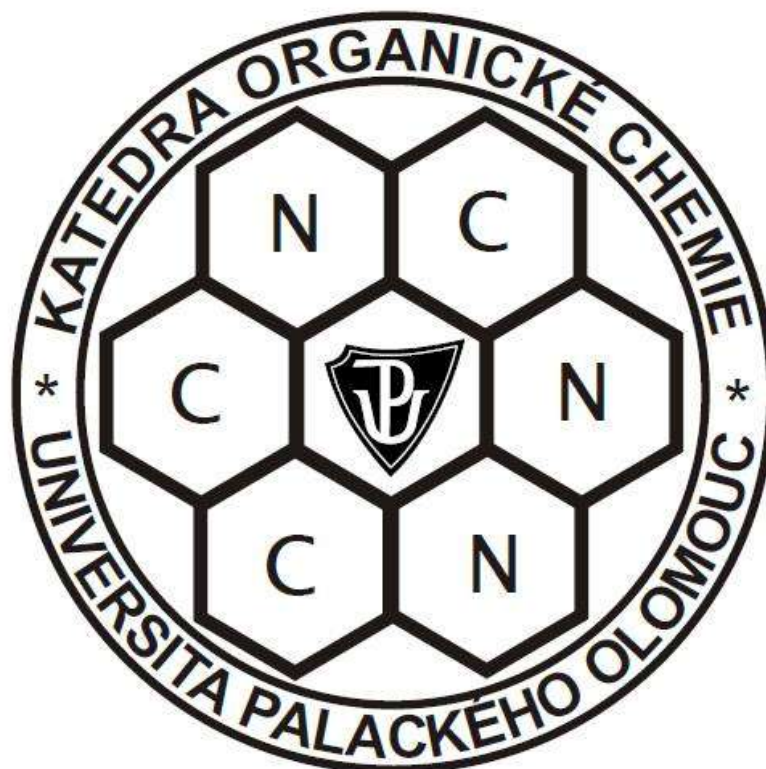


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
Katedra organické chemie



Miloš Hollan

**Využití hydroxylaminů pro stanovení
peroxidických sloučenin**

Diplomová práce

Studijní obor: Bioorganická chemie a chemická biologie

Vedoucí práce: Mgr. Petra Jedináková

Konzultant: Prof. RNDr. Jan Hlaváč, Ph.D.

Olomouc 2016

Rád bych poděkoval vedoucí své diplomové práce, Mgr. Petře Jedinákové, za skvělé vedení v celém průběhu vypracování bakalářské práce, pomoc při vyhodnocování MS a NMR spekter a trpělivost, kterou se mnou měla. Dále bych chtěl poděkovat celému osazenstvu Ústavu molekulární a translační medicíny a katedry organické chemie za všestrannou pomoc v nepřítomnosti Mgr. Petry Jedinákové. A v neposlední řadě děkuji také rodině za trpělivost a podporu.

Tato závěrečná práce vznikla za podpory projektu studentské grantové soutěže na UP s reg. číslem IGA_PrF_2015_007 a IGA-PrF-2016-020.

Já, Miloš Hollan, prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně pod odborným dohledem Mgr. Petry Jedinákové. Veškeré použité zdroje jsou uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry organické chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne

.....

Miloš Hollan

Bibliografická identifikace:

Autor: Miloš Hollan

Název práce: Využití hydroxylaminů pro stanovení peroxidických sloučenin

Typ práce: Diplomová

Pracoviště: Katedra organické chemie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci

Vedoucí práce: Mgr. Petra Jedináková

Konzultant: Prof. RNDr. Jan Hlaváč, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2016

Abstrakt: Působením oxidativního stresu, který patří mezi významné faktory přispívající ke vzniku řady často se vyskytujících onemocnění jako je např. rakovina, cukrovka a srdeční choroby, vznikají peroxylipidy obsahující ve své struktuře systém konjugovaných dvojných vazeb. Vhodně značené hydroxylaminové deriváty, které mohou být působením oxidačních činidel převedeny na nitrosoderiváty podléhající hetero-Diels-Alderově reakci s dieny, by pak mohly být použity pro přímé stanovení peroxylipidů. Cílem předložené práce bylo připravit hydroxylaminové deriváty nesoucí fluorescenční značku a studovat možnost jejich oxidace pomocí peroxidu vodíku a následné hetero-Diels-Alderovy reakce. Teoretická část práce je rozdělena do dvou hlavních částí, kde v první jsou popsány možné hetero-Diels-Alderovy reakce nitrososloučenin a ve druhé je popsána peroxidace lipidů, její mechanismu, možnosti stanovení a přímé důsledky na lidské zdraví. Část práce výsledky a diskuze se zabývá námi navrženou a provedenou přípravou hydroxylaminových derivátů, jejich následnými oxidacemi peroxidem vodíku a nitroso-Diels-Alderovými reakcemi, které vedly k přípravě osmi nových oxazinových derivátů. Nakonec byly popsány základní spektrální vlastnosti připravených hydroxylaminů.

Klíčová slova: peroxidace lipidů, hydroxylamin, oxidace, nitroso-Diels-Alderova reakce

Počet stran: 79

Počet příloh: 0

Jazyk: český

Bibliographical identification:

Author: Miloš Hollan

Title: The use of hydroxylamines for determination of peroxidic compounds

Type of thesis: Diploma

Department: Department of Organic Chemistry

Supervisor: Mgr. Petra Jedináková

Consultant: Prof. RNDr. Jan Hlaváč, Ph.D.

Year of presentation: 2016

Abstract: Oxidative stress, which belongs to important factors contributing to series of frequently occurring diseases such as eg. cancer, diabetes or heart diseases, is responsible for creating peroxylipids containing in their structure conjugated double bonds. Appropriately labelled hydroxylamine derivates, which can be oxidized to nitrosoderivates and react in hetero-Diels-Alder reaction with dienes, should be used for direct determination of peroxylipids. The aim of this work was to prepare hydroxylamine derivates carrying a fluorescent label and to study their possible oxidation by hydrogen peroxide and subsequent hetero-Diels-Alder reaction. The theoretical part is divided to two main parts. First part is focused on possibilities of hetero-Diels-Alder reaction of nitrosoderivates. The second part deals with lipid peroxidation mechanism, possibilities of peroxylipides establishment and their direct results to human health. The chapter results and discussion is focused on synthesis of hydroxylamine derivates, their oxidation by hydrogen peroxide and nitroso-Diels-Alder reactions, which lead to preparation of eight new oxazine derivates. The spectral properties of prepared hydroxylamines are described at the end of this chapter.

Key words: lipid peroxidation, hydroxylamine, oxidation, nitroso-Diels-Alder reaction

Number of pages: 79

Number of appendixes: 0

Language: Czech

Seznam zkratek

AcCN	Acetonitril
Boc-EDA	tercbutyl(2-aminoethyl)karbamát
COX	cyklooxygenáza
DBU	1,8-diazobicykloundec-7-en
DCC	<i>N,N'</i> -dicyklohexylkarbodiimid
DCM	dichlormethan
DIC	diisopropylkarbodiimid
DIEA	diisopropylethylamin
DMAP	4-dimethylaminopyridin
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
DNPH	2,4-dinitrofenylhydrazin
EDA	ethylendiamin
EDC*HCl	N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylkarbodiimid hydrochlorid
Ekv	ekvivalent
EtOH	ethanol
GC	plynová chromatografie
HATU	1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxid hexafluorophosphate
HDA	Hetero-Diels-Alderova reakce
HOBt	1-hydroxybenzotriazol
HPLC	vysoce účinná kapalinová chromatografie
LC	kapalinová chromatografie
LDL	low density lipoprotein
LOX	lipooxygenáza
m-CPBA	3-chlorperoxobenzoová kyselina
MeOH	Methanol
NCS	<i>N</i> -chlorsukcinimid
NDA	Nitroso-Diels-Alderova reakce
NMPI	N-methyl-2-fenylindol
PUFA	polynenasycené mastné kyseliny

Pyr	pyridin
Rho B	Rhodamin B
rt	pokojová teplota
TBAHS	tetrabutylammonium hydrogen sulfate
TBARS	2-Thiobarbituric acid reactive substances
TFA	trifluoroctová kyselina
UHPLC	ultra účinná kapalinová chromatografie
VLDL	very low density lipoprotein

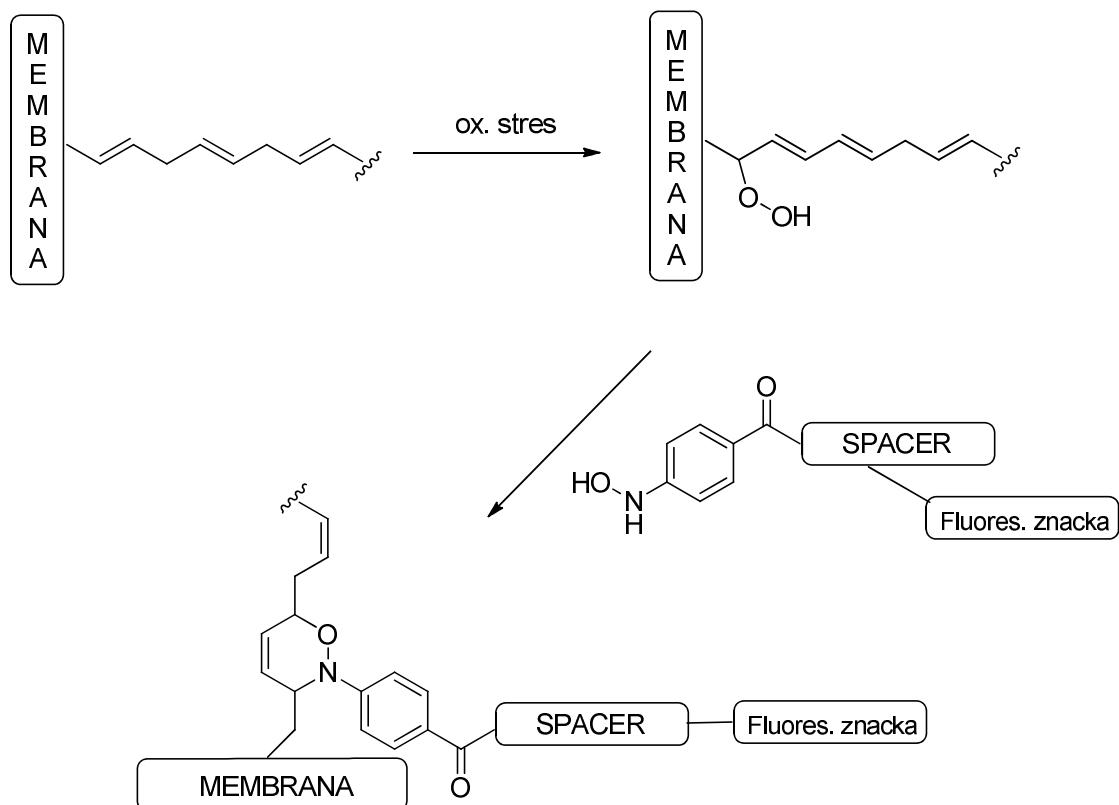
Obsah

1. Úvod.....	10
2. Cíle práce.....	12
3. Teoretická část.....	13
3.1. Hetero-Diels-Alderova reakce nitrososloučenin	13
3.1.1. Hetero-Diels-Alderova reakce	13
3.1.2. Nitroso-Diels-Alderova reakce.....	14
3.1.3. Asymetrická NDA.....	18
3.1.4. Intramolekulární NDA.....	21
3.1.5. Enantioselektivní NDA	22
3.2. Peroxylipidy	25
3.2.1. Mechanismus peroxidace lipidů	25
3.2.1.1. Enzymatická peroxidace lipidů.....	26
3.2.1.2. Neenzymatická peroxidace lipidů.....	27
3.2.2. Stanovení produktů peroxidace lipidů.....	29
3.2.2.1. TBARS	30
3.2.2.2. NMPI	31
3.2.2.3. DNPH	31
3.2.2.4. GC-MS	32
3.2.2.5. Analýza vzniklého pentanu	32
3.2.3. Důsledky peroxidace lipidů.....	33
3.2.3.1. Vliv peroxidace lipidů na vznik Alzheimerovy choroby.....	33
3.2.3.2. Vliv peroxidace lipidů na vznik Parkinsonovy choroby.....	34
3.2.3.3. Vliv peroxidace lipidů na vznik kardiovaskulárních onemocnění.....	34
3.2.3.4. Vliv peroxidace lipidů na vznik rakoviny	35
4. Výsledky a diskuze.....	36
4.1. Příprava hydroxylaminových derivátů značených rhodaminem B	37
4.1.1. Příprava rhodaminem B značeného hydroxylaminového derivátu odvozeného odkyseliny 4-fluor-3-nitrobenzoové	37
4.1.1.1. Příprava amidu kyseliny 4-fluor-3-nitrobenzoové	37
4.1.1.2. Substituce fluoru za hydroxylamin.....	40
4.1.1.3. Navázání rhodaminu B na ethylendiaminový linker.....	40
4.1.1.4. Příprava rhodamin B ethylendiaminu	44
4.1.1.5. Příprava hydroxylaminu značené 4-fluor-3-nitrobenzoové kyseliny	45
4.1.2. Příprava hydroxylaminového derivátu od kyseliny 6-fluornikotinové	46

4.1.2.1. Optimalizace syntézy amidu kyseliny 6-fluornikotinové	47
4.1.2.2. Příprava hydroxyaminového derivátu od kyseliny 6- fluornikotinové	48
4.2. Příprava hydroxylaminových derivátů značených fluoresceinem	50
4.2.1. Optimalizace podmínek navázání ethylendiaminu na fluorescein s využitím propylaminu.....	51
4.2.2. Příprava fluorescein ethylendiaminu.....	52
4.2.3. Příprava fluoresceinem značených amidů kyselin	53
4.2.3.1. Syntéza amidu 4-fluor-3-nitrobenzoové kyseliny	53
4.2.3.2. Syntéza amidu 6-fluornikotinové kyseliny.....	54
4.3. Oxidace hydroxylaminové skupiny a HDA	55
4.3.1. Optimalizace oxidace peroxidem vodíku.....	55
4.3.2. Příprava oxazinových derivátů.....	59
4.4. Spektrální vlastnosti	61
4.4.1. Fluorescenční vlastnosti	61
4.4.2. Absorpční vlastnosti	63
5. Experimentální část.....	65
5.1. Metody	65
5.2. Přípravy.....	65
6. Závěr.....	74
7. Seznam literatury	75

1. Úvod

Oxidativním stresem můžeme nazývat stav, kdy se v prostředí organismu tvoří velké množství volných kyslíkových radikálů, nebo lépe tzv. ROS (reactive oxygen species – reaktivních kyslíkových částic), tento název zahrnuje nejen volné radikály atomárního kyslíku, ale i radikály molekulárního kyslíku, hydroxylové radikály, peroxidické radikály, superoxydy atd. Definici oxidativního stresu odpovídají i stavy, kdy v organismu selhávají mechanismy k odstraňování zplodin oxidativního stresu.¹



Obrázek 1: Vznik peroxy lipidů s konjugovanými dvojnými vazbami

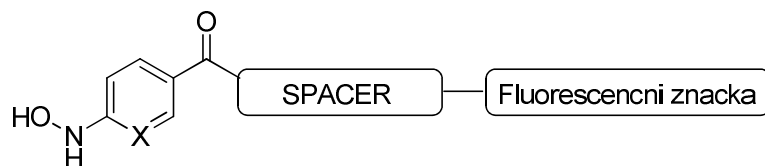
V posledních desetiletích byla objevena řada souvislostí mezi oxidativním stresem a nejrozšířenějšími onemocněními ve vyspělých zemích (příkladem mohou být onemocnění centrální nervové soustavy, onemocnění oběhové soustavy, cukrovka a dokonce i některé druhy rakoviny). Z tohoto důvodu je vhodné mít nástroje pro stanovení míry poškození oxidativním stresem.¹

Jedním z prostudovaných destruktivních mechanismů oxidativního stresu je tvorba tzv. peroxy lipidů. Peroxy lipidy vznikají reakcí kyslíkových radikálů s mastnými kyselinami obsaženými v buněčných membránách; současně dochází k přeměně izolovaného systému dvojných vazeb na systém konjugovaný (Obrázek 1).¹

Současné metody pro určení míry peroxidace mastných kyselin jsou založeny zejména na stanovení množství rozkladných produktů vznikajících z peroxylipidů. Oproti tomu vhodně označené hydroxylaminové sloučeniny mohou být působením peroxylipidů oxidovány na odpovídající nitrososloučeniny, které mohou následně podléhat hetero-Diels-Alderově reakci s konjugovaným systémem dvojných vazeb peroxylipidu za vzniku oxazinového cyklu. Tato metoda by pak mohla sloužit pro přímé stanovení peroxylipidů v organismu.

2. Cíl práce

Cílem předložené diplomové práce bude syntéza hydroxylaminových derivátů vhodně značených fluorescenční značkou (Obrázek 2).



X = N, C-NO₂

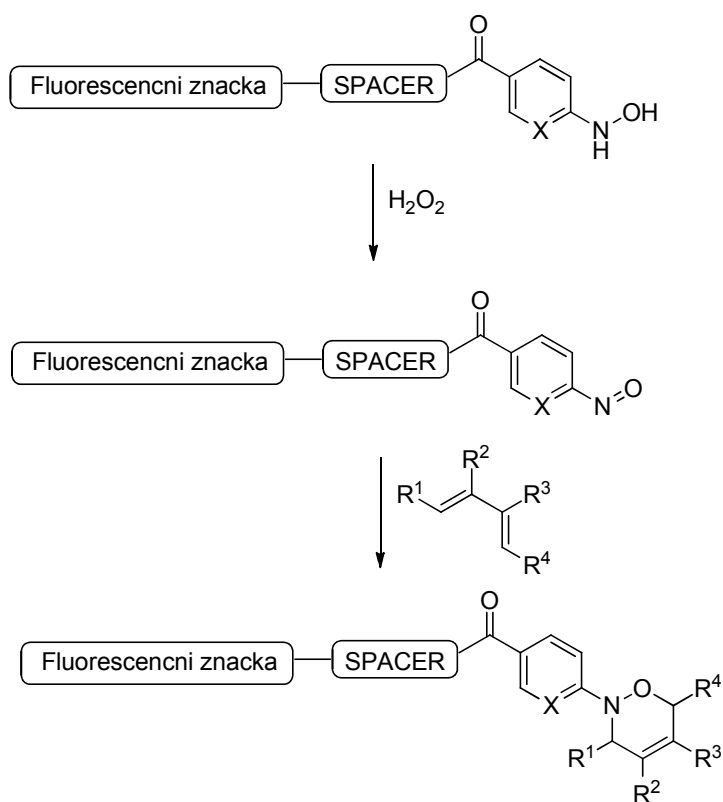
SPACER = ethylendiamin

Fluorescenční značka = Rhodamin B, Fluorescein

Obrázek 2: Obecná struktura značeného hydroxylaminového derivátu

U připravených derivátů budou následně studovány tyto vlastnosti:

- Spektrální vlastnosti připravených hydroxylaminů
- Oxidovatelnost hydroxylaminové skupiny peroxidem vodíku (Obrázek 3)
- Reaktivita vzniklé nitrososkupiny s konjugovanými dieny (Obrázek 3)
- Příprava a izolace jednotlivých oxazinů



Obrázek 3: Ukázka možnosti oxidace a nitroso-Diels-Alderovy reakce

3. Teoretická část

Teoretická část předložené diplomové práce bude rozdělena na dvě dílčí části. V první části budou shrnuty dosud popsané poznatky týkající se hetero-Diels-Alderových reakcí nitrososloučenin. Druhá část bude pojednávat o možnostech peroxidace mastných kyselin, o vlastnostech a možnostech identifikace vzniklých peroxy lipidů.

3.1 Hetero-Diels-Alderovy reakce nitroso sloučenin

Pokud mluvíme o hetero-Diels-Alderových reakcích, nemůžeme opomenout vysvětlení pojmu Diels-Alderova reakce.

Obecně se jedná o [4+2] cykloadiční reakci, kdy do reakce vstupuje konjugovaný dien a dienofil. Produktem reakce je cyklohexen či příbuzné deriváty. Reakce byla prvně provedena v roce 1928 dvojicí Otto Diels a Kurt Alder. Jako výchozí látky pro reakci byl použit cyklopentadien (jako dien) a 1,4-benzochinon **I** (jako dienofil), kdy reakce probíhá do druhého stupně (Schéma 1). Reakce se využívá při syntéze šestičlenných cyklů s možností různé substituce.²

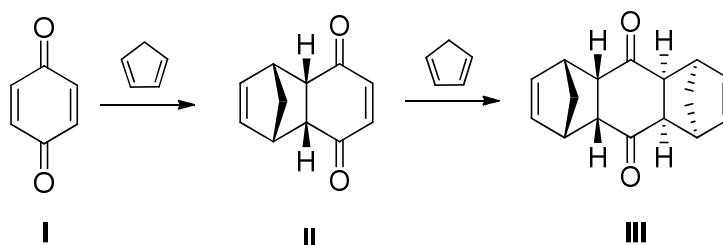


Schéma 1: Diels-Alderova reakce chinonu **I** s cyklopentadienem²

3.1.1. Hetero-Diels-Alderovy reakce

Jak již název napovídá, hetero-Diels-Alderova reakce je taktéž [4+2] cykloadiční reakce, ve které se vyskytuje alespoň jeden heteroatom v molekule dienu či dienofilu. Nejčastěji se vyskytující heteroatomy jsou dusík a kyslík (z důvodu použití HDA reakcí při syntéze biologicky aktivních látek). Příkladem může být tzv. Aza-Diels-Alderova reakce využívající iminů **IV** jako dienofilů v reakci s dieny **V**, kdy dochází ke vzniku různě substituovaných tetrahydropyridinů **VI** (Schéma 2).³

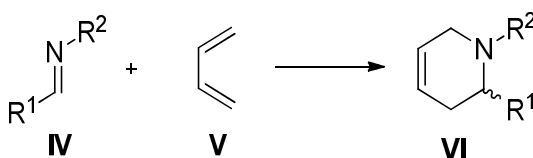


Schéma 2: Příklad aza-Diels-Alderova reakce³

Dalším příkladem jsou tzv. oxo-diels-Alderovy reakce, kdy se využívá karbonylových sloučenin **VII** jako dienofilů v reakci s dieny **VIII**. Produkty těchto reakcí jsou různě substituované dihydropyranové cykly **IX** (Schéma 3).⁴

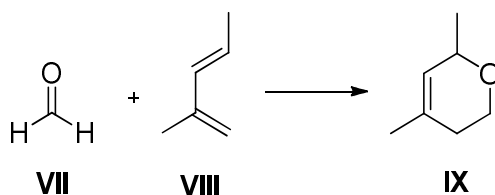


Schéma 3: Příklad oxo-Diels-Alderova reakce⁴

3.1.2. Nitroso-Diels-Alderovy reakce

Nitrososloučeniny jsou vysoce reaktivní a užitečné dienofily pro hetero-Diels-Alderovu reakci. Tato reakce (Schéma 4) umožňuje jednoduchý jedнокrokový přístup k cenným 3,6-dihydro-1,2-oxazinonovým sloučeninám **XII**. Takto získané látky mohou sloužit například k přípravě 1-amino-4-hydroxyenů **XIII**, které mohou být použity jako intermediáty pro širokou škálu následných reakcí, zejména v organické syntéze biologicky aktivních látek např.: Mannostatinu⁵ A či Lycoricidinu⁶.

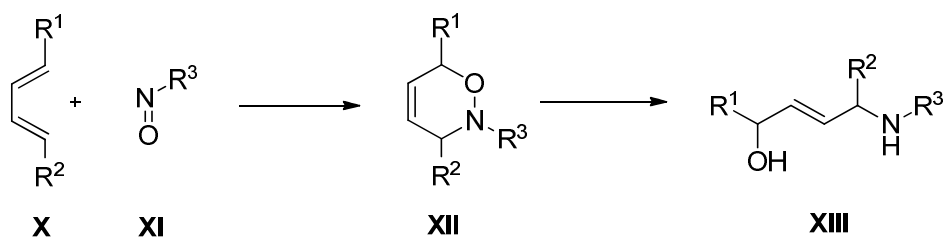
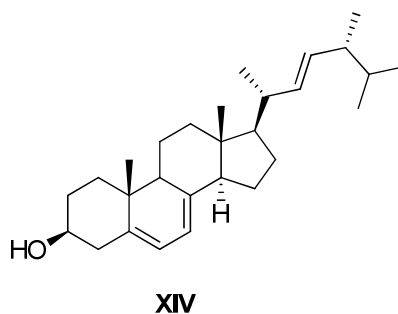


Schéma 4: Nitroso-Diels-Alderova reakce

Velice zajímavé je i využití nitroso-Diels-Alderovy reakce pro úpravu přírodních látek obsahujících konjugovaný systém dvojných vazeb.

Výborným příkladem může být syntéza derivátů ergosterolu **XIV** (Obrázek 4), který je nejen důležitým provitaminem živočichů, ale i nedílnou součástí metabolismu hub, u kterých se podílí se na stavbě jejich buněčné stěny. Výskyt v buněčné stěně hub ve spojení s jeho absencí v živočišné, dělá z ergosterolu vhodný cíl pro antifungální terapii⁷.



