technik.

Intracelulární pH hraje důležitou roli v životních aktivitách buňky, jako je proliferace a apoptóza, transport živin, endocytóza nebo svalové kontrakce. Abnormální pH uvnitř buňky indikuje poškození růstu a jejich funkci. S těmito poškozeními jsou spojené nemoci jako například rakovina.

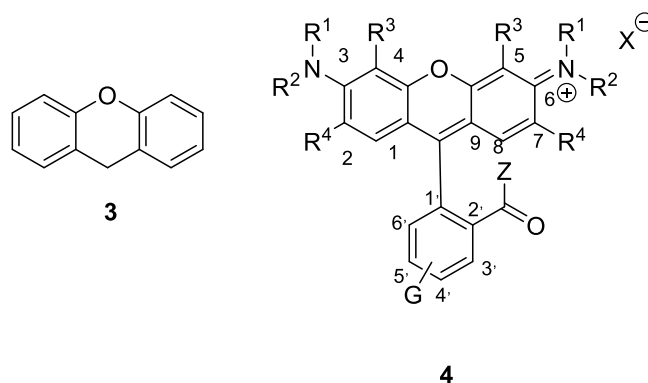
Jako fluorescenční značky užívané ke značení buněk či buněčných organel můžeme využít rhodaminy, fluorescein a jeho deriváty, benzoxanthenová barviva, BODIPY nebo trifenylphosfinové sloučeniny. Dále pak rhodoly, které jsou hybridními sloučeninami fluoresceinu a rhodaminu. Vzhledem k tomu, že je tato práce zaměřená na syntézu derivátů Rhodaminu B, bude v následujících kapitolách pozornost věnována pouze skupině rhodaminových barviv.

3.1.3.1 Rhodaminové fluorescenční značky

Syntéza rhodaminů sahá až do 19. století, kdy se staly novou třídou syntetických barviv. Využívaly se k barvení kosmetiky, textilií, inkoustů, dokonce i potravinářských výrobků.⁴

Rhodaminová barviva jsou velmi často užívaná jako fluorescenční značky, jelikož mají široký rozsah fluorescence ve viditelné oblasti elektromagnetického spektra a vysoké kvantové výtěžky. Díky jejich stabilitě a výborným fyzikálním vlastnostem mají bohaté využití.

Patří do skupiny xanthenových barviv společně s fluoresceinem a jeho deriváty a eosinem. Obecné struktury chromoforu xanthenu **3** a rhodaminových barviv **4** jsou uvedeny na obr. 2.



Obr. 2: Obecné struktury xanthenu a rhodaminu

Rhodaminová barviva jsou velmi často užívaná jako fluorescenční značky, jelikož mají široký rozsah fluorescence ve viditelné oblasti elektromagnetického spektra a vysoké kvantové výtěžky. Díky jejich stabilitě a výborným fyzikálním vlastnostem mají bohaté využití.

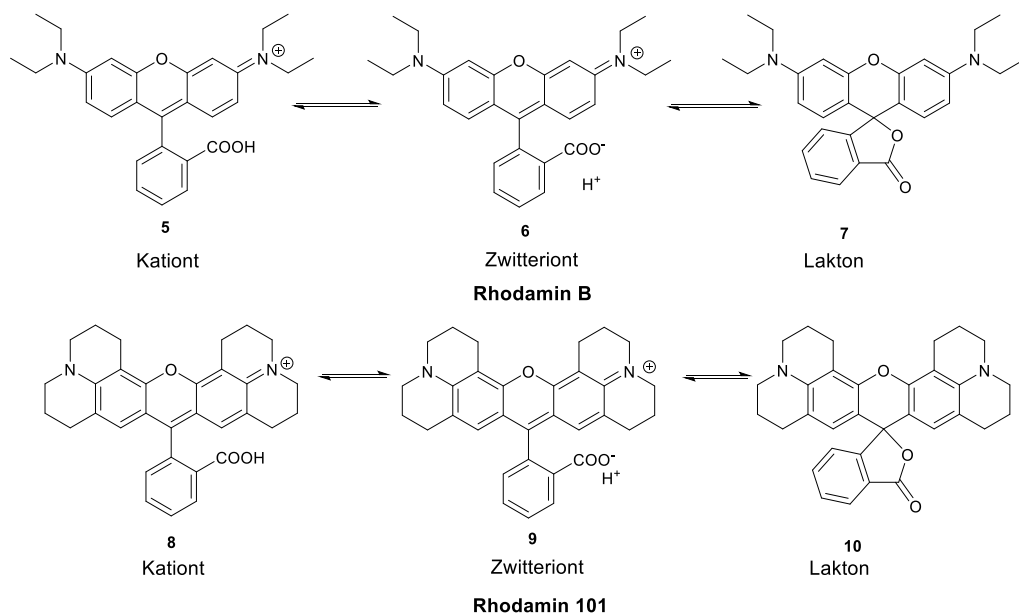
Rhodaminy se často používají v buněčné biologii. Tyto kladně nabitě fluorofory velmi dobře pronikají do buněk díky negativnímu membránovému potenciálu v cytoplasmě buněk. Delokalizovaný kationtový systém π -elektronů navíc podporuje akumulaci rhodaminů uvnitř mitochondrií na základě ještě silnějšího negativního potenciálu vnitřní mitochondriální membrány. Další výhodou je jejich vysoká stereospecifita reakce s povrchem biomakromolekul.^{5,6}

Rhodaminová barviva lze snadno modifikovat. Tyto modifikace můžeme rozdělit do tří hlavních tříd. První z nich je modifikace aminoskupin xanthenové podjednotky, což vede k několika změnám ve fotofyzikálních vlastnostech, může dojít dokonce k úplné

ztrátě fluorescence. Tato vlastnost je užitečná při syntéze latentního fluoroforu (pro-fluoroforu). Latentní fluorofory se užívají při studiu aktivity enzymů např. kaspázy, esterázy, proteázy, nebo k organokovové katalýze v živých buňkách a k detekci malých molekul in vivo. Pro některé aplikace jsou rhodaminy používány v jejich volné formě, avšak pro většinu z nich je potřeba ukotvit je k jiné molekule (polymer, oligonukleotid, biomolekuly atd.) nebo povrchu. Za tímto účelem jsou modifikovány na karboxyphenylovém kruhu v pozici 4'- nebo 5'-substituenty (G = aktivovaný ester, acyl chlorid, sulfonyl chlorid), které snadno podléhají reakci s nukleofilními skupinami v cílové molekule. Tyto deriváty jsou velmi drahé a většinou se prodávají jako směs isomerů. Jsou to například sukcinimidestery, isothiokyanáty a maleinimidové deriváty Rhodamin 110 nebo Rhodamin 101. Jejich použití je tedy omezené kvůli vysoké ceně. Třetí skupinou jsou pak modifikace karboxylové kyseliny v poloze 2'. Může se zdát, že modifikace této polohy je jednoduchá. Avšak teprve v nedávné době začaly vycházet odborné články zaměřené na změnu struktury rhodaminové fluorescenční značky právě ve zmíněné pozici.⁷ Jednou z prvních prací za účelem modifikovat tuto karboxylovou skupinu byla její amidace, kterou provedli Cincotta a Foley.⁸ Nová fluorescenční značka se pak používá ve fotografických procesech.

V závislosti na substituentech R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , G a také na counteriontu X^- (většinou Cl^- , Br^- , ClO_4^-) mají značky různé fotofyzikální vlastnosti v roztoku, jako absorpční a emisní maxima, poločas fluorescence a kvantový výtěžek. V kyselých roztocích je karboxylová skupina protonována a rhodaminová značka se tak vyskytuje ve formě kationtu, vbazických roztocích dochází k disociaci a rhodaminová značka je tak převedena na formu zwitteriontu. V důsledku induktivního efektu záporného náboje dochází k červenému posunu v absorpčním i fluorescenčním maximu. V méně polárních rozpouštědlech podléhají zwitterionty reverzibilní konverzi na bezbarvý lakton kvůli přerušení konjugace v molekule chromoforu (Obr 3).⁷

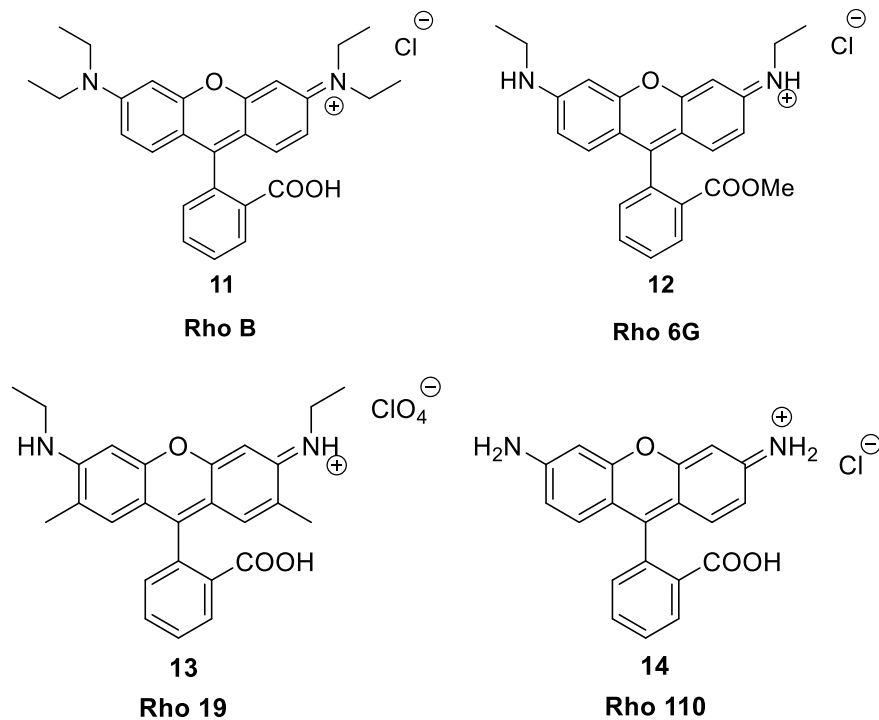
Na obr. 3 jsou zobrazeny kationtové a zwitteriontové struktury Rhodaminu B a Rhodaminu 101, které po přijetí protonu fluoreskují a laktonové formy, které jsou bezbarvé.



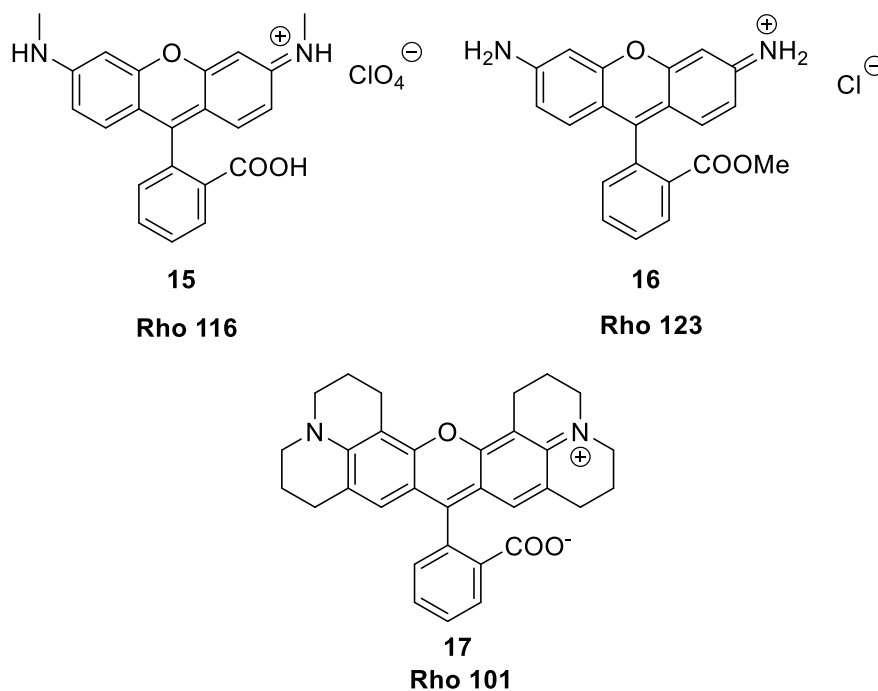
Obr. 3: Fluoreskující a bezbarvé struktury rhodaminových barviv

V následujícím textu jsou uvedeny příklady již poměrně dlouho známých a využívaných rhodaminových sloučenin i některé nedávno vyvinuté deriváty.

Mezi komerčně dostupné a velmi užívané rhodaminy patří Rhodamin B, Rhodamin 6G, Rhodamin 19, Rhodamin 110(Obr.4), Rhodamin 116, Rhodamin 123 a Rhodamin 101 (Obr. 5).



Obr. 4: Struktury rhodaminů



Obr. 5: Struktury rhodaminů

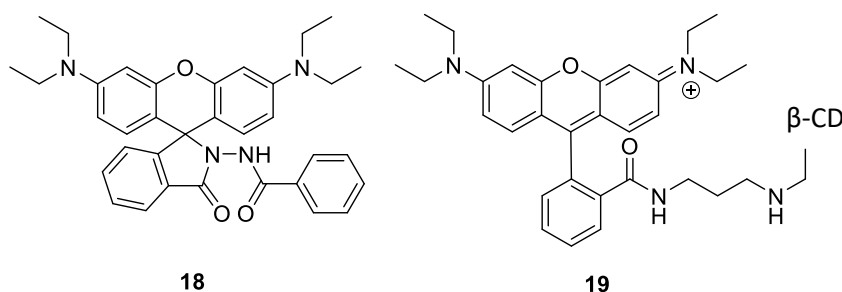
Rhodamin B se užívá k monitorování membránové fúze, ke studiu struktury krevních koagulačních faktorů a receptorů. Dále k barvení tubulů generovaných v buněčném cyklu, ke stanovení lysozomálních degradačních lipoproteinů a ke zkoumání vlivu proteinů na dynamiku lipidů pomocí fluorescenční anizotropie.

Rhodamin 6G se používá v biotechnologiích jako je fluorescenční mikroskopie, průtoková cytometrie, fluorescenční korelační spektroskopie a ELISA. Dále je vhodný pro přípravu nukleotidů a oligonukleotidových konjugátů.

Rhodamin 110 je velmi užitečný při detekci ROS v buňkách nebo při studiu enzymů proteasy a kaspásy. Rhodamin 123 se používá pro detekci mnoha různých typů buněk například lidských neuronů, bakterií nebo dokonce rostlinných buněk. Rhodamin 101 má využití při studiu biologických membrán.⁹

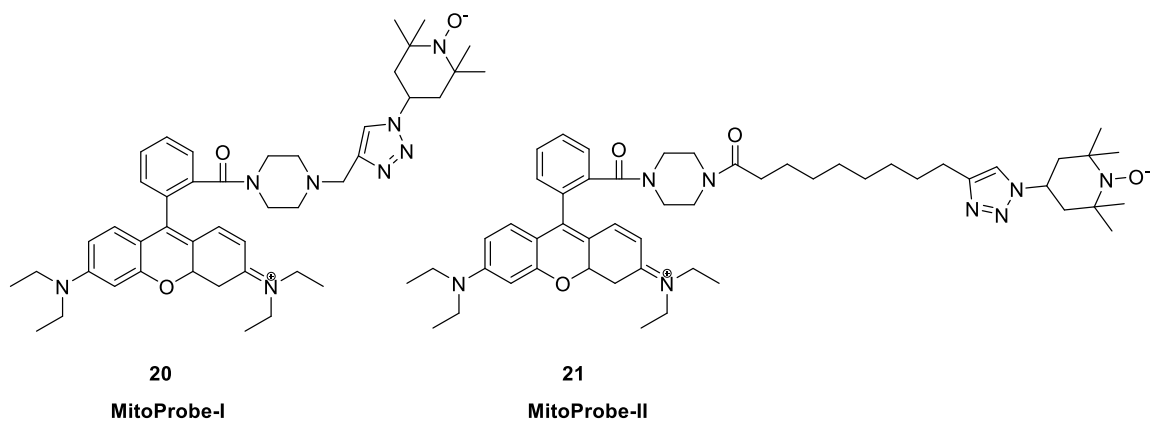
Důležitou aplikací rhodaminových barviv je stanovení pH. Detekční mechanismus této metody je založen na již zmíněné změně molekulární struktury rhodaminových barviv mezi spirocyklickou (nefluorescenční) formou a formou s otevřeným kruhem (fluorescenční). Například u derivátu Rhodaminu B **18** (Obr. 6) se v rozmezí pH 4,2 - 6,0 zvýší intenzita fluorescence až stonásobně.¹⁰

Dalším derivátem je β -CD, což je Rhodamin B modifikovaný β -cyklodextrinem **19** (Obr. 6) kterým se značka připojuje k makromolekulám v cílových lysozomech. Tento derivát navrhl Hasegawa a kolektiv.¹¹



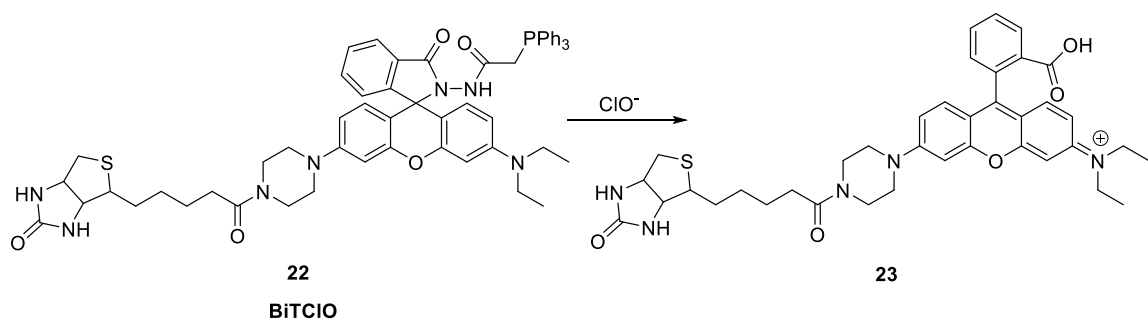
Obr. 6: Struktury derivátů Rhodaminu B

Fluorescenční analýza je velmi pohodlnou metodou pro sledování struktury, biologických pochodů a jejich změn v živém organismu. Přestože je dostupná široká škála fluorescenčních barviv využívaných v této oblasti, jejich využití je stále limitováno jejich vlastnostmi. Jako příklad může být uvedena detekce reaktivních radikálů (ROS) v mitochondriích. Použití typických mitochondriálních barviv jako např. Rhodamin 123 je zatěžováno tzv. fotobleachingem, kdy po osvětlení fluoroforu dochází k jeho rozkladu. Proto je vývoji nových fluorescenčních barviv věnována stále velká pozornost. Chang a kolektiv v nedávné době navrhli nová fluorescenční barviva MitoProbe-I **20** a MitoProbe-II **21** (Obr. 7) k detekci peroxidu vodíku v buňkách. Díky nim můžeme pozorovat oxidační stres v mitochondriích v reálném čase.¹²



Obr. 7: Struktura fluorescenčních značek MitoProbe I a II

Další rhodaminovou značkou specifickou pro nádory a mitochondrie, která snímá obsah chlornanových aniontů v reálném čase je konjugát biotinu, rhodaminu a triphenylfosfinu (BiTCIO) **22** (Obr. 8). Tato sonda je velmi selektivní a citlivá. Triphenylfosfinová část zamíří molekulu na mitochondrie, biotin slouží jako skupina specifická pro nádorové buňky. Pokud tato značka reaguje s chlornanovými anionty, dojde k nárůstu intenzity fluorescence.¹³

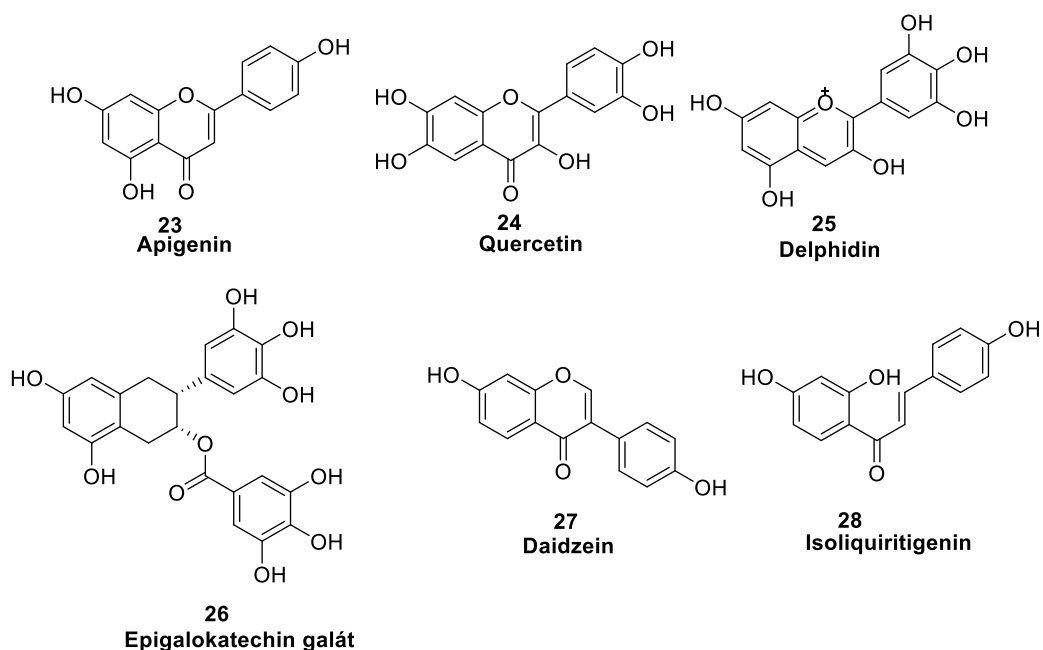


Obr. 8: Struktura fluorescenční značky BiTCIO

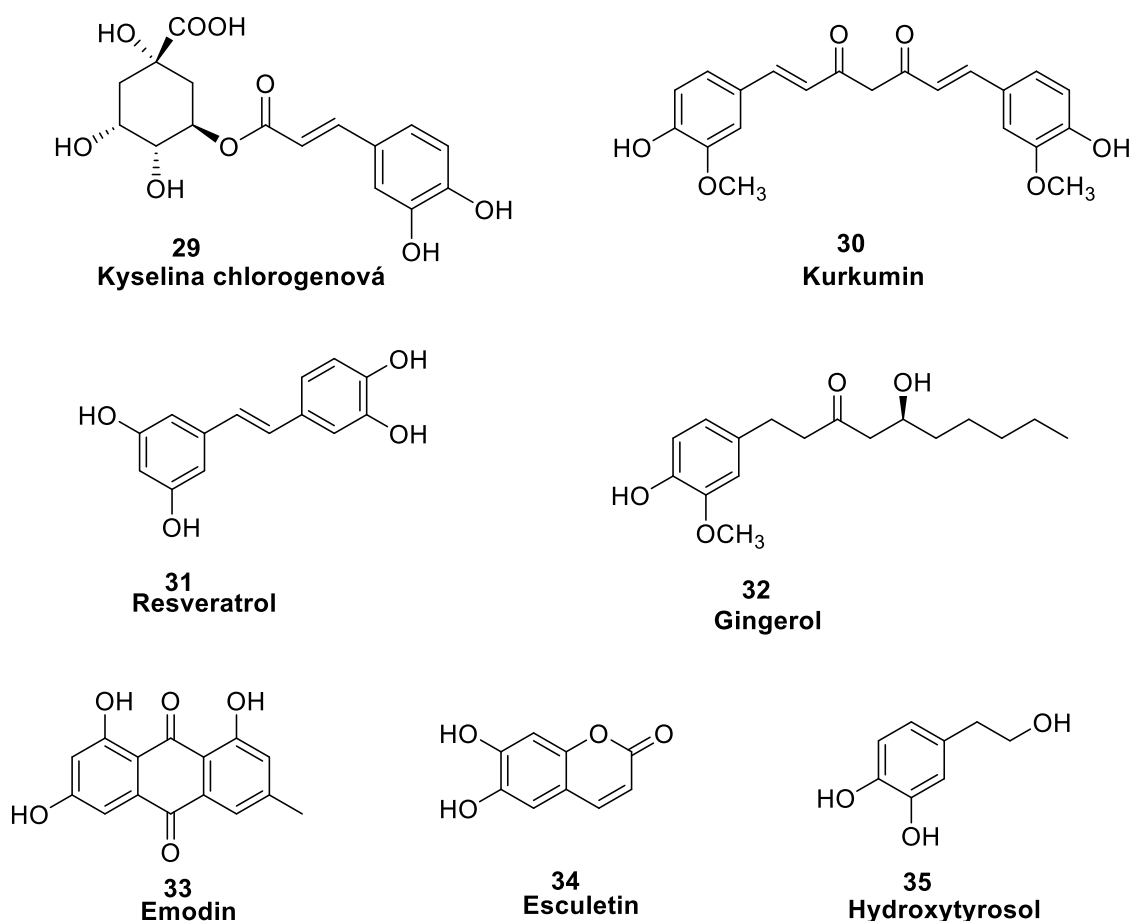
Rhodaminy jsou kvůli jejich intenzivní barvě a fluorescenci používány v nízkých koncentracích. Byla také zvažována jejich toxicita, ovšem bylo prokázáno, že pro člověka nejsou toxické.¹⁴

3.2 Polyfenoly

Polyfenoly jsou chemické sloučeniny vyskytující se v rostlinách. Jsou heterogenní skupinou sekundárních metabolitů syntetizované v metabolické cestě kyseliny šikimové a polyacetátů. Ve své struktuře mají jednu nebo více fenolických skupin, mohou existovat i jako velmi rozvětvené polymery. Rozdělují se do dvou hlavních skupin flavonoidů (Obr. 9) a non-flavonoidů (Obr. 10). Flavonoidy obsahují flavony (**24**), flavonoly (**25**), anthokyaniny (**26**), flavanoly (**27**), isoflavony (**28**) a chalkony (**29**). Do non-flavonoidů řadíme fenolové kyseliny (**30**), diarylheptanoidy (**31**), stilbeny (**32**), aryl alkanony (**33**), antrachinony (**34**), kumariny (**35**) a jednoduché fenoly (**36**). Dnes je známo přes 8000 polyfenolů. Vyskytují se v běžných potravinách (zelenině), dokonce i v koření a nápojích (zelený čaj, víno).



Obr. 9: Struktury zástupců jednotlivých tříd flavonoidů



Obr. 10: Struktury zástupců jednotlivých tříd non-flavonoidů

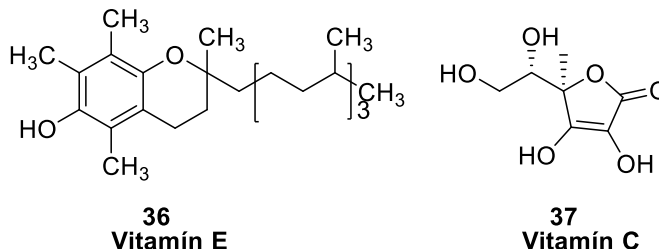
V několika posledních letech výrazně stoupl vědecký zájem o možném přínosu polyfenolů pro lidské zdraví. Jejich obsah v každodenní stravě by mohl mít vliv na léčbu nebo prevenci mnoha chorob, jako například rakovina, kardiovaskulární choroby, cukrovka nebo neurodegenerativní onemocnění (Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba). V zemích, kde lidé tradičně konzumují více zeleniny nebo ovoce, je nižší výskyt těchto nemocí. Polyfenoly hrají důležitou roli v omezování buněčného stárnutí způsobeného reaktivními kyslíkovými radikály (ROS).

Pojednává se také o jejich schopnosti modulovat signální dráhy zahrnuté v patofyziologii těchto nemocí. I přes mnoho kladných biologických účinků polyfenolů pořád není dostatek důkazů, jak působí na chronické nemoci. Spekuluje se o tom, že větší přínos pro zdraví má kombinace více fytochemikálií, než jen jeden polyfenol. Dále se musí vzít v úvahu další faktory při prevenci chronických onemocnění a to pohlaví, věk, genotyp, metabolismus a biologická dostupnost.¹⁵

Široký rozsah farmakologických aktivit je spojován s fenoly zahrnujícími antioxidační, analgetické a protizánětlivé účinky, také zlepšují endotelickou funkci a cytotoxické účinky proti bakteriím, houbám, prvokům a rakovinovým buňkám.

3.2.1 Příbuznost s vitamíny

Polyfenoly jsou velmi často nesprávně řazeny mezi vitamíny, díky podobným vlastnostem. Vitamíny jsou esenciální organické látky, někdy se označují jako mikronutrienty. Jejich potřebná množství jsou velmi malá. Nedostatek těchto esenciálních látek vyvolává takzvanou karenci, příznaky jsou rozličné podle doby trvání. Například vitamín E neboli tokoferol (**36**) (Obr. 11), působí jako antioxidant a chrání nenasycené mastné kyseliny a vitamín A před oxidací. Také zvyšuje podíl HDL cholesterolu a snižuje podíl LDL cholesterolu a chrání tak tělo před aterosklerózou. Vitamín C neboli kyselina askorbová (**37**) (Obr. 11) a jeho dostatečný příjem je důležitý pro správnou funkčnost mnoha metabolických dějů. Spolu s vitamínem E patří do skupiny antioxidačních živin, které chrání před kyslíkovými radikály.¹⁶



Obr. 11: Struktura vitamínu E a vitamínu C

3.2.2 Účinky polyfenolů na lidský organismus

Účinek polyfenolů na ochranu zdraví je připisován jejich anti-oxidačním vlastnostem. Nicméně za určitých podmínek (závislost na koncentraci a buněčném prostředí) mohou vykazovat také prooxidační účinky. Antioxidační ani prooxidační vlastnosti nebyly zatím jasně prokázány a vzhledem k nízkému obsahu polyfenolů v jídle a jejich omezené biodostupnosti je nepravděpodobné tyto vlastnosti dokázat *in-vivo* po konzumaci jídla a nápojů na ně bohaté.¹⁷

3.2.2.1 Polyfenoly jako antioxidanty

Polyfenoly jako antioxidanty jsou spojovány se snížením rizika chorob spojených s věkem. Flavonoidy mají velkou antioxidační kapacitu, jsou schopné vychytat široké rozmezí forem reaktivního kyslíku (ROS), dusíku (RNS) i chlóru, mohou také chelatovat kovové ionty, což snižuje pro-oxidační vlastnosti kovových iontů. Dále inhibují schopnost myeloperoxidázy oxidovat nízkodenzitní lipoproteiny (LDL) a anti-aterosklerotické účinky.¹⁷

Nádorové buňky mají zvýšenou hladinu ROS kvůli zvýšené rychlosti metabolismu. Zvýšené buněčné hladiny ROS jsou spojené s klíčovými aspekty procesu karcinogeneze včetně indukce genetické alterace, buněčné proliferace, rezistence k apoptóze, metastáze a angiogeneze. Navíc bylo ukázáno, že snížení hladiny ROS užitím antioxidačních enzymů, např. superoxid dismutázy (SOD), může zvrátit maligní fenotyp rakovinových buněk. ROS ve vysokých koncentracích indukují oxidativní poškození biomolekul, včetně DNA, lipidů a proteinů. V nižších koncentracích mohou působit jako druhý posel, což reguluje buněčné přežití a proliferaci.¹⁸

Účelem „antioxidační ochranné sítě“ není odstranit všechny reaktivní radikály, ale kontrolovat jejich hladinu, aby byly umožněny užitečné funkce při minimalizaci oxidativního poškození. „Vychytávače“ volných radikálů jsou jednou z nejdůležitějších tříd antioxidantů a staly se předmětem mnoha studií.

Kapacita antioxidantů závisí na mnoha faktorech, které je třeba vzít v úvahu. Jedním z těchto faktorů je biodostupnost. Antioxidant by měl být tedy absorbován, transportován, distribuován a správně udržován v tělních tekutinách, buňkách a tkáních.¹⁹

3.2.2.2 Polyfenoly jako prooxidanty

V posledních letech výrazně vzrostl zájem o prooxidanty jako o látky účinné v boji s rakovinou. Tato léčba je také známa jako „oxidační terapie“. Bylo zjištěno, že užívání léčiv a stravy, které generují peroxid vodíku, mohou úspěšně usmrtit nádorové buňky a přitom ovlivnit zdravé buňky jen zanedbatelně. Mezi tyto sloučeniny se řadí například

kurkumin (**30**) (Obr. 10), epigalokatechin galát (EGCG) (**25**) (Obr. 9) nebo resveratrol (**31**) (Obr. 10).^{20,21,22}

Protinádorová léčiva cílená na mitochondrie se nazývají mitokany a dělí se do několika tříd podle jejich způsobu působení. Jsou to například inhibitory hexokinás, thiolové redoxní inhibitory, deregulátory napětí dependentního aniontového kanálu, mitochondriální činidla zaměřující DNA atd.²³

Nádorové buňky jsou na zvýšenou hladinu peroxidu vodíku více citlivé než zdravé buňky. Navíc, tvorba ROS přispívá k protinádorové aktivitě několika běžných chemoterapeutik (například Paclitaxel, Cisplatin, Doxorubicin atd.). Zatím není zcela dokázáno, jakým způsobem dokážou prooxidanty usmrtit rakovinové buňky. Jedním z možných vysvětlení je fakt, že rakovinové buňky produkují mnohem více peroxidu vodíku než zdravé buňky.¹⁸

Při vysokém pH a přítomnosti redoxně aktivních přechodných kovů mohou fenolické sloučeniny působit jako prooxidanty. Prooxidační vlastnosti polyfenolů jsou založeny na formaci labilního redoxního komplexu nebo labilního arylového radikálu s kationtem kovu. Dále mohou být pro-oxidační účinky polyfenolů zprostředkovány redukcí přechodných kovů v redoxních cyklech nebo iniciací generace hydroxylových radikálů při Fentonových reakcích (za přítomnosti přechodných kovů např. Fe^{2+} , Cu^{2+} se peroxid vodíku redukuje na velmi reaktivní hydroxylový radikál).²⁴ Mobilizace endogenních přechodných kovů je zajímavou hypotézou k vysvětlení cytotoxicity polyfenolů zaměřenou na rakovinové buňky.¹⁸

Cytotoxická aktivita polyfenolů je spojena s indukcí apoptózy a zastavení buněčného cyklu různými cestami.

Kurkumin (**30**) (Obr. 10) indukuje apoptózu pomocí ROS u buněk rakoviny žaludku aktivací signální kaskády regulace apoptózy (ASK1).²⁵

Léčba buněk rakoviny tlustého střeva pomocí EGCG (**25**) (Obr. 9) vedla ke zvýšené produkci ROS doprovázenou silnou aktivací AMP-protein kinázy (AMPK) a inhibicí cyklooxygenázové exprese a redukce buněčné proliferace.²⁶

Další zástupce polyfenolů, resveratrol (**31**) (Obr. 10), podporuje apoptózu rakovinových buněk blokováním exprese antiapoptotických proteinů nebo inhibicí přenosu signálu přes fosfoinositol 3-kinasu (PI3K) nebo mitogenaktivovanou proteinkinasu (MAPK).²⁷

Indukce oxidativního stresu je atraktivní přístup k podpoře apoptózy a zastavení buněčného cyklu, což vede následně k indukci buněčné smrti v rakovinových buňkách. Polyfenoly mohou samy působit proti rakovině nebo se používají jako doplňující látky při klasické chemoterapii. Přestože řada důkazů naznačuje, že potraviny bohaté na polyfenoly mají ochranné účinky na lidský organismus před mnoha vážnými onemocněními, je stále třeba zabývat se biologickou dostupností a účinkem polyfenolových metabolitů, charakterizací struktury v závislosti na cílové buňce a klinickými důkazy biologického potenciálu.

3.2.3 Vlastnosti hydroxylových skupin

V předešlé podkapitole byl stručně popsán mechanismus prooxidačních vlastností fenolických sloučenin. V molekule flavonoidu je prooxidační aktivita přímoúměrná celkovému počtu hydroxylových skupin. Zatímco mono- a dihydroxy flavonoidy nevykazují detekovatelnou prooxidační aktivitu, sloučeniny s více hydroxylovými skupinami, zvláště v B-kruhu, výrazně zvyšují produkci hydroxylového radikálu.²⁸

Antioxidační vlastnosti polyfenolů jsou založeny na schopnosti hydroxylové skupiny darovat vodíkový proton molekule reaktivního volného radikálu, čímž vytvoří stabilnější a méně reaktivní molekulu. Vodíkový proton poskytnutý hydroxylovou skupinou může reagovat s kyslíkatými nebo dusíkatými radikály. Tím se poruší cyklus nového generování radikálů a dojde ke stabilizaci. Některé polyfenoly, jako například EGCG, mohou tvořit kovové cheláty. Díky tvorbě chelátů se zabrání katalýze volných radikálů kovem a Fentonovým reakcím. Oxidačnímu poškození lipidů, proteinů a nukleových kyselin je zabráněno v důsledku nižší akumulace volných radikálů v biologickém systému.

Vedle prooxidačních a antioxidačních vlastností je hydroxylová skupina také schopna tvořit vodíkové vazby s biologickými membránami a upravuje regulaci enzymů a receptorů vázaných na membránu. Například quercetin (**24**) (Obr. 9) byl identifikován

jako silný antagonistu receptoru, který reguluje expresi enzymu cytochromu P450, ten je schopen aktivovat prokarcinogeny.

Přítomnost hydrofobního benzoového kruhu a schopnost tvorby vodíkové vazby pomáhá polyfenolům interagovat s bílkovinami v buněčných membránách. Právě proto potlačují aktivitu enzymů jako isoformy cytochromu P450, lipoxygenázy a cyklooxygenázy a redukují intracelulární oxidační stres.²⁹

3.2.4 Funkce prevence rakoviny

Oxidační poškození DNA je centrální proces způsobující karcinogenezi. Rostlinné polyfenoly vykazují několik režimů funkcí prevence rakoviny.

Zprvé, působí jako antioxidanty a regulují oxidační stres způsobený karcinogeny. Zadruhé, polyfenoly inhibují aktivaci enzymů cytochromu P450, které vytvářejí elektrofilní metabolity z prokarcinogenů. Tyto reaktivní meziprodukty se mohou vázat na místa specifická pro DNA a tvoří DNA adukty, které aktivují onkogeny a potlačují nádorové supresorové geny, což vede k rakovině. Zatřetí, polyfenoly zvyšují aktivitu detoxikačních enzymů fáze II, které jsou schopny detoxikovat elektrofilní metabolity z enzymů fáze I a vyloučí je močí a žlučí.