Obrázek 4: Ergosterol⁷

Výchozí hydroxámové kyseliny **XVa-f** byly získány reakcí příslušných anhydridů či esterů kyselin s hydroxylaminem. Následná oxidace hydroxylaminové skupiny na nitrososkupinu **XVIa-f** byla provedena pomocí tetrabutylamonium perjodátu v přítomnosti ergosterol acetátu.⁸ Tato reakce poskytuje 5R-N-8R-O-adykty **XVIIa-f** s příslušnou substitucí ve výtěžcích okolo 25% v případě substitucí **a** a **b** a ve výtěžcích okolo 95% v případě substitucí **c-f** (Schéma 5). V případě derivátů **XVIa** a **XVIb** docházelo současně se vznikem oxazinového produktu **XVIIa,b** i ke vzniku dioxazinového vedlejšího produktu **XVIIIa,b** (výsledek sigmatropního přesmyku). U ostatních substituentů nebyl vedlejší produkt detekován.⁷

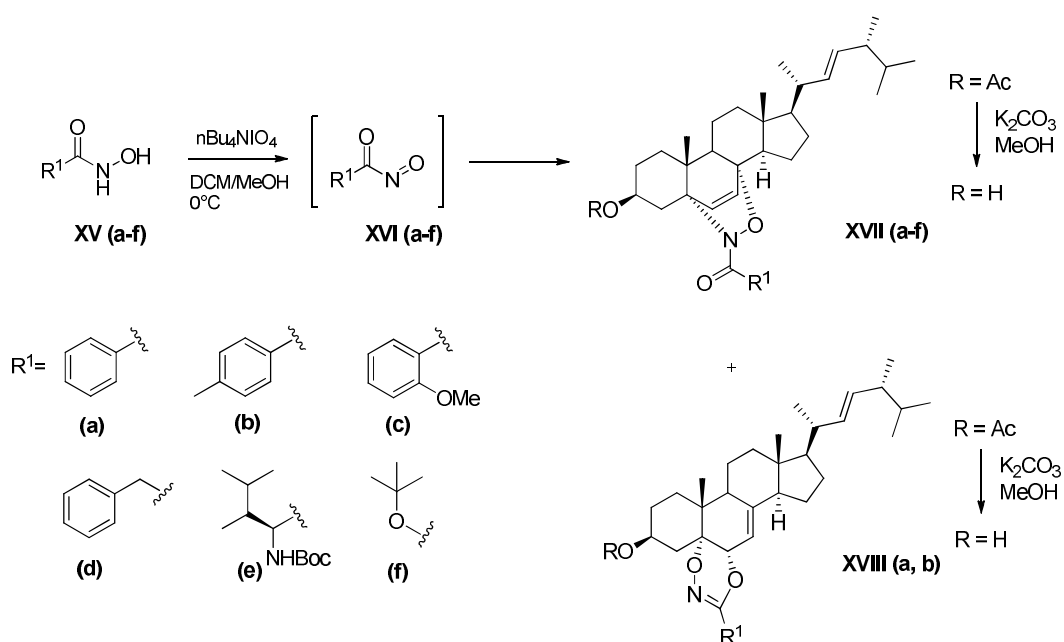


Schéma 5: Příprava různých derivátů ergosterolu⁸

Nitroso-Diels-Alderova reakce s ergosterolem byla rovněž provedena s nitrosobenzenem. V reakční směsi byl sice detekován produkt, který se ale nepodařilo z reakční směsi izolovat.⁷ Dále byla reakce provedena na iminonitrososloučeninách, hlavně na 2-nitrosopyridinových derivátech **XX** (Schéma 6). Výtěžky produktů **XXI (a-k)** se pohybovaly v rozmezí 82-98%. Příslušné nitrosoderiváty **XX** byly připraveny z aminoheterocyklických sloučenin **XIX** ve dvou krocích (nejprve příprava *N,N*-dimethylsulfiliminového intermediátu a následná oxidace pomocí *m*-CPBA) a následně podrobeny reakci s ergosterol acetátem.⁷

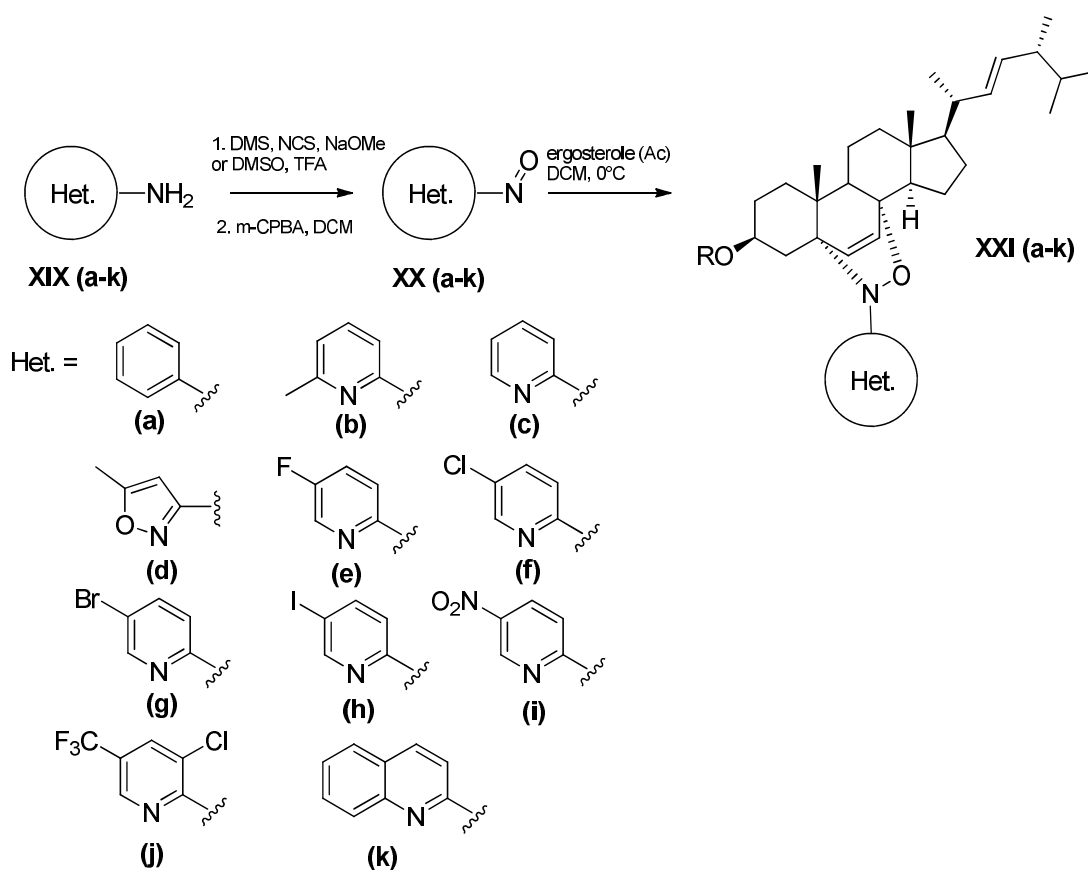


Schéma 6: Příprava derivátů ergosterolu s heterocykly⁷

Některé z připravených oxazinů **XXI** byly následně podrobeny štěpení N-O vazby za vzniku sloučenin **XXII** (Schéma 7), což vede k dalším možnostem modifikace těchto molekul. Po optimalizaci byla zvolena metoda za využití sodného amalgámu jako redukčního činidla.⁹

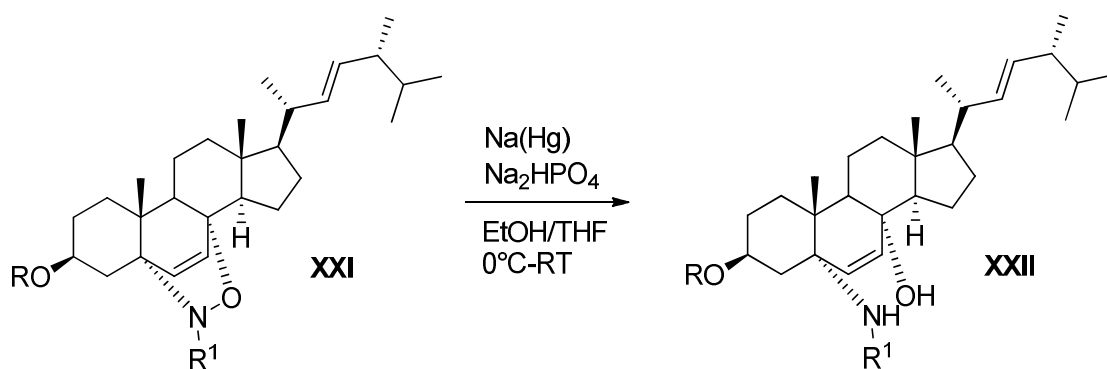
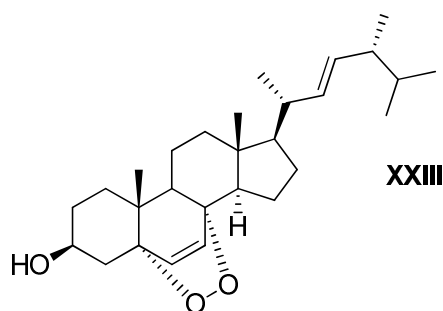


Schéma 7: Štěpení N-O vazby oxazinů **XXI**⁹

Dalším cílem bylo vytvořit derivát podobný ergosterol peroxidu **XXIII** (Obrázek 5). Ten je přírodním sterolovým derivátem s velkou a pestrou biologickou aktivitou jako je např.: antitumorová a imunosupresivní aktivita¹⁰. Jednoduchým odstraněním Boc skupiny z aduktu **XVII f** dostáváme izoelektronový analog **XXIV** ergosterol peroxidu (Schéma 8).⁷



Obrázek 5: Ergosterol peroxid⁴

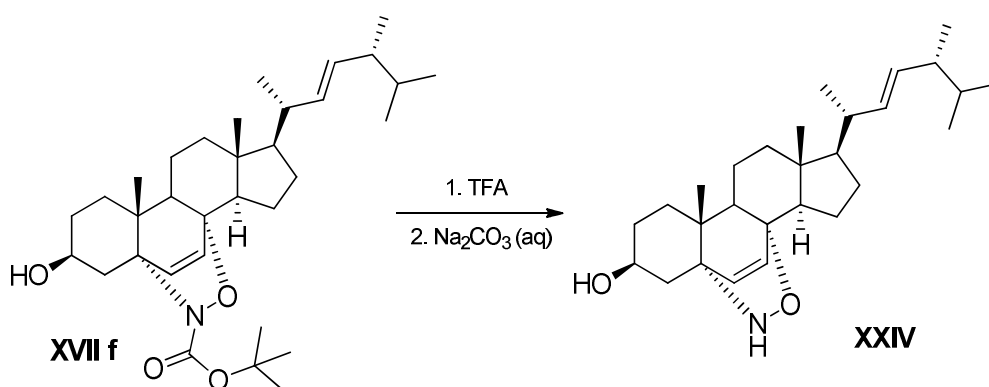


Schéma 8: Příprava analogu ergosterol peroxidu **XXIV**¹⁰

3.1.3. Asymetrické nitroso-Diels-Alderovy reakce

Intermediáty získané asymetrickou nitroso-Diels-Alderovou reakcí s 1,3-cyklodieny jsou atraktivními prekurzory pro cyklické polyhydroxy sloučeniny. Příkladem může být využití této reakce pro syntézu (+)-6-epitrehazolinu **XXVIII** (Schéma 9), kdy reakcí [(benzyloxy)methyl]cyklopentadienu **XXV** s nitrosoderivátem (S)-mandlové kyseliny **XXVI** vzniká intermediát podléhající rozštěpení vazby N-O pomocí sodíkového amalgámu. Dalším kroky je dosaženo finálního produktu **XXVIII**.¹¹

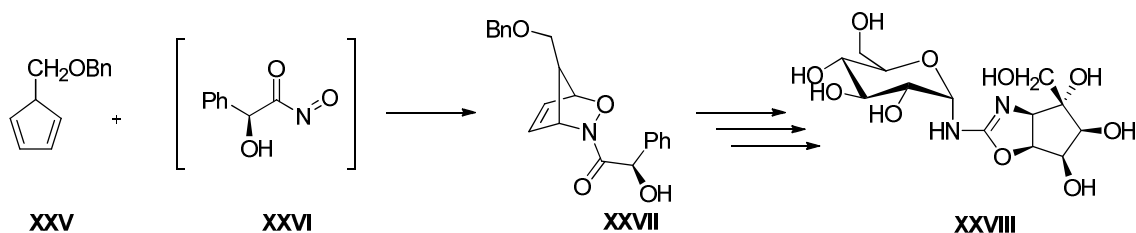


Schéma 9: Syntéza (+)-6-epitrehazolinu¹¹

Použití symetricky substituovaných symetrických dienů pro nitroso-Diels-Alderovy reakce může poskytovat více stereocenter v jednom reakčním kroku. Tohoto faktu bylo využito při syntéze (+)-calysteginu B₂ **XXXII**, který je potenciálním inhibitorem β -glukosidázy a α -galaktosidázy (Schéma 10).¹² Reakcí příslušného substituovaného cykloheptadienu **XXIX** s cukerným α -chlornitrosoderivátem **XXX** dochází ke vzniku produktu **XXXI** s kompletním diastereoselektivním pokrytím všech stereocenter.¹³ Další transformace již vedou k finálnímu produktu **XXXII**.

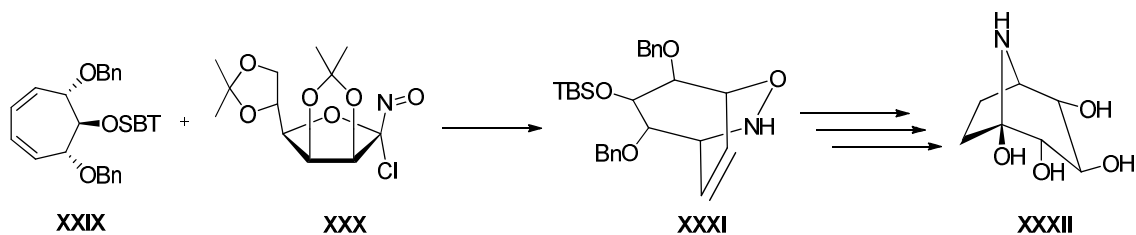


Schéma 10: Syntéza (+)-calysteginu B₂¹³

Adukt **XXXI** vzniklý nitroso-Diels-Alderovou reakcí 1,3-cyklohexadienu je taky vhodným prekurzorem pro syntézu 7-azabicyclo[2.2.1]-heptanových derivátů.¹³

Na schématu 11 vidíme totální syntézu (-)-epibatidinu **XXXVI**¹⁴ s využitím asymetrické nitroso-Diels-Alderovy reakce s N-acylnitrosodienofilem **XXXIII** odvozeným od mentolu.¹⁵ Reakce s 2-chloro-5-(1,5-cyclohexadienyl)pyridinem **XXXIV** poskytuje meziprodukt se správnou diastereo selektivitou **XXXV**. Následnými reakcemi dosáhneme produktu **XXXVI**.⁷

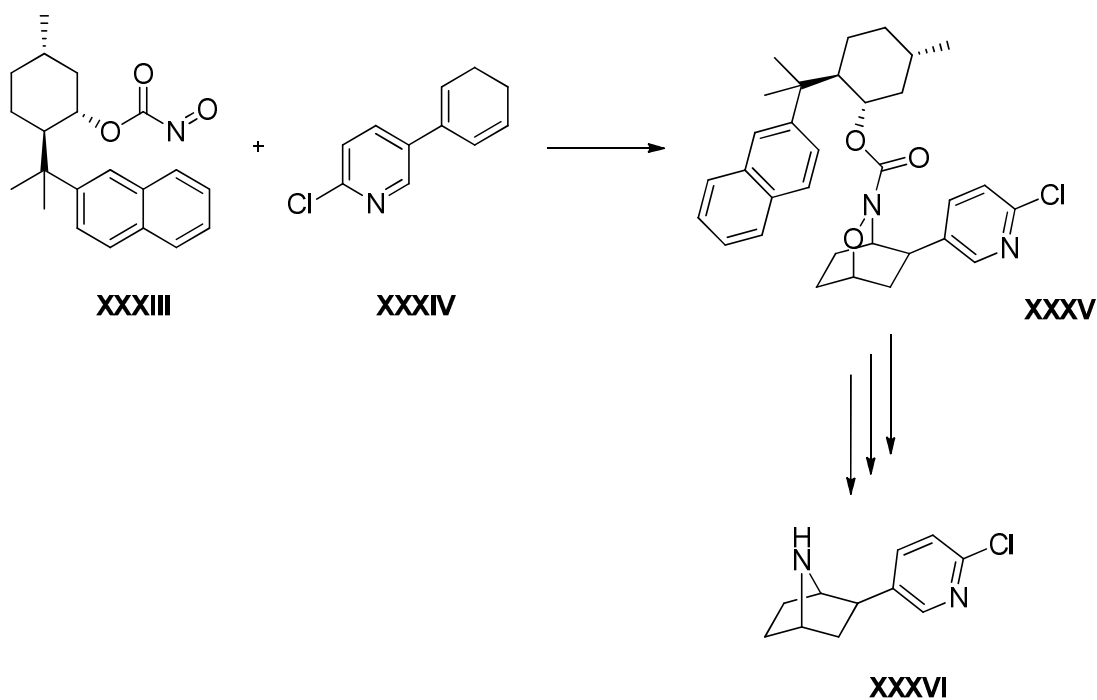


Schéma 11: Příprava (-)-epibatidinu¹⁴

Zajímavostí může být metoda enzymatického rozdělení aminocyklopentanolových produktů acylnitroso-Diels-Alderovy reakce,¹⁶ které bylo využito při kinetickém dělení racemického (\pm)-*cis*-4-aminocyclopent-2-en-1-olu **XL** pomocí imobilizovaného enzymu z *C. Antartica B* (Schéma 12). Čisté enantiomery (-)-acetátu **XLII** a (-)-alkoholu **XLI** byly získány rekrystalizací.¹⁷

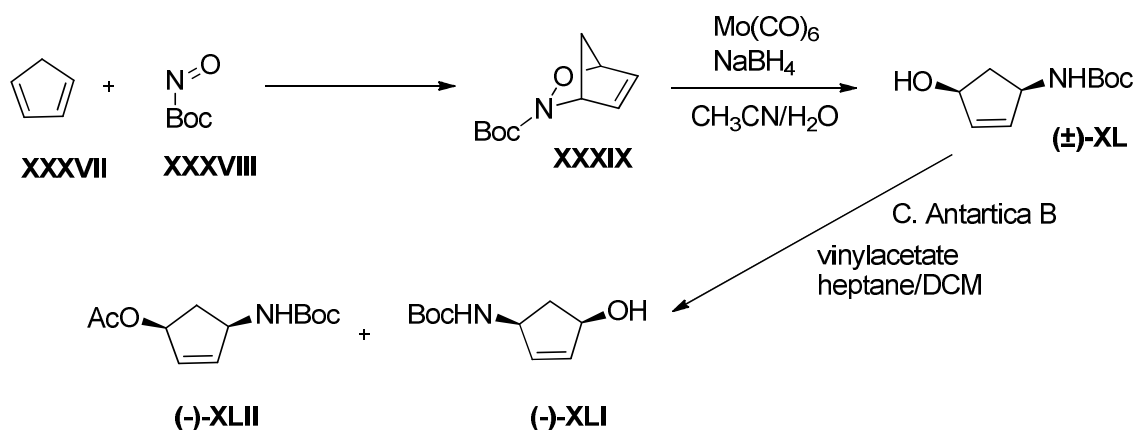


Schéma 12: Dělení racemátů za využití bakteriálních enzymů¹⁶

Využití takto získaného amino alkoholu může být demonstrováno na jednoduché syntéze (+)-streptazolinu **XLV** (Schéma 13), který byl syntetizován z **XLI**.¹⁸

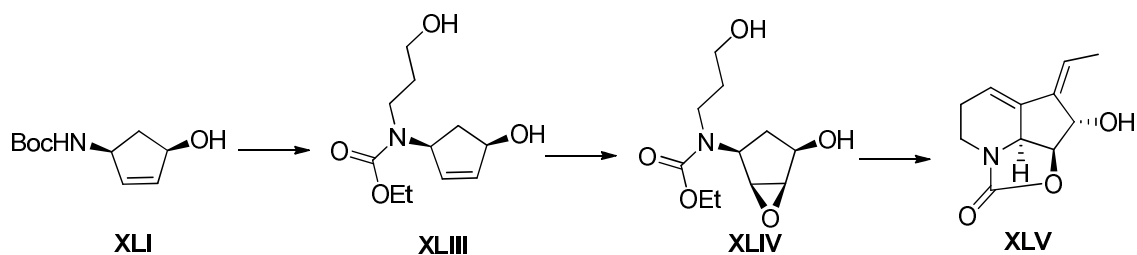


Schéma 13: Syntéza (+)-streptazolinu¹⁸

Zajímavá je též reakce vedoucí k D-5 a D-6 aminoallosovým derivátům. Tyto deriváty, např.: nojirimycin, vykazují schopnost inhibovat glykosidázy. Jejich funkce spočívá v blokování enzymů, jejichž přirozeným substrátem jsou příslušné pyranózy. Konkrétně nojirimycin, který je 5-azaderivátem D-glukopyranózy, silně inhibuje α a β -glykosidázy.¹⁹ Jejich syntéza je uvedena ve schématu 14.

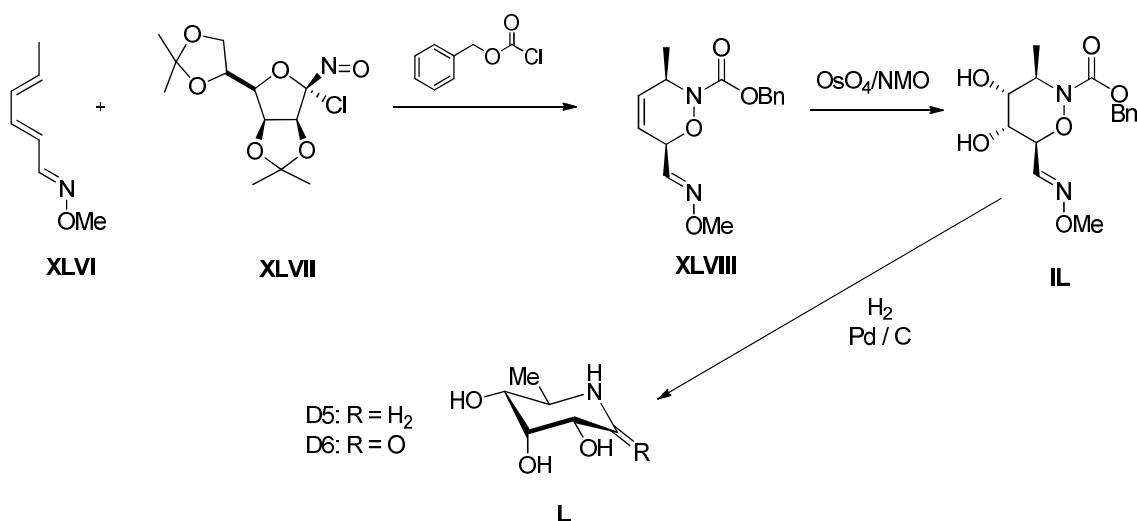


Schéma 14: Syntéza nojirimycinu¹⁹

Při reakci chirálního nitrosodienofilu **XLVII** s dieny s vázanou methoxyoximovou skupinou **XLVI** (jsou zastoupeny jak EE tak EZ izomery) dochází primárně ke vzniku cis izomeru produktu až z 80%.²⁰ Dále je celá reakční směs podrobena reakci s benzylchloromravenčanem, což poskytne meziprodukt **XLVIII**. Působením oxidu osmičelého za přítomnosti *N*-methylmorfolinu jako reoxidantu vzniká substituívaný cis glykol **IL** (trans izomer nereaguje).¹⁹ Následnou redukcí vodíkem vzniká D5 produkt **L**. Syntéza D6 derivátu probíhá obdobně, s rozdílem ve struktuře výchozího dienu **XLVI**, který má namísto oximové skupiny navázanou COOMe skupinu.¹⁹

3.1.4. Intramolekulární nitroso-Diels-Alderova reakce

Tato reakce je cennou metodou pro syntézu látek obsahujících ve své molekule piperidinový nebo pyrrolidonový cyklus se stereocentry.

Z literatury je známo mnoho příkladů použití chirálních substrátů v asymetrické syntéze přírodních látek, diastereoselektivních je známo méně. Jako příklad diastereoselektivní syntézy může posloužit totální syntéza (-)-lepadinů A, B a C (Schéma 15),²¹ kdy reakcí chirální sloučeniny **LI** dochází ke vzniku bicyclo[4.4.0]1,2-oxazinů **LIII** a **LIV**. Při použití H₂O / DMF v poměru 50:1 jako rozpouštědla, dochází primárně ke vzniku žádaného izomeru **LIII** a to v poměru 6,6:1, při výtěžku cca 90%. Dalšími kroky bylo dosaženo finálních produktů **LV**.²²

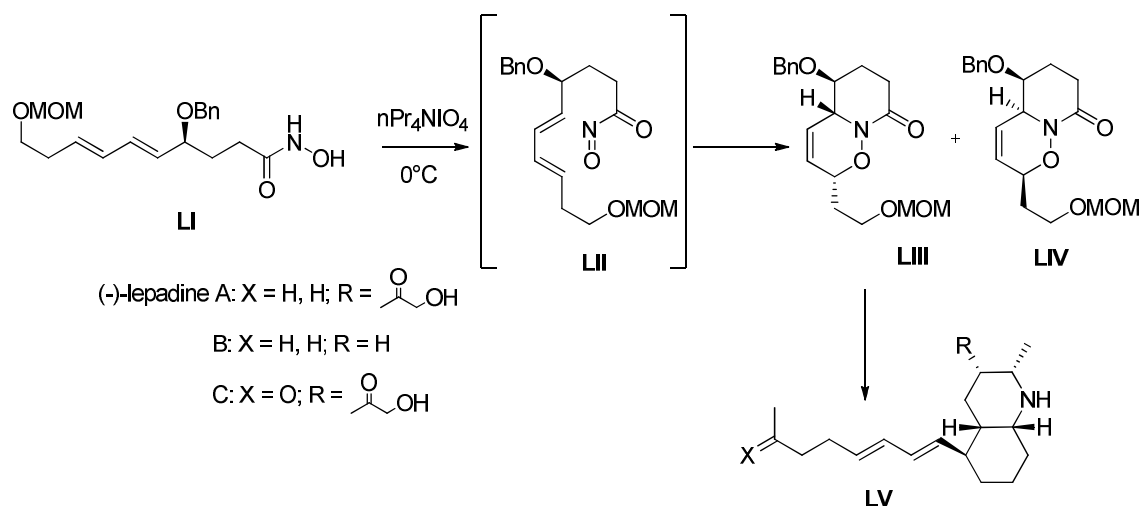


Schéma 15: Syntéza lepadinů²²

Bohužel diastereoselektivita nefunguje ve vodném prostředí pokaždé stejně, čehož důkazem může být syntéza (+)-lolinu (Schéma 16).²³ Ve vodných roztocích nedocházelo ke vzniku primárně žádaného izomeru nebo reakce probíhala ve prospěch nežádoucího izomeru **LIX**. Nejlepší možností se ukázalo použití benzenu, kde docházelo ke vzniku 71% žádaného izomeru **LVIII**.