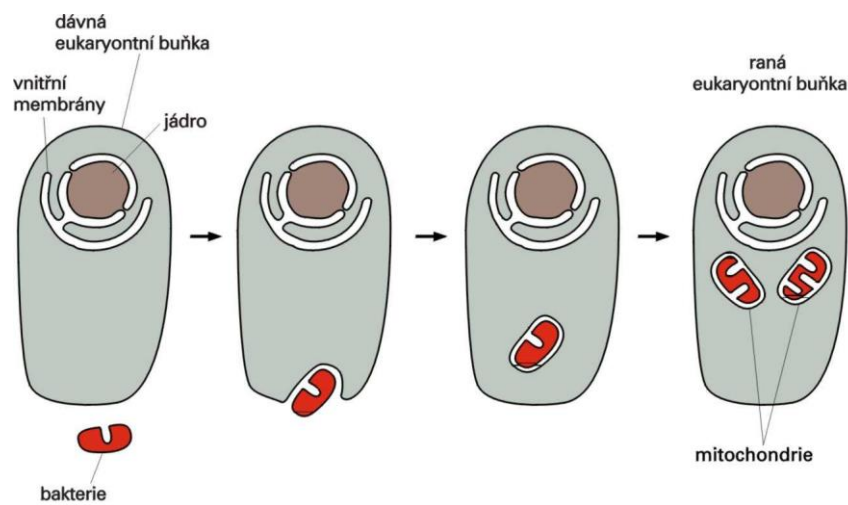
Dále mnoho polyfenolů zvyšuje aktivitu mnoha enzymatických i neenzymatických antioxidantů, které jsou schopny vyvážit hladinu ROS a RNS v buňkách.³⁰

Chemopreventivní účinky antioxidantních polyfenolů zahrnují jejich schopnost zabránit nebo redukovat oxidační stres způsobený buněčným poškozením díky vychytávání ROS, chelataci kovů nebo indukci exprese genů detoxikačních enzymů.³¹

Ačkoli mnoho preklinických studií ukázalo potenciální protinádorovou aktivitu antioxidantů, včetně selenu a vitamínu E a C, většina provedených klinických studií selhala v demonstrování jasného snížení prevence rizika rakoviny podáváním těchto antioxidantů.³²

3.3 Mitochondrie

Mitochondrie je organela eukaryotické buňky. Její vznik popisuje takzvaná endosymbiotická teorie (Obr. 12) kdy prokaryotická buňka pohltila aerobní bakterii. Tyto dva organismy se dostaly do společné symbiomy. Mitochondrie byla obalena do váčku z cytoplazmatické membrány. Dnešní mitochondrie mají tedy na svém povrchu dvojistou membránu, vnitřní původní a vnější od hostitelské buňky. Mitochondrie byla dříve soběstačnou organelou, její genom byl časem zredukován a přesunut do buněčného jádra. Nyní se mitochondrie označuje jako semiautonómni organela.³³



© Espero Publishing, s.r.o.

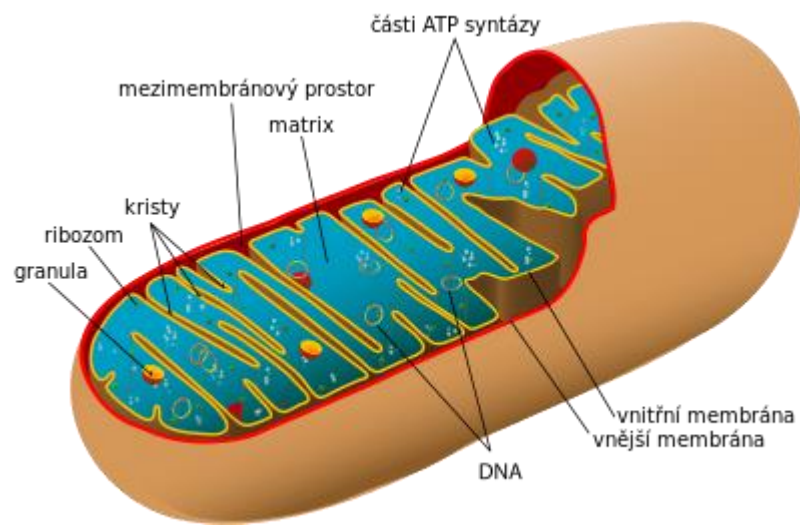
Obr. 12: Endosymbiotická teorie³⁴

Mitochondrie je multifunkční organela, která je především energetickým centrem buňky. Jednou z úloh těchto organel je metabolismus sacharidů, dále metabolismus lipidů a aminokyselin. Obsahuje také enzymy citrátového cyklu, β -oxidace mastných kyselin, ketogeneze a dýchacího řetězce. Za přítomnosti kyslíku zde dochází k uvolnění chemické energie ze štěpených látek. Získaná energie je dále vázána do energeticky bohaté sloučeniny ATP.

Mitochondrie jsou pro své bohaté vlastnosti v dnešní době uznávány jako jeden z nejdůležitějších a nejvýznamnějších cílů pro „drug design“ a syntézu nových léčiv. Mitochondriální defekty nebo dysfunkce jsou spojeny s nástupem několika nemocí, například rakoviny, kardiovaskulárních nebo neurologických onemocnění. Vývoj

terapie zaměřený na obnovu správné funkce mitochondrií je velmi významný a kriticky potřebný.

Současná teorie je založena na předpokladu, že zmírňování škodlivého působení reaktivních kyslíkových radikálů (reactive oxygen species, ROS) pomocí antioxidantů nebo činidel působících na mitochondrie (mitochondria-targeted antioxidants, MTAs) inhibují buněčnou smrt a zabraňují tak stárnutí a rozvoji chronických onemocnění.³⁵

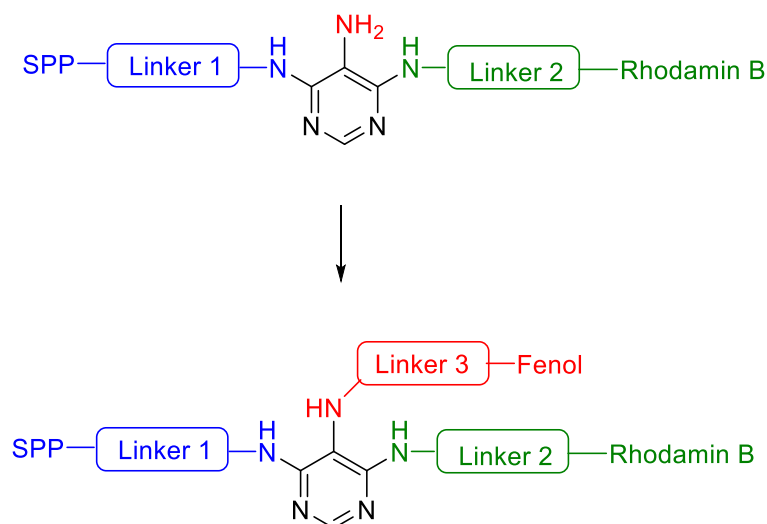


Obr. 13: Stavba mitochondrie³⁶

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Tato práce vychází z výsledků předchozího výzkumu Katedry organické chemie Univerzity Palackého v Olomouci.³⁷ Předmětem tohoto výzkumu byla syntéza fluorescenčních značek odvozených od Rhodaminu B s využitím syntézy na pevné fázi. Tyto sloučeniny prostupují buněčnou membránou, akumulují se v mitochondriích a mohou sloužit k jejich vizualizaci ve fluorescenční mikroskopii. Systém obsahuje centrální pyrimidinové jádro, které lze snadno modifikovat ve třech pozicích. Jedna z pozic slouží k zavedení peptidového linkeru pro zlepšení permeability látky přes membránu, popř. zacílení molekuly (linker 1). Druhá pozice nese diaminový linker, ke kterému je kovalentně vázáno fluorescenční barvivo (linker 2). V poslední pozici je nitroskupina, která jednak usnadňuje substituci dvou výše zmíněných pozic a také může být následně převedena na aminoskupinu a zavést do molekuly další prostor pro modifikaci.

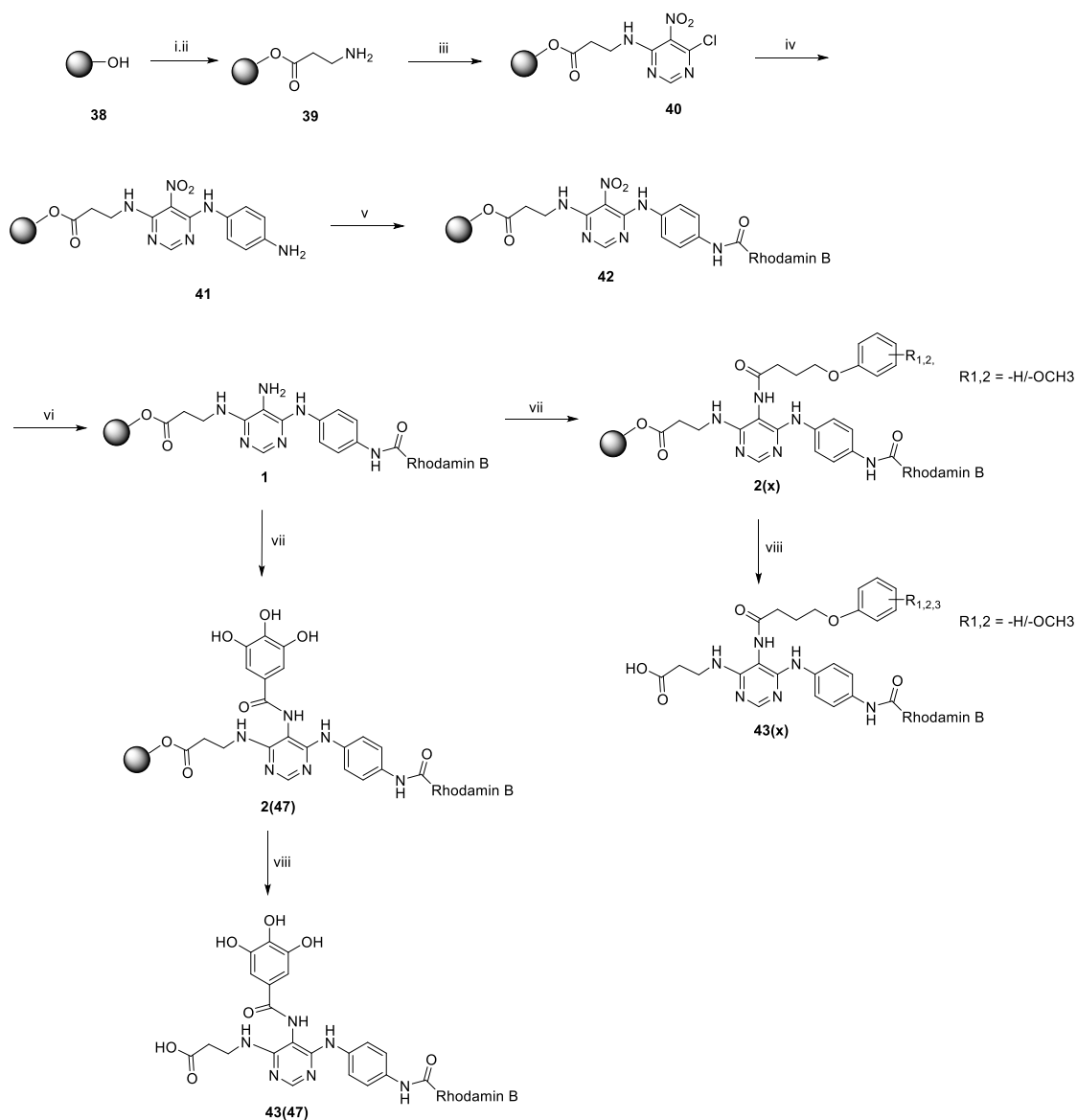
Jelikož jsou buněčným cílem těchto látek mitochondrie, rozhodli jsme se do třetí pozice zavést skupinu s potenciálním vlivem na jejich funkci. Mezi takové sloučeniny se řadí fenoly a polyfenoly. A právě zavedením fenolických sloučenin do poslední pozice se zabývá tato bakalářská práce (Obr. 14).



Obr. 14: Obecná struktura cílových molekul

V předešlé práci byla připravena série derivátů lišících se linkerem 1 a linkerem 2. Pro naše účely jsme vybrali jeden z derivátů s nejlepšími fluorescenčními a penetračními vlastnostmi nesoucí β -alanin jako linker 1 a *p*-fenyldiamin jako linker 2. Aminopyrimidinový prekurzor (Obr.14) byl vystavěn na polymerním nosiči podle popsané syntetické cesty. V prvním kroku byl na Wangovu pryskyřici **38** ukotven aminokyselinový linker 1. Na ten byl v dalším kroku navázán 4,6-dichloro-5-nitropyrimidin, který byl poté substituován *p*-fenyldiaminem. Následný coupling s Rhodaminem B poskytl sloučeninu **42**, která byla po redukcí nitroskupiny na aminoskupinu **1** acylována karboxylovými kyselinami s fenolickým prvkem v molekule za vzniku finálních derivátů **2(x)** respektive **2(47)**.

Reakční kroky bakalářské práce lze shrnout do reakčního schématu 2.

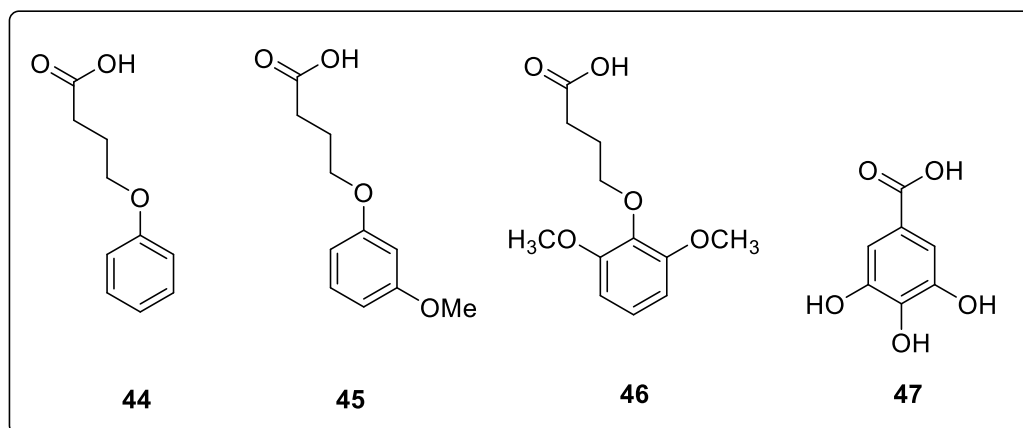


 = Wangova pryskyřice

- i) Fmoc- β -Ala, DMAP, HOBt, DIC, DMF/DCM (1:1; V/V), rt, 16 hodin
- ii) piperidin/DMF (1:1; V/V), rt, 30 minut
- iii) suchý DMF 4,6-dichloro-5-nitropyrimidin, DIEA, rt, 1,5 hodiny
- iv) *p*-fenylendiamin, 2,6-lutidin, DMF, rt, 16 hodin
- v) Rhodamin B, DMAP, DIC, HOBt, DMF/DCM (1:1; V/V), rt, 16 hodin
- vi) Na₂S₂O₄, K₂CO₃, ethylviologen dihydrid, H₂O/DCM (1:1; V/V), rt, 16 hodin
- vii) karboxylová kyselina, HOBt, DIC, DMAP, DMF/DCM (1:1; V/V), rt, 16 hodin
- viii) TFA/DCM (1:1; V/V), rt, 30 minut

Schéma 2: Obecné schéma syntézy

Přehled použitých karboxylových kyselin je na obr. 15.



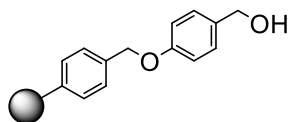
Obr. 15: Karboxylové kyseliny použité ve finálním kroku

4.1 Příprava pyrimidinového prekursoru na pevné fázi

Jak již bylo v úvodu této kapitoly zmíněno, první kroky syntetické cesty byly provedeny s využitím syntézy na pevné fázi. Syntéza na pevné fázi byla vytvořena profesorem Robertem Bruceem Merrifieldem v roce 1963 za účelem syntézy peptidů.³⁸ Jeho objev byl v roce 1984 oceněn Nobelovou cenou za chemii.

Principem syntézy na pevné fázi je použití nerozpustného polymeru s reaktivní funkční skupinou, na kterou lze kovalentní vazbou navázat vhodné reaktanty neboli výchozí látky. Pryskyřice reaguje s reakčním roztokem výchozí látky po dobu nutnou ke kvantitativnímu průběhu reakce. V době, kdy je reakce ukončena se nerozpustná pryskyřice s navázanou výchozí látkou odfiltruje a promyje vhodnými rozpouštědly, čímž dojde k odstranění zbytků reakčního roztoku. Připojení první výchozí látky k pryskyřici se nazývá imobilizace a je to také určující krok pro další průběh syntézy. Následuje navazování dalších reagentů až do ukončení reakční sekvence a vytvoření cílového produktu. Na konci syntézy je konečný produkt odštěpen z pryskyřice za specifických podmínek. Aby bylo možné odštěpit finální produkt bez poškození, je nutné vsunout mezi pryskyřici a první imobilizovanou látku tzv. linker. Linker má dvě funkční skupiny, z nichž jedna tvoří s polymerem pevnou vazbu, která je neštěpitelná. Druhá funkční skupina slouží k imobilizaci výchozí látky, vytvořená vazba je pevná, ale štěpitelná za daných reakčních podmínek.³⁹

Dostupné jsou pevné nosiče s různými linkery. Nejčastěji se používá tzv. Wangova hydroxymethylová pryskyřice (Obr. 16)⁴⁰, která je použita v experimentální části.

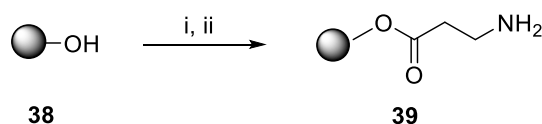


38

Obr. 16: Struktura Wangova hydroxymethylenového linkeru

Tento způsob syntézy se volí díky jednoduchosti a rychlosti provedení, které nevyžaduje izolaci meziproduktů. Jako reakční nádoby se používají polypropylenové stříkačky s porézní fritou uvnitř. Jedná se o známou metodu vývoje nových léčiv, která umožňuje rychlou přípravu série látek. Pomocí rychlé syntézy většího množství látek lze také velmi dobře studovat vztah mezi jejich strukturou a biologickou aktivitou. Výhoda syntézy na pevné fázi spočívá především ve snadnosti separace meziproduktů navázaných na pevný nosič, od rozpustných složek v reakční směsi jednoduchou filtrací a promytím pryskyřice. Díky jednoduchému a opakujícímu se procesu syntézy lze celý systém automatizovat.⁴¹

Prvním krokem syntézy byla imobilizace fmoc- β -alaninu na Wangovu pryskyřici prostřednictvím esterové vazby. K tvorbě esterové vazby mezi karboxylovou skupinou aminokyseliny a hydroxylovou skupinou Wangovy pryskyřice byla použita známá metoda hojně využívaná v syntéze peptidů. Principem této metody je vytvoření aktivovaného esteru výchozí kyseliny reakcí s diisopropylkarbodiimidem (DIC) a hydroxybenzotriazolem (HOBt). Ten pak snadno reaguje s aminem v případě tvorby amidické vazby či s alkoholem v případě tvorby esterové vazby. Následovala deprotektace chránící fmoc skupiny v 50% roztoku piperidinu v *N,N*-dimethylformamidu (DMF) za vzniku volné aminoskupiny (Schéma 3).