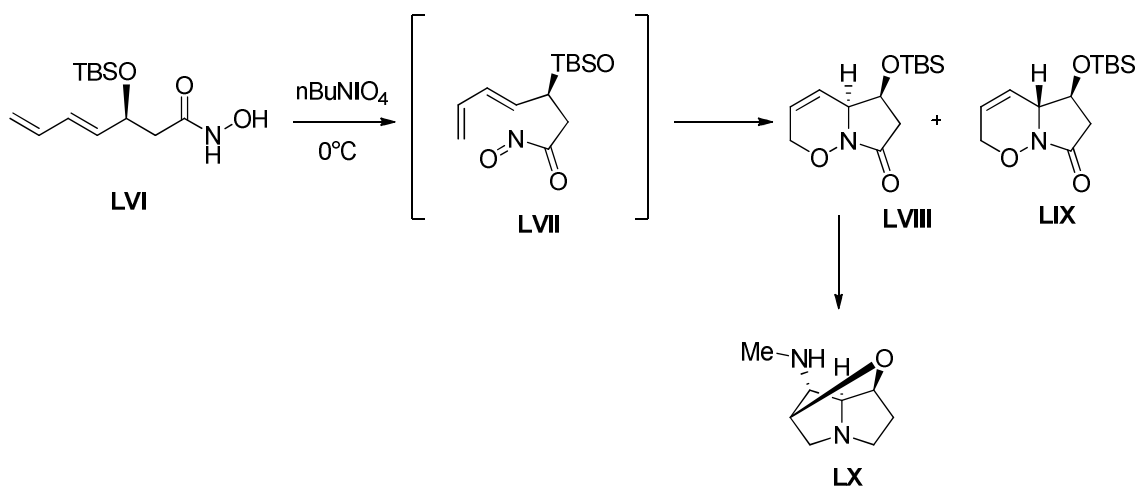


Schéma 16: Synteza (+)-lolinu²³

3.1.5. Enantioselektivní nitroso-Diels-Alderova reakce

Tento typ reakcí byl dlouhou dobu považován za téměř nemožný. Důvodem je velmi vysoká reaktivita nitrososloučenin, které podléhají 1,3 cykloadici s dieny i bez aktivace. Z vysoké reaktivity logicky vyplývá prakticky nemožnost jejich dlouhodobého uchovávání. Na druhou stranu např. acylnitroso sloučeniny lze velmi snadno získat *in situ* oxidací příslušných hydroxamových kyselin, které jsou nesrovnatelně stabilnější.²⁴

První enantioselektivní nitroso-Diels-Alderova reakce byla zveřejněna v roce 2003 (Schéma 17) a využívala stechiometrického množství zinečnatého komplexu esteru kyseliny vinné.²⁵ Dvoujaderný zinečnatý komplex a (cyklohex-1,3-dienyl)methanol vytvoří zinečnatý alkoxid **LXIII**, který dále reaguje s nitrosobenzenem poskytující produkt **LXIV** s odpovídající diastereoselektivitou ve výtěžku 94%.²⁶

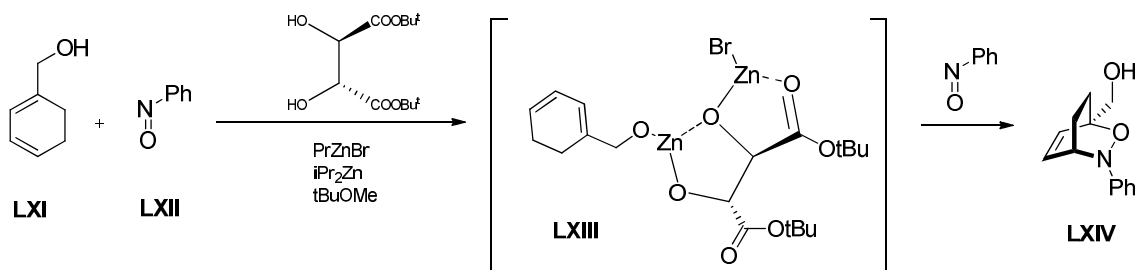


Schéma 17: První enantioselektivní NDA reakce²⁶

Pro poskytnutí produktu enantioselektivní nitroso-Diels-Alderovy reakce je nezbytné, aby došlo k chelataci nitrososloučenin s vhodným ligandem.²⁷

Reakce 6-methyl-2-nitrosopyridinu **LXVI** s cyklickým 1,3 dienem **LXV** byla provedena v přítomnosti měďného komplexu (S)-SEGPHOS (Schéma 18). Příslušné produkty reakce byly získány ve vysokém výtěžku okolo 99% a enantiomerní čistotě přes 90%. V tomto případě vzniká chelatací substituovaného pyridinu **LXVI** monomerní nitrosopyridin-katalyzátorový komplex **LXVII**, který neprodleně reaguje s dienem za vzniku příslušného produktu reakce **LXVIII**.²⁷

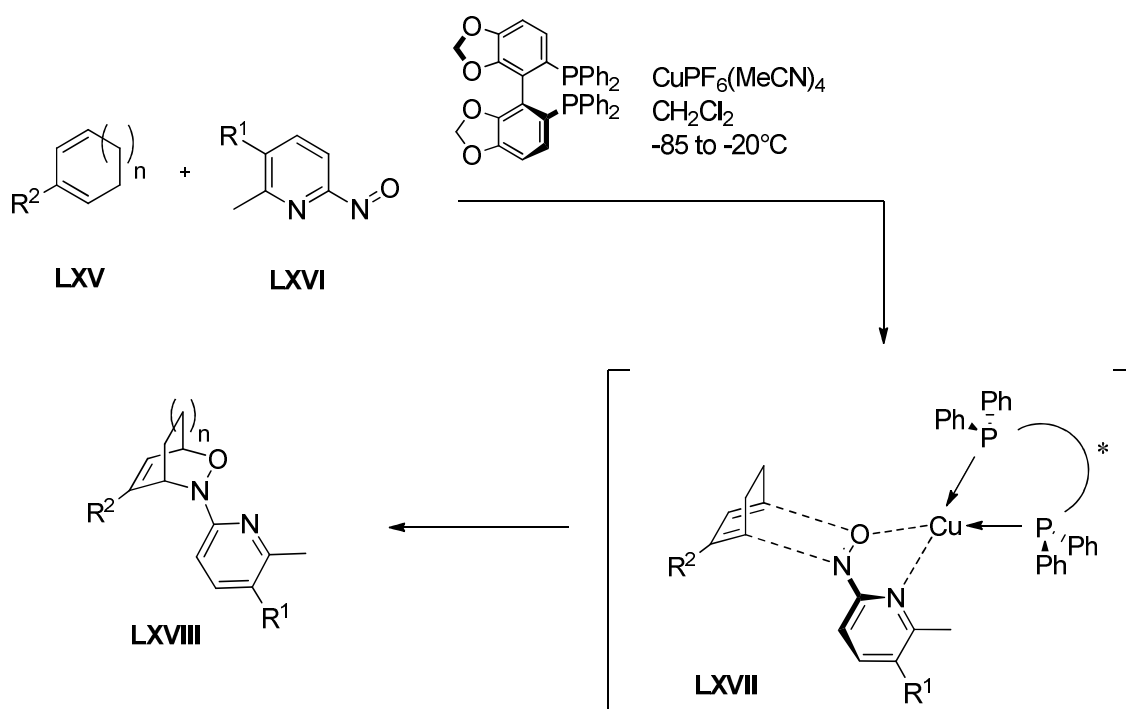


Schéma 18: Měďným komplexem katalyzovaná enantioselektivní NDA reakce²⁷

Také 6-methyl-2-nitrosopyridin **LXX** reaguje s alifatickým 2-triisopropylsilyloxy(OTIPS)-1,3-butadienem **LXIX** poskytující příslušný produkt **LXXI** s výtěžkem přes 90% a s vynikající regio a enantioselektivitou ($>95\%$).²⁷ V této reakci byl pro katalýzu použit (S)-DIFLUORPHOS (Schéma 19), se kterým bylo dosaženo lepších výsledků, než s výše zmiňovaným (S)-SEGPHOSem¹⁵. Dieny odvozené od OTIPS vykazovaly vyšší aktivitu a enantioselektivitu než odpovídající trimethylsilyloxy-(OTMS) nebo terc-butyldimethylsilyloxy-(OTBDMS) dieny. Vysoká reaktivita pramení z objemnosti triisopropylsilylskupiny (TIPS), která nutí dien k přijetí s-cis konformace ve prospěch koordinované [4+2] cykloadice.²⁸

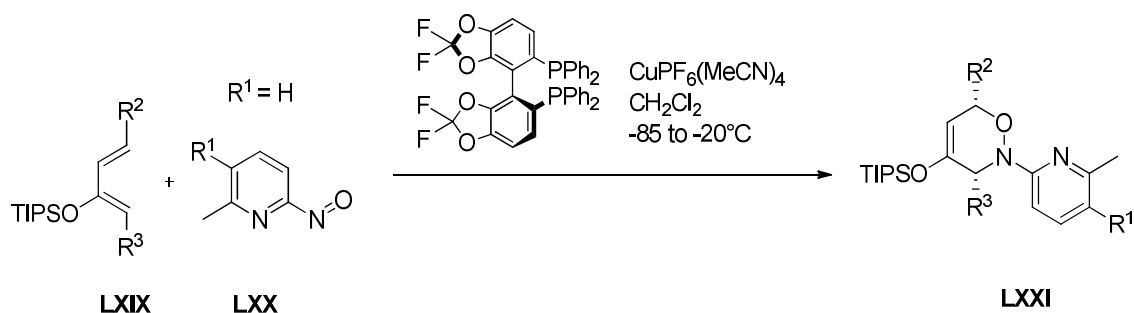


Schéma 19: Reakce s využitím OTIPS skupiny a (S)-SEGPHOS²⁸

Pokud je následující reakce 2-nitrosopyridinu **LXXIII** s racemickým dienem **LXXII** provedena za využití chirálního měďného komplexu s Walphos-CF₃, dochází ke vzniku pouhých dvou izomerů z osmi možných (Schéma 20).²⁹ Produkty **LXXIV** a **LXXV** jsou získány ve vysokém výtěžku (>95% pro produkt **LXXIV** a okolo 50% pro **LXXV**) s vysokou enantioselektivitou (>90% pro oba produkty). Zejména využití stericky bráněného substituentu, např.: arylů, úplně potlačí vznik ostatních izomerů.²⁹

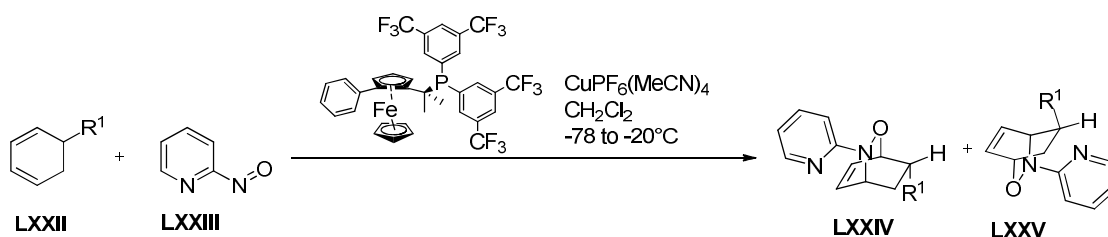


Schéma 20: Reakce s využitím Walphos-CF₃²⁹

Tato metoda se osvědčila při totální syntéze (+)-trans-dihydronarciclasinu **LXXVIII** s potenciálním protinádorovým a antivirotickým účinkem.³⁰ Reduktivní rozštěpení vazby N-O aduktu **LXXVI** pomocí Mo(CO)₆ a NaBH₄, provázené diastereoselektivní dihydroxylací a ochráněním vzniklých hydroxy skupin, poskytuje produkt **LXXVII**. Pyridylová skupina této látky je odstraněna kvarterizací s methyl triflátem a následnou bazickou hydrolyzou. V následných pěti krocích dostáváme (+)-trans-dihydronarciclasin **LXXVIII** (Schéma 21).³¹

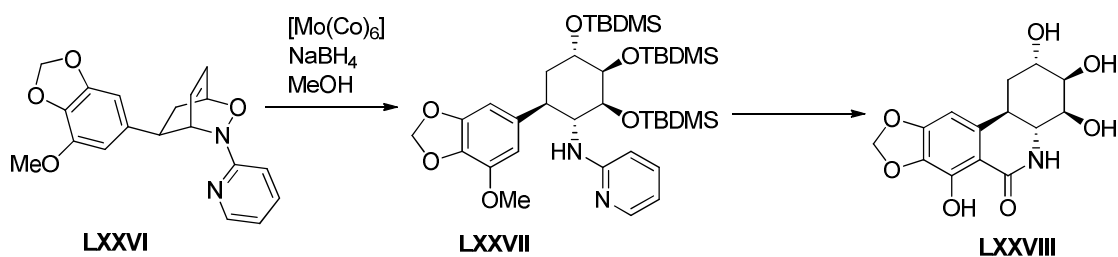


Schéma 21: Syntéza (+)-trans-dihydronarciclasinu³¹

3.2. Peroxylipidy

Peroxidace lipidů může být zhruba definována jako proces zavádění hydroperoxidické skupiny do molekuly lipidů.³² Polynenasycené mastné kyseliny (PUFA) vyskytující se ve fosfolipidech, glycerolipidech a cholesterolu, nepostradatelných součástech buněčné membrány, jsou nejčastější cíle peroxidace. Další důležitou funkcí fosfolipidů je jejich role zásobárny výchozího materiálu pro signální molekuly (oxidované deriváty volných mastných kyselin apod.). Peroxidická skupina má svůj původ v molekule kyslíku nebo peroxidu vodíku.³² Polynenasycené mastné kyseliny obsahují dvě a více izolovaných dvojných vazeb, oddělených methylenovými můstky. Allylické vodíky, vázané na uhlících sousedících s dvojnou vazbou, jsou velmi snadno odštěpitelné a tím činí tyto uhlíky velmi náchylné k peroxidaci.³² Jak již bylo řečeno výše, nenasycené mastné kyseliny jsou díky své vysoké flexibilitě nedílnou součástí buněčné stěny (tvoří až 50% všech mastných kyselin ve stěně).³³ V lidském organismu je zastoupeno široké spektrum polynenasycených mastných kyselin, které se v různých typech tkáně vyskytují v různé koncentraci. Například, ω -6 polynenasycené mastné kyseliny (hlavně arachidonová a linolenová) je možné detekovat napříč membránami napříč celým organismem, na druhou stranu ω -3 polynenasycené mastné kyseliny (hlavně dokosahexaenová kyselina) se vyskytují v kůře mozku a tkanivu nervového systému. Ona všudypřítomnost polynenasycených mastných kyselin je jedním z důvodů jejich tak častého poškození oxidativním stresem.

Oxidované lipidové mediátory jsou nezbytné pro udržování homeostatické rovnováhy v lidském organismu. Bohužel zvýšená produkce těchto molekul a s tím související vyčerpání zásoby antioxidantových rezerv vede k zánětu nebo programované buněčné smrti.³⁴ Vedle místních projevů peroxidace, jako jsou změny v propustnosti, integritě a funkčnosti buněčné stěny jsou produkty peroxidace aktivní v iniciování sekundární buněčné imunitní odpovědi.³⁵

3.2.1. Mechanismus peroxidace lipidů

Běžně popisovaný řetězový mechanismus peroxidace polynenasycených mastných kyselin obsahuje tři základní kroky a to: iniciaci, prolongaci a terminaci (Schéma 22). Iniciací je vlastně odštěpení vodíku z allylického uhlíku a vytvoření radikálu lipidu. Poté dochází k přesmyku, při kterém molekula zaujme výhodnější postavení konjugovaného dienu (radikálu konjugovaného dienu). Takto vzniklý radikál následně přitahuje rozpuštěný kyslík ze svého okolí a dochází k formování peroxylipidového radikálu.

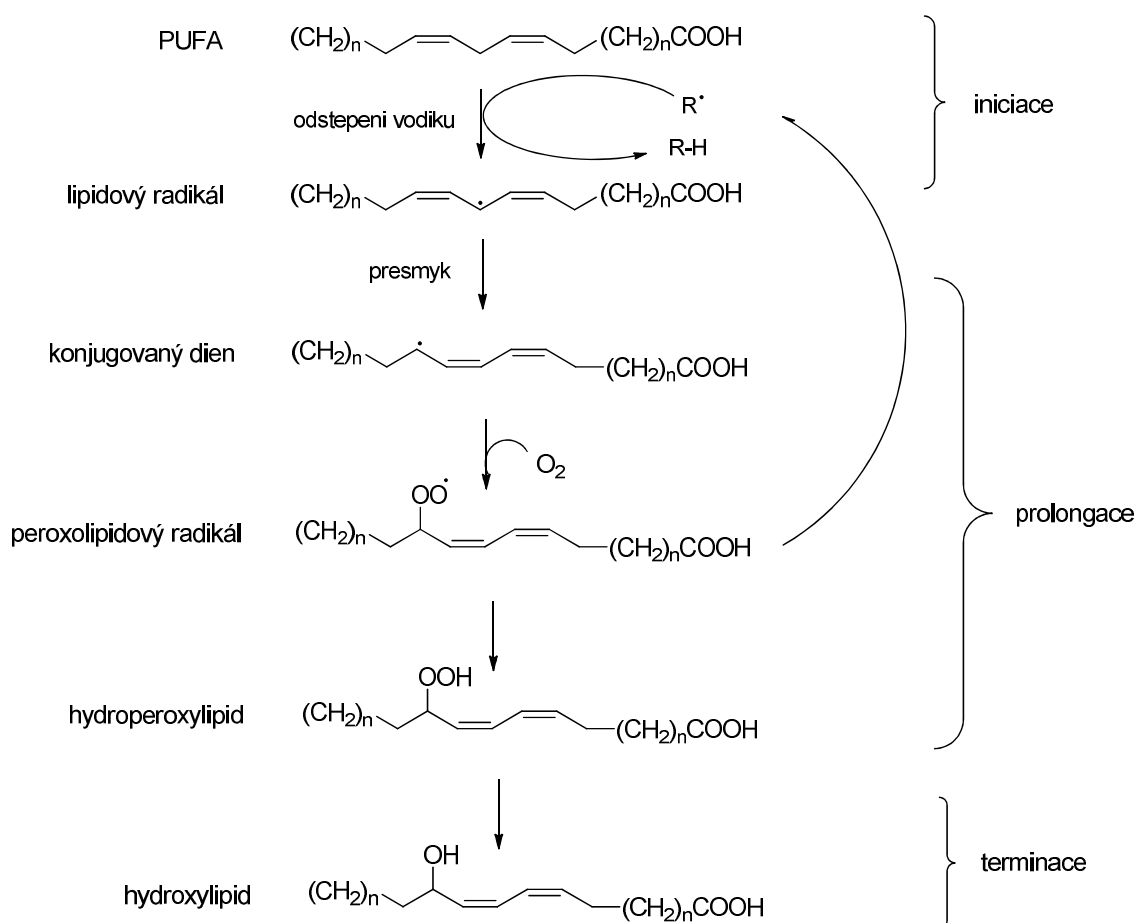


Schéma 22: Mechanismus peroxidace lipidů^{36,37,38}

Peroxylipidový radikál následně iniciuje další odštěpení vodíku z nové molekuly lipidu a sám přijímá odtržený vodík za vzniku hydroperoxylipidu. Posledním krokem, neboli terminací, je sloučení dvou radikálů a ukončení řetězové reakce.^{36,37,38}

Kromě hydroperoxylipidů vzniká během řetězové reakce i spousta dalších produktů, příkladem mohou být isoprostany, neuroprostany, aldehydy, ketony, alkany, lyso-fosfolipidy a aldehydy modifikované proteiny.³⁹

3.2.1.1. Enzymatická peroxidace lipidů

Hydroperoxydy fosfolipidů jsou primárními produkty fosfolipidové oxidace a jejich vznik je zprostředkován hlavně enzymatickou cestou v buňkách. Enzymy obsahující železo v hemové či nehemové formě mohou snadno katalyzovat peroxidaci fosfolipidů. Cyklooxygenázy (prostaglandin-endoperoxidázové syntázy nebo COX) jsou hlavní enzymy oxidace fosfolipidů a produktem jejich katalýzy jsou prostanoidy, například:

prostaglandiny, prostacykliny nebo tromboxany.^{40,41,42} COX primárně působí na volnou arachidonovou kyselinu produkující pestrou škálu prostanoidů. Bohužel bylo prokázáno, že COX může působit i na jiné polynenasycené mastné kyseliny jako je linolová, gama-linolová, eikosadienová, eikosatrienová, eikosapentaenová, dokosapentaenová a dokosaheptaenová kyselina.^{43,44,45} Enzymová aktivita COX byla původně popisována jako prostředek oxidace volných mastných kyselin, později se ale ukázalo, že oxidaci na fosfolipidy podléhají i esterifikované mastné kyseliny. Mechanismus jakým reakce probíhá není bohužel stále známý.⁴⁶ V savčím organismu se vyskytují tři druhy COX, a to COX1, COX2 a COX3. COX1 je produkován prakticky neustále, zatímco COX2 a COX3 jsou produkovány na základě specifické indukce.⁴⁷

Další skupinou enzymů podléjících se na oxidaci mastných kyselin jsou lipoxygenázy (LOX). Zatímco COX produkují cyklické produkty oxidace, LOX produkují lineární produkty.⁴⁸ Lipoxygenázy jsou odpovědné za produkci hydroperoxy, hydroxy, epoxy a ketoxy kyselin, leukotrienů, hepoxilinů, a lipoxinů.^{49,50,51} Lipoxygenázy mohou oxidovat jak volné kyseliny, tak i příslušné estery. Na základě pozice peroxidické skupiny na produktu enzymatické reakce dělíme savčí lipoxygenázy na LOX3, LOX5, LOX8, LOX12, LOX15. LOX3 má primární funkci izomerázy, ostatní jsou peroxidázami.⁵²

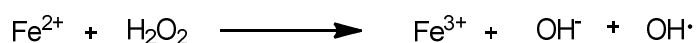
Kromě COX a LOX, které hrají hlavní roli ve fosfolipidové oxidaci, mohou oxidaci fosfolipidů provádět i ostatní enzymy, jako např. enzymy metabolismu xenobiotik z rodiny cytochromů P450.⁵³ Cytochromy P450 patří do skupiny ω -hydroxyláz, epoxygenáz a bisallylické hydroxylázy, které produkují konečné hydroxylované mastné kyseliny, epoxykyseliny a hydroxyeikosatetraenovou kyselinu.⁵⁴

Vedle COX, LOX a cytochromů P450, mohou lipidperoxidázovou aktivitu získat i různé železo obsahující proteinové struktury.⁵⁵ Jedním z proteinů, který vzbudil pozornost na poli peroxidace lipidů je mitochondriální elektrontransportní řetězový komplex cytochromu C. Vedle proapoptotické stimulace, cytochrom C umí také selektivně oxidovat anionický fosfolipid kardiolipin v mitochondriích a fosfatidylserin v plazmatické membráně.^{55,56,57} Stejně jako cytochrom C, i další membránové proteiny s hemovým katalytickým centrem byly identifikovány v peroxidaci lipidů, příkladem mohou být: myeloperoxidáza, cytoglobin, myoglobin a hemoglobin.^{58,59,60,61}

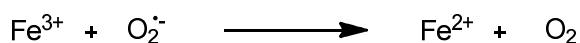
3.2.1.2. Neenzymatická peroxidace lipidů

Neenzymatická peroxidace lipidů je primárně založena na reaktivitě volných radikálů. Hydroxylový radikál vzniklý interakcí přechodného kovu s reaktivní kyslíkovou sloučeninou je hlavním radikálem vyskytujícím se v tomto procesu.⁶² Reaktivní

kyslíkové sloučeniny jsou odvozeny od molekulárního kyslíku, peroxidu vodíku či organických peroxidů.⁶³ Ačkoli i molekulární kyslík je silným oxidačním činidlem, nebylo pozorováno jeho přímé zapojení se do peroxidace lipidů. Přijetím elektronu se ale z molekulárního kyslíku stává superoxidový aniontový radikál (O_2^-). Za normálních okolností je vzniklý superoxidový radikál zredukován pomocí superoxid dismutáz za vzniku peroxidu vodíku.⁶⁴ Peroxid vodíku reaguje s železnatým iontem (Fentonova reakce) (Obrázek 6) za vzniku hydroxylového radikálu, hydroxylového aniontu a železitého kationtu.⁶⁵ Superoxid může být využit pro redukci železitého kationtu na železnatý v prvním kroku Haber-Weissovy reakce (Obrázek 7).



Obrázek 6: Fentonova reakce⁵⁵



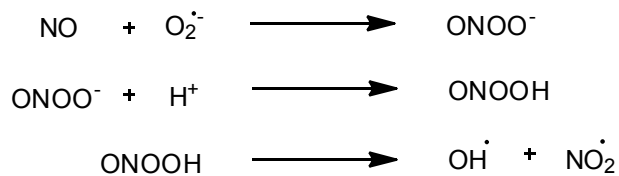
Obrázek 7: Haber-Weissova reakce⁵⁵

Nejen železo ale i dvojmocné ionty jiných přechodných kovů mohou iniciovat vznik hydroxylového radikálu skrze Fentonovu reakci, a to měďnaté (Cu^{2+}), kobaltnaté (Co^{2+}) a nikelnaté (Ni^{2+}), reakce ale probíhá pomaleji a s menší účinností (Obrázek 8). Železnaté a měďnaté kationty se také účastní degradace organických hydroperoxidů na organické peroxyradikály a hydroxylové radikály.⁶⁵ Množství volných železnatých a měďnatých kationtů v organismu je za normálních okolností velmi malé, vzhledem k velmi efektivnímu zacházení s těmito ionty uvnitř i mimo buňku.⁶⁶ Mohou se ale vyskytnout stavy, kdy se koncentrace těchto iontů nebezpečně zvyšuje vlivem poškozených mechanismů, příkladem může být hemochromatóza.⁶⁷ Volné přechodné kovy mohou hrát významnou roli v syntéze hydroperoxidáz lipidů.