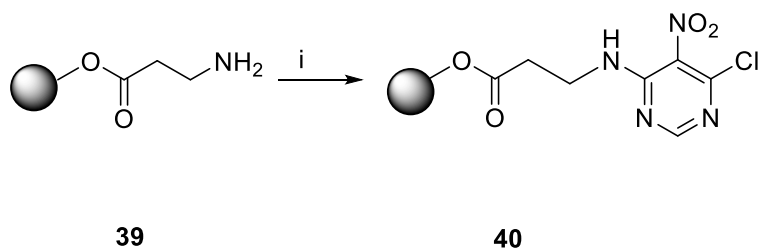


- i) Fmoc- β -Ala-OH, DMAP, HOBt, DIC, DMF/DCM (1:1; V/V), rt, 16 hodin
- ii) piperidin/DMF (1:1; V/V), rt, 30 minut

Schéma 3: Příprava linkeru s β -alaninem

Centrální pyrimidinový kruh byl do molekuly vnesen reakcí imobilizované aminokyseliny s 4,6-dichlor-5-nitropyrimidinem, kdy docházelo k přednostní substituci atomu chlóru v poloze 6. Tento stavební blok se volí z důvodu rozložení substituentů, které budou později využity k dalšímu větvení molekuly. Před samotnou reakcí musí být pryskyřice promyta suchým DMF, který se používá i jako rozpouštědlo v tomto reakčním kroku.

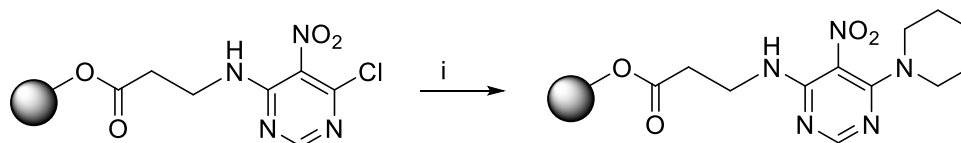
Reakce s 4,6-dichloro-5-nitropyrimidinem probíhala v suchém DMF za působení báze diisopropylethylaminu (DIEA) za laboratorní teploty (Schéma 4). Během 2 hodin byla výchozí látka zcela zreagovaná.



- i) 4,6-dichloro-5-nitropyrimidin, suchý DMF, rt, 2hodiny

Schéma 4: Příprava systému linker-pyrimidin

Analýza sloučeniny **40** byla znesnadněna přítomností reaktivního chlóru v poloze 4. Pro určení čistoty látky **40** bylo analytické množství pryskyřice podrobena reakci s piperidinem v DMF a produkt substituce, který už byl během analýzy stabilní, následně analyzován. (Schéma 5).



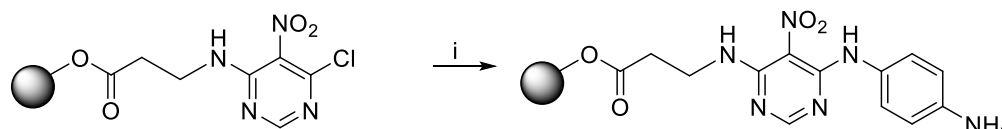
40

48

i) piperidin/DMF (1:1; V/V), rt, 1hodina

Schéma 5: Substitutece chlorderivátu piperidinem

Dalším krokem byla substitutece druhého atomu chlóru pyrimidinu **40** *p*-fenylendiaminem v prostředí báze 2,6-lutidinu. Reakce běžela přes noc (Schéma 6). Diaminový substituent byl do molekuly zaveden jako můstek pro ukotvení fluorescenčního barviva.



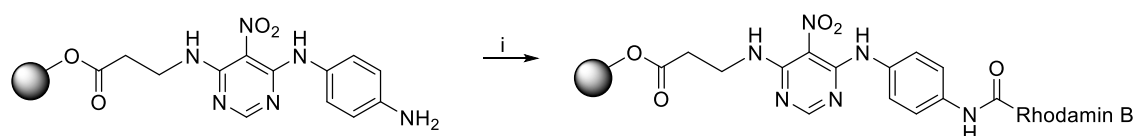
40

41

i) *p*-fenylendiamin, 2,6-lutidin, DMF, rt, 16 hodin

Schéma 6: Substitutece chlorderivátu *p*-fenylendiaminem

Za účelem navázání barviva na pryskyřici **41** byla využita opět HOBt technika. Rhodamin B byl navázán prostřednictvím amidické vazby (Schéma 7).



41

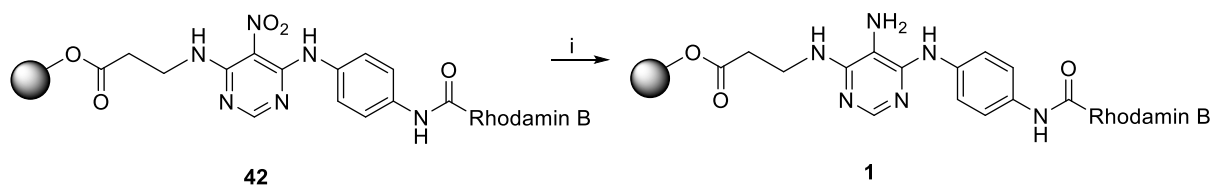
42

i) Rhodamin B, HOBt, DIC, DMF/DCM (1:1; V/V), rt, 16 hodin

Schéma 7: Acylace aminoderivátu Rhodaminem B

Pro zavedení karboxylových kyselin odvozených od polyfenolů bylo nutné zredukovat nitroskupinu látky **42**. Redukce byla provedena roztokem dithioničitanu sodného

($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) a uhličitanu draselného (K_2CO_3) v $\text{H}_2\text{O}/\text{DCM}$ (1:1; V/V). Jako fázový katalyzátor byl použit ethylviologen diiodid (Schéma 8).



i) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, K_2CO_3 , ethylviologen diiodid, $\text{H}_2\text{O}/\text{DCM}$ (1:1; V/V), rt, 16 hodin

Schéma 8: Redukce nitroskupiny pyrimidinu na aminoskupinu

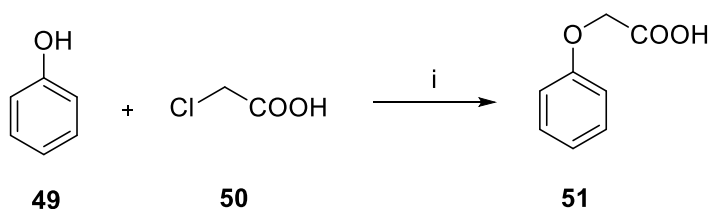
4.2 Modifikace fenolických sloučenin

Posledním krokem syntetické cesty bylo zavedení fenolického substituentu na pyrimidinový kruh. Za tímto účelem bylo nutné modifikovat jednu fenolickou hydroxyskupinu a opatřit ji linkerem nesoucím vhodnou funkční skupinu. Rozhodli jsme se zavést do molekuly karboxylovou funkci, která by pak s aminoskupinou pyrimidinového kruhu vytvořila amidickou vazbu. K přípravě těchto karboxylových kyselin byla použita roztoková syntéza. Při roztokové syntéze se dají poměrně snadno optimalizovat reakční podmínky, přidává se ekvivalentní množství reagentů, přičemž se dá aplikovat libovolný typ organické reakce. Naopak se roztoková syntéza špatně automatizuje. Analýzu meziproductů můžeme provádět ihned z reakční směsi. Rozpouštědla z reakční směsi se odstraňují tradičními separačními technikami. Vlivem izolace meziproductu můžeme částečně ztrácet jeho množství. Výhodou roztokové syntézy je volba syntetizovaného množství.

Vzhledem k tomu, že bylo nutné jednotlivé hydroxysloučeniny modifikovat za jiných podmínek, je modifikaci každé z nich věnována jedna podkapitola.

4.2.1 4-fenoxybutanová kyselina

První fenolickou sloučeninou, která měla být zavedena v posledním kroku do molekuly, byl jednoduchý fenol. Alkylace hydroxyskupiny 2-chloroctovou kyselinou byla první varianta, kterou jsme se pokusili zavést do molekuly fenolu karboxylovou skupinu (Schéma 9). Nejdříve jsme reakci provedli ve vodě za působení 2,5 ekvivalentů hydroxidu sodného jako báze. Principem této reakce je odtržení protonu z mírně kyselého fenolu za vzniku fenolátu, který reaguje substitučně s kyselinou 2-chloroctovou za vzniku kyseliny 2-fenoxyoctové. Reakce ale neproběhla s dostatečnou konverzí. Další báze, která byla testována, byl uhličitán draselný v ethanolu či butan-2-onu. Ani při této reakci jsme nedosáhli lepších výsledků. Reakční podmínky a výsledky reakcí jsou shrnuty v tab. 1.



- i) NaOH, H₂O, reflux, 16 hodin nebo K₂CO₃, H₂O, reflux, 16 hodin nebo K₂CO₃, ethanol, 80 °C, 16 hodin nebo NaOH, butan-2-on, 80 °C, 16 hodin

Schéma 9: Syntéza kyseliny 2-fenoxyoctové

Rozpouštědlo	Báze	Ekvivalent báze	Ekvivalent alkylačního činidla	Teplota	Reakční doba [hodiny]	Konverze* [%]
H ₂ O	NaOH	2,5	1	reflux	16	24
H ₂ O	K ₂ CO ₃	2,5	1	reflux	16	27
Ethanol	K ₂ CO ₃	4	1	reflux	16	30
Butan-2-on	NaOH	4	1	80°C	16	15

* Během reakce vznikalo zanedbatelné množství nečistot, proto jsou výsledky udávány jako konverze. Produkt = 100 % - výchozí látka

Tab. 1: Reakční podmínky alkylace fenolu kyselinou 2-chloroctovou

Po neúspěšném pokusu zavést do molekuly linker s karboxylem přes etherovou vazbu jsme přistoupili k další možnosti a to vazbě esterové, kterou jsme se pokusili získat acylací fenolu dikarboxylovými kyselinami. Reakce s kyselinou benzylmalonovou v suchém tetrahydrofuranu (THF) za působení báze dicyklohexylkarbodiimidu (DCC) neproběhla s dostatečnou konverzí na požadovaný produkt (Schéma 10). Lepší výsledek neposkytla ani reakce s kyselinou sukcinovou (Schéma 10). Vedle volných karboxylových kyselin jsme vyzkoušeli i reakce s jejich reaktivnějšími funkčními deriváty jako anhydrid (Schéma 11) nebo chlorid kyseliny sukcinové. Druhý zmíněný derivát jsme připravovali z kyseliny sukcinové a thionylchloridu (SOCl_2) *in situ* a následně nechali reagovat s fenolem za působení báze triethylaminu (Et_3N) (Schéma 12). Ani u této reakce jsme nedosáhli lepších výsledků. Reakční podmínky a výsledky reakcí jsou shrnuty v tab. 2.

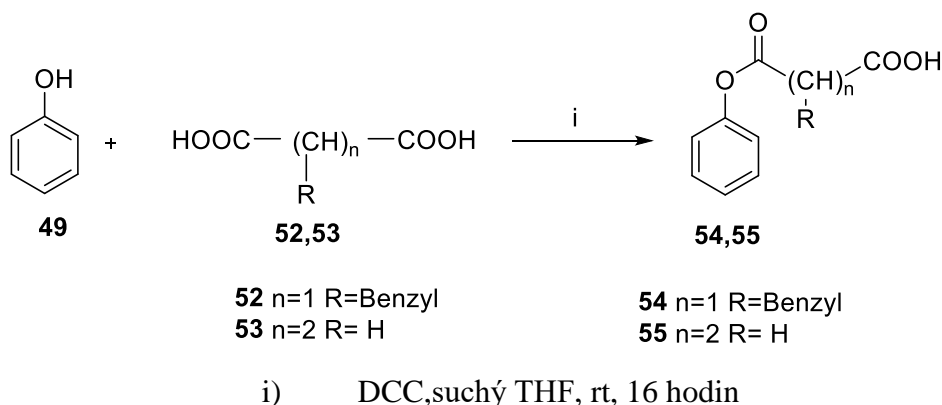


Schéma 10: Syntéza oxo-fenoxykarboxylových kyselin

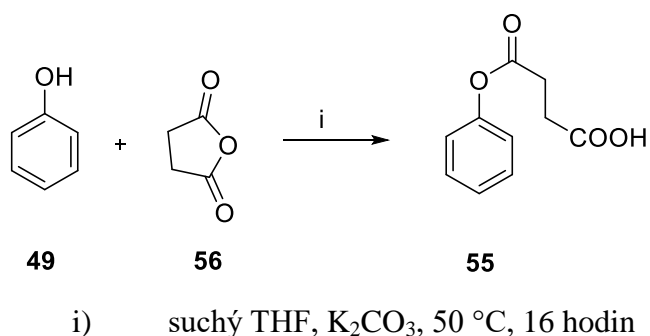
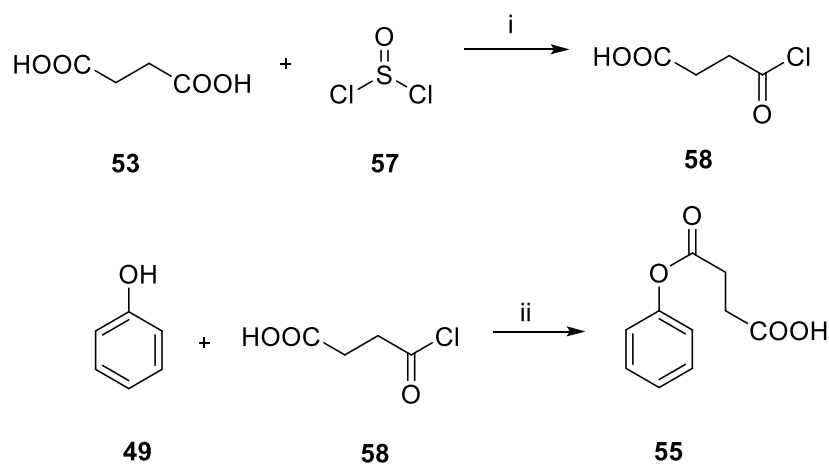


Schéma 11: Syntéza 4-oxo-4-fenoxybutanové kyseliny



- i) SOCl_2 , Et_3N , suchý THF, rt, 1 hodina
ii) fenol, Et_3N , suchý THF, rt, 16 hodin

Schéma 12: Syntéza 4-oxo-fenoxybutanové kyseliny z chloridu kyseliny sukcinové

Rozpouštědlo	Báze	Ekvivalent báze	Acylační činidlo	Ekvivalent acylačního činidla	Teplota	Reakční doba [hodiny]	Konverze* [%]
Suchý THF	DCC	1	Kyselina benzylmalonová	1	rt	16	23
Suchý THF	DCC	1	Kyselina sukcinová	1	rt	16	29
Suchý THF	NaH	1	Anhydrid kyseliny sukcinové	1	50°C	16	22
Suchý THF	Et_3N	1	Chlorid kyseliny sukcinové	1	rt	16	45

* Během reakce vznikalo zanedbatelné množství nečistot, proto jsou výsledky udávány jako konverze. Produkt = 100 % - výchozí látka

Tab. 2: Reakční podmínky pro syntézu oxo-fenoxykarboxylových kyselin

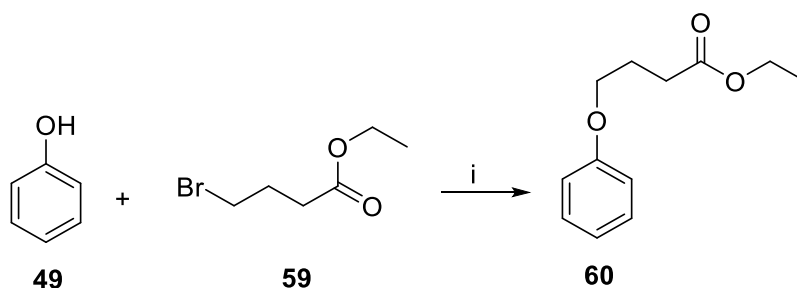
Vrátili jsme se tedy zpět k alkylační metodě. Protože předchozí alkylaci 2-chloroocetovou kyselinou pravděpodobně bránila přítomnost karboxylové skupiny, nahradili jsme ji sloučeninou, kde je karboxylová skupina ochráněna. Reakce s ethyl-4-bromobutyrate měžela podstatně lépe. Zkoušeli jsme různá rozpouštědla s různými poměry báze a alkylačního činidla (Tab. 3). Nejlepší výsledek poskytla reakce v DMF s

2,5 ekvivalenty uhličitanu draselného a jodidem draselným jako katalyzátorem. Průběh této reakce je znázorněn ve schématu 13.

Rozpouštědlo	Báze	Ekvivalent báze	Ekvivalent alkylačního činidla	Teplota	Reakční doba [hodiny]	Konverze* [%]
Aceton	K ₂ CO ₃	2,5	1	reflux	16	57
Aceton	K ₂ CO ₃ + KI	2,5	1	reflux	16	51
MeCN	K ₂ CO ₃	1,2	1	reflux	16	39
MeCN	K ₂ CO ₃	2	1	reflux	16	63
MeCN	K ₂ CO ₃	2,5	1	reflux	16	69
MeCN	K ₂ CO ₃ + KI	2,5	1	reflux	16	75
DMF	K ₂ CO ₃	1,2	1	70 °C	16	45
DMF	K ₂ CO ₃	2	1	70 °C	16	80
DMF	K ₂ CO ₃ + KI	2,5	1	70 °C	16	98

* Během reakce vznikalo zanedbatelné množství nečistot, proto jsou výsledky udávány jako konverze. Produkt = 100 % - výchozí látka

Tab. 3: Reakční podmínky pro syntézu ethylesteru 4-fenoxybutanové kyseliny

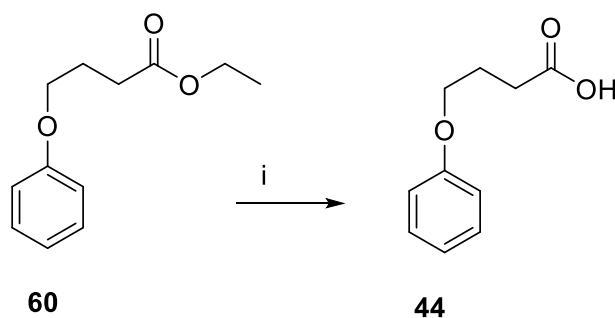


i) K₂CO₃, KI, DMF, 70 °C, 16 hodin

Schéma 13: Syntéza ethylesteru 4-fenoxybutanové kyseliny

Následovala hydrolyza produktu **60**, kdy se z esteru vytvoří karboxylová kyselina. Hydrolyza probíhá za kyselých nebo bazických podmínek. Kyselá hydrolyza 1M kyselinou chlorovodíkovou byla testována v prostředí methanol:H₂O (1:1; V/V) a v prostředí THF:H₂O (1:1; V/V). Hydrolyza bohužel neběžela dle představ, dokonce i za zvýšené teploty (50°C) byla v reakční směsi detekována pouze výchozí látka.