Obrázek 8: Fentonova reakce s přechodnými kovy⁶⁵

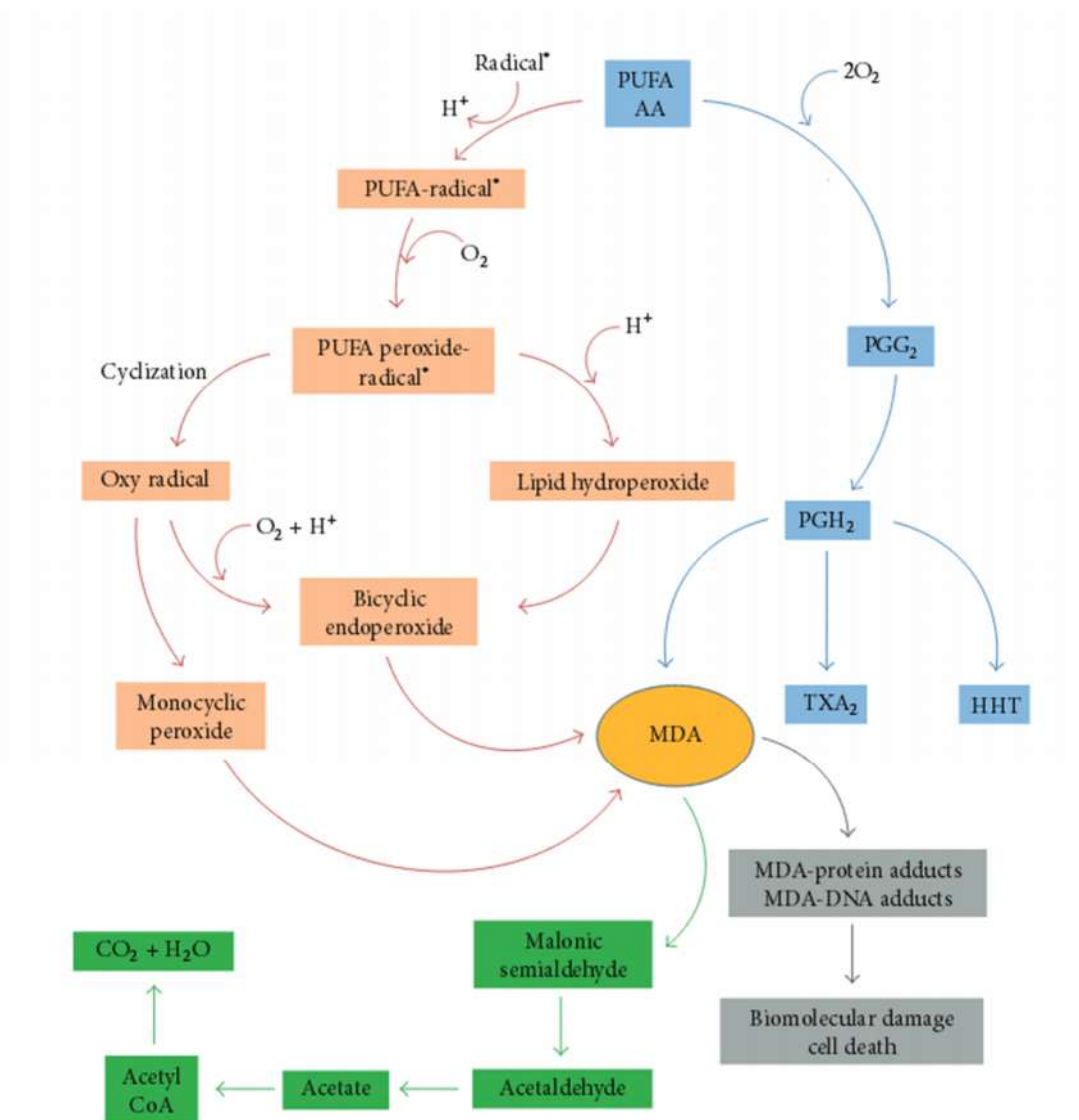
Další možností vzniku hydroxylového radikálu je rozklad peroxodusité kyseliny, vznikající reakcí superoxidového radikálu s oxidem dusnatým (Obrázek 6).^{68,69} Takto vzniklé hydroxylové radikály mohou být iniciátory peroxidace lipidů.⁷⁰ Celkově lze říci, že neenzymatická peroxidace lipidů je těžko terapeuticky zacelitelná, neboť reakce je velmi intenzivní a vzniká obrovské množství nespecifikovaných produktů.



Obrázek 9: Vznik radikálu z peroxodusité kyseliny⁶⁹

3.2.2. Stanovení produktů peroxidace lipidů

Velká většina analytických metod je založena na stanovení produktů vznikajících rozkladem peroxylipidového radikálu. Tato molekula podléhá rozkladu za vzniku pestré škály produktů, hlavní sledované produkty jsou malondialdehyd a 4-hydroxy-2-nonenal (Obrázek 10).⁷¹



Obrázek 10: Přehled možností vzniku malondialdehydu, jeho metabolizace a možná škodlivost⁷¹

Nejpravděpodobnější cesta vzniku malondialdehydu je při rozkladu arachidonové kyseliny (AA) a dalších nenasycených mastných kyselin s delším řetězcem (PUFAs). Malondialdehyd vzniká jako vedlejší produkt při enzymatické biosyntéze tromboxanu A₂ (TXA₂) a 12-L-hydroxy-5,8,10-heptadekatrienové kyseliny (HHT). K jeho vzniku může také docházet při neenzymatickém procesu z bicyklických endoperoxidů vzniklých během peroxidace lipidů (Schéma 23).⁷²

Dalšími produkty peroxidace lipidů mohou být například konjugované dieny, hydroperoxydy lipidů, isoprostany, isofurany, lipid-DNA adukty, lipid-protein adukty a plyny (např. pentan).⁷³

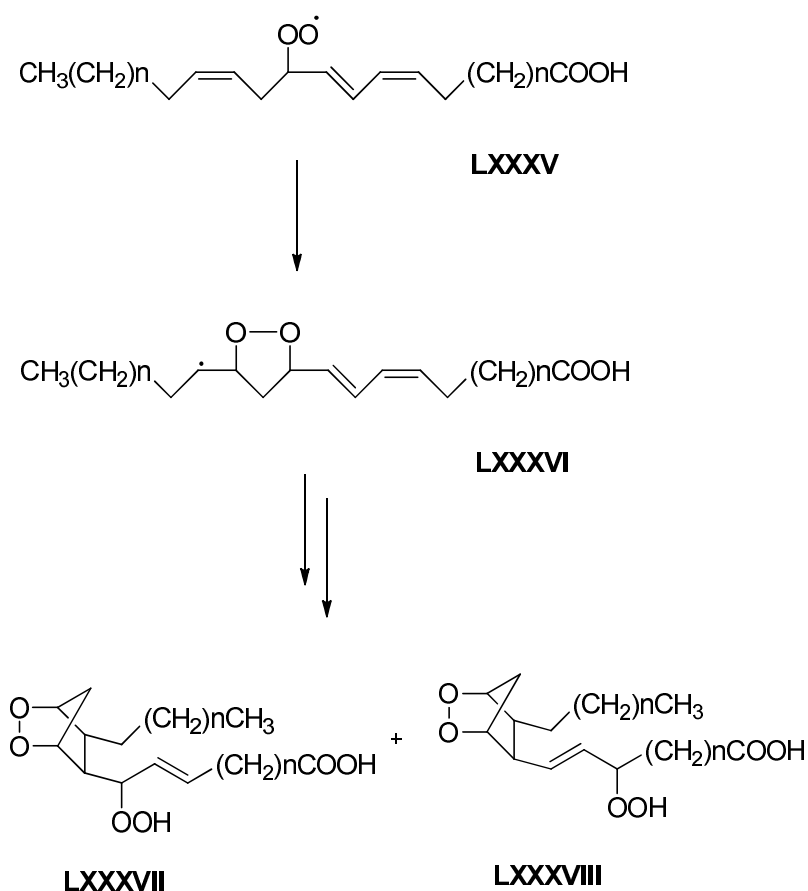


Schéma 23: Vznik bicyklických endoperoxidů z peroxylipidového radikálu⁷²

3.2.2.1. TBARS (2-Thiobarbituric acid reactive substances)

Tato metoda je založena na reakci výše zmiňovaného malondialdehydu **XC** s thiobarbiturovou kyselinou **LXXXIX**, kdy produktem je adukt **XCI** (červený pigment), který má absorpční maximum při 532 nm (Schéma 24). Následně je množství vzniklého pigmentu kvantifikováno pomocí fluorescenční spektrofotometrie.⁷⁴

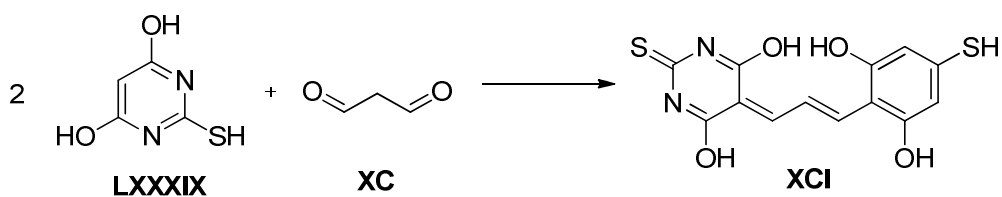


Schéma 24: Reakce thiobarbiturové kyseliny s malondialdehydem⁷³

TBARS metoda se využívá *in vitro*. Nevýhodou této metody je, že TBA reaguje i s jinými látkami v organismu, čímž se snižuje přesnost analytické metody.

3.2.2.2. NMPI (N-methyl-2-fenylyndol)

NMPI je další metodou, při které reakcí malondialdehydu **XC** s činidlem **XCII** vzniká adukt **XCIII** se specifickým absorpčním maximem při 586 nm. Činidlem je *N*-methyl-2-fenylyndol **XCII** a reakce probíhá v kyselém prostředí.⁷⁵ Kvantifikace je opět provedena metodou fluorescenční spektroskopie.

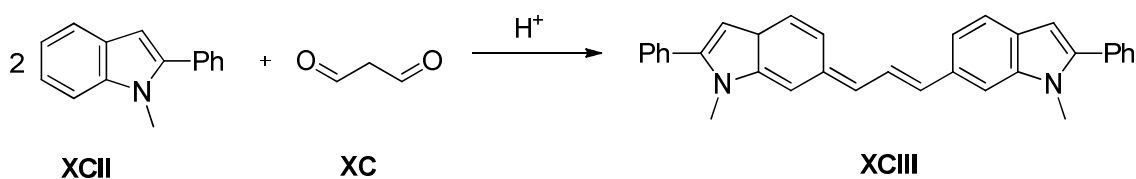


Schéma 25: Reakce NMPI s malondialdehydem

3.2.2.3. DNPH (2,4-dinitrofenylhydrazin)

Další metoda stanovení karbonylových produktů (aldehydů a ketonů) pomocí činidla **XCIV**, jehož reakcí dochází ke vzniku produktu se specifickým absorpčním maximem při 370 nm. Vzniklý hydrazon **XCVI** má intenzivně žluté zbarvení. Reakce probíhá *in vitro* (Schéma 26).⁷⁶

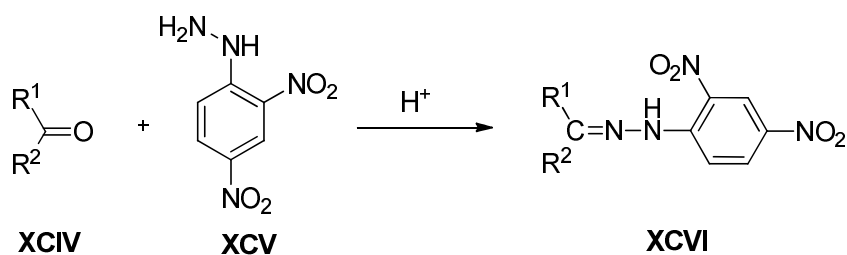


Schéma 26: Reakce DNPH s karbonylovými sloučeninami⁷⁶

3.2.2.4. Analýza pomocí GC-MS

Jak bylo zmíněno výše, jedním z hlavních produktů peroxidace lipidů je cytotoxický 4-hydroxynonenal **XCVII** (Schéma 27), což je α,β -nenasycený aldehyd. Jeho cytotoxicita spočívá v možnosti provedení Michaelovy adice za tvorby thioetherů nebo tvorby Schiffových bazí s volnými aminokyselinami a s ϵ -amino skupinou lysinu a imidazolovou skupinou na histidinu obsažených v proteinech.⁷⁷

Při použití GC-MS je nejprve třeba provést sérii separačních operací a následně reagovat vzorek s pentafluorbenzylhydroxylaminem (PFB) za současné sililace přítomné hydroxyskupiny pomocí N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamidu (Schéma 27). Vzniklý derivát **XCVIII** je vlivem trimethylsililové skupiny těkavější a tudíž použitelný pro plynovou chromatografii.⁷⁸

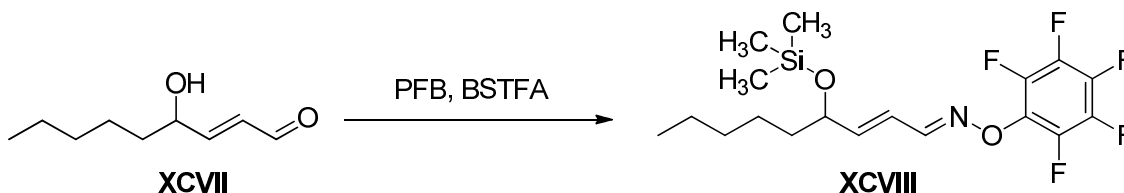


Schéma 27: Úprava 4-hydroxynonenalu **XCVII** pro GC-MS⁷⁸

PFB skupina propůjčuje molekule **XCVIII** díky své vysoké elektronegativitě schopnost zachytávat elektron a molekula tudíž může být podrobena negativní iontové chemické ionizaci (NICI). Hmotnost iontového štěpu analytu je 152, pokud PFB skupina disociuje za měkkých ionizačních technik.

3.2.2.5. Analýza vznikajícího pentanu

Jedním z vedlejších produktů peroxidace lipidů jsou i plynné alkyly s krátkým řetězcem (ethan, pentan). Plyny vznikají zejména při tepelném či kovem katalyzovaném rozkladu hydroperoxy lipidů. Tyto vzniklé plyny mohou být stanoveny pomocí GC-MS ve vydechovaném kondenzátu.⁷⁹ Díky své neinvazivnosti je metoda využívána pro *in vivo* analýzu lipidové peroxidace.⁷⁹

Tato metoda je ale nepřesná z důvodu závislosti tvorby pentanu na kyslíku ve tkáních. Kromě toho je pentan metabolizován cytochromy p450, pokud se tedy v organismu vyskytují induktory cytochromů p450, pentan nemusí být zachycen.⁸⁰ Další nepřesností může způsobovat pentan produkovaný bakteriemi, při jejich přemnožení či infekci. Tyto problémy vedly k velkému ústupu pentanu jako ukazatele peroxidace lipidů.⁸⁰

3.2.3. Důsledky peroxidace lipidů

Hromadící se důkazy podporují hypotézu, že oxidativní stres, peroxidace lipidů a oxidativní poškození buněk v organismu má za následek rozvoj se stárnutím souvisejících onemocnění.⁸¹ Oxidativní stres je způsoben nerovnováhou v produkci volných radikálů a míře jejich odstraňování díky snížené aktivitě obranných mechanismů organismu.⁸¹ Největší problém nastává ve tkáních s pomalou či úplně chybějící buněčnou přeměnou (buněčným cyklem) jako je např. mozek, srdce a kosti. Tyto tkáně mají tendenci zadržovat škodlivé produkty peroxidace lipidů.⁸¹ Produkty peroxidace se v malém množství chovají jako buněčné mediátory a až později se projeví stárnutím tkání, onemocněním jater, ledvin, nervového a kardiovaskulárního systému, rakovinným bujením, metabolickými a endokrinními poruchami a cukrovkou.⁸¹

3.2.3.1. Vliv peroxidace lipidů na vznik Alzheimerovy choroby

Oxidativní stres se podílí na vzniku všech neurodegenerativních onemocnění a zdá se být obzvláště důležitý při vzniku a rozvoji Alzheimerovy choroby.⁸² Toto onemocnění se projevuje výpadky paměti, v pozdějších fázích i dysfázií (porucha řeči) a dyspraxií (poruchy pohybu). Alzheimerova choroba je jednou z nejrozšířenějších neurodegenerativních chorob, postihuje až 10% populace po 80. roce věku. U pacientů s Alzheimerovou chorobou byly pozorovány specifické mutantní geny pro membránový amyloidový prekurzorový protein.⁸² Alzheimerova choroba je morfoloicky prezentována amyloid obsahujícími plaky a neurofibrilárními uzly hlavně v oblasti hippokampu a frontálního kortexu.⁸² Jádro těchto plaků je tvořeno amyloidním β -proteinem, který je proteolyticky vyštěpen z daleko většího amyloidového prekurzorového proteinu. Amyloidní β -protein je toxický a jeho akumulace tvoří již zmiňované plaky. Zvýšená aktivita proteolytického enzymu (BACE1) tvořícího amyloidový β -protein je pak pozitivně ovlivňována oxidativním stresem. Vysvětlením může být aktivace dráhy c-Jun N-terminální kinázy vlivem oxidativního stresu, která zvýší expresi BACE1.⁸²

3.2.3.2. Vliv peroxidace lipidů na vznik Parkinsonovy choroby

Parkinsonova choroba je druhé nejčastější neurodegenerativní onemocnění na světě. Hlavním projevem nemoci jsou snížené motorické funkce pacientů, třes, poruchy chůze a rovnováhy a obecně zpomalené pohyby. Této chorobě jsou přičítány proteinové agregáty s α -synukleinem, což je protein, který je odpovědný za mitochondriální funkce a tvorbu synaptických vezikul.^{83,84} Jedním z produktů peroxidace lipidů je i akrolein, u kterého byla objevena schopnost modifikovat α -synuklein v dopaminergních neuronech, což vede k narušení mitochondriální funkce. Tyto proteinové agregáty jsou hlavní součástí Lewyho tělísek kumulovaných primárně v putamenu a černé substanci. Tyto dvě části mozku jsou důležité pro koordinaci pohybu a učení se. Hlavní motorický neurotransmitter, dopamin, je v těchto oblastech významně ztracen a dochází k úbytku neuronů.⁸³

Již bylo v literatuře popsáno, že 4-hydroxynonenalové a malondialdehydové adukty byly nalezeny Lewyho tělíscích v neokortexu a mozkových kmenových neuronech.^{86,87} 4-hydroxynonenal byl také sledován jako činitel pozměňující transport dopaminu.⁸⁸ Tato fakta mohou být příčinou snížené hladiny dopaminu, což je největším problémem tohoto onemocnění. Ztráta dopaminu spřažená s proteinovou agregací a nárůstem 4-hydroxynonenalu má obrovský vliv na pohybové a učební schopnosti osob trpících Parkinsonovou chorobou.⁸⁴

3.2.3.3. Vliv peroxidace lipidů na vznik kardiovaskulárních onemocnění

Atheroskleróza a s ní související komplikace jsou jedním z nejčastějších důvodů úmrtí u lidí žijícím západním stylem života. Role vysokých hodnot cholesterolu je potvrzená, nicméně není jediným faktorem vzniku těchto onemocnění. Dalším mechanismem, pohánějícím patologické změny v chronické onemocnění jsou ty, které představují akutní zánětlivé odpovědi.⁸⁹ Přirozeně se v krvi vyskytující lipoproteinové částice (LDL a VLDL) mohou pronikat do subendotelové vrstvy, tzv. intimy. V dalším kroku mohou být vlivem oxidativního stresu přeměněny na pestrou škálu produktů. Takto modifikované lipoproteiny mohou interagovat v mezibuněčné matrix s proteoglykany a způsobovat jak strukturní změny proteinů, tak i crosslinking. Nejen že dochází ke zvětšení endotelového matrix a tím ztluštění endotelu, ale dochází i

k jeho poškození a tím pádem k adhezi a agregaci trombocytů. V tomto místě dochází k zánětlivé reakci, tím je zablokována syntéza oxidu dusnatého a tím pádem nedochází k vasodilataci. Následnou tvorbu aterosklerotických plátů, způsobujících finální ucpávání cév mají na svědomí pozměněné makrofágy tzv. pěnové buňky, které se formují z akumulovaného cholesterolu.⁹⁰

3.2.3.4. Vliv oxidativního stresu na vznik rakoviny

Obecně lze o rakovině mluvit, jako o nekontrolovaném růstu buněk vlastního organismu. Za normálních okolností je buňka schopná mutaci detekovat a spustit proces opravy. Další možností je apoptóza buňky. Bohužel tyto mechanismy vlivem mutací selhávají a v tomto případě dochází ke vzniku rakoviny. Rakovina může vzniknout prakticky v jakékoli tkáni těla. Nejčastěji bývají zasaženy tkáně, kde dochází k intenzivnímu buněčnému dělení (plíce, střeva apod.) nebo ve tkáních podléhajících hormonální stimulaci (vaječníky, štítná žláza).⁹¹ Příkladem mutací vedoucích ke vzniku rakoviny může být oxidace adeninu hydroxylovým radikálem, kdy aminoskupina adeninu podléhá oxidaci na hydroxy skupinu. Tato změna poté způsobuje, že se adenin nepáruje s thyminem, ale cytosinem, čímž dochází k mutaci. Obdobně probíhá oxidace guaninu, který se následně páruje s adeninem namísto cytosinu.⁹²

Problémem reaktivním kyslíkových sloučenin není jen mutagenita, ale i suplování funkce signálních molekul, což se může projevit antiapoptoticky, nebo se může vytrácet buněčný kontakt, dokonce je možná i podpora angiogeneze.⁹³

Paradoxem je, že již vzniklé rakovinné buňky ve své membráně neobsahují tak velké množství polynenasycených mastných kyselin, jako zdravé buňky, tudíž nepodléhají tak intenzivně oxidativnímu stresu.⁹⁴

4. Výsledky a diskuze

Cílem předložené diplomové práce bylo připravit hydroxylaminové deriváty nesoucí fluorescenční značku. U těchto derivátů pak byla studována možnost oxidace hydroxylaminové skupiny pomocí peroxidu vodíku a následné hetero-Diels-Alderovy reakce *in situ* generované nitrososlučeniny s konjugovanými dieny (Schéma 28). U derivátů hydroxylaminu byly studovány také jejich spektrální vlastnosti.

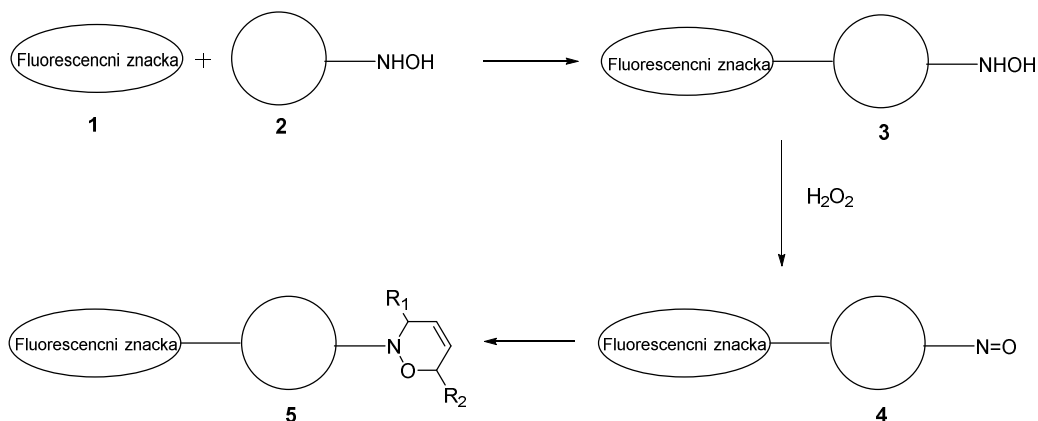
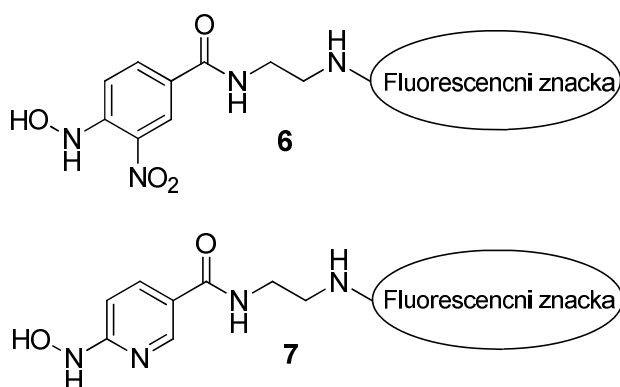


Schéma 28: Obecné schéma přípravy oxazinů

Jako výchozí substráty pro přípravu cílových sloučenin byly zvoleny kyselina 4-fluor-3-nitrobenzoová a kyselina 6-fluornikotinová (Obrázek 11). Rhodamin B a Fluorescein byly zvoleny jako fluorescenční značka. Jako linker pro propojení fluorescenční značky se zbytkem molekuly byl použit ethylendiamin.



Obrázek 11: Obecná struktura připravovaných hydroxylaminů 6 a 7.

4.1. Příprava hydroxylaminových derivátů značených Rhodaminem B

4.1.1. Příprava Rhodaminem B značeného hydroxylaminu odvozeného od kyseliny 4-fluor-3-nitrobenzoové

Pro přípravu Rhodaminem B značeného hydroxylaminu odvozeného od kyseliny 4-fluor-3-nitrobenzoové **14** (Schéma 29) byla navržena syntetická cesta, kdy by výchozí kyselina **8** měla být převedena reakcí s ethylendiamiem na odpovídající amid **10**. Následně by měl být připraven substitucí fluoru hydroxylaminový derivát **12** a acylací druhé aminoskupiny ethylendiaminu Rhodaminem B cílový produkt **14** (Schéma 30). Struktura Rhodaminu B bude v dalších schématech pro zjednodušení nahrazena zkratkou Rho B.