Vyzkoušeli jsme tedy bazickou hydrolyzu v 1M roztoku hydroxidu sodného. Reakce byla testována ve směsi rozpouštědel methanol:H₂O (1:1; V/V) a THF:H₂O (1:1; V/V). Ve druhém případě byla konverze rychlejší. 4-Fenoxybutanová kyselina byla tedy získána hydrolyzou 1M roztokem NaOH ve směsi THF:H₂O (1:1; V/V) a následnou krystalizací z vody (Schéma 14).

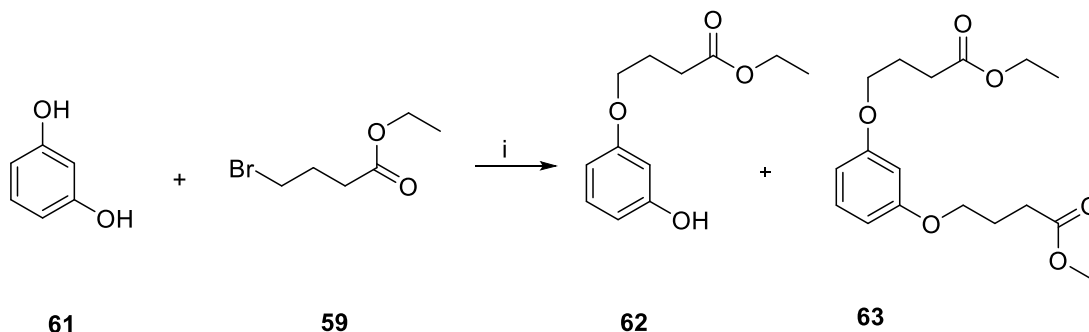


i) 1M roztok NaOH v THF: H₂O (1:1; V/V), rt, 1 hodina

Schéma 14: Hydrolyza ethylesteru 4-fenoxybutanové kyseliny na 4-fenoxybutanovou kyselinu

4.2.2 4-(3-methoxyfenoxy)butanová kyselina

Původním záměrem bylo získat fenoxybutanovou kyselinu odvozenou od *m*-resorcinolu. Protože *m*-resorcinol obsahuje dvě hydroxyskupiny, které mohou podlehnout alkylationi, očekávali jsme, že reakce poskytne směs produktů. Podle předpokladu reakce s bromobutyrátem v přítomnosti K₂CO₃ vznikaly směsi mono- a di-alkylovaného derivátu (Schéma 15).



i) K₂CO₃, DMF, 70 °C, 16 hodin

Schéma 15: Alkylatione *m*-resorcinolu

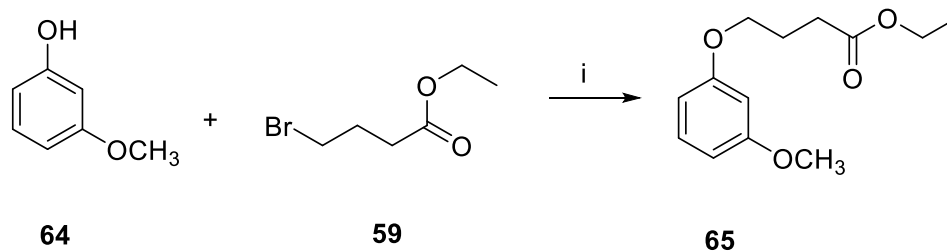
Proto jsme se rozhodli využít k syntéze této kyseliny *m*-methoxyfenol, který má volnou pouze jednu hydroxyskupinu a po alkylationi bromobutyrátem methylovou skupinu odštěpit. Jelikož alkylationi v tomto případě neprobíhala za stejných podmínek jako u fenolu kvantitativně a v reakční směsi byla pořád přítomna výchozí látka, byly reakční podmínky optimalizovány různými poměry báze a alkylationi činidla (Tab. 4).

Rozpouštědlo	Báze	Ekvivalent báze	Ekvivalent alkylationi činidla	Teplota	Reakční doba [hodiny]	Konverze* [%]
DMF	K ₂ CO ₃	2,5	2	70 °C	16	63
DMF	K ₂ CO ₃ + KI	2,5	2	70 °C	16	65
Aceton	NaOH	1	2	reflux	16	54
Aceton	K ₂ CO ₃	1	2	reflux	16	59
DMF	K ₂ CO ₃ + KI	3	2,6	70 °C	16	57
DMF	K ₂ CO ₃ + KI	3	3	70 °C	16	60
Suchý aceton	K ₂ CO ₃	2	2	reflux	16	51
Suchý aceton	K ₂ CO ₃	4	4	reflux	16	79
Suchý DMF	K ₂ CO ₃	2	2	100 °C	16	45
Suchý DMF	K ₂ CO ₃	4	4	100 °C	16	94
Suchý DMF	K ₂ CO ₃	4	4	70 °C, N ₂	16	100

* Během reakce vznikalo zanedbatelné množství nečistot, proto jsou výsledky udávány jako konverze. Produkt = 100 % - výchozí látka

Tab. 4: Reakční podmínky pro syntézu ethylesteru 4-(3-methoxyfenoxy)butanové kyseliny

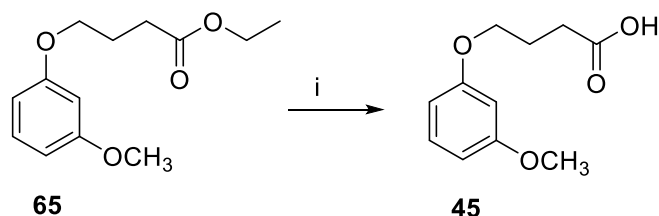
Nakonec nejlépe běžela reakce za užití 4 ekvivalentů K₂CO₃ a 4 ekvivalentů alkylationi činidla v suchém DMF. Po extrakci do ethylacetátu a kolonové chromatografii byl získán ethylester 4-(3-methoxyfenoxy)butanové kyseliny (Schéma 16). Přestože čistota látky byla dle U-HPLC analýzy poměrně vysoká (93 %), NMR analýza odhalila přítomnost nečistot (20 %). Pokusili jsme se čistotu produktu zvýšit krystalizací. Vyzkoušeno bylo několik rozpouštědel a jejich směsí (dichlormethan, hexan, methanol, cyklohexan), ani v jednom případě ovšem nebyl získán krystalický produkt. Do dalšího syntetického kroku jsme tedy pokračovali s mírně znečištěnou výchozí látkou.



i) $\text{K}_2\text{CO}_3, \text{DMF}, 70\text{ }^\circ\text{C}, 16\text{ hodin}$

Schéma 16: Syntéza ethylesteru 4-(3-methoxyfenoxy)butanové kyseliny

Ethylester 4-(3-methoxyfenoxy)butanové kyseliny **65** byl následně bazicky hydrolyzován na kyselinu 4-(3-methoxyfenoxy)butanovou **45**. Hydrolyza ale neběžela jako u předchozí látky za použití 1M roztoku hydroxidu sodného THF:H₂O (1:1; V/V) a bylo nutné najít jiné podmínky. Úspěšný byl pokus s 1M roztokem trimethylsilanolátu draselného (TMSOK) v THF (Schéma 17). Produkt byl poté okyselen a vyextrahován do ethylacetátu. Odparek byl ještě několikrát rozpuštěn v toluenu a odpařen pro odstranění zbytku silanolu. Produkt byl následně vykrystalizován z methanolu a vody.

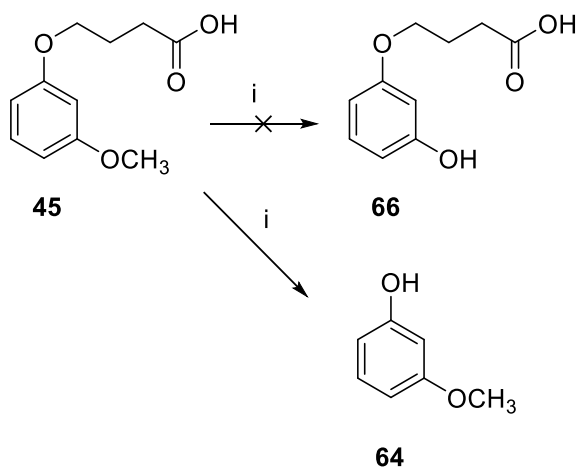


i) THF, TMSOK, rt, 1 hodina

Schéma 17: Hydrolyza ethylesteru 4-(3-methoxyfenoxy)butanové kyseliny na kyselinu 4-(3-methoxyfenoxy)butanovou

Na začátku této podkapitoly bylo zmíněno, že původní záměr bylo získat hydroxyderivát fenoxybutanové kyseliny. Pokusili jsme se tedy podrobit 4-(3-methoxyfenoxy)butanovou kyselinu demethylaci s chloridem hlinitým (AlCl₃) (Schéma 18). Bohužel došlo k odštěpení alkylového řetězce a získali jsme tak 3-methoxyfenol, který byl výchozí látkou pro přípravu zmíněné kyseliny. Vzhledem k tomu, že se stejně jako u demethylace jedná o štěpení etherové vazby, nebyl to překvapivý výsledek. Nicméně podobný případ demethylace vedle další alkoxykupiny je popsán

v literatuře.⁴²Pro nedostatek času jsme se hledání podmínek dále nevěnovali a ve finálním acylačním kroku použili methylderivát **45**.

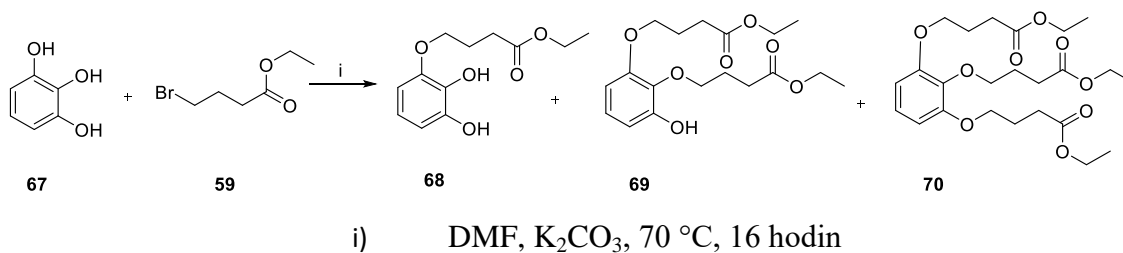


i) AlCl_3 , suchý DCM, rt, 1 hodina

Schéma 18: Demethylace 4-(3-methoxyphenoxy)butanové kyseliny

4.2.3 4-(2,6-dimethoxyphenoxy)butanová kyselina

Další fenolickou sloučeninou, kterou jsme chtěli navázat na fluorescenční prekurzor, byl pyrogallol **67**. Stejně jako u resorcinolu lze očekávat, že alkylation podlehnou všechny hydroxyskupiny. Podle předpokladu reakcí s bromobutyrátem v přítomnosti K_2CO_3 vznikaly směsi mono-, di- a trialkylovaných derivátů pyrogallolu (Schéma 19). Pokusili jsme se selektivitu reakce zvýšit a vyzkoušeli různé poměry ekvivalentů báze a bromobutyrátu. Všechny testované podmínky poskytly směsi. Reakční podmínky a výsledky reakcí jsou shrnuty v tab. 5.



i) DMF , K_2CO_3 , $70\text{ }^\circ\text{C}$, 16 hodin

Schéma 19: Alkylation pyrogallolu

Rozpouštědlo	Báze	Ekvivalent báze	Ekvivalent alkylačního činidla	Teplot a	Reakční doba [hodiny]	Konverze* [%]
DMF	K ₂ CO ₃	3	1	70 °C	16	44
DMF	K ₂ CO ₃	1	1	70 °C	3	53
DMF	K ₂ CO ₃	2	1	70 °C	1	62
DMF	K ₂ CO ₃	1	0,7	70 °C	3	57
DMF	K ₂ CO ₃	1	0,5	70 °C	1	60

* Během reakce vznikalo zanedbatelné množství nečistot, proto jsou výsledky udávány jako konverze. Produkt = 100 % - výchozí látka

Tab. 5: Reakční podmínky alkylace pyrogallolu ethyl-4 bromobutyrate

Bylo tedy nutné dvě hydroxyskupiny pyrogallolu ochránit. Jelikož v předchozím případě jsme využili derivátu, který měl pokrytou jednu hydroxyskupinu methylem, zvolili jsme stejný přístup i u pyrogallolu. Dimethylovaný derivát jsme ale neměli k dispozici a museli ho připravit. Pyrogallol byl nejdříve převeden na trimethoxybenzen. Methylace pyrogallolu methyljodidem (CH₃I) v suchém DMF za přítomnosti K₂CO₃ poskytla po dvou hodinách směs mono- a di-derivátu. Stejný výsledek byl pozorován i po prodloužení reakční doby přes noc.⁴³ Průběh reakce se nezměnil ani po přidání dalších 2 ekvivalentů báze a metylačního činidla.

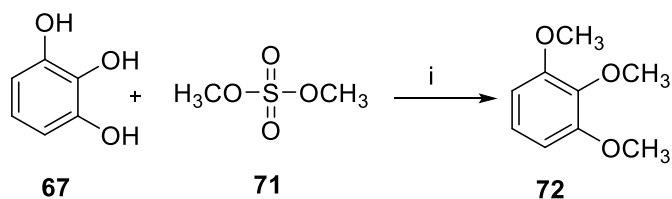
Další možnou variantou bylo použití dimethylsulfátu ((CH₃)₂SO₄). Bylo vyzkoušeno několik reakcí s různými poměry ekvivalentů báze a alkylačního činidla i různá rozpouštědla (Tab. 6).

Rozpouštědlo	Báze	Ekvivalent báze	Alkylační činidlo	Ekvivalent alkylačního činidla	Teplota	Reakční doba [hodiny]	Konverze* [%]
Suchý DMF	K ₂ CO ₃	1	CH ₃ I	2	rt	2	3
Suchý DMF	K ₂ CO ₃	1	CH ₃ I	2	rt	16	16
Suchý DMF	K ₂ CO ₃	3	CH ₃ I	4	rt	16	87
H ₂ O	NaOH	1	(CH ₃) ₂ SO ₄	2	80 °C	16	20
Aceton	NaOH	1	(CH ₃) ₂ SO ₄	2	rt	16	70
Aceton:H ₂ O	NaOH	3	(CH ₃) ₂ SO ₄	1	65 °C	16	46
Aceton:H ₂ O	K ₂ CO ₃	3	(CH ₃) ₂ SO ₄	2	65 °C	16	90
Aceton	NaOH	3	(CH ₃) ₂ SO ₄	1	rt	16	17
Aceton	K ₂ CO ₃	1	(CH ₃) ₂ SO ₄	3	reflux	16	11
Aceton	K ₂ CO ₃	3	(CH ₃) ₂ SO ₄	3	reflux	16	36
Aceton	K ₂ CO ₃	3	(CH ₃) ₂ SO ₄	4	reflux	16	98
Aceton	K ₂ CO ₃	3	(CH ₃) ₂ SO ₄	4	rt	16	80

* Během reakce vznikalo zanedbatelné množství nečistot, proto jsou výsledky udávány jako konverze. Produkt = 100 % - výchozí látka

Tab. 6: Reakční podmínky pro methylaci pyrogallolu

Nejlepšího výsledku bylo dosaženo reakcí pyrogallolu v acetonu se 3 ekvivalenty K₂CO₃ pod inertní atmosférou a následným přidáním 4 ekvivalentů dimethylsulfátu a refluxem reakční směsi (Schéma 20).



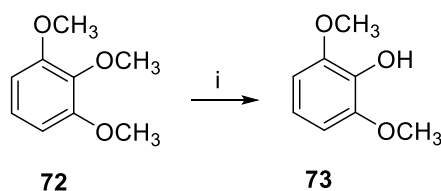
i) K₂CO₃, aceton, reflux, 16 hodin

Schéma 20: Methylace pyrogallolu

Trimethoxybenzen **72** byl následně podroben parciální demethylaci na dimethoxyfenol **73**. Jednou z reakcí, která byla aplikována na demethylaci, byla reakce s užitím

3 ekvivalentů chloridu litného (LiCl) v DMF.⁴⁴ Tato reakce byla bohužel neúspěšná a v reakční směsi byla detekována pouze výchozí látka.

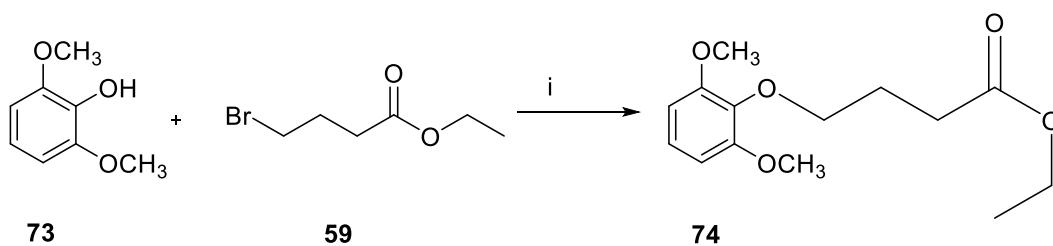
V dalším pokusu jsme nechali na trimethoxybenzen působit 3 ekvivalenty AlCl_3 v suchém DCM.⁴⁵ V reakční směsi ale i po jednom dnu zůstávala výchozí látka. Po přidavku dalšího ekvivalentu AlCl_3 byla výchozí látka zreagována za 3 hodiny (Schéma 21). Po extrakci a sloupcové chromatografii byl získán produkt **73**.



i) AlCl_3 , suchý DCM, rt, 3 hodiny

Schéma 21: Parciální demethylace trimethoxybenzenu na dimethoxyfenol

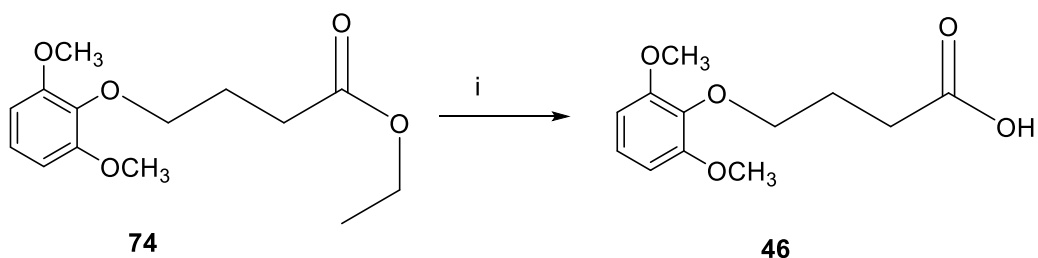
Získaný dimethoxyfenol **73** byl stejně jako v předchozím případě naalkylován ethyl-4-bromobutyrátem v DMF za přítomnosti uhličitanu draselného (Schéma 22). Po zpracování byl získán produkt **74**, který byl následně podroben hydrolyze.



i) K_2CO_3 , DMF, 70 °C, 16 hodin

Schéma 22: Syntéza ethylesteru 4-(2,6-dimethoxyfenoxy)butanové kyseliny

K tomuto účelu se opět využila hydrolyza 1M TMSOK v THF. Po extrakci a kolonové chromatografii byla získána karboxylová kyselina **46**. (Schéma 23).

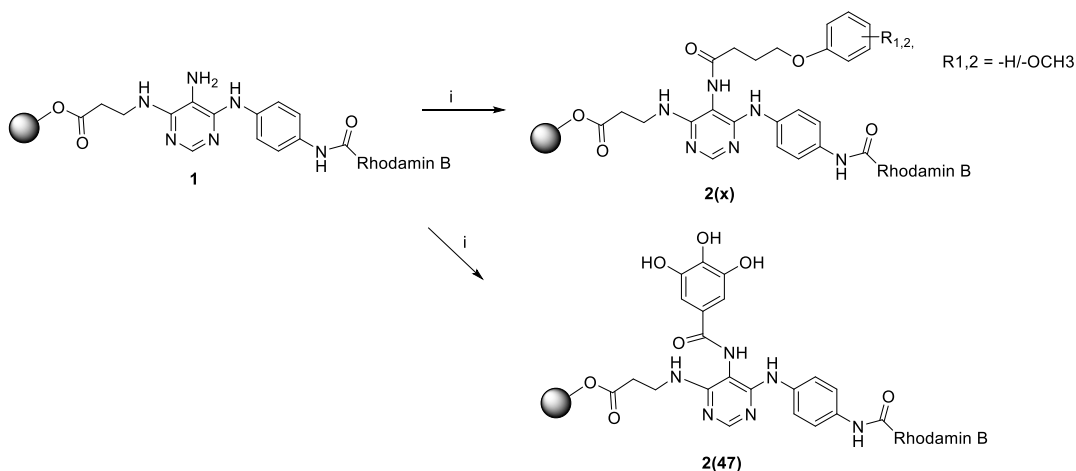


i) THF, TMSOK, rt, 3 hodiny

Schéma 23: Hydrolýza ethylesteru 4-(2,6-dimethoxyfenoxy)butanové kyseliny na kyselinu 4-(2,6-dimethoxyfenoxy)butanovou

4.3 Finální acylace pyrimidinových prekurzorů

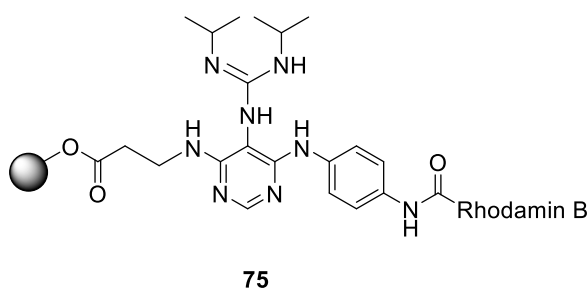
Získané amino deriváty **1** byly v posledním kroku podrobeny reakci s karboxylovými kyselinami. Jelikož se jednalo o tvorbu amidické vazby, byl v tomto kroku opět využit HOBt coupling (Schéma 24). Přestože reakce aktivovaného esteru s aminem probíhá ve většině případů bez přítomnosti další báze (jen DIC), z předchozích nepublikovaných výsledků vyplynulo, že tento aminopyrimidinový derivát reaguje pouze v přítomnosti *N,N*-dimethylaminopyridinu (DMAP).



i) karboxylová kyselina, HOBt, DIC, DMAP, DMF/DCM (1:1; V/V), rt, 16 hodin

Schéma 24: Příprava cílových látek

Tyto podmínky se však osvědčily pouze pro deriváty **2(44)** a **2(45)**, které vznikaly v surové čistotě 93% respektive 95%. Kyselina 4-(2,6-dimethoxyfenoxy)butanová poskytla za těchto podmínek produkt o MW = 839, kdy mohlo přednostně dojít ke vzniku aduktu s DIC (Obr. 17). Protože byl ale produkt vyizolován ve velmi malém výtěžku, nepodařilo se nám doposud strukturu produktu potvrdit. Charakterizaci tohoto produktu bude dále věnována pozornost.



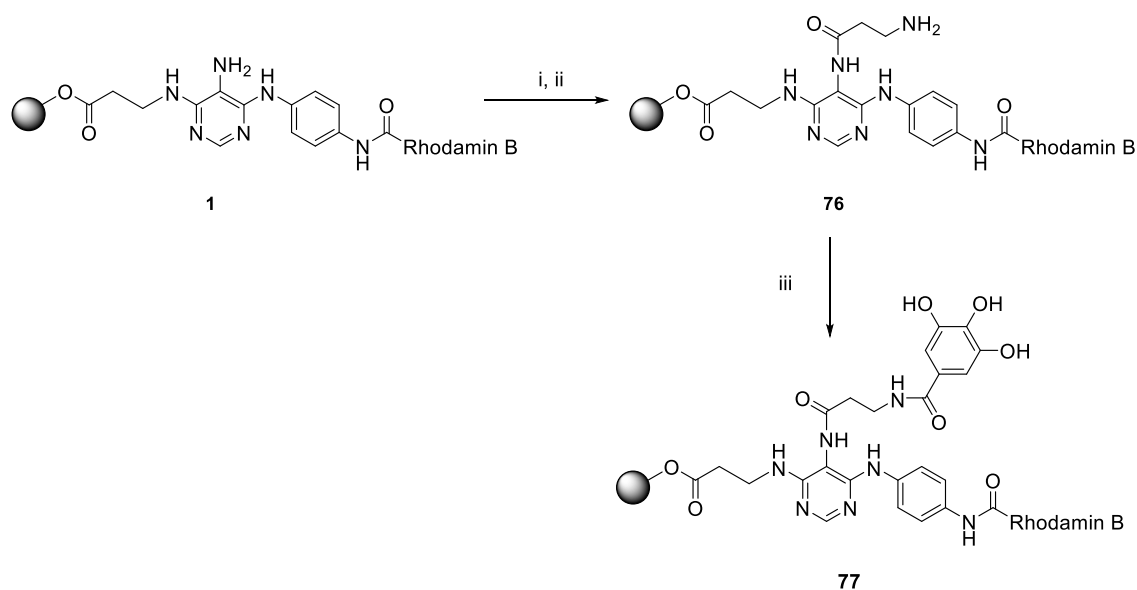
Obr. 17: Vedlejší produkt reakce kyseliny 4-(2,6-dimethoxyfenoxy)butanové

Kyselina gallová **47** také nereagovala za podmínek HOBt acylace a po ukončení reakce jsme získali pouze výchozí látku. Proto byla do systému **1** zavedena ještě jedna aminokyselina – Fmoc- β -Ala-OH za vzniku látky **76** (Schéma 25). Acylací pryskyřice **1** následovanou ochráněním fmoc skupiny jsme do molekuly zanesli novou reaktivnější aminoskupinu, která byla dále od pyrimidinového jádra a celého systému, tudíž lépe přístupná pro navázání další molekuly. Navíc se jednalo o alifatickou aminoskupinu, která je nukleofilnější a tedy reaktivnější při acylaci než původní aromatická aminoskupina. Nicméně ani pryskyřice **76** s kyselinou gallovou za podmínek HOBt acylace nereagovala. Protože existuje celá řada couplingových činidel, rozhodli jsme se vyzkoušet, jestli některé z nich neposkytnou požadovaný produkt **77**. K dispozici jsme měli 1-[bis(dimethylamino)methylen]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]pyridinium 3-oxid hexafluorofosfát (HATU), 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid (EDC), benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium hexafluorofosfát (PyBOP) a 1-[(1-(cyano-2-ethoxy-2-oxoethylideneaminoxy)-dimethylamino-morpholino)]uranium hexafluorofosfát (COMU).^{46,47} Reakční podmínky jsou shrnuty v tab. 7.

Rozpouštědlo	Báze	Ekvivalent báze	Acylační činidlo	Ekvivalent acylačního činidla	U-HPLC čistota [%]
DMF	DIEA	1	PyBOP	1	76
DMF	DIEA	2,5	EDC	1,2	46
DMF	DIEA	3,5	HATU	3,5	44
DMF	DIEA	6	COMU	3	30

Tab. 7: Reakční podmínky acylace pryskyřice kyselinou galovou

Nejlepší výsledek tedy poskytla reakce s PyBoP. Bohužel při pokusu převést reakci do preparativního množství bylo detekováno jen malé procento produktu v bohaté směsi vedlejších látek (Schéma 25).



- i) Fmoc-β-Ala-OH, HOBt, DMAP, DIC, DMF/DCM (1:1; V/V), rt, 16 hodin
- ii) piperidin/DMF (1:1; V/V), rt, 30 minut
- iii) kyselina gallová, PyBOB, DIEA, DMF, rt, 16 hodin

Schéma 25: Syntéza cílové látky s kyselinou gallovou

Protože jsme neuspěli při pokusu získat deriváty fenolických sloučenin s volnými hydroxylovými skupinami během jejich modifikace (viz. kapitola 4.2.2), pokusili jsme o demethylaci finálních sloučenin na pryskyřici **2(45)**. Provedli jsme pokus s analytickým množstvím pryskyřice a AlCl₃, ale bohužel bez úspěchu. Po odštěpení a analýze jsme detekovali pouze výchozí látku.

Látky **2(44)** a **2(45)** byly štěpeny 50% kyselinou trifluoroctovou v DCM a poskytly produkty **43(44)** a **43(45)**, které byly poté purifikovány na semipreparativním HPLC za použití mobilní fáze: vodný roztok octanu amonného a acetonitril. Přestože po purifikaci byla čistota látek vysoká (98 % a 95 %, podle U-HPLC), po lyofilizaci roztoku octanu amonného výrazně klesla (85 % a 78 %, podle U-HPLC). Před další přípravou finálních látek a purifikací jsme chtěli získat informace o jejich stabilitě. Provedli jsme proto několik pokusů s využitím rozložených finálních sloučenin z předešlého pokusu. Z tab. 8 vyplývá, že delším stáním v octanovém pufru zůstává čistota látek zachována, naopak se snižuje v roztoku methanolu a vody.

Látka	Rozpouštědlo	dny	U-HPLC čistota [%]	Látka	Rozpouštědlo	dny	U-HPLC čistota [%]
43(44)	Octan amonný	1	85	43(45)	Octan amonný	1	78
		2	84			2	76
		3	82			3	62
	DMSO	1	83		DMSO	1	82
		2	76			2	80
		3	69			3	78
	Pevná látka za RT bez rozpouštědla	1	76		Pevná látka za RT bez rozpouštědla	1	80
		2	74			2	71
		3	70			3	70
	MeOH:H ₂ O (1:1; V/V)	1	67		MeOH:H ₂ O (1:1; V/V)	1	78
		4	64			4	77
		5	60			5	77

Tab. 8: Testy stability produktů **43(44)** a **43(45)**

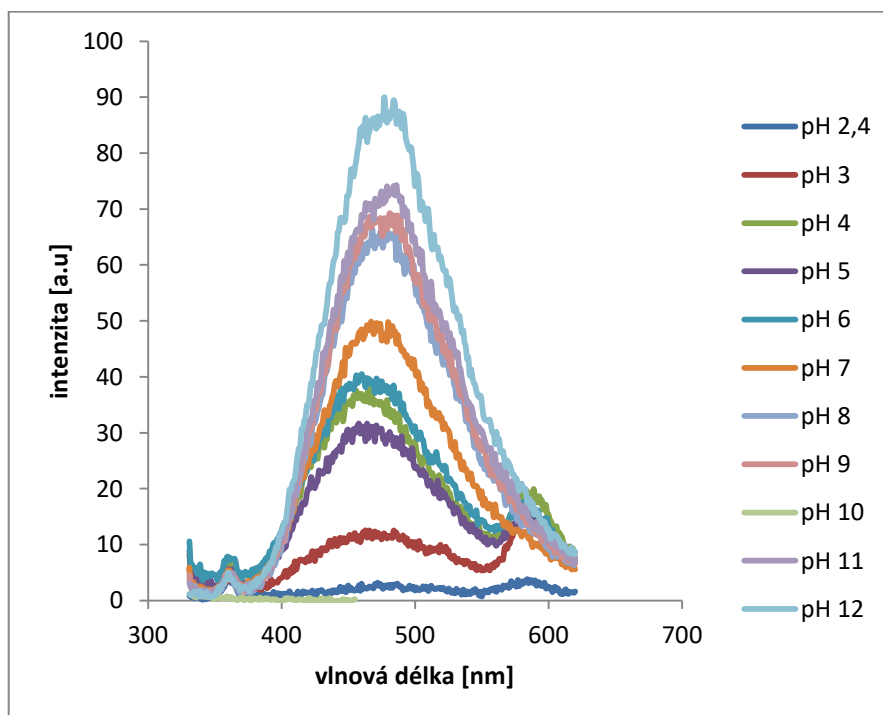
Protože jsme se chtěli vyhnout semipreparativnímu HPLC a lyofilizaci, přestoupili jsme ke sloupcové chromatografii. Tímto způsobem se nám podařilo získat v dostatečné čistotě pouze derivát **43(44)**. U druhé sloučeniny se nám nepodařilo všechny nečistoty odstranit ani po opakované sloupcové chromatografii či použití gradientové metody. Posledním pokusem o separaci nečistot bylo použití semipreparativní tenkovrstevné chromatografie. Bohužel ani ten nebyl úspěšný.

4.4 Fluorescenční vlastnosti látek

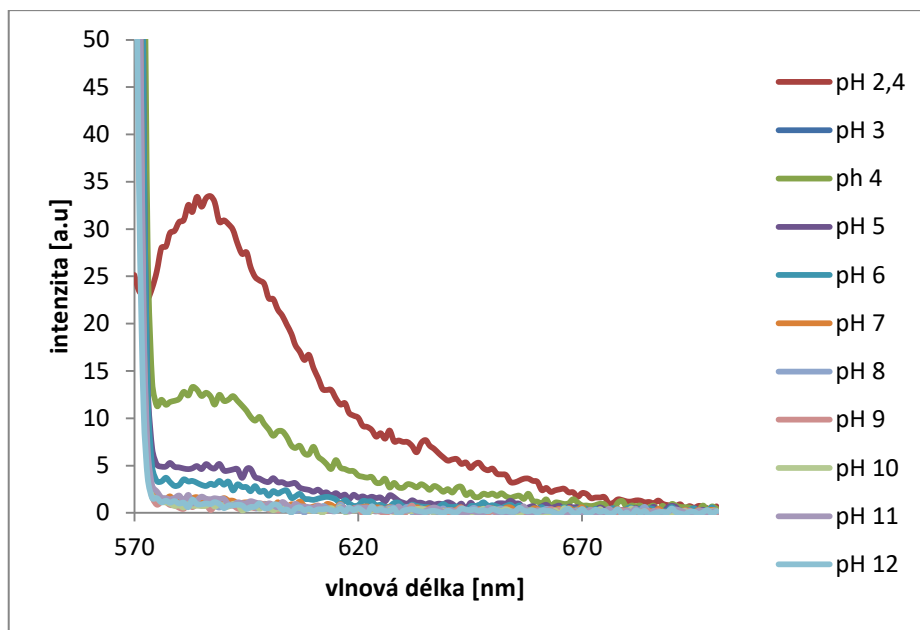
V následujících podkapitolách jsou popsány všechny naměřené fluorescenční vlastnosti cílové látky **43(44)**. Emisní a excitační spektra byla měřena na fluorescenčním spektrofotometru.

4.4.1 Emisní spektra

Testovaná sloučenina vykazovala fluorescenci při excitační vlnové délce 320 nm a 565 nm. Druhá zmíněná vlnová délka je typická pro rhodaminové deriváty. Fluorescence byla měřena za použití Britton-Robinsonova pufru v rozmezí pH 2,4-12. Příslušná emisní spektra můžeme vidět v příložených grafech



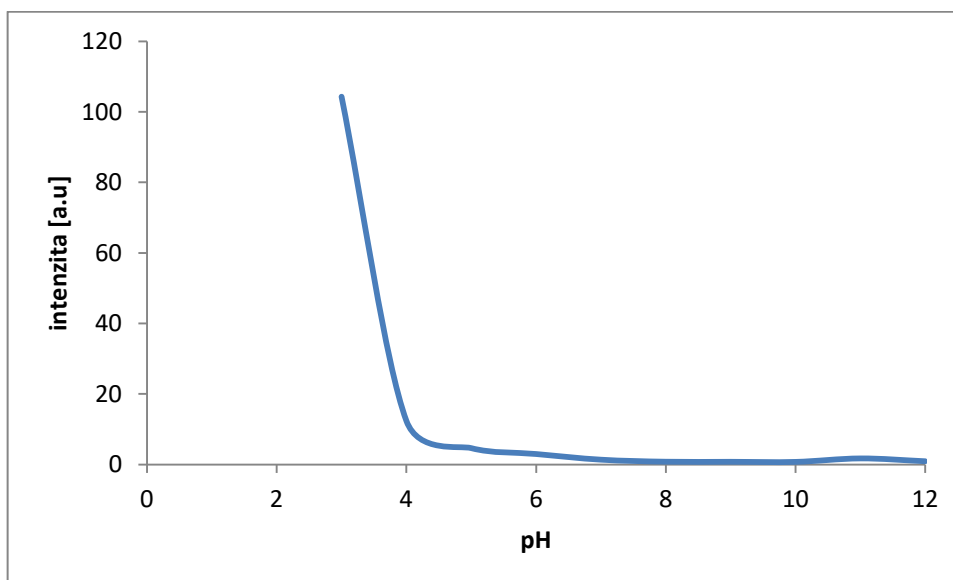
Graf 1: Emisní spektrum při excitaci 320 nm



Graf 2: Emisní spektrum při excitaci 565 nm

4.4.2 pH závislost

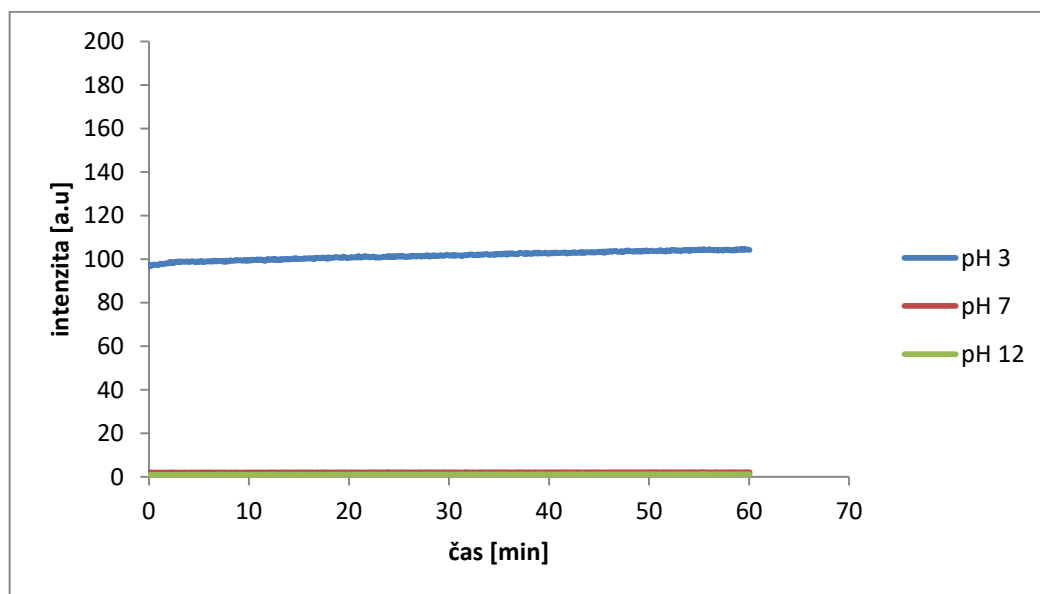
U dané látky byla měřena závislost její rhodaminové fluorescence na pH. Z grafu 3 je patrné, že látka přestává fluoreskovat již ve slabě kyselém prostředí při excitaci 565 nm.