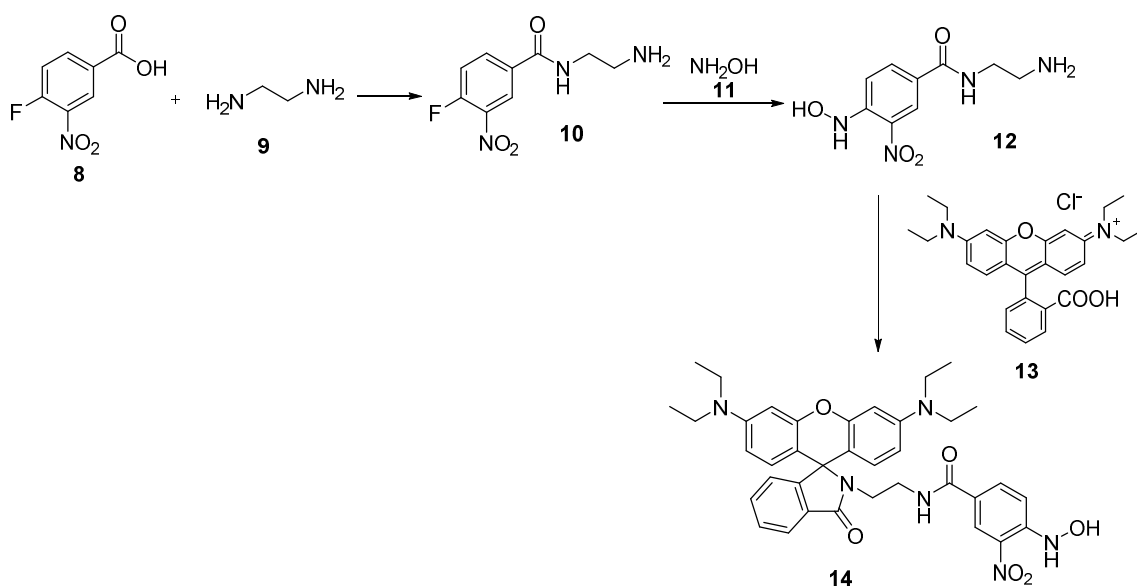


Schéma 29: Návrh syntetického postupu pro přípravu hydroxylaminu **14**

4.1.1.1. Příprava amidu kyseliny 4-fluor-3-nitrobenzoové

Pro přípravu amidu kyseliny 4-fluor-3-nitrobenzoové byla kyselina nejprve převedena na odpovídající chlorid **15**. Pro tuto reakci byl jako chlorační činidlo zvolen oxalyl chlorid. Jako rozpouštědlo byl zvolen bezvodý dichlormethan, reakce byla

katalyzována pomocí dimethylformamidu (Schéma 31). Reakce probíhala 22 hodin; na základě LC/MS analýzy dochází po této době ke 100% konverzi.

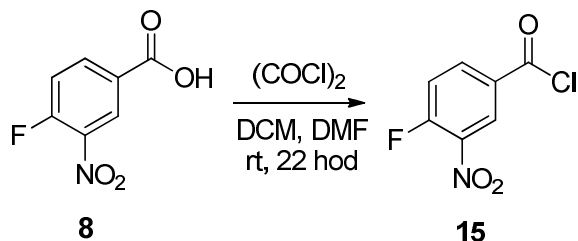


Schéma 30: Chlorace 4-fluor-3-nitrobenzoové kyseliny **8**

Pro optimalizaci podmínek reakce chloridu kyseliny **15** s aminem byla nejprve provedena modelová reakce s piperidinem (Schéma 32). Bohužel za laboratorní teploty dochází kromě vzniku produktu **16** i ke vzniku značného množství sloučeniny **17**, vzniklé substitucí fluoru piperidinem (Tabulka 1). Jak vyplývá z tabulky 1, této nežádoucí substituci se dá vyhnout chlazením reakční směsi.

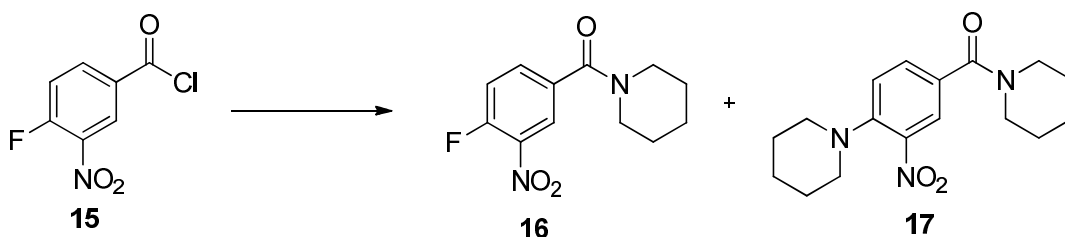


Schéma 31: Optimalizace podmínek přípravy amidu s využitím piperidinu

Tabulka 1: Přehled podmínek a výsledků reakce chloridu kyseliny **15** s piperidinem

	Piperidin	Rozpouštědlo	Teplota	čas	16 [%]	17[%]
A	1,5 ekv	DCM	rt	22 h	29	20
B	1 ekv	DCM	rt	22 h	18	22
C	1 ekv	DCM	Led	22 h	77	0
D	1 ekv	DCM	rt	30 min	31	19
				60 min	21	11

Optimalizované podmínky byly následně použity pro reakci s ethylendiaminem **9**. Za laboratorní teploty docházelo primárně k substituci fluoru. Navíc byl pozorován vznik sloučeniny **18** a to jak za laboratorní teploty, tak za chlazení. Při reakci docházelo i k masivní hydrolyze chloridu kyseliny zpět na kyselinu. (Schéma 33, Tabulka 2).

Z tohoto důvodu byl pro další optimalizace připraven Boc skupinou chráněný ethylendiamin.

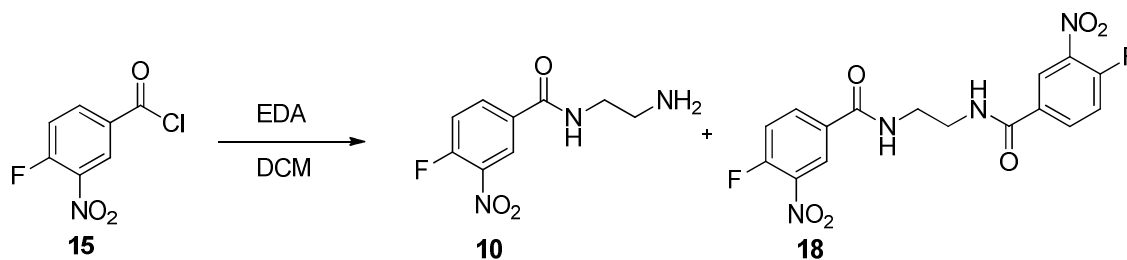


Schéma 32: Reakce chloridu kyseliny **15** s ethylendiaminem

Tabulka 2: Přehled podmínek a výsledků reakce chloridu kyseliny **15** s ethylendiaminem

	EDA	Rozpouštědlo	Teplota	čas	10 [%]	18 [%]
A	2 ekv	DCM	RT	22 h	0	2
B	1 ekv	DCM	RT	22 h	9	12
C	2 ekv	DCM	Led	22 h	28	10
D	1,5 ekv	DCM	Led	22 h	4	29

Chráněný ethylendiamin **21** byl připraven reakcí ethylendiaminu s Boc-anhydridem podle v literatuře popsánoho postupu (Schéma 34).⁹⁵

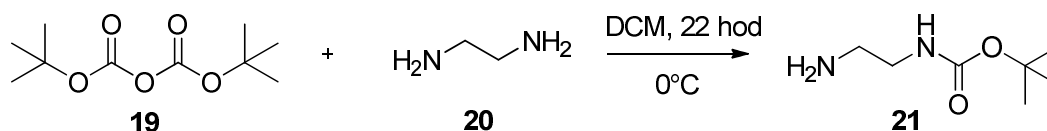


Schéma 33: Příprava Boc chráněného EDA **21**⁹¹

Připravený Boc-ethyleniamin **21** byl následně použit pro reakci s chloridem kyseliny **15** (Schéma 33). Reakce byla provedena v bezvodém DCM za chlazení ledem. Po 22 hodinách bylo v reakční směsi přítomno 71 % produktu **22**. Surový produkt byl následně odchráněn působením 4 M roztoku kyseliny chlorovodíkové v dioxanu. Po 4 hodinách byl z reakční směsi odpařen dioxan, zbytek byl neutralizován nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného a produkt extrahován do DCM (Schéma 35). Produkt **10** byl získán ve výtěžku 84%.

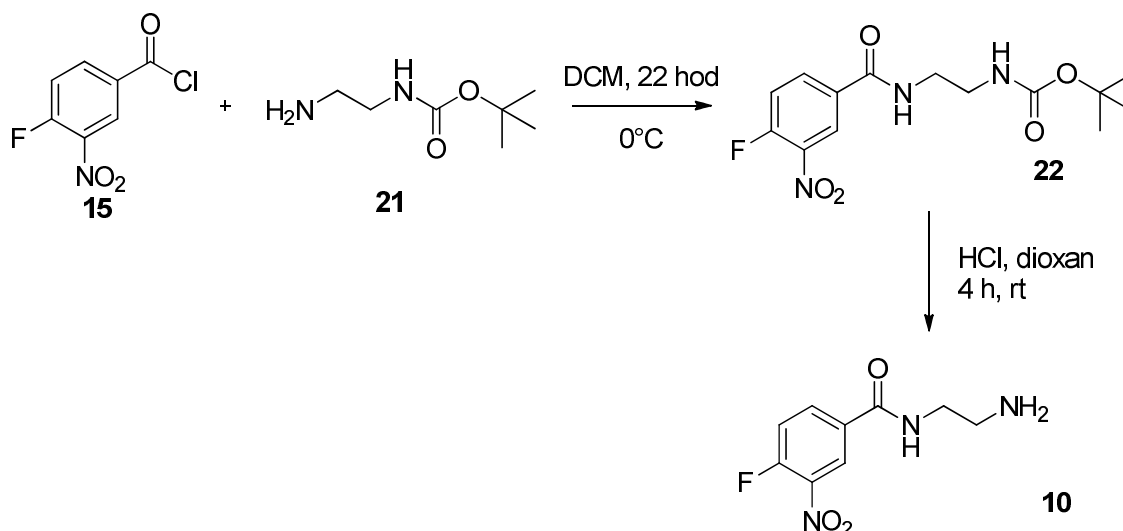


Schéma 34: Reakce chloridu kyseliny **15** s chráněným EDA **21** a následné odchránění

4.1.1.2. Substituce fluoru hydroxylaminem

Pro substituci fluoru byla zvolena reakce s hydroxylaminem v pyridinu při 80 °C (Schéma 36). Jelikož je fluor díky sousední nitroskupině poměrně reaktivní, k úplnému odreagování výchozí látky **10** docházelo již po 3 hodinách. Hydroxylaminový derivát **12** byl získán ve výtěžku 74%.

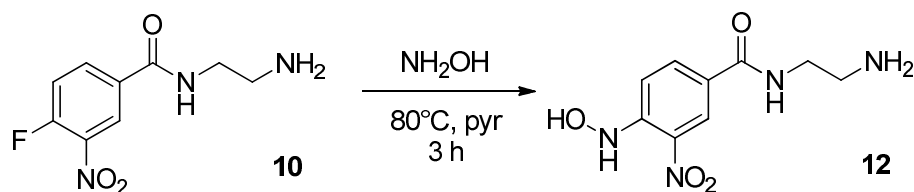


Schéma 35: Příprava hydroxylaminu **12**

4.1.1.3 Navázání Rhodaminu B na ethylendiaminový linker

Tato reakce byla z důvodu úspory hydroxylaminového derivátu kyseliny 4-fluor-3-nitrobenzoové **12** optimalizována za použití propylaminu **23** (Schéma 37). Pro reakci byly zvoleny podmínky s využitím činidel používaných v peptidové chemii.

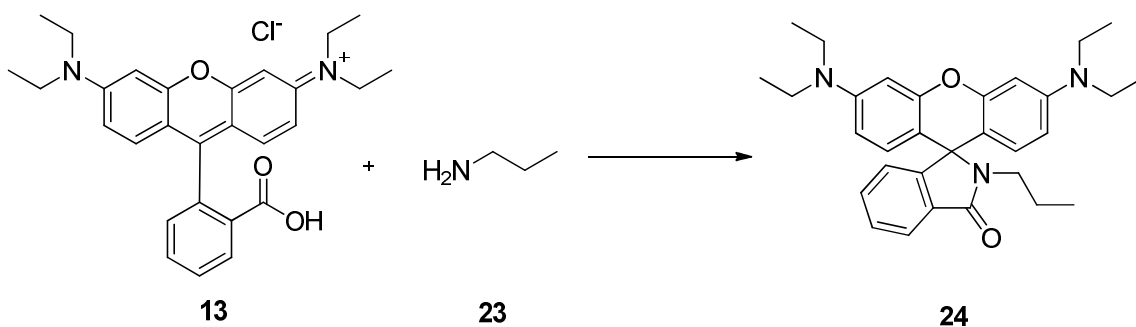


Schéma 36: Optimalizace přípravy amidu Rhodaminu B **13** s propylaminem

Jak vyplývá z tabulky 3, poměrně uspokojivých konverzí bylo dosaženo v případě použití HOBt/DIC a EDC*HCl. Naopak činidlo HATU se ukázalo jako zcela neúčinné, jelikož ani po 22 hodinách nebyl pozorován vznik produktu **24**.

Tabulka 3: Přehled použitých podmínek a výsledků přípravy amidu Rhodaminu B **13** s propylaminem

	23	Činidla	Rozpouštědlo	čas	24 [%]	13 [%]
A	1,2 ekv	1,2 ekv HATU 2 ekv DIEA	DMF	22 h	0	80
B	1,2 ekv	1,2 ekv HOBt 1,2 ekv DIC	DMF	22 h	87	13
C	1,1 ekv	1,1 ekv EDC*HCl 1,1 ekv HOBt 2 ekv DIEA	DMF	22 h	68	32

V další sérii optimalizací bylo do reakční směsi za stejných podmínek přidáno katalytické množství DMAP. Tato úprava pozoruhodně nastartovala reakci za podmínek A (Tabulka 4), ale v případě podmínek B a C nebyl pozorován žádný efekt. Jelikož nejlepších výsledků bylo dosaženo za použití podmínek B a C, byly další optimalizace zaměřeny pouze na ně.

Tabulka 4: Přehled výsledků optimalizace přípravy amidu Rhodaminu B **13** s propylaminem

Po 22 hod	Produkt [%]	Výchozí látka [%]
A	43	53
B	87	6
C	53	47

S cílem dosažení co nejvyšší konverze byly v další optimalizaci použity větší množství činidel. Jak je vidět z tabulky 5, použitím HOBt/DIC bylo po 22 hodinách v reakční směsi přítomno 90% produktu. Z tohoto důvodu byla tato metoda (B) zvolena jako optimální.

Tabulka 5: Přehled použitých podmínek a výsledků přípravy amidu Rhodaminu B **13** s propylaminem

	27	Činidla	Rozpouštědlo	čas	28 [%]	13 [%]
B	1,3 ekv	1,3 ekv HOBt 1,3 ekv DIC	DMF	22 h	90	3
C	1,3 ekv	1,3 ekv EDC*HCl 1,3 ekv HOBt 2,5 ekv DIEA	DMF	22 h	45	55

Jak je zřejmé z výše uvedených optimalizací, pro reakci Rhodaminu B s připraveným hydroxylaminovým derivátem 4-fluor-3-nitrobenzoové kyseliny **12** byly zvoleny podmínky B (Schéma 38) využívající HOBt/DIC. Za těchto podmínek byla nasazena série reakcí, kdy v prvním případě byly užity podmínky B v nezměněné podobě a pro další reakce byly podmínky upraveny (Tabulka 6). Bohužel ani v jednom případě nedocházelo ke vzniku žádaného produktu.

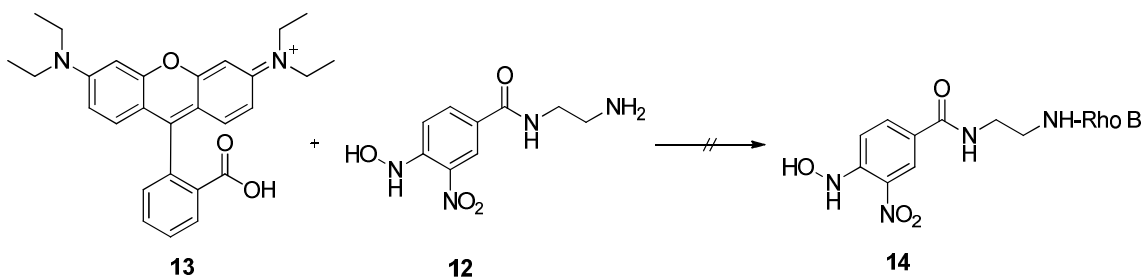


Schéma 37: Navázání Rhodaminu B **13** na hydroxylaminový derivát **12**

Tabulka 6: Přehled použitých podmínek a výsledků optimalizace navázání Rhodaminu B **13** na hydroxylaminový derivát **12**

	19	HOBt/DIC	Báze	Rozpouštědlo	čas	14 [%]	12 [%]
B	1,3 ekv	1,3 ekv	DMAP	DMF	22 h	0	100
B2	1,3 ekv	1,3 ekv	DIEA	DMF	22 h	0	100
B3	1,3 ekv	1,3 ekv	DIEA DMAP	DMSO	22 h	0	100

Jelikož reakce s využitím couplingových činidel neprobíhala, byl proveden pokus o převedení Rhodaminu B na odpovídající chlorid **25** (Schéma 39). Pro chloraci byl zvolen thionylchlorid, reakce byla provedena pod refluxem (85°C) a trvala 1 hodinu. Reakční směs byla po odstavení zbavena přebytečného thionylchloridu na vakuové odparce a následně reagována s 1,3 ekv. hydroxylaminového derivátu **12** v DMSO s 1 ekv. pyridinu po dobu 22 hodin. Ačkoli na základě LC/MS analýzy chlorace proběhla kvantitativně, nebyl pozorován vznik amidu **14** (Schéma 37). Nereaktivita hydroxylaminového derivátu **12** je pravděpodobně způsobena jeho nerozpustností v použitých rozpouštědlech. Kromě toho je možné, že se tato sloučenina vyskytuje ve formě vnitřní soli (Obrázek 12).

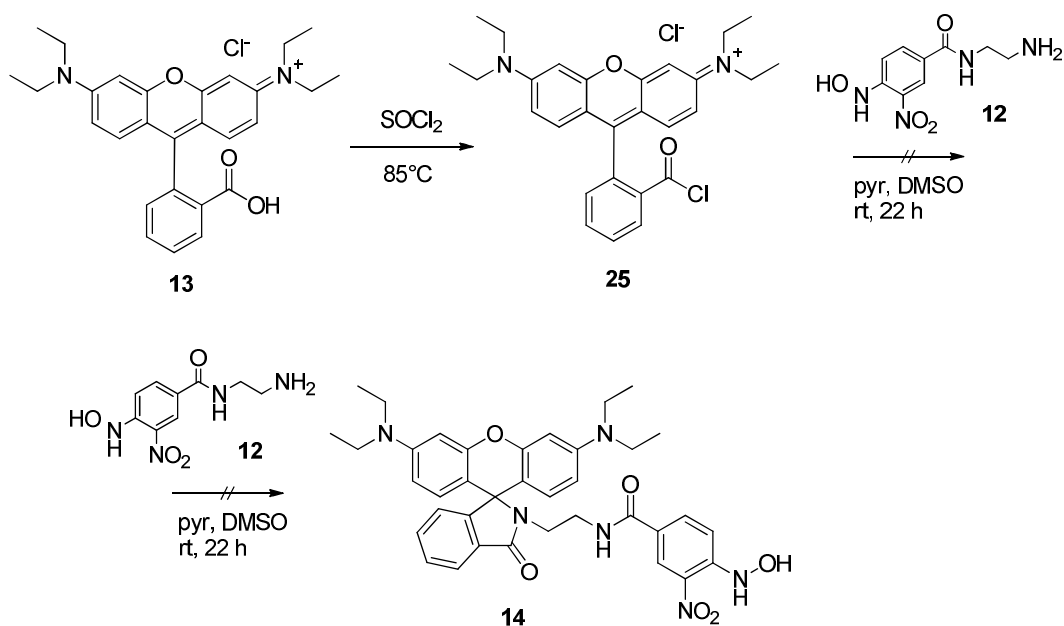
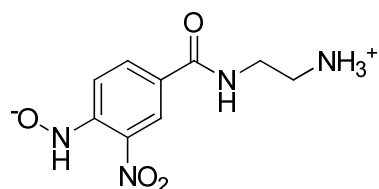


Schéma 38: Syntéza hydroxylaminového derivátu s fluorescenční značkou s využitím chlorace Rhodaminu B



Obrázek 12: Sloučenina **12** ve formě vnitřní soli

4.1.1.4 Příprava Rhodamin B ethylendiaminu

Jelikož nebylo možné žádným způsobem navázat Rhodamin B na ethylendiaminový linker molekuly **12**, byl navržen alternativní způsob přípravy. V tomto případě měl být Rhodamin B nejprve navázán na Boc-ethylendiamin **21**. Po ochránění měl být vytvořen amid s kyselinou 4-fluor-3-nitrobenzoovou **28** následovaný substitucí fluoru hydroxylaminem **14** (Schéma 40).

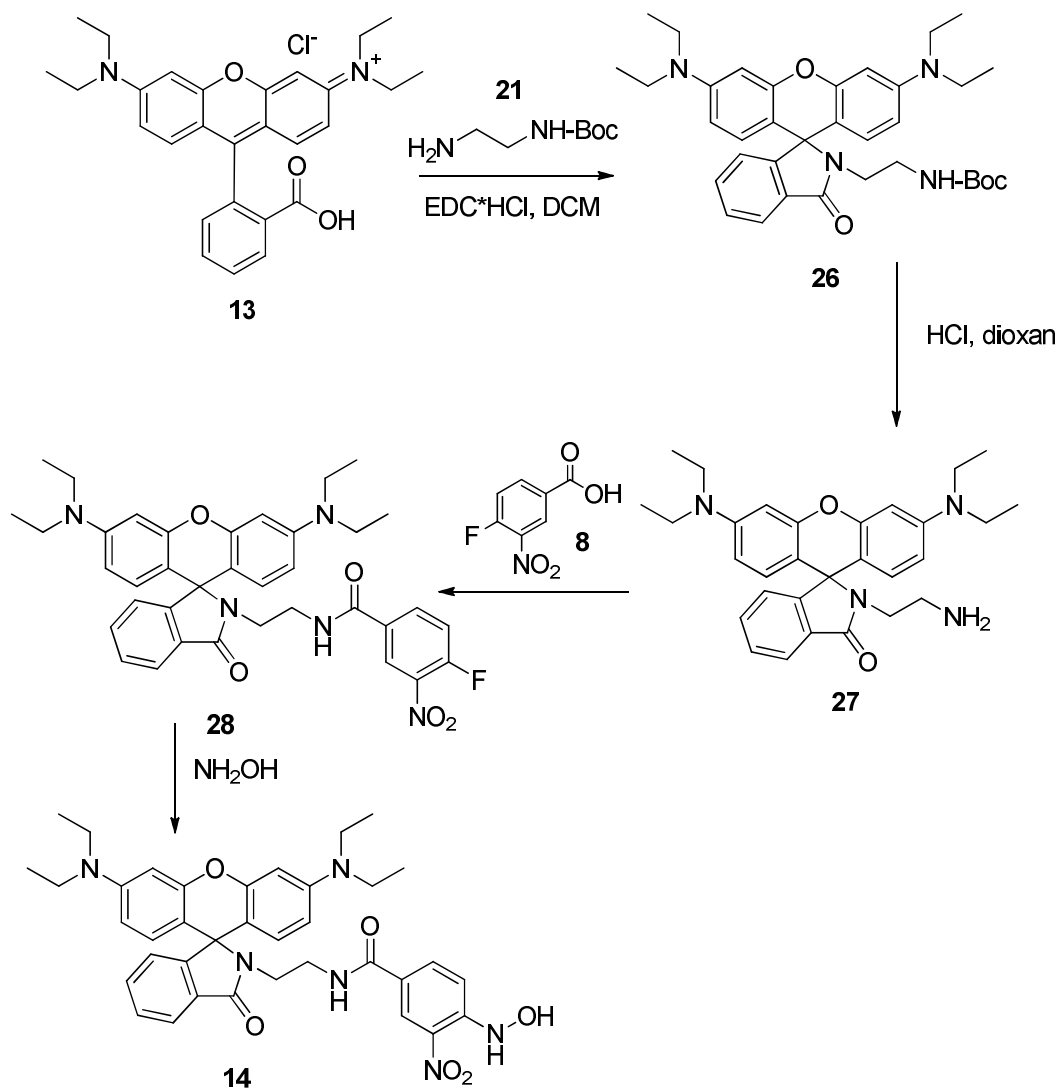


Schéma 39: Návrh syntetické cesty pro přípravu hydroxylaminu **14**

Pro reakci Rhodaminu B s Boc-ethylendiaminem bylo využito vyzkoušených postupů z optimalizace reakce Rhodaminu B s propylaminem. Za těchto podmínek bohužel nedocházelo ke vzniku více než 25% produktu. Proto byly podmínky opět modifikovány. Jako nejúspěšnější se ukázalo použití 1,3 ekv. EDC*HCl a 1,3 ekv. Boc-EDA **21**. Reakce byla provedena za laboratorní teploty v DCM (Schéma 38). Po 1 hodině dochází ke vzniku 77% produktu. DCM byl poté odpařen a odparek byl podroben reakci se štěpící směsí (4M HCl v dioxanu). Po 1 hodině dochází ke kvantitativnímu odchránění a produkt **27** (Schéma 41) byl získán ve výtěžku 69%.

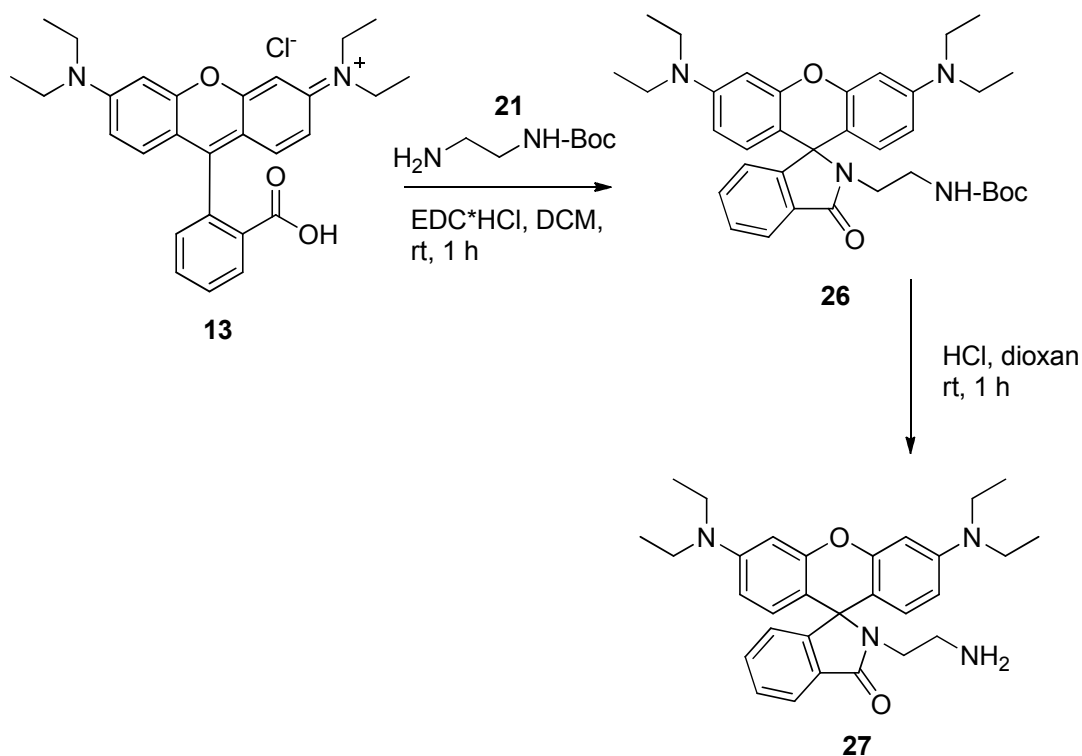


Schéma 40: Příprava Rhodamin B ethylendiaminu **27**

4.1.1.5. Příprava hydroxylaminu značené 4-fluor-3-nitrobenzoové kyseliny

Abychom mohli připravit cílový hydroxylaminový derivát, bylo nejprve nutné navázat kyselinu 4-fluor-3-nitrobenzoovou na připravený Rhodaminem B substituovaný ethylendiaminem **27**. Při této reakci bylo využito výše optimalizovaného postupu, kdy byla v prvním kroku provedena chlorace kyseliny 4-fluor-3-nitrobenzoové pomocí oxalylchloridu v bezvodém DCM. Po odpaření rozpouštědel byl surový chlorid kyseliny **15** podroben reakci s Rhodamin B ethylendiaminem **27** v bezvodém DCM za chlazení

(Schéma 42). Po 22 hodinách dochází ke vzniku 72% produktu **28**, který byl izolován ve výtěžku 63%.

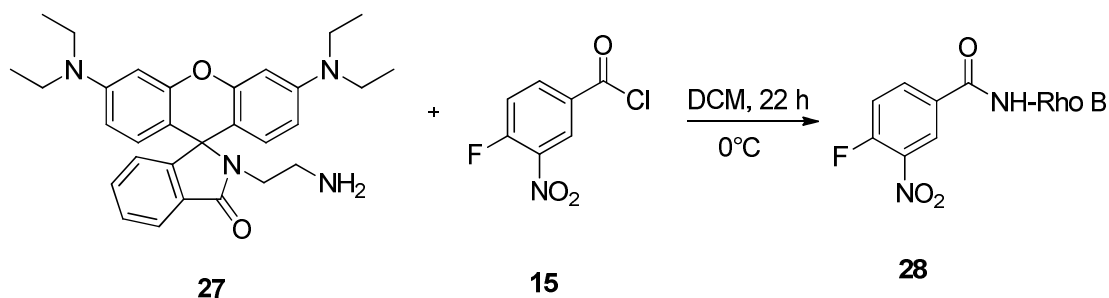


Schéma 41: Navázání Rhodamin B ethylendiaminu **27** na kyselinu 4-fluoro-3-nitrobenzoovou

Posledním krokem pak byla substituce atomu fluoru hydroxylaminem. Opět bylo využito optimalizovaných podmínek. Tzn., že jako rozpouštědlo byl použit pyridin, hydroxylaminu bylo použito 1,5 ekvivalentu a reakce probíhala při 80°C. Reakce byla monitorována pomocí LC-MS a reakční doba se pohybovala v rozmezí 1-3 hodin (Schéma 43). Finální produkt **14** byl po odlyofilizování pyridinu přečištěn pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu s použitím 5% roztoku methanolu v DCM jako mobilní fáze. Výtěžek činil 55%.

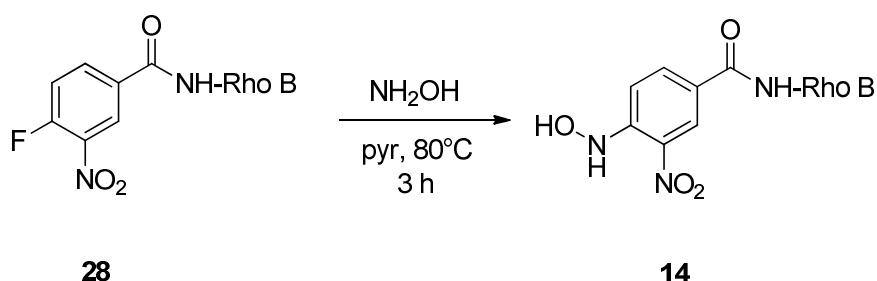


Schéma 42: Příprava hydroxylaminu značené 4-fluoro-3-nitrobenzoové kyseliny **14**

4.1.2 Příprava hydroxylaminového derivátu odvozeného od kyseliny 6-fluornikotinové

Při přípravě tohoto derivátu byla navržena syntetická cesta analogická ke kyselině 4-fluor-3-nitrobenzoové. Prvním krokem byla tvorba amidu kyseliny nikotinové **29** s předem připraveným ethylendiaminem nesoucím Rhodamin B **27**. Následujícím krokem byla substituce atomu fluoru hydroxylaminem za vzniku finální sloučeniny **33** (Schéma 44).

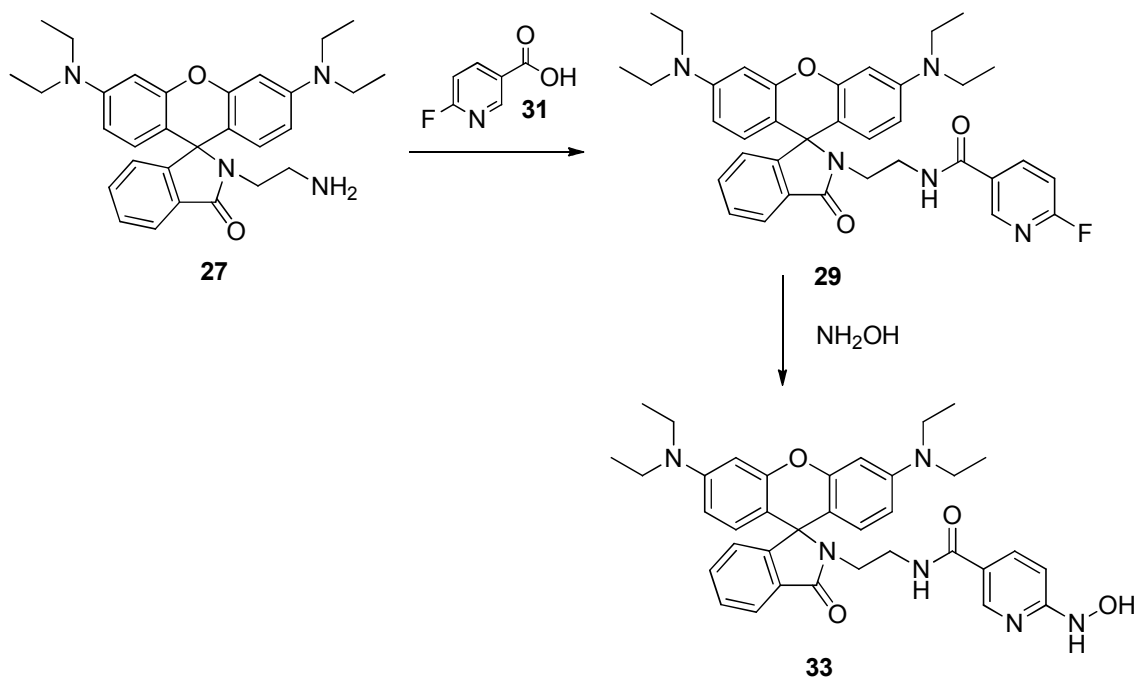


Schéma 43: Navrhovaná cesta k syntéze hydroxylaminového derivátu **33**

4.1.2.1. Optimalizace syntézy amidu kyseliny 6-fluornikotinové

Nejprve byla analogicky ke kyselině 4-fluor-3-nitrobenzoové vyzkoušena chlorace oxalylchloridem následovaná reakcí s Boc-ethylendiaminem. Problémy se vyskytly již při přípravě chloridu, kdy nebylo možné pomocí LC/MS ověřit, zda reakce proběhla, jelikož na záznamu z hmotnostního spektrometru nebyla pozorovaná žádná ionizace. I přesto byl ale proveden pokus o následnou reakci s Boc-ethylendiaminem, který ale nevedl ke vzniku požadovaného produktu **29** (Schéma 41).

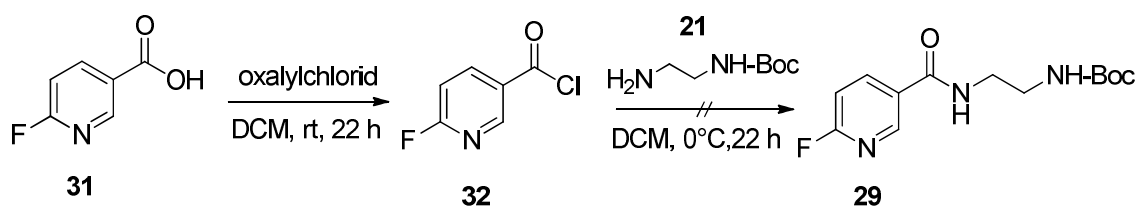


Schéma 44: Chlorace kyseliny 6-fluornikotinové **31** a navázání Boc-ethylendiaminu **21**

Z tohoto důvodu byly hledány alternativní podmínky. Nejprve byla vyzkoušena reakce s HOBt a DIC nebo DCC (tabulka 7). V tomto případě sice docházelo ke vzniku

produktu, byl ale zastoupen ve směsi s výchozí látkou v poměru cca 1:1. Podobně probíhá reakce, ve které byl nejprve připraven chlorid kyselin reakcí s thionyl chloridem. Jako neúspěšnější se ukázala reakce s EDC*HCl, kdy po 22 hodinách dochází k úplnému odreagování výchozí látky **31**.

Tabulka 7: Přehled použitých metod a výtěžků pro navázání Boc ethylendiaminu na kyselinu 6-fluornikotinovou

	21	Činidla	Rozpouštědlo	Čas	29 [%]	31 [%]
A	1,2 ekv	1,2 ekv HOBt 1,2 ekv DIC	DMF	22 h	49	40
B	1,1 ekv	1,1 ekv HOBt 1,2 ekv DCC 2 ekv DIEA	DMF	22 h	44	41
C	1 ekv	1,2 ekv EDC*HCl	DCM	22 h	63	0
D	1 ekv	i) 50 ekv SOCl ₂ ii) 2,1 ekv Et ₃ N	DCM	22 h	41	28

4.1.2.2. Příprava hydroxylaminu odvozeného od 6-fluornikotinové kyseliny

Na základě optimalizovaného postupu pro navázání Boc-ethylendiaminu **21** byl nejprve připraven amid kyseliny 6-fluornikotinové značený Rhodaminem B **29** (Schéma 46) působením činidla EDC*HCl. Po 22 hodinách bylo v reakční směsi pozorováno 62% produktu, který byl následně izolován ve výtěžku 32%.

Dalším krokem byla snaha o substituci fluoru za hydroxylamin. Jelikož je v tomto případě atom fluoru méně reaktivní, než v případě 4-fluor-3-nitrobenzoové kyseliny, ukázala se reakce s 1,5 ekvivalenty hydroxylaminu při 80°C v pyridinu jako neúčinná (Tabulka 8). Z tohoto důvodu musela být provedena optimalizace podmínek.

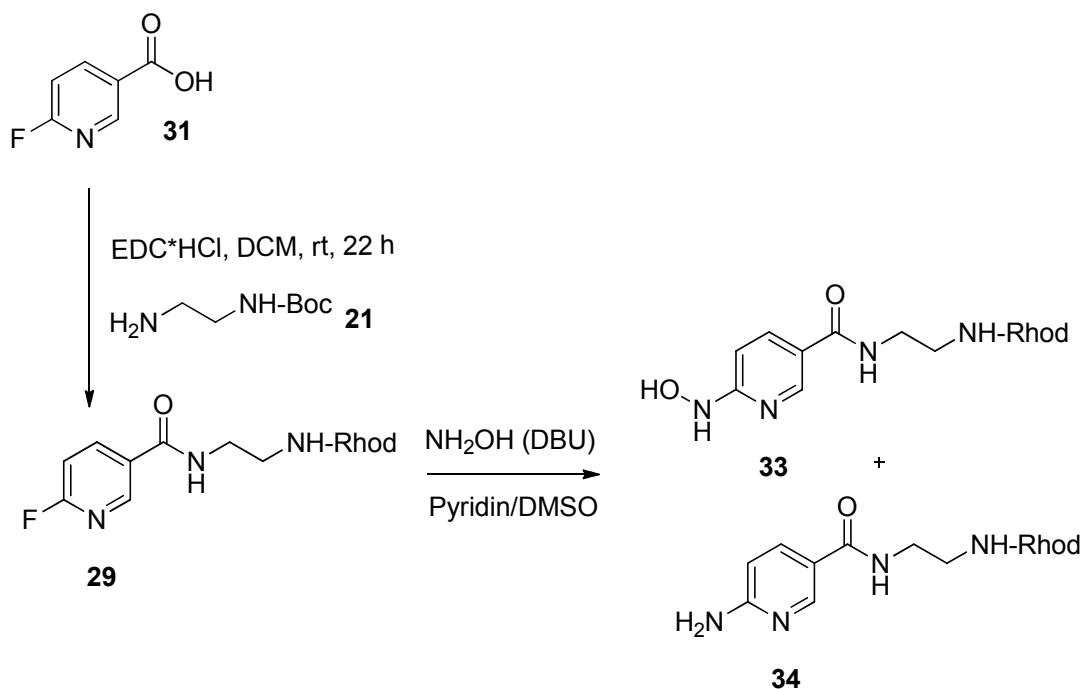


Schéma 45: Příprava Rhodaminem B značené 6-fluornikotinové kyseliny **29** a reakce s hydroxylaminem

Nejprve byl pouze zaměněn pyridin za DMSO, opět ale nebyl pozorován vznik hydroxylaminu **33**. Následně bylo k reakci přidáno DBU, kdy docházelo ke vzniku produktu, který byl ale částečně rozkládán na aminoderivát **34**. Zvýšení množství hydroxylaminu a DBU sice vedlo k mírnému nárůstu produktu v reakční směsi (Tabulka 7), ale i tak nebyla konverze považována za uspokojivou.

Tabulka 8: Přehled použitých metod a výtěžků pro přípravu hydroxylaminu **33** (80 °C, 3 h)

	NH_2OH	Báze	Rozpouštědlo	33 [%]	34 [%]	29 [%]
A	1,5 ekv	---	Pyridin	0	0	100
B	1,5 ekv	---	DMSO	0	0	100
C	1,5 ekv	1,5 ekv DBU	DMSO	18	10	72
D	3 ekv	1,5 ekv DBU	DMSO	28	9	63

Další pokusy o zvýšení konverze byly provedeny v mikrovlnném reaktoru nastaveném na 100 °C a 300W. Při použití 1 ekvivalentu hydroxylaminu a DBU docházelo po 1 hodině ke vzniku pouze 2% produktu. Navýšení množství činidel na 3 ekvivalenty vedlo ke zvýšení výtěžku **33** na 53 % po 1 hodině. (Tabulka 8). Prodloužení reakční doby, stejně tak přidání další porce činidel nevedlo ke zvýšení takto dosažené

konverze, byl pozorován pouze rozklad produktu **33** na aminoderivát **34**. Úplného odreagování výchozí látky ve prospěch produktu pak bylo dosaženo až použitím 20 ekvivalentů hydroxylaminu a DBU (Tabulka 9). Hydroxylamin **33** byl získán ve výtěžku 85%.

Tabulka 9: Přehled použitých metod a výtěžků pro přípravu hydroxylaminu **33** (DMSO, 100 °C, 300 W, 1h).

	NH ₂ OH	Báze	33 [%]	34 [%]	29 [%]
A	1 ekv	1 ekv DBU	2	2	96
B	3 ekv	3 ekv DBU	53	21	32
C	10 ekv	10 ekv DBU	54	14	25
D	20 ekv	20 ekv DBU	85	15	0

4.2. Příprava hydroxylaminových derivátů značených fluoresceinem

Syntetická cesta vedoucí k cílovým sloučeninám měla být analogická, jako v případě derivátů s Rhodaminem B. Prvním krokem měla být příprava Fluorescein-ethylendiaminu následovaná tvorbou amidu příslušných kyselin. Posledním krokem pak měla být substituce atomu fluoru hydroxylaminem (Schéma 47).

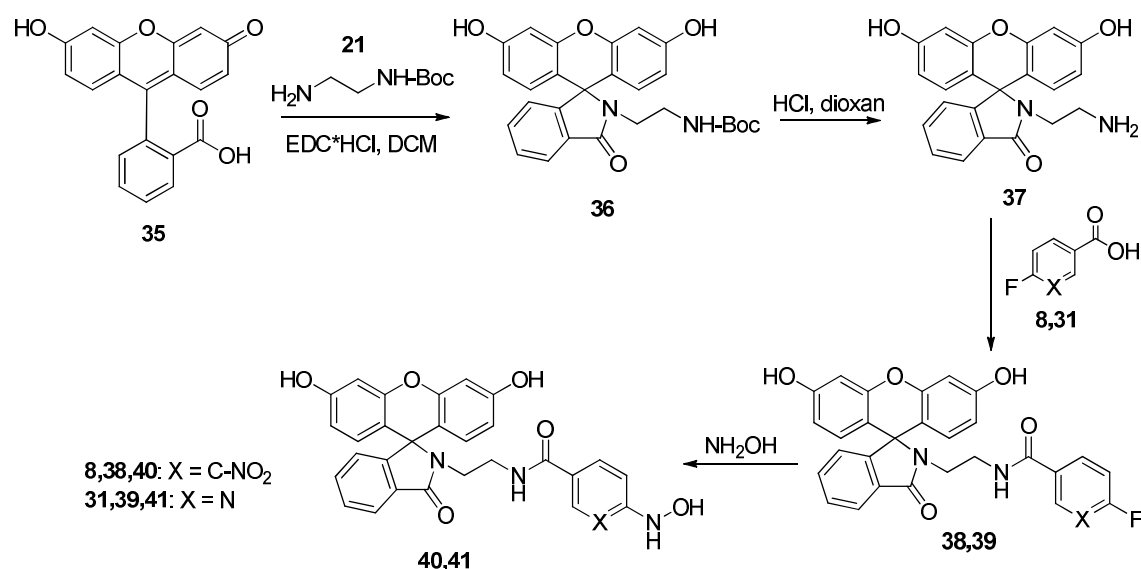


Schéma 46: Strategie přípravy derivátů **40** a **41** značených Fluoresceinem

4.2.1. Optimalizace podmínek navázání ethylendiaminu na Fluorescein s využitím propylaminu

Pro optimalizaci syntézy amidu Fluoresceinu byl zvolen již dříve vyzkoušený propylamin **23** (Schéma 48). Podmínky reakce byly nejprve zvoleny na základě přípravy Rhodamin B-ethylendiaminu. Jelikož ale nedocházelo ke vzniku produktu, byly tyto podmínky dále modifikovány (Tabulka 10). Překvapivě ani v jednom z uvedených případů nedocházelo ke vzniku produktu.

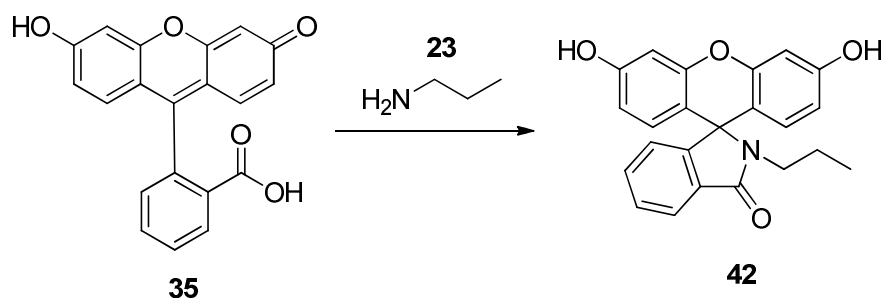


Schéma 47: Optimalizace reakce Fluoresceinu **35** s propylaminem **23**

Tabulka 10: Přehled použitých metod a výtěžků reakce Fluoresceinu **35** s propylaminem **23**

	Propylamin	Činidlo	Báze	Rozoušředlo	Teplota
A	2 ekv	HOBt (1,3 ekv)/DIC (3 ekv)	DIEA (3 ekv)	DMF	RT
B	2 ekv	HOBt (1,3 ekv)/DIC (3 ekv)	DIEA (3 ekv)	DMF	55 °C (reflux)
C	1,3 ekv	EDC*HCl (1,3 ekv)	-	DCM	RT
D	1,3 ekv	EDC*HCl (1,3 ekv)	-	DCM	55 °C (reflux)

Jelikož nebylo možné převést fluorescein na odpovídající amid pomocí couplingových činidel, byl proveden pokus, ve kterém byl fluorescein převeden na aktivovaný ester pomocí N-hydroxysukcinimidu na základě postupu uvedeného v literatuře (Schéma 49).⁹⁶

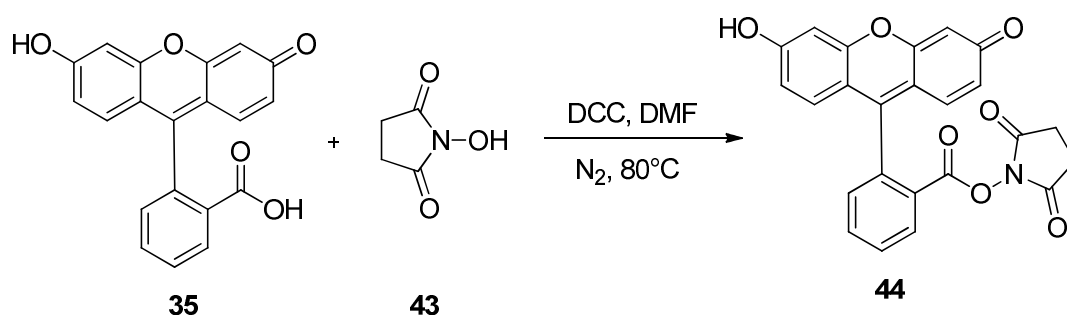


Schéma 48: Reakce Fluoresceinu **35** s N-hydroxysukcinimidem **43**

Fluorescein-sukcinimid **44** byl poté podroben reakci s 2 ekvivalenty propylaminu s použitím triethylaminu jako báze. Po 1-2 hodinách docházelo ke vzniku až 70% produktu **42** (Schéma 50).

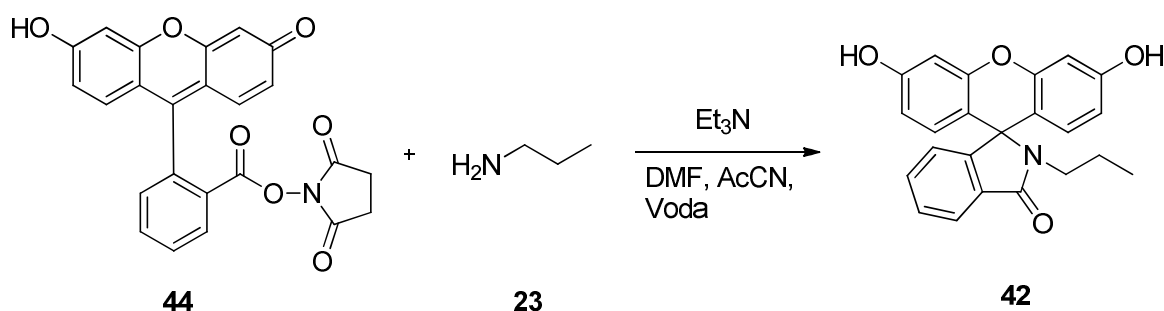


Schéma 49: Optimalizační reakce Fluorescenu **44** s propylaminem **23**

4.2.2. Příprava fluorescein ethylendiaminu

Jelikož se se podmínky reakce Fluorescein-sukcinimidu **44** s propylaminem ukázaly jako vhodné, byla provedena analogická reakce s chráněným ethylendiaminem **21** (Schéma 51). Očekávaný produkt **36** vznikl z 82%. Po odlyofilizování rozpouštědel byl surový produkt **36** podroben štěpení Boc skupiny 4M HCl v dioxanu (Schéma 51). Po 2 hodinách byla reakční směs zneutralizována nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného, což vedlo k vysrážení produktu **37**, který byl po filtraci ještě přečištěn pomocí sloupcové chromatografie mobilní fází složené z 12% MeOH v DCM a izolován ve výtěžku 70%.