Graf 3: pH závislost fluorescence při excitaci 565 nm.

4.4.3 Fotostabilita

Změřili jsme také fotostabilitu dané látky v Britton-Robinsonově pufru během jedné hodiny při vybraných hodnotách pH. Zjistili jsme, že jsou látky stabilní, což je zřejmé z doloženého grafu 4.



Graf 4: Fotostabilita v průběhu 1 hodiny

Kvantový výtěžek bohužel nebyl stanoven a UV/VIS spektra nebyla změřena, jelikož došlo k poruše počítače. Kvantový výtěžek bude stanoven a UV/VIS spektra budou doměřena.

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Analytické metody

Měření hmotnostních spekter bylo realizováno na hmotnostním spektrometru s jednoduchým kvadrupólem (Waters) s kolonou X-Select C18 za použití mobilní fáze složené z (A) 0,01 M octanu amonného ve vodě a (B) acetonitrilu. Měření NMR spekter bylo provedeno v roztoku DMSO – *d*6 na Jeol ECX-500 (500 MHz). Hodnoty chemického posunu (δ) jsou udány v ppm jednotkách, interakční konstanty (J) v Hz. Preparativní HPLC byla prováděna s využitím přístroje Waters 1500 series a preparativní kolony YMC-Pack Pro C1820x100mm s-5 μ m, 12 nm. Mobilní fáze byla složena z 0,01 M octanu amonného a acetonitrilu. TLC chromatografie byla prováděna na hliníkových deskách pokrytých silikagelem 60 F254 značky Merck. Emisní spektra byla zaznamenána na fluorescenčním spektrofotometru Cary Eclipse (FL1009M015, Varian). UV-VIS spektra byla měřena na spektrofotometru Cary 300 UV-VIS (UV1111M031, Agilent Technologies).

Před každou analýzou LC-MS byla pryskyřice promyta vhodným rozpouštědlem. Malé množství pryskyřice (cca 5 mg) se odebralo do eppendorfky a poté byla po dobu 30 minut třepána ve směsi 50% TFA/DCM (1 ml). Roztok byl poté odpařen pod proudem dusíku. Odparek byl rozpuštěn v methanolu (0,5 ml) a vodě (0,5 ml). Před analýzou byl roztok zfiltrován pomocí polypropylenové injekční stříkačky a mikrofiltru.

5.2 Stanovení loadingu

Pro stanovení loadingu byla provedena metoda vnějšího standardu, jako standard byl použit roztok o přesné koncentraci Fmoc- β -Ala-OH v methanolu. Protektivní skupina Fmoc absorbuje UV záření o vlnové délce 300 nm. Na základě toho byly srovnány plochy píků absorbance standardu a vzorku. Pro každé stanovení loadingu byly provedeny dva paralelní odběry vzorku.

$$L = \frac{S_{vz.}}{S_{std.}} * \frac{c_{std.}}{m_{vz.}} * 1000$$

(L = loading pryskyřice [mmol/g]; $S_{vz.}$ = plocha píku vzorku; $S_{std.}$ = plocha píku standardu; $c_{std.}$ = koncentrace standardu [mmol/ml]; $m_{vz.}$ = hmotnost odebrané pryskyřice [g])

5.3 Syntetické postupy

5.3.1 Modifikace fenolických sloučenin

5.3.1.1 Příprava 4-fenoxybutanové kyseliny 44

5.3.1.1.1 Příprava ethylesteru 4-fenoxybutanové kyseliny 60

Fenol **49** (2 g; 0,02 mol) byl rozpuštěn vDMF (40 ml) a za rt míchán s 2,5 ekvivalenty K_2CO_3 (7,35 g; 0,05 mol) po dobu 30 minut. Poté byl přidán 1 ekvivalent ethyl-4-bromobutyrate (3 ml; 0,02 mol), jako katalyzátor byl použit jodid draselný (0,04 g; 0,024 mmol). Reakční směs byla zahřívána v olejové lázni (70 °C) přes noc (cca 16 hodin). Následně byla reakční směs přefiltrována. Filtrát byl naředěn vodou(30 ml) a třikrát extrahován do ethylacetátu (60 ml). Organická fáze byla vysušena Na_2SO_4 . Síran byl odstraněn filtrací přes vatu. Ethylacetát byl odpařen na rotační vakuové odparce. Z odparku byl odebrán vzorek na analýzu LC/MS. Zbytkový DMF byl odstraněn lyofilizací přes noc. Čistota produktu**60** byla ověřena pomocí LC/MS a NMR.

5.3.1.1.2 Hydrolýza ethylesteru 4-fenoxybutanové kyseliny 44

Sloučenina **60** byla rozpuštěna v 1M roztoku NaOH ve směsi THF:voda (1:1, V/V, 30 ml). Reakční směs byla míchána za laboratorní teploty 5,5 hodiny. Reakční směs byla odpařena na polovinu svého objemu a zneutralizována 1M roztokem HCl (20 ml). Po neutralizaci se směs naředila vodou(100 ml) a třikrát extrahovala do diethyletheru (100 ml). Organická fáze byla vysušena Na_2SO_4 . Síran se odstranil pomocí filtrace přes vatu. Dietyether byl odpařen na RVO. Po odpaření se k odparku přidala voda (20 ml). Vyloučená sraženina byla odfiltrována, vysušena a zvážena. Čistota produktu **44** byla ověřena pomocí LC/MS a NMR.

5.3.1.2 Příprava 4-(3-methoxyfenoxy)butanové kyseliny 45

5.3.1.2.1 Příprava ethylesteru 4-(3-methoxyfenoxy)butanové kyseliny 65

3-Methoxyfenol **64** (0,5 g; 4 mmol) byl rozpuštěn v DMF (40 ml) a za rt míchán se 4 ekvivalenty K_2CO_3 (2,19 g; 0,016 mol) po dobu 30 minut. Poté byly přidány 4 ekvivalenty ethyl-4-bromobutyrate (2,305 ml; 0,016 mol). Reakční směs byla zahřívána v olejové lázni (70°C) přes noc (cca 16 hodin). Následně byla reakční směs okyselena 1M HCl (20 ml) na pH 2 a naředěna vodou (30 ml) a třikrát extrahována do ethylacetátu (60 ml). Organická fáze byla vysušena Na_2SO_4 . Síran byl odstraněn filtrací

přes vatu. Ethylacetát byl odpařen na rotační vakuové odparce. Odparek byl přečištěn pomocí kolonové chromatografie (mobilní fáze hexan:ethylacetát v poměru 7:1). Po odpaření rozpouštědel ze sesbíraných frakcí byl produkt **65** vysušen na lyofilizátoru. Čistota produktu **65** byla ověřena pomocí LC/MS a NMR.

5.3.1.2.2 Hydrolýza ethylesteru 4-(3-methoxyfenoxy)butanové kyseliny **45**

Sloučenina **65** byla zhydrolyzována 1M roztokem TMSOK (2,56 g; 0,02 mol) v THF (20 ml) za rt za dobu 1 hodiny. Reakční směs se naředila vodou (200 ml) a okyselila 3M roztokem HCl (20 ml) na pH 2. Následně se reakční směs třikrát extrahovala do ethylacetátu (200 ml). Organická fáze byla vysušena Na₂SO₄. Síran byl odstraněn filtrací přes vatu. Ethylacetát byl odpařen na rotační vakuové odparce. K odparku byl přidán toluen (20 ml), který byl následně odpařen na odparce. Odpaření toluenu se opakovalo ještě dvakrát. Následně byl odparek rozpuštěn v MeOH (15 ml) za zahřívání pod horkovzdušnou pistolí. Za stálého míchání se přidávala teplá voda, dokud se roztok nezakalil. Poté se přidal ještě zahřátý MeOH (5 ml). Po vyčeření roztoku se opět přidávala voda (celkový objem 30 ml) dokud nezačaly vypadávat krystalky. Produkt byl odfiltrován. Čistota produktu **45** byla ověřena pomocí LC/MS a NMR.

5.3.1.3 Příprava 4-(2,6-dimethoxyfenoxy)butanové kyseliny **46**

5.3.1.3.1 Příprava trimethoxybenzenu **72**

Pyrogallol **67** (2 g; 0,016 mol) byl rozpuštěn v acetonu (60 ml) a za rt byl míchán se 3 ekvivalenty K₂CO₃ (6,57 g; 0,048 mol) po dobu 30 minut. Poté byly přidány 4 ekvivalenty dimethylsulfátu (6 ml; 0,063 mol). Reakční směs byla refluxována přes noc (cca 16 hodin). Následně byl odpařen aceton na RVO, odparek byl naředěn 100 ml vody. Směs byla zneutralizována 3M HCl (15 ml) a třikrát extrahována do diethyletheru. Organická fáze byla vysušena pomocí Na₂SO₄. Síran byl odstraněn filtrací přes vatu. Diethylether byl odpařen na rotační vakuové odparce. Odparek byl vysušen přes noc na lyofilizátoru. Čistota produktu byla ověřena pomocí LC/MS. Odparek byl přečištěn pomocí kolonové chromatografie (mobilní fáze hexan:ethylacetát v poměru 7:1). Po odpaření rozpouštědel ze sesbíraných frakcí jsme získali produkt trimethoxybenzen **72**. Čistota produktu **72** byla ověřena pomocí LC/MS a NMR.

5.3.1.3.2 Parciální demethylace trimethoxybenzenu

73

Trimethoxybenzen **72** (0,5 g; 0,003 mol) byl rozpuštěn v suchém DCM (20 ml). Následně byly přidány 4 ekvivalenty chloridu hlinitého (1,57 g; 0,011 mol). Reakční směs byla míchána za rt po dobu 3 hodin. K reakční směsi byla přidána po částech 1M HCl (30 ml) za chlazení v ledové lázni. Směs byla poté třikrát extrahována do diethyletheru (50 ml). Organická fáze byla promyta 5 % NaHCO₃ a solankou. Organická fáze byla vysušena pomocí Na₂SO₄. Síran byl odstraněn filtrací přes vatu. Diethylether byl odpařen na rotační vakuové odparce. Čistota produktu dimethoxyfenolu **73** byla ověřena pomocí LC/MS. Produkt byl přečištěn pomocí kolonové chromatografie (mobilní fáze petrolether:ethylacetát v poměru 5:3). Po odpaření frakcí byl odparek rozpuštěn ve směsi terc-butylmethyletheru a hexanu (5:6; V/V; 11 ml) a podchlazen v kapalném dusíku. Po chvíli vypadla bílá sraženina, která byla promyta hexanem a vysušena. Čistota produktu **73** byla ověřena pomocí LC/MS a NMR.

5.3.1.3.3 Příprava ethylesteru 4-(2,6-dimethoxyphenoxy)butanové kyseliny

74

Dimethoxyfenol **73** (0,5 g; 0,003 mol) byl rozpuštěn v DMF (20 ml) a za RT byl míchán se 4 ekvivalenty K₂CO₃ (1,65 g; 0,012 mol) po dobu 30 minut. Následně byly přidány 4 ekvivalenty ethyl-4-bromobutyátu (1,7 ml; 0,012 mol). Reakční směs byla míchána a zahřívána v olejové lázni (70°C) přes noc (cca 16 hodin). Následně byla reakční směs naředěna vodou (100 ml) a třikrát extrahována do diethyletheru (300 ml). Organická fáze byla vysušena Na₂SO₄. Síran byl odstraněn filtrací přes vatu. Diethylether byl odpařen na rotační vakuové odparce. Odparek byl lyofilizován přes noc. Čistota produktu **74** byla ověřena pomocí LC/MS a NMR.

5.3.1.3.4 Hydrolýza ethylesteru 4-(2,6-dimethoxyphenoxy)butanové kyseliny

46

Produkt **74** (0,6 g; 0,002 mol) byl zhydrolyzován 1M roztokem TMSOK (1,28 g; 0,01 mol) v THF (10 ml) přes noc. Reakční směs byla naředěna 1M HCl (30 ml). Směs byla třikrát extrahována do diethyletheru (150 ml). Organická fáze byla vysušena Na₂SO₄. Síran byl odstraněn filtrací přes vatu. Diethylether byl odpařen na rotační vakuové odparce. K odparku byl přidán toluen (20 ml), který byl následně odpařen na odparce. Odpaření toluenu se opakovalo ještě dvakrát. Produkt **46** se přečistil pomocí kolonové chromatografie (mobilní fáze hexan:ethylacetát:methanol v poměru 7:4:2). Čistota produktu **46** byla ověřena pomocí LC/MS a NMR.

5.3.2 Syntéza pyrimidinového prekurzoru

5.3.2.1 Ukotvení Fmoc- β -alaninu na Wangovu pryskyřici

39

Wangova pryskyřice (1 g, 0,49 mmol/g) byla promyta DMF (3x) a DCM (3x). Do stříkačky byl přidán 0,2 M roztok Fmoc- β -Ala-OH (0,623 g; 2 mmol), HOBt (0,27 g; 2 mmol), DMAP (0,24 g; 2 mmol) a DIC (0,308 ml; 2 mmol) v 10 ml DMF/DCM (1:1; V/V). Reakce byla třepána za laboratorní teploty po dobu dvou hodin. Poté byla reakční směs odstraněna a pryskyřice promyta DMF (3x) a DCM (3x).

5.3.2.2 Navázání 4,6-dichloro-5-nitropyrimidinu na pryskyřici

40

Výchozí látka **39** byla defmokována reakcí s 50 % piperidinem v DMF (10 ml) po dobu 30 minut za laboratorní teploty. Po odstranění reakční směsi byla pryskyřice promyta DMF (3x), DCM (3x) a suchým DMF (3x). Do stříkačky byl přidán 0,5 M roztok 4,6-dichloro-5-nitropyrimidinu (0,97 g; 5 mmol), DIEA (0,83 ml; 5 mmol) v suchém DMF (10 ml). Reakce byla třepána za laboratorní teploty po dobu 1,5 hodiny. Poté byla reakční směs odstraněna a pryskyřice promyta DMF (3x) a DCM (3x).

5.3.2.3 Nukleofilní substituce pryskyřice **40** s *p*-fenylendiaminem

41

Do stříkačky k výchozí látce **40** byl přidán 0,5 M roztok *p*-fenylendiaminu (0,54 g; 5 mmol) a 2,6-lutidinu (0,582 ml; 5 mmol) v DMF (10 ml). Reakce byla třepána za laboratorní teploty přes noc (cca 16 h). Poté byla reakční směs odstraněna a pryskyřice promyta DMF (3x) a DCM (3x).

5.3.2.4 Acylace pryskyřice **3** Rhodaminem B

42

V kádince byl rozpuštěn Rhodamin B (1,53 g; 3,0 mmol) a DIC (0,5 ml; 3,0 mmol) v 5 ml DMF. Po 15 minutách byl přidán HOBt (0,49 g; 3,0 mmol) a DCM (5 ml) a reakční směs byla přidána do stříkačky k výchozí látce **41**. Reakce byla třepána za laboratorní teploty přes noc (cca 16 h). Poté byla reakční směs odstraněna a pryskyřice promyta DMF (8x) a DCM (8x).

5.3.2.5 Redukce nitro skupiny

1

Do stříkačky k výchozí látce **42** byl přidán 0,5 M roztok Na₂S₂O₄ (0,87 g; 5 mmol), K₂CO₃ (0,97 g; 5 mmol), ethylviologen diiodidu (0,12 g; 0,3 mmol) v 10 ml směsi DCM/voda (1:1). Reakce byla třepána za laboratorní teploty přes noc (cca 16 h). Poté byla reakční směs odstraněna a pryskyřice promyta DCM/voda (1:1; V/V) (3x), DMF (3x), MeOH (3x) a DCM (3x).

5.3.2.6 Prodloužení pyrimidinového prekurzoru β -alaninem

76

Do stříkačky s 0,5 g výchozí látky **1** byl přidán 0,2 M roztok Fmoc- β -Ala-OH (0,315 g; 2 mmol), HOBt (0,135 g; 2 mmol), DMAP (0,12 g; 2 mmol) a DIC (0,154 ml; 2 mmol) v 10 ml DMF/DCM (1:1; V/V). Reakce byla třepána za laboratorní teploty po dobu dvou hodin. Poté byla reakční směs odstraněna a pryskyřice promyta DMF (3x) a DCM (3x). Poté byla látka defmokována reakcí s 50 % piperidinem v DMF (10 ml) po dobu 30 minut za laboratorní teploty. Po odstranění reakční směsi byla pryskyřice promyta DMF (3x), DCM (3x).

5.3.3 Finální acylace pyrimidinových prekurzorů

5.3.3.1 Acylace pryskyřice **1** fenoxybutanovou kyselinou

43(44)

Do stříkačky s 0,5 g výchozí látky **1** byl přidán 0,2 M roztok kyseliny 4-fenoxybutanové (0,181 g; 1 mmol), HOBt (0,135 g; 1 mmol), DMAP (0,122 g; 1 mmol) a DIC (0,154 ml; 1 mmol) v 5 ml DMF/DCM (1:1; V/V). Reakce byla třepána za laboratorní teploty přes noc (cca 16 hodin). Poté byla reakční směs odstraněna a pryskyřice promyta DMF (3x) a DCM (3x). Látka byla přečištěna na semipreparativním HPLC s mobilní fází složenou z AcCN a acetátového pufru.

5.3.3.2 Acylace pryskyřice **1** 4-(3-methoxyfenoxy)butanovou kyselinou

43(45)

Do stříkačky s 0,5 g výchozí látky **1** byl přidán 0,2 M roztok kyseliny 4-(3-methoxyfenoxy)-butanové (0,21 g; 1 mmol), HOBt (0,135 g; 1 mmol), DMAP (0,122 g; 1 mmol) a DIC (0,154 ml; 1 mmol) v 5 ml DMF/DCM (1:1; V/V). Reakce byla třepána za laboratorní teploty přes noc (cca 16 hodin). Poté byla reakční směs odstraněna a pryskyřice promyta DMF (3x) a DCM (3x). Látka byla přečištěna na semipreparativním HPLC s mobilní fází složenou z AcCN a acetátového pufru.

5.4 Analytická data

Ethylester 4-fenoxybutanové kyseliny

60

výtěžek: 68 %, nažloutlá olejovitá látka

ESI-MS pro $C_{12}H_{16}O_3$: 208,11; nalezeno 209,14 $[M+H]^+$; Čistota: 88 %

1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1.18 (t, $J=7.16$ Hz, 3 H), 1.96 (quin, $J=6.59$ Hz, 2 H), 2.45 (t, $J=7.16$ Hz, 2 H), 3.97 (t, $J=6.01$ Hz, 2 H), 4.06 (q, $J=7.06$ Hz, 2 H), 6.88 - 6.94 (m, 3 H), 7.27 (t, $J=7.73$ Hz, 2 H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 14.64, 24.77, 30.70, 60.40, 66.81, 114.91, 121.05, 130.01, 158.96, 173.10.