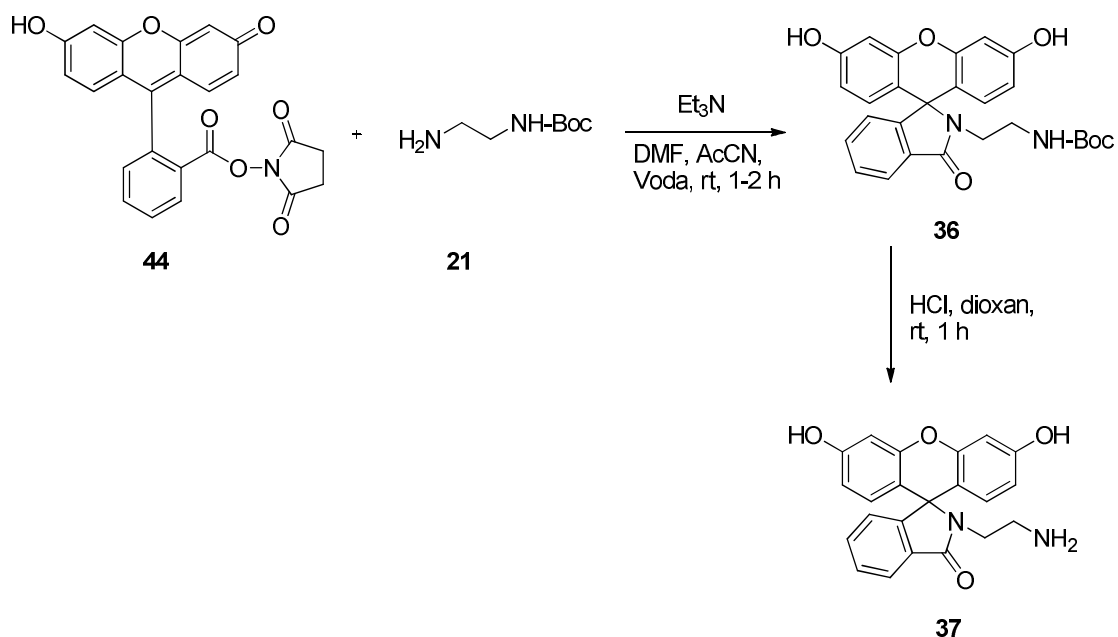


Schéma 50: Příprava Fluorescein-ethylendiaminu **37**

4.2.3. Příprava Fluoresceinem značených amidů kyselin

4.2.3.1. Syntéza amidu kyseliny 4-fluor-3-nitrobenzoové

Pro přípravu amidu kyseliny 4-fluor-3-nitrobenzoové byly použity podmínky optimalizované při reakci s Rhodamin B-ethylendiaminem. Kyselina **6** byla nejprve převedena na chlorid kyseliny **15**, který byl následně reagován s fluorescein-ethylendiaminem **37** v přítomnosti pyridinu za chlazení (Schéma 52). V tomto případě ale k reakci nedocházelo. Proto byl další pokus proveden za laboratorní teploty, kdy sice docházelo ke vzniku produktu, ale pouze z 5%, kromě toho vznikalo velké množství nečistot.

Z časových důvodů nebyla reakce dále optimalizována a proto se cílový fluoresceinem značený hydroxylaminový derivát nepodařilo připravit.

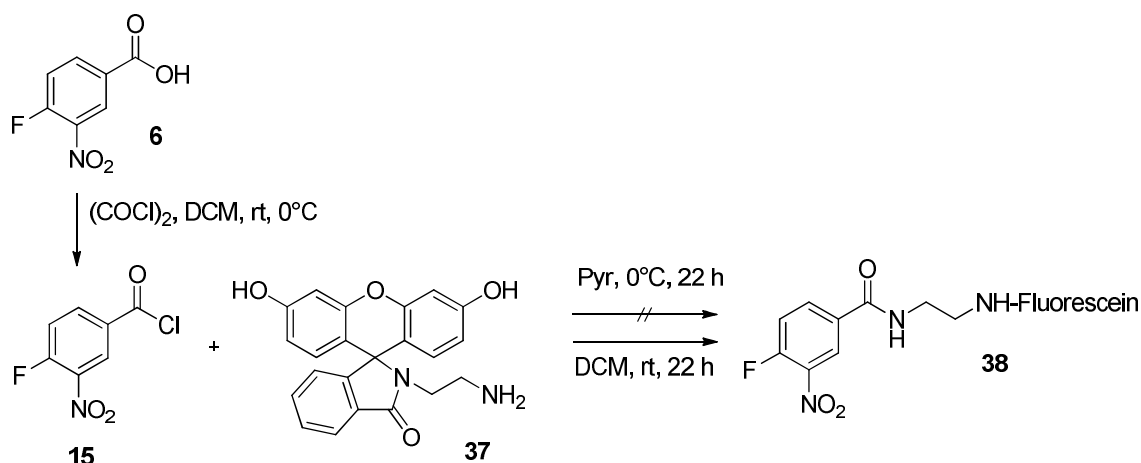


Schéma 51: Navázání Fluorescein-ethylendiaminu **37** na 4-fluor-3-nitrobenzoovou kyselinu

4.2.3.2. Syntéza amidu kyseliny 6-fluornikotinové

Pro přípravu amidu kyseliny 6-fluornikotinové byly opět použity podmínky optimalizované při reakci s Rhodamin B-ethylendiaminem. Kyselina **31** reagována s Fluorescein-ethylendiaminem **37** v přítomnosti EDC*HCl za laboratorní teploty (Schéma 50). Očekávaný produkt **39** bohužel vznikal pouze z 27% doprovázený velkým množstvím nečistot. Podobného výsledku bylo dosaženo i v případě postupu, ve kterém byla kyselina **31** nejprve převedena na chlorid **32** působením oxalylchloridu. Následnou reakcí se sloučeninou **37** vznikalo pouze 5% produktu (Schéma 53). I v tomto případě nebyla z časových důvodů reakce dále optimalizována.

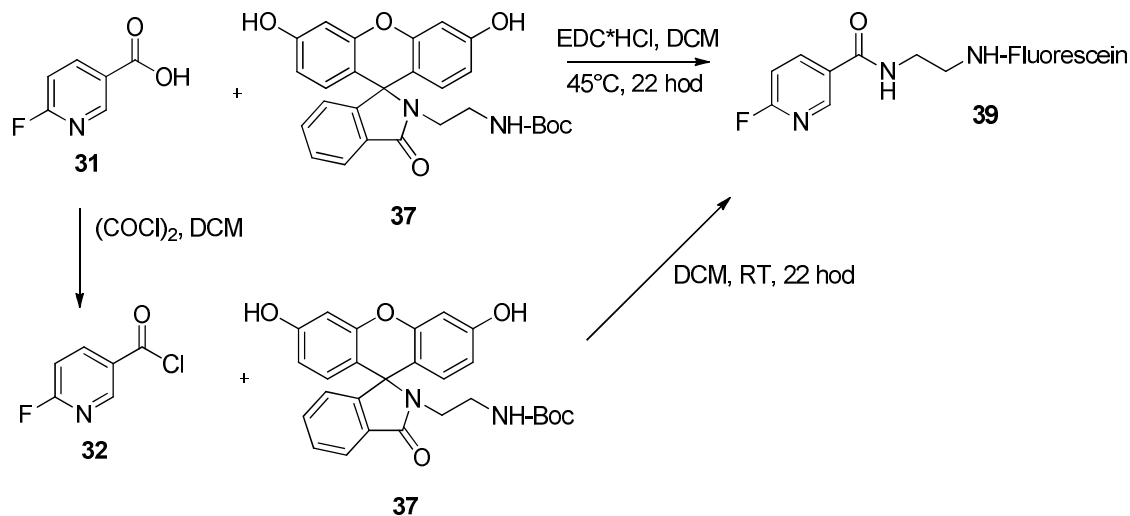


Schéma 52: Navázání Fluorescein-ethylendiaminu **37** na 6-fluornikotinovou kyselinu

4.3. Oxidace hydroxylaminové skupiny a hetero-Diels-Alderova reakce

Připravené hydroxylaminové deriváty **14** a **33** byly použity pro studium možnosti jejich oxidace pomocí peroxidu vodíku na odpovídající nitrososlučeniny, které následně mohou podléhat hetero-Diels-Alderově reakci různými dieny za vzniku oxazinových derivátů (Schéma 54).

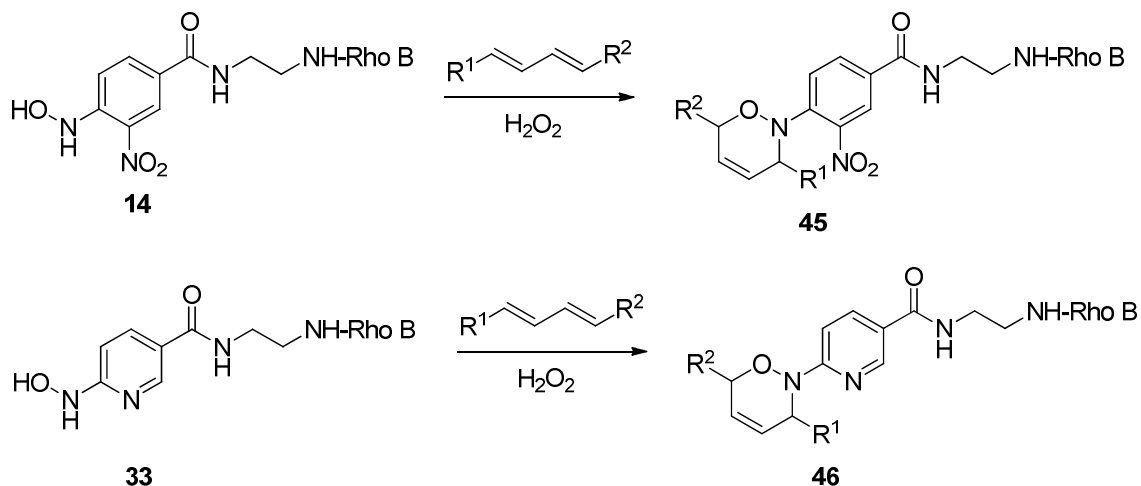


Schéma 53: Obecné schéma oxidace hydroxylaminů **14** a **33** a následná hetero-Diels-Alderova reakce

4.3.1. Optimalizace oxidace hydroxylaminů pomocí peroxidu vodíku

Studium oxidace peroxidem vodíku a reaktivity s dieny bylo provedeno s hydroxylaminovým derivátem **14**. Jako dieny byly použity kyselina sorbová **47** a cyklohexadien **48** (Schéma 55).

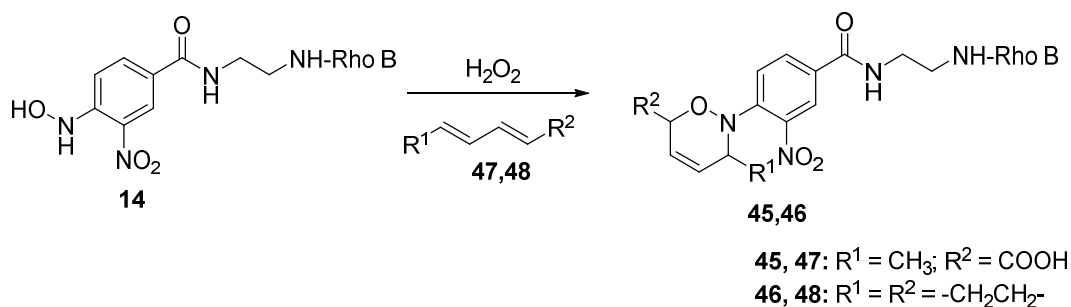


Schéma 54: Obecná rovnice oxidace hydroxylaminu **14** a následné reakce s dieny **47** a **48**

Oxidační reakce byly nejprve studovány v DCM jako rozpouštědle se 2 ekvivalenty peroxidu vodíku a 1,5 ekvivalentem dienu. V případě kyseliny sorbové nedocházelo po 48 h ke vzniku produktu **45** (Tabulka 10), v případě cyklohexadienu bylo v reakční směsi přítomno 20 % produktu **46** vedle značného množství výchozího hydroxylaminu a řady nečistot. Z tohoto důvodu byl proveden pokus s použitím heterogenního systému rozpouštědel (DCM/voda) a fázového katalyzátoru TBAHS (Tabulka 10). Ani v tomto případě ale nebylo dosaženo uspokojivé konverze a čistoty produktů **45** a **46**.

Tabulka 11: Zkouška oxidovatelnosti hydroxylaminu **14** peroxidem vodíku

Činidla	Dien	Rozpouštědlo	Reakční čas	Produkt [%]	Výchozí látka [%]
2 ekv H_2O_2	1,5 ekv kyseliny sorbové	DCM	48 h	0	71
5 ekv H_2O_2 TBAHS	1,5 ekv kyseliny sorbové	DCM/ H_2O 1:1	48 h	5	24
2 ekv H_2O_2	1,5 ekv cyklohexadien	DCM	48 h	20	45
5 ekv H_2O_2 TBAHS	1,5 ekv cyklohexadien	DCM/ H_2O 1:1	48 h	19	69

Jelikož oxidace peroxidem vodíku mohou být závislé na pH roztoku, následující pokusy byly provedeny v kyselém, neutrálním a alkalickém pH ve směsi DMSO/voda 1:1 (Tabulka 11). V případě kyseliny sorbové nedocházelo ani v jednom případě ke vzniku požadovaného produktu. Z tohoto důvodu byly další optimalizační reakce provedeny jen s cyklohexadienem.

Tabulka 12: Zkouška závislosti oxidovatelnosti hydroxylaminu **14** na pH s kyselinou sorbovou

Činidla	Dien	Rozpouštědlo	Reakční čas	pH	Produkt [%]	Výchozí látka [%]
2 ekv H ₂ O ₂	1,5 ekv kyseliny sorbové	DMSO/H ₂ O 1:1	48 h	4	0	57
2 ekv H ₂ O ₂	1,5 ekv kyseliny sorbové	DMSO/H ₂ O 1:1	48 h	7	0	79
2 ekv H ₂ O ₂	1,5 ekv kyseliny sorbové	DMSO/H ₂ O 1:1	48 h	10	0	20

V případě cyklohexadienu docházelo při pH 4 k úplnému odreagování výchozí látky, nicméně produkt byl kontaminován velkým množstvím nečistot (Tabulka 13). V alkalickém pH potom docházelo k rozkladu výchozího hydroxylaminu **14**.

V dalších experimentech bylo zvýšeno množství oxidačního činidla a reakce byly provedeny v užším rozsahu pH (Tabulka 13). Z tabulky 13 je patrné, že nejvíce produktu vzniká při pH 3, bohužel dochází také ke vzniku značného množství nečistot.

Tabulka 13: zkouška závislosti oxidovatelnosti hydroxylaminu **14** na pH s cyklohexadienem

Činidla	Dien	Rozpouštědlo	Reakční čas	pH	Produkt [%]	Výchozí látka [%]
2 ekv H ₂ O ₂	2 ekv cyklohexadien	DMSO/H ₂ O 1:1	48 h	4	22	0
2 ekv H ₂ O ₂	2 ekv cyklohexadien	DMSO/H ₂ O 1:1	48 h	7	13	44
2 ekv H ₂ O ₂	2 ekv cyklohexadien	DMSO/H ₂ O 1:1	48 h	10	---	rozklad
4 ekv H ₂ O ₂	2 ekv cyklohexadien	DMSO/H ₂ O 1:1	48 h	1	23	10
4 ekv H ₂ O ₂	2 ekv cyklohexadien	DMSO/H ₂ O 1:1	48 h	3	29	1
4 ekv H ₂ O ₂	2 ekv cyklohexadien	DMSO/H ₂ O 1:1	48 h	4	21	14
4 ekv H ₂ O ₂	2 ekv cyklohexadien	DMSO/H ₂ O 1:1	48 h	6	10	37
4 ekv H ₂ O ₂	2 ekv cyklohexadien	DMSO/H ₂ O 1:1	48 h	10	14	35

S cílem minimalizovat množství nečistot vznikajících během reakce při optimálním pH 3, byla provedena změna rozpouštědla z DMSO na MeOH. Působením 4 ekvivalentů peroxidu vodíku a 2 ekvivalentů cyklohexadienu na sloučeninu **14** v roztoku MeOH/voda 1:1 o pH 3 byl produkt **46** v reakční směsi přítomen z 73% (Schéma 56). Tyto podmínky byly tedy zvoleny jako optimální.

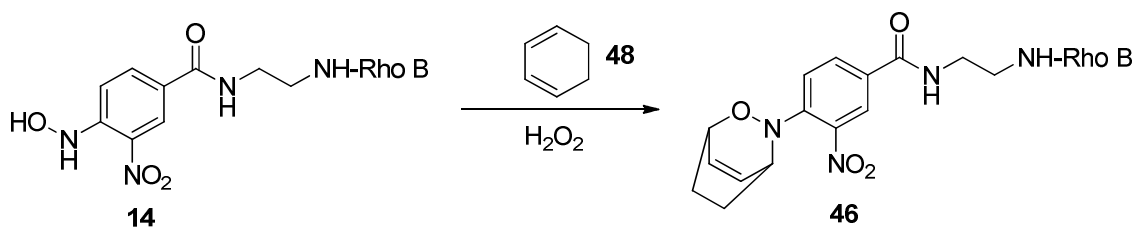


Schéma 55: Optimalizační reakce hydroxylaminu **14** s cyklohexadienem **48**

4.3.2. Příprava derivátů oxazinů

Vzhledem k úspěšné optimalizaci reakce hydroxylaminu **14** s cyklohexadienem **48** byly optimalizované podmínky otestovány i pro jiné dieny (kyselinu sorbovou **47**, isopren **55** a 2,3-dimethylbuta-1,3-dien **56**) (Schéma 57). Stejně tak byla provedena oxidace a následná hetero-Diels-Alderova reakce u hydroxylaminu **33** (Schéma 57).

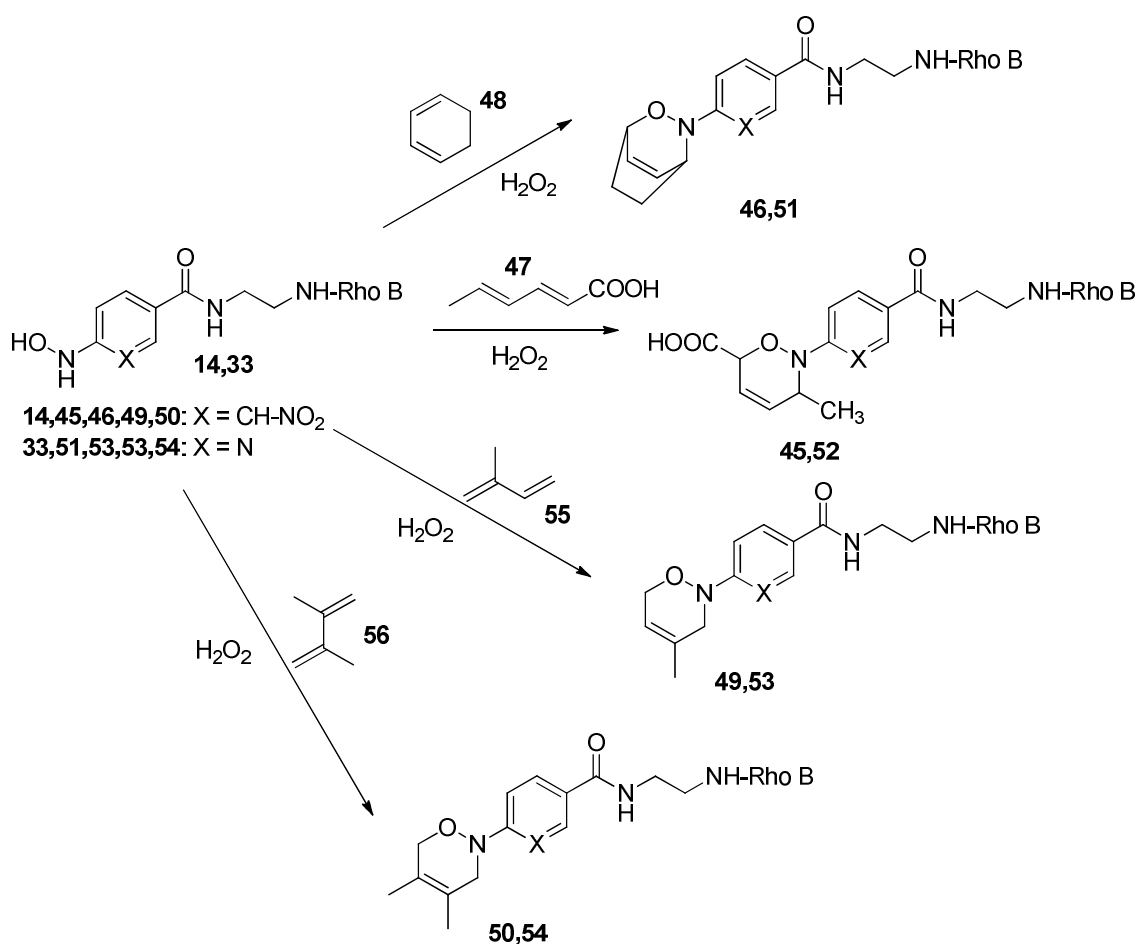


Schéma 56: Použití hydroxylaminů **14** a **33** k přípravě oxazinů **45,46** a **49-54**

Reakce byly provedeny v analytickém množství a ve všech případech byl pozorován vznik oxazinových derivátů z 51-74% (Tabulka 14). V případě hydroxylaminu **14** docházelo kromě tvorby produktu také ke vzniku neidentifikovaných nečistot, v případě hydroxylaminu **33** pak docházelo ve všech reakcích ke vzniku majoritního vedlejšího produktu, pravděpodobně N-oxidu příslušné látky.

Tabulka 14: Přehled použitých dienů a výtěžků jednotlivých reakcí

Hydroxylamin	Dien	Produkt [%]	Výchozí látka [%]
14	Cyklohexadien	73	0
14	Kyselina sorbová	70	0
14	Isopren	62	0
14	2,3-dimethylbuta-1,3-dien	51	0
33	Cyklohexadien	74	0
33	Kyselina sorbová	59	0
33	Isopren	60	0
33	2,3-dimethylbuta-1,3-dien	66	0

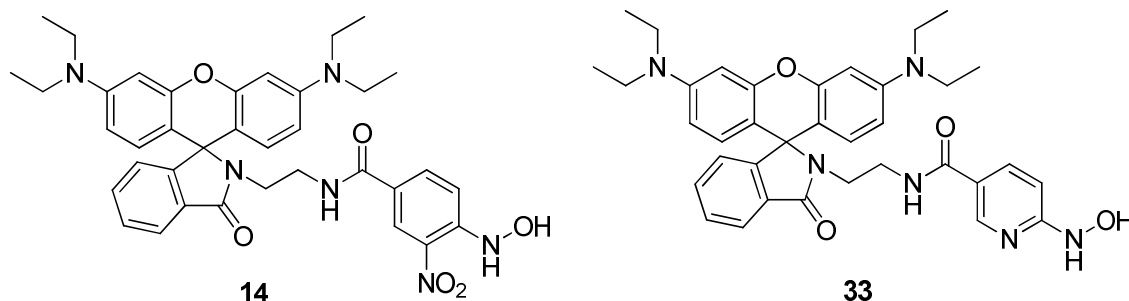
Následně byly všechny výše uvedené reakce provedeny v preparativním množství s cílem izolovat a plně identifikovat jednotlivé oxazinové deriváty **45,46** a **49-54**. Bohužel při použití hydroxylaminu **14** docházelo v preparativním množství ke vzniku většího množství nečistot, než v případě experimentů prováděných v analytickém množství. Reakce s derivátem **33** probíhaly téměř identicky jako v analytickém množství. Připravené oxaziny byly následně přečištěny pomocí semipreparativní HPLC a byly získány ve výtěžku 7-49% (Tabulka 15).

Tabulka 15: Přehled čistot a výtěžků finálních produktů

Oxazin	Surová čistota [%]	Izolovaná čistota [%]	Výtěžek [%]
45	21	84	11
46	28	94	7
49	48	91	48
50	36	75	13
51	80	80	15
52	42	85	13
53	74	96	9
54	73	95	49

4.4. Spektrální vlastnosti

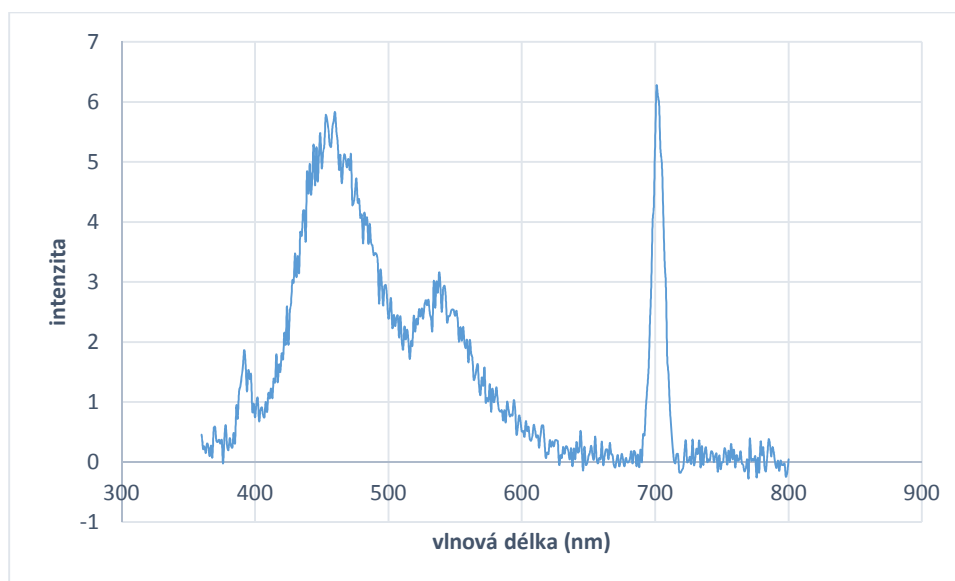
U námi připravených hydroxylaminových derivátů **14** a **33** (Obrázek 13) byly studovány jejich spektrální vlastnosti.



Obrázek 13: Deriváty u nichž byly studovány spektrální vlastnosti

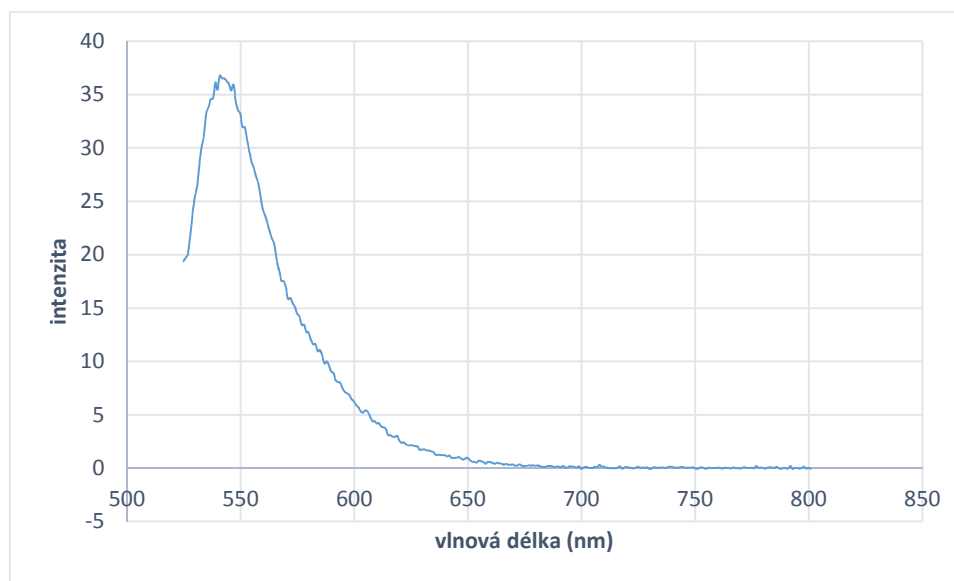
4.4.1. Fluorescenční vlastnosti

Nejprve byly studovány fluorescenční vlastnosti obou připravených hydroxylaminů **14** a **33**. Základní excitační a emisní spektra byla měřena v methanolu, následně byla studována závislost jejich fluorescence na pH ve fosfátovém pufru. Na obrázku 14 můžeme vidět excitační spektrum derivátu **14** s maximy v cca 460 a 535 nm, v oblasti cca 700 nm je vidět pík methanolu.