NMR data korespondují s dříve popsanou strukturou

4-fenoxybutanová kyselina

44

Výtěžek: 63 %, bílá krystalická látka

ESI-MS pro $C_{10}H_{12}O_3$: 180,08; nalezeno 179,45 $[M-H]^-$; Čistota: 97 %

1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1.90 (quin, $J=6.87$ Hz, 2 H), 2.35 (t, $J=7.45$ Hz, 2 H), 3.93 (t, $J=6.59$ Hz, 2 H), 6.85 - 6.91 (m, 3 H), 7.24 (t, $J=8.02$ Hz, 2 H), 12.12 (s, 1 H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 24.78, 30.65, 66.91, 114.92, 121.01, 130.01, 159.02, 174.66.

NMR data korespondují s dříve popsanou strukturou

Ethylester 4-(3-methoxyfenoxy)butanové kyseliny

65

Výtěžek: 75 %, nažloutlá olejovitá kapalina

ESI-MS pro $C_{13}H_{18}O_4$: 238,12; nalezeno 239,11 $[M+H]^+$; Čistota: 93 %

NMR analýza znečištěná

4-(3-methoxyfenoxy)butanová kyselina

45

Výtěžek: 64 %, bílá krystalická látka

ESI-MS pro $C_{11}H_{14}O_4$: 210,09; nalezeno 209,24 $[M-H]^-$; Čistota: 98 %

1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1.91 (2 H, quin, $J=6.87$ Hz), 2.37 (2 H, t, $J=7.16$ Hz), 3.68 (3 H, s), 3.95 (2 H, t, $J=6.30$ Hz), 6.48 - 6.51 (3 H, m), 7.16 (1 H, t, $J=8.02$ Hz), 12.12 (1 H, s). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 24.77, 30.64, 55.58, 67.08, 101.19, 106.86, 107.12, 130.46, 160.30, 161.04, 174.59.

NMR data korespondují s dříve popsanou strukturou

Trimethoxybenzen

72

Výtěžek: 65 %, bílá krystalická látka

ESI-MS pro $C_9H_{12}O_3$: 168,08; nalezeno 169,11 $[M+H]^+$; Čistota: 98 %

1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 3.73 (9 H, s), 6.62 (2 H, d, $J=8,02$), 6.95 (1 H, t, $J=8.02$ Hz). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 56.31, 60.49, 106.02, 124.21, 137.08, 153.70.

NMR data korespondují s dříve popsanou strukturou

Dimethoxyfenol

73

Výtěžek: 76 %, olejovitá kapalina

ESI-MS pro $C_8H_{10}O_3$: 154,06; nalezeno 155,05 $[M+H]^+$; Čistota: 92 %

1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 3.77 (6 H, s), 6.56 (2 H, d, $J=8,3$), 6.95 (1 H, t, $J=8.88$ Hz), 8.19 (1 H, s). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 56.52, 106.32, 118.67, 136.26, 148.75.

NMR data korespondují s dříve popsanou strukturou

Ethylester 4-(2,6-dimethoxyfenoxy)butanové kyseliny

74

Výtěžek: 70 %, nažloutlá olejovitá kapalina

ESI-MS pro $C_{14}H_{20}O_5$: 268,13; nalezeno 269,17 $[M+H]^+$; Čistota: 95 %

1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1.14 (3 H, s), 1.77 - 1.83 (2 H, m), 3.82 (2 H, t, $J=6.16$ Hz), 4.04 (2 H, q, $J=7.16$ Hz), 6.62 (2 H, d, $J=8.59$ Hz), 6.93 (1 H, t, $J=8.72$ Hz). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 14.64, 25.58, 30.51, 56.36, 60.23, 71.86, 106.08, 124.13, 137.07, 153.83, 173.32.

4-(2,6-dimethoxyfenoxy)butanová kyselina

46

Výtěžek: 50 %, bílá krystalická látka

ESI-MS pro $C_{12}H_{16}O_5$: 240,10; nalezeno 241,38 $[M+H]^+$; Čistota: 94 %

1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1.80 (2 H, q, $J=6.59$), 2.40 (2 H, t, $J=7.45$ Hz), 3.81 (2 H, t, $J=6.30$ Hz), 6.6 (2 H, d, $J=8.31$ Hz), 6.94 (1 H, t, $J=8.31$). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 25.65, 30.62, 56.39, 72.04, 106.08, 124.09, 137.14, 153.83, 174.32.

N-(9-(2-((4-((6-((2-carboxyethyl)amino)-5-(4-fenoxybutanamido)pyrimidin-4-yl)amino)fenyl)carbamoyl)fenyl)-7-(diethylamino)-3H-xanthen-3-ylidene)-N-ethylethanaminium **43(44)**

Výtěžek: 5 %, růžová krystalická látka

ESI-MS pro $C_{51}H_{55}N_8O_6^+$: 875,42; nalezeno 875,62 $[M+H]^+$; Čistota: 89 %

HRMS m/z calcd for $C_{51}H_{54}N_8O_6[M+H]^+$ 875,4239, nalezeno 875,4304

1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1.10 (12 H, t, $J=6,9$), 2.02 (2 H, quin, $J=6.84$ Hz), 2.43 (2 H, t, $J=7.16$ Hz), 2.52 - 2.58 (4 H, m), 3.47 - 3.53 (8 H překryto se signálem vody), 4.00 (2 H, t, $J=6.44$ Hz), 6.23 - 6.33 (3 H, m), 6.40 (2 H, dd, $J=8.88$, 2.58 Hz), 6.52 - 6.61 (4 H, m), 6.87 - 6.98 (3 H, m), 7.08 (1 H, d, $J=6.59$ Hz), 7.22 - 7.33 (3 H, m), 7.52 - 7.61 (2 H, m), 7.81 (1 H, s), 7.85 - 7.89 (1 H, m), 8.01 (1 H, s), 8.72 (1 H, s).

Kvůli nízkému výtěžku nebylo uhlíkové spektrum čitelné.

3-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)propanová kyselina **39**

ESI-MS pro $C_{18}H_{17}NO_4$: 311,12; nalezeno 311 $[M-H]^-$; Čistota: 93 %

3-((6-chloro-5-nitropyrimidin-4-yl)amino)propanová kyselina **40**

ESI-MS pro $C_7H_7ClN_4O_4$: 246,02; nalezeno 245 $[M-H]^-$; Čistota: 80 %

3-((6-((4-aminophenyl)amino)-5-nitropyrimidin-4-yl)amino)propanová kyselina **41**

ESI-MS pro $C_{13}H_{14}N_6O_4$: 318,11; nalezeno 317 $[M-H]^-$; Čistota: 74 %

N-(9-(2-((4-((6-((2-carboxyethyl)amino)-5-nitropyrimidin-4-yl)amino)phenyl)carbamoyl)phenyl)-7-(diethylamino)-3H-xanthen-3-ylidene)-N-ethylethanaminium **42**

ESI-MS pro $C_{41}H_{43}N_8O_6^+$: 743,33; nalezeno 743 $[M+H]^+$; Čistota: 72 %

N-(9-(2-((4-((5-amino-6-((2-carboxyethyl)amino)pyrimidin-4-yl)amino)phenyl)carbamoyl)phenyl)-7-(diethylamino)-3H-xanthen-3-ylidene)-N-ethylethanaminium **1**

ESI-MS pro $C_{41}H_{45}N_8O_4^+$: 713,36; nalezeno 712 $[M-H]^-$; Čistota: 68 %

N-(9-(2-((4-((5-(3-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)propanamido)-6-((2-carboxyethyl)amino)pyrimidin-4-yl)amino)phenyl)carbamoyl)phenyl)-7-(diethylamino)-3H-xanthen-3-ylidene)-N-ethylethanaminium **76**

ESI-MS pro $C_{59}H_{60}N_9O_7^+$: 1006,46; nalezeno 1007 $[M+H]^+$; Čistota: 59 %

6 ZÁVĚR

Tato práce byla zaměřená na modifikaci fluorescenčních značek odvozených od pyrimidinu a Rhodaminu B fenolickými sloučeninami s cílem získat látky, které se hromadí v mitochondriích, mají schopnost je vizualizovat a působit na ně svými účinky.

V první části byla pozornost věnována derivatizaci použitých fenolických sloučenin tak, aby byly schopny reagovat s aminoskupinou pyrimidinového jádra. Připraveny byly tři karboxylové kyseliny, z nichž jedna nebyla dosud popsána. Dvě zbývající kyseliny jsou sice známé sloučeniny, nicméně přesto bylo nutné optimalizovat podmínky pro jejich přípravu.

Následující část byla zaměřena na vývoj metody navázání karboxylových kyselin odvozených od fenolických sloučenin na fluorescenční systém. Při tomto kroku byla pozorována snížená reaktivita u některých substrátů a z testovaných čtyř fenolických derivátů se nám podařilo na fluorescenční systém navázat dva (kyselina 4-fenoxybutanová a kyselina 4-(3-methoxyfenoxy)butanová).

Purifikaci finálních sloučenin znesnadňovala jejich nestabilita při separaci na semipreparativním HPLC a bylo nutné hledat alternativní metody čištění. Díky této komplikaci byl získán pouze jeden finální produkt o dostatečné čistotě. U finální sloučeniny byla změřena excitační a emisní fluorescenční spektra, která vykazovala typickou rhodaminovou fluorescenci. Dalšími experimenty bylo zjištěno, že fluorescence finální sloučeniny je závislá na pH. Testována byla také fotostabilita a bylo potvrzeno, že sloučenina je po dobu jedné hodiny stabilní. Z časových důvodů a vzhledem k tomu, že se dosud podařilo připravit pouze jeden derivát, zatím neproběhlo testování penetrace přes buněčnou a mitochondriální membránu.

7 SEZNAM LITERATURY

1. Berčík, J.; Bustin, D.; Garaj, J.; Traiter, M.; Štefanec, J.; Čerňák, J. *Fyzikálne a fyzikálnochemické analytické metódy*. ALFA vydavateľstvo, **1977**, 313.
2. Drummen, G. P. *Molecules* **2012**, *17*, 1420-3049.
3. Stokes, G. G. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*. **1852**, *142*, 463-562.
4. Cooksey C. J. Quirks of dye nomenclature. 5. Rhodamines; *Biotechnic & Histochemistry*. **2016**, *91*(1), 71–76.
5. De Simone, A.; Corrie, J. E. T.; Dale, R. E.; Irving, M.; Fraternali, F. Conformation and Dynamics of a Rhodamine Probe Attached at Two Sites on a Protein: Implications for Molecular Structure Determination *in situ*. *J. AM. CHEM. SOC.* **2008**, *130*, 17120–17128.
6. Mottram, L. F.; Forbes, S.; Ackley B. D.; Peterson B. R. Hydrophobic analogues of rhodamine B and rhodamine 101: potent fluorescent probes of mitochondria in living *C. elegant*. *Beilstein J. Org. Chem.* **2012**, *8*, 2156–2165.
7. Beija, M.; Afonso, C. A. M.; Martinho, J. M. G. Synthesis and application of Rhodamine derivatives as fluorescent probes. *Chem. SOc. Rev.*, **2009**, *38*, 2410-2433.
8. L. Cincotta and J.W.Foley, US4290955, 1981
9. Johnson, I. *Molecular Probes Handbook, A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*; 11 ed.; Life Technologies Corporation: 2010
10. Wang, R.; Yu, C.; Yu, F.; Chen, L.; Yu, C. Molecular fluorescent probes for monitoring pH changes in living cells. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2010**, *29* (9), 1004-1013.
11. Hasegawa, T.; Kondo, Y.; Koizumi, Y.; Sugiyama, T.; Takeda, A.; Ito, S.; Hamada, F. A highly sensitive probe detecting low pH area of HeLa cells based on rhodamine B modified beta-cyclodextrins. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*(16), 6015-6019.
12. Yapici, N. B.; Mandalapu, S.; Gibson, K. M.; Bi, L. Targeted fluorescent probes for detection of oxidative stress in the mitochondria. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 3476–3480.

13. Li, K.; Hou, J-T.; Yang, J.; Yu, X-Q. A tumour-specific and mitochondria-targeted fluorescent probe for real-time sensing of hypochlorite in living cells. *Chem. Commun.*, **2017**, 53, 5539—5541.
14. Nestmann, E. R.; Douglas, G. R.; Matula, T. I.; Grant, C. E.; Kowbel, D. J. Mutagenic activity of rhodamine dyes and their impurities as detected by mutation induction in *Salmonella* and DNA in Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res.* 39, **1979**, 4412 – 4417.
15. Costa, C.; Tsatsakis, A.; Mamoulakis, C.; Teodoro, M.; Briguglio, G.; Caruso, E.; Tsoukalas, D.; Margina, D.; Dardiotis, E.; Kouretas, D.; Ferga, C. Current evidence of the effect of dietary polyphenols intake on chronic diseases. *Food and Chemical Toxicology*, 2017, 110, 286–299.
16. Kasper, H.; *Výživa v medicíně a dietetika*. GRADA PUBLISHING: **2015**, 33-56.
17. Halliwell B. Are polyphenols antioxidant or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **2008**, 476, 107-112.
18. León-González, A. J.; Auger, C.; Schini-Kerth, V. B. Pro-oxidant activity of polyphenols and its implication on cancer chemoprevention and chemotherapy, *Biochemical Pharmacology*, **2015**, 98(3), 371-380.
19. Niki, E. Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. *Free Radical biology & Medicine*, **2010**, 49, 503-515.
20. Rajendran, P.; Ho, E.; Williams, D. E.; Dashwood, R. H. Dietary phytochemicals, HDAC inhibition, and DNA damage/repair defects in cancer cells. *Clinical Epigenetics* **2011**, 3.
21. Remely, M.; Lovrecic, L.; de la Garza, A. L.; Migliore, L.; Peterlin, B.; Milagro, F. I.; Martinez, A. J.; Haslberger, A. G. Therapeutic perspectives of epigenetically active nutrients. *British Journal of Pharmacology*, **2015**, 172, 2756–2768.
22. Berghe, W. V. Epigenetic impact of dietary polyphenols in cancer chemoprevention: Lifelong remodeling of our epigenomes. *Pharmacological Research*, **2012**, 65, 565– 576.
23. Gorlach, S.; Fichna, J.; Lewandowska, U. Polyphenols as mitochondria-targeted anticancer drugs. *Cancer Letters*, **2015**, 366, 141–149.

24. Koppenol, W. H. The centennial of the fenton. *Free Radical Biology & Medicine*, 1993, 15, 645-651.
25. Liang, T.; Zhang, X.; Xue, W.; Zhao, S.; Zhang, X.; Pei, J. Curcumin Induced Human Gastric Cancer BGC-823 Cells Apoptosis by ROS-Mediated ASK1-MKK4-JNK Stress Signaling Pathway. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, 15(9), 15754–15765.
26. Hwang J.-T.; Ha, J.; Park, I.-J.; Lee, S.-K.; Baik, H. W.; Kim, Y. M.; Park, O. J. Apoptotic effect of EGCG in HT-29 colon cancer cells via AMPK signal pathway. *Cancer Letters*, **2007**, 247, 115–121.
27. Lastra, C. A.; Villegas, I. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanism and clinical implications. *Biochemical Society Transactions*, **2007**, 35(5), 1156-1160.
28. Procházková, D.; Boušová, I.; Wilhelmová, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*, **2011**, 82, 513-523.
29. Amararathna, M.; Johnston, M.; Rupasinghe, H. P. V. Plant Polyphenols as Chemopreventive Agents for Lung Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, 17, 1352.
30. Thomasset, S. C.; Berry, D. P.; Garcea, G.; Marczylo, T.; Steward, W. P.; Gescher, A. J. Dietary polyphenolic phytochemicals—Promising cancer chemopreventive agents in humans? A review of their clinical properties. *Int. J. Cancer*, **2006**, 120, 451–458.
31. Dai, J.; Mumper, R. J. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules*, 2010, 15(10), 7313-7352.
32. Glasauer, A.; Chandel, N. S. Targeting antioxidants for cancer therapy. *Biochemical Pharmacology*, **2014**, 92, 90–101.
33. Fellnerová, I.; Hlaváček, I.; Čelechovský, A. *Obecná fyziologie I – chemické a buněčné základy*. **2014**, Univerzita Palackého v Olomouci. 79.
34. <http://docplayer.cz/docs-images/15/63421/images/19-0.jpg>
35. Zielonka, J.; Joseph, J.; Sikora, A.; Hardy, M.; Ouari, O.; Vasquez-Vivar, J.; Cheng, G.; Lopez, M.; Kalyanaraman, B. Mitochondria-Targeted Triphenylphosphonium-Based Compounds: Syntheses, Mechanisms of Action, and Therapeutic and Diagnostic Applications. *Chem. Rev.*, **2017**, 117(15), 10043-10120.
36. https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/3/37/Animal_mitochondrion_diagram_cs.svg/330px-Animal_mitochondrion_diagram_cs.svg.png

37. Brulikova, L.; Krupkova, S.; Labora, M.; Motyka, K.; Hradilova, L.; Mistrik, M., Bartek, J.; Hlavac, J.: Synthesis and study of novel pH-independent fluorescent mitochondrial labels based on Rhodamine B. *RSC Adv.* **2016**, 6, 23242-23251.
38. Merrifield, R. B. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85 (14), 2149-2154.
39. Lemrová B.; Fülöpová V. *Praktické aspekty syntézy na pevné fázi.* **2015**, Univerzita Palackého v Olomouci.
40. Wang, S. S. p-Alkoxybenzyl alcohol resin and p-alkoxybenzyloxycarbonylhydrazide resin for solid phase synthesis of protected peptide fragments. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, 95 (4), 1328-1333.
41. Hlavac, J.; Sural, M.; Krchnak, V. Practical aspects of combinatorial solid-phase synthesis. *John Wiley & Sons*, **2012**, 95-130.
42. Das, J.; Pany, S.; Majhi, A. Chemical modifications of resveratrol for improved protein kinase C alpha activity. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, 19(18), 5321-5333.
43. Kwak, J.-H.; Lee, S.; Park, E.-S.; In, J.-K.; Song, J.; Kim, Y. J.; Choi, N. S.; Lee, H.; Yun, Y.-P.; Hong, J. T.; Kwak, Y.-S.; Min, K. H.; Jung, J.-K.: Synthesis and Anti-platelet Activity of Obovatol Derivatives, *Arch. Pharm Res.* **2011**, 34(7), 1107-1112.
44. Bernard, A. M.; Ghiani, M. R.; Piras, P. P.; Rivoldini, A. Dealkylation of Activated Alkyl Aryl Ethers Using Lithium Chloride in Dimethylformamide. **1989**.
45. Yuan, H. J.; Cheng, Y. Y.; Qian, S.; Xiao, X.; Wu, Y. A new shortcut synthesis route for (±)raphidecursinol. *Chinese Chemical Letters.* **2010**, 21, 127-130.
46. Katritzky, A. R.; Suyuki, K.; Singh, S. N-Acylation in combinatorial chemistry. *Arkivoc* **2004** (i) 12-35, ISSN 1424-6376.
47. El-Faham, A.; Funosas, R. S.; Prohens, R.; Albericio, F. COMU: A safer and More Effective Replacement for Benzotriazole-Based Uronium Coupling Reagents. *Chem. Eur. J.* **2009**, 15, 9404-9416.