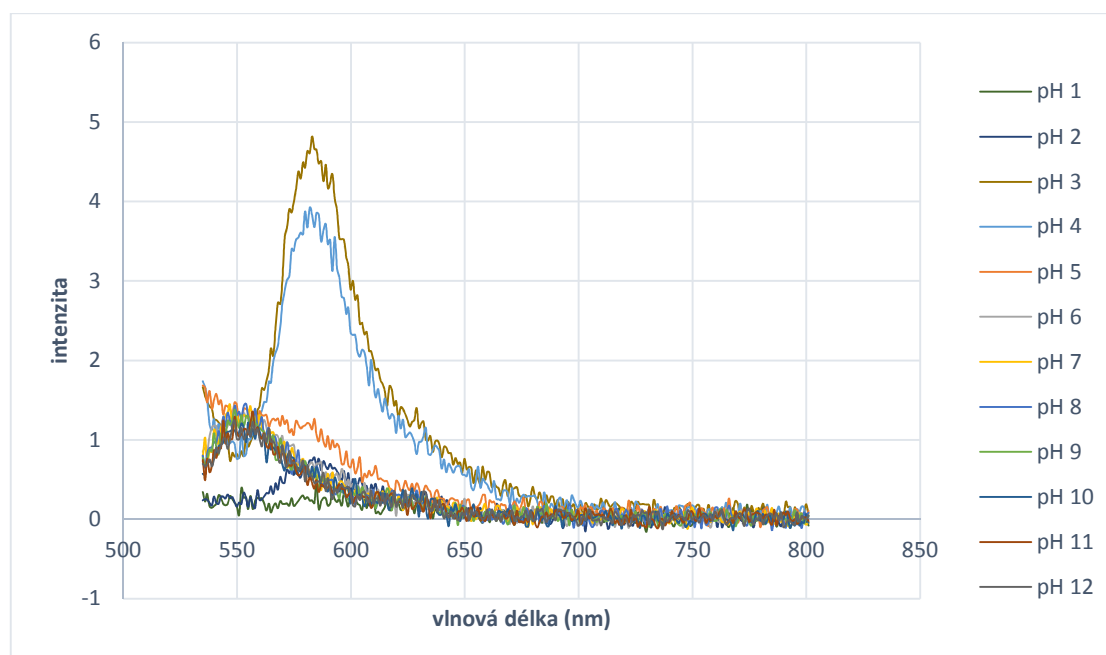
Obrázek 14: Excitační spektrum derivátu **14**

Emisní spektrum bylo následně měřeno po excitaci při 525 nm. Na obrázku 15 je patrné emisní maximum při 540 nm. Kvantový výtěžek $\Phi = 0,31\%$.



Obrázek 15: Emisní spektrum derivátu 14

Následně bylo změřeno emisní fluorescenční spektrum v závislosti na změně pH. Jako excitační vlnová délka bylo použito 525 nm. Z obrázku 14 je patrné, že při pH 1-4 se nachází emisní maximum při cca 580 nm, navíc při pH 3 a 4 dochází k dramatickému nárůstu intenzity fluorescence. Emisní maximum při pH 6 – 12 je pak mírně posunuto k 550 nm.

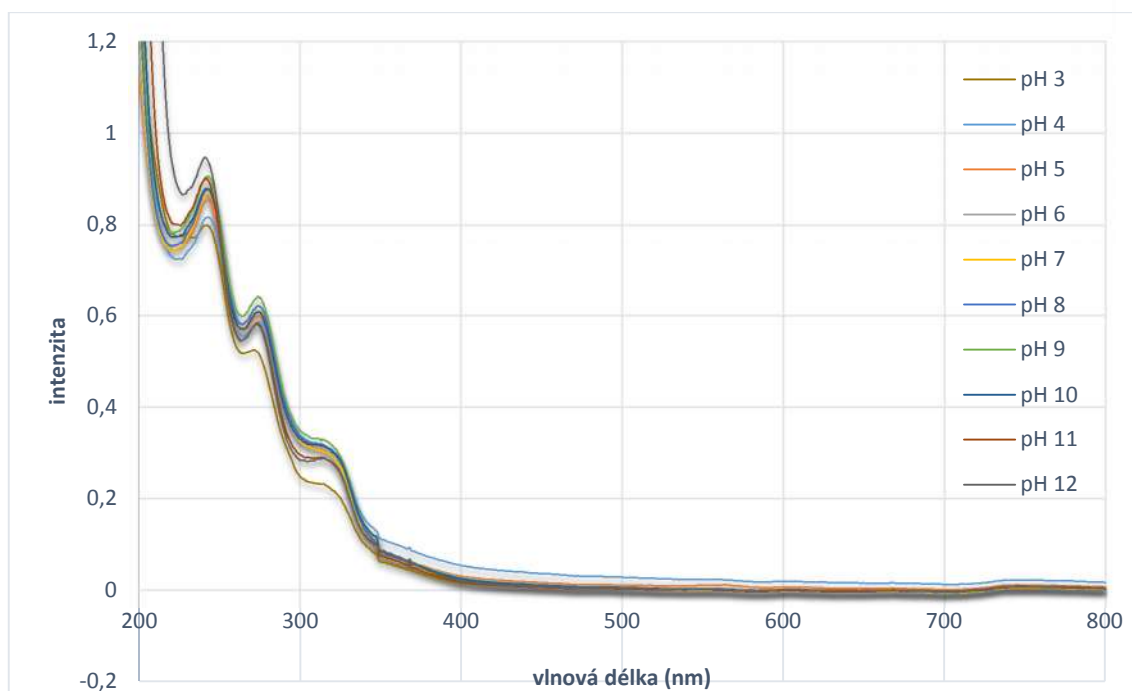


Obrázek 16: pH závislost derivátu 14 pro excitaci při 525 nm

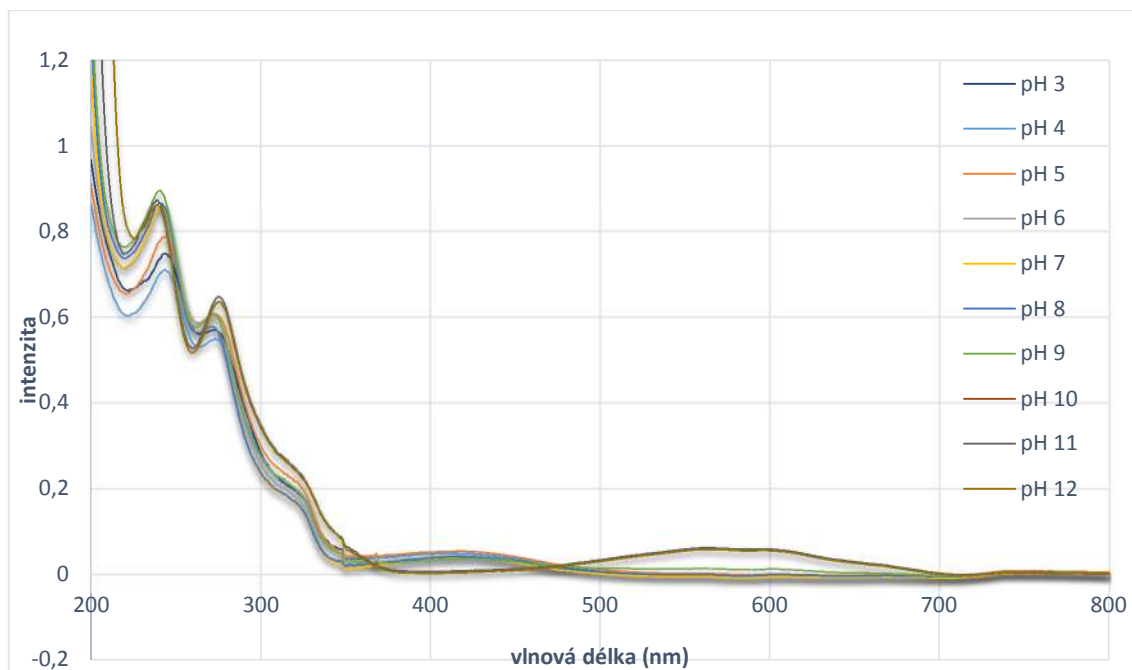
V případě hydroxylaminu **33** nebylo z neznámého důvodu možné naměřit excitační a tím pádem ani emisní fluorescenční spektra.

4.4.2. Absorpční spektra

U připravených hydroxylaminů **14** a **33** byla měřena také závislost jejich absorpčních spekter na pH. Z obrázku 17 je zřejmé, že změna pH nemá vliv na absorpční vlastnosti derivátu **33** a křivka závislosti je při všech hodnotách pH téměř totožná. Jiná situace panuje v případě závislosti u derivátu **14**, kdy je z obrázku 18 vidět, že v zásadité oblasti (pH 9-12) dochází k zániku maxima při cca 420 nm a dochází ke vzniku nového absorpčního maxima s hodnotou odpovídající cca 580 nm.



Obrázek 17: Závislost absorbance na pH derivátu **33**



Obrázek 18: Závislost absorbance na pH derivátu 14

5. Experimentální část

5.1. Metody

HPLC/MS analýzy byly provedeny za použití UHPLC/MS systému, složeného z UHPLC chromatografu Acquity s detektorem fotodiodového pole a jednoduchého kvadrupólového hmotnostního spektrometru Waters, za použití kolony X-Select C18 při teplotě 30 °C s průtokovou rychlostí 600 µl/min. Mobilní fáze se skládala z (A) octanu amonného ve vodě (0,01 mol/dm³) a (B) acetonitrilu s lineárně programovaným gradientem rostoucím v průběhu 2,5 minut a udržovaným po dobu 1,5 minuty. Kolona byla ekvilibrována použitím 10 % roztoku (B) po dobu 1 minuty. Zdroj APCI byl nastaven na vybíjecí proud 5 µA, odpařovací teplotu 350 °C a kapilární teplotu 200 °C.

Čistota sloučeniny byla stanovena jako poměr plochy daného píku k celkové ploše všech píků v dané reakční směsi.

Čištění bylo provedeno pomocí semipreparativní HPLC, Waters 1500 vybavené Autosamplerem 2707, binárním HPLC čerpadlem 1525, Waters detektorem diodového pole 2998 a Waters sběračem frakcí III s kolonou s reverzní fází YMC C18 o velikosti 20 x 100 mm s průměrem částic o velikosti 5 µm. Mobilní fáze se skládala z acetonitrilu a octanu amonného ve vodě (10 mmol/dm³) s gradientem rostoucím po dobu 6 minut.

NMR spektra byla měřena v roztoku DMSO – *d*6 na spektrometru Jeol ECX – 500 (500 MHz). Hodnoty chemického posunu δ jsou vyjádřeny v jednotkách ppm a hodnoty interakční konstanty *J* v Hz.

Fluorescenční spektra byla měřena na přístroji Cary Eclipse Varian.

Podrobný postup přípravy pro sloučeniny **21**⁹⁵ a **44**⁹⁶ je popsán v literatuře.

5.2. Přípravy

2-(2-aminoethyl)-3',6'-bis(diethylamino)spiro[isoindoline-1,9'-xanthen]-3-on (27)

Rhodamin B **13** (1 g, 2,10 mmol) byl rozpuštěn v DCM (40 ml). Do roztoku byl přidán EDC·HCl (520 mg, 2,73 mmol) a Boc-EDA **21** (435 mg, 2,73 mmol). Reakce probíhala za stálého míchání při laboratorní teplotě 2 hodiny. Po odstavení bylo DCM odpařeno a odparek podroben ochrání pomocí 4M HCl v dioxanu (25 ml). Po 2 hodinách míchání za laboratorní teploty byla reakční směs zneutralizována nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného a produkt byl extrahován do DCM. Po vysušení bezvodým síranem sodným byl DCM odpařen. Produkt byl získán ve formě fialové pevné látky ve výtěžku 700 mg (69%).

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1.07 (t, $J=7.02$ Hz, 12 H) 3.03 - 3.09 (m, 2 H) 3.14 - 3.20 (m, 2 H) 3.29 (q, $J=7.45$ Hz, 8 H) 3.55 (br. s, 2 H) 6.32 (dd, $J=9.00, 2.60$ Hz, 2 H) 6.37 (d, $J=2.43$ Hz, 2 H) 6.38 (d, $J=8.90$ Hz, 2 H) 6.97 - 6.99 (m, 1 H) 7.47 - 7.50 (m, 2 H) 7.78 - 7.81 (m, 1 H); ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 12.41, 37.57, 40.42, 43.62, 64.23, 97.26, 104.71, 108.06, 122.30, 123.56, 128.20, 128.22, 129.94, 132.72, 148.32, 152.54, 153.93, 167.60. MS m/z pro $\text{C}_{30}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_2$: 484.63, nalezeno 485.81 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

***N*-(2-(3',6'-bis(diethylamino)-3-oxospiro[isoindoline-1,9'-xanthen]-2-yl)ethyl)-4-(hydroxyamino)-3-nitrobenzenamid (14)**

Kyselina 4-fluor-3-nitrobenzoová **8** (100 mg, 0,54 mmol) byla rozpuštěna v bezvodém DCM (3 ml), do roztoku byl přidán oxalyl chlorid (0,51 ml, 2,70 mmol) a DMF (5 μl). Směs byla míchána za laboratorní teploty 22 hodin. Po odstavení byla rozpouštědla a nezreagovaný oxalyl chlorid odstraněny na vakuové odparce. Výtěžek byl 102 mg (94%). Surový chlorid **15** (102 mg, 0,51 mmol), byl rozpuštěn v bezvodém DCM (10 ml) a ochlazen ledem. Do tohoto roztoku byl přidán roztok složený z bezvodého DCM (20 ml) a Rhodaminu B s navázaným ethylendiaminem **27** (248 mg, 0,51 mmol). Reakce probíhala za chlazení ledem po dobu 22 hodin. Po odstavení byla směs vytřepána 3x nasyceným roztokem NaHCO_3 (30 ml), 3x vodou (30 ml) a 3x solankou (30 ml). Po vysušení bezvodým Na_2SO_4 byl DCM odpařen na vakuové odparce. Výtěžek činil 229 mg (63%). Surový derivát **28** (146 mg, 0,22 mmol) byl rozpuštěn v pyridinu (10 ml). Do tohoto roztoku byl přidán $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ (23 mg, 0,33 mmol). Reakce byla za stálého míchání zahřívána v olejové lázni nastavené na 80°C po dobu 3 hodin. Po zlyofilizování pyridinu byla směs podrobena čištění pomocí kolonové chromatografie na silikagelu, kde mobilní fází byl 5% roztok methanolu v DCM. Látka byla získána ve formě hnědočervených krystalů ve výtěžku 197 mg což je 55%.

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1.05 (t, $J=6.87$ Hz, 12 H) 3.11 - 3.20 (m, 4 H) 3.27 (q, $J=6.87$ Hz, 8 H) 6.30 (d, $J=8.87$ Hz, 2 H) 6.35 (d, $J=1.72$ Hz, 2 H) 6.38 (d, $J=8.87$ Hz, 2 H) 6.95 - 7.00 (m, 1 H) 7.33 (d, $J=9.16$ Hz, 1 H) 7.41 - 7.51 (m, 2 H) 7.72 - 7.80 (m, 1 H) 7.87 (d, $J=8.88$ Hz, 1 H) 8.34 (t, $J=4.72$ Hz, 1 H) 8.44 (s, 1 H) 10.05 (br. s., 1 H); ^{13}C NMR (125.77 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 12.92, 39.38, 44.13, 64.83, 97.81, 105.28, 108.61, 114.30, 121.94, 122.48, 124.15, 125.07, 125.08, 128.20, 128.26, 128.82, 130.58, 133.27, 134.98, 148.25, 148.82, 153.09, 154.50, 164.43, 168.20. MS m/z pro $\text{C}_{37}\text{H}_{40}\text{N}_6\text{O}_6$: 664.75, nalezeno 665.35 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

***N*-(2-(3',6'-bis(diethylamino)-3-oxospiro[isoindoline-1,9'-xanthen]-2-yl)ethyl)-6-(hydroxyamino)-nikotinamid (33)**

Rhodamin B s navázaným ethylendiaminem **27** (3,44 g, 7,10 mmol) byl rozpuštěn v DCM (50 ml). Do tohoto roztoku byla přidána kyselina 6-fluornikotinová **31** (1 g, 7,10 mmol) a EDC*HCl (1,63 g, 8,52 mmol). Reakce probíhala za laboratorní teploty po dobu 22 hodin. Po odstavení byla směs vytřepána 3x nasyceným roztokem NaHCO₃ (30 ml), 3x vodou (30 ml) a 3x solankou (30 ml). Po vysušení bezvodým Na₂SO₄ byl odpařen DCM. Výtěžek činil 1,375 g (32%). Surový derivát **29** (461 mg, 0,76 mmol) byl rozpuštěn v DMSO (25 ml). Do tohoto roztoku byl přidán NH₂OH*HCl (1,052 g, 15,14 mmol) a DBU (2,26 ml, 15,14 mmol). Reakce probíhala v mikrovlnném reaktoru nastaveném na 100°C a 300W po dobu 1 hodiny. Po zlyofilizování byl produkt získán ve formě tmavě modré krystalické látky, výtěžek reakce činil 400 mg což je 85%. Pro NMR analýzu byl vzorek přečištěn na semipreparativním HPLC. Mobilní fáze byla složena z (A) 0.01 mol.dm⁻³ octanu amonného ve vodě a (B) AcCN s lineárně programovaným gradientem od 70% B do 90% B během 6 minut.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.04 (t, *J*=7.02 Hz, 12 H) 2.98 - 3.07 (m, 2 H) 3.11 - 3.18 (m, 2 H) 3.29 (q, *J*=7.02 Hz, 8 H) 6.32 (dd, *J*=9.96, 2.50 Hz, 2 H) 6.37 (d, *J*=2.50 Hz, 2 H) 6.38 (d, *J*=8.96 Hz, 2 H) 6.74 (d, *J*=6.17 Hz, 1 H) 6.91 - 7.00 (m, 1 H) 7.41 - 7.49 (m, 2 H) 7.73 - 7.79 (m, 1 H) 7.80 - 7.89 (m, 1 H) 8.12 (br. s., 1 H) 8.35 - 8.43 (m, 1 H); ¹³C NMR (125.77 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 12.96, 38.13, 40.42, 44.17, 64.79, 97.82, 105.28, 108.63, 109.58, 122.30, 123.56, 124.13, 128.20, 128.22, 130.51, 133.29, 137.13, 147.59, 148.88, 153.10, 154.49, 164.60, 164.92, 168.17. MS *m/z* pro C₃₆H₄₀N₆O₄: 620.74, nalezeno 621.44 [M+H]⁺.

***N*-(2-(2-aminoethyl)-3',6'-dihydroxyspiro[isoindoline-1,9'-xanthen]-3-on) (37)**

V DMF (1 ml) byl rozpuštěn Fluorescein-sukcinimid **46** (45 mg, 0,14 mmol). Do tohoto roztoku byl přidán roztok Boc-EA **21** (34 mg, 0,27 mmol) a triethylaminu (69 μl, 0,54 mmol) v roztoku AcCN:voda 1:1 (1 ml). Reakce probíhala za stálého míchání po dobu 1 hodiny. Po odpaření AcCN a odlyofilizování vody a DMF byl zbytek podroben odchránění Boc skupiny pomocí 4M HCl (5 ml). Po 2 hodinách byla směs zneutralizována a došlo k vysrážení produktu **37**. Oranžová sraženina byla odfiltrována a promyta vodou. Produkt byl podroben čištění pomocí sloupcové chromatografie, kde mobilní fázi byl 12% MeOH v DCM. Produkt byl získán ve formě žlutoranžové pevné látky. Výtěžek činil 35 mg což je 70%.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 2.16 (t, *J*=7.59 Hz, 2 H) 2.94 (t, *J*=7.59 Hz, 2 H) 3.55 (br. s, 2 H) 6.39 (d, *J*=8.72 Hz, 2 H) 6.46 (dd, *J*=8.72, 2.29 Hz, 2 H) 6.59 (d,

$J=2.29$ Hz, 2 H) 6.91 - 7.01 (m, 1 H) 7.41 - 7.55 (m, 2 H) 7.71 - 7.81 (m, 1 H); ^{13}C NMR (125.77 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm 43.64, 64.24, 79.17, 102.84, 109.94, 113.00, 122.95, 124.10, 128.51, 129.05, 130.80, 133.36, 152.51, 153.75, 159.17, 167.62. MS m/z pro $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4$: 374.39, nalezeno 375.41 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

2-(4-((2-(3',6'-bis(diethylamino)-3-oxospiro[isoindoline-1,9'-xanthen]-2-yl)ethyl)carbamoyl)-2-nitrophenyl)-3-methyl-3,6-dihydro-2H-1,2-oxazine-6-karboxylová kyselina (45)

Hydroxylamin **14** (240 mg, 0,36 mmol) byl rozpuštěn v roztoku MeOH:voda 1:1 (40 ml) o pH 3 (dosaženo pomocí kyseliny octové). Do tohoto roztoku byla následně přidána kyselina sorbová (162 mg, 1,44 mmol) a 30% peroxid vodíku (295 μl , 2,88 mmol). Reakce probíhala za laboratorní teploty po dobu 22 hodin. Po odstavení byl produkt extrahován do DCM a tato fáze byla vytřepána 3x nasyceným roztokem NaHCO_3 , 3x vodou a 3x solankou. Po vysušení bezvodým Na_2SO_4 byl odpařen DCM. Odparek byl podroben purifikaci na semipreparativním HPLC. Mobilní fáze byla složena z (A) 0.01 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ octanu amonného ve vodě a (B) AcCN s lineárně programovaným gradientem od 30% B do 60% B během 6 minut. Produkt byl získán ve formě světle fialové pevné látky. Výtěžek činil 14 mg což je 7%.

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm 1.06 (t, $J=6.87$ Hz, 12 H) 1.11 (d, $J=6.44$ Hz, 3 H) 3.08 - 3.14 (m, 2 H) 3.15 - 3.22 (m, 2 H) 3.25 - 3.31 (m, 8 H) 4.36 - 4.43 (m, 1 H) 4.93 (d, $J=1.15$ Hz, 1 H) 5.94 (d, $J=10.02$ Hz, 1 H) 6.08 - 6.12 (m, 1 H) 6.27 - 6.34 (m, 2 H) 6.34 - 6.42 (m, 4 H) 6.95 - 7.02 (m, 1 H) 7.27 (d, $J=8.81$ Hz, 1 H) 7.47 - 7.51 (m, 2 H) 7.77 - 7.81 (m, 1 H) 7.91 (dd, $J=8.81, 1.43$ Hz, 1 H) 8.04 (d, $J=1.43$ Hz, 1 H) 8.46 (t, $J=5.44$ Hz, 1 H); ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm 12.38, 14.22, 37.66, 40.42, 43.62, 52.50, 64.24, 76.73, 97.28, 104.73, 108.10, 121.38, 122.31, 123.58, 123.83, 128.25, 128.43, 129.98, 130.42, 131.07, 132.22, 132.75, 134.32, 139.63, 140.92, 148.32, 152.54, 153.91, 163.48, 167.60, 168.27. MS m/z pro $\text{C}_{43}\text{H}_{46}\text{N}_6\text{O}_8$: 774.86, nalezeno 775.67 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

4-(2-oxa-3-azabicyclo[2.2.2]oct-5-en-3-yl)-N-(2-(3',6'-bis(diethylamino)-3-oxospiro[isoindoline-1,9'-xanthen]-2-yl)ethyl)-3-nitrobenzamid (46)

Hydroxylamin **14** (160 mg, 0,24 mmol) byl rozpuštěn v roztoku MeOH:voda 1:1 (20 ml) o pH 3 (dosaženo pomocí kyseliny octové). Do tohoto roztoku byl následně přidán cyklohexadien (45 μl , 0,48 mmol) a 30% peroxid vodíku (99 μl , 0,96 mmol). Reakce probíhala za laboratorní teploty po dobu 22 hodin. Po odstavení byl produkt extrahován do DCM a tato fáze byla vytřepána 3x nasyceným roztokem NaHCO_3 , 3x vodou a 3x

solankou. Po vysušení bezvodým Na₂SO₄ byl odpařen DCM. Odparek byl podroben purifikaci na semipreparativním HPLC. Mobilní fáze byla složena z (A) 0.01 mol.dm⁻³ octanu amonného ve vodě a (B) AcCN s lineárně programovaným gradientem od 70% B do 90% B během 6 minut. Produkt byl získán ve formě zelené pevné látky. Výtěžek činil 16 mg což je 11%.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.03 (t, *J*=7.02 Hz, 12 H) 1.36 - 1.39 (m, 1 H) 1.44 - 1.50 (m, 1 H) 1.96 - 2.12 (m, 2 H) 3.02 - 3.10 (m, 2 H) 3.11 - 3.18 (m, 2 H) 3.25 - 3.35 (m, 8 H) 4.44 - 4.56 (m, 1 H) 4.73 - 4.78 (m, 1 H) 6.22 (ddd, *J*=7.88, 6.16, 1.51 Hz, 1 H) 6.29 - 6.46 (m, 6 H) 6.63 (ddd, *J*=8.09, 6.09, 1.51 Hz, 1 H) 6.92 - 6.99 (m, 1 H) 7.28 (d, *J*=8.88 Hz, 1 H) 7.42 - 7.51 (m, 2 H) 7.72 - 7.83 (m, 1 H) 7.83 (dd, *J*=8.88, 2.08 Hz, 1 H) 8.10 (d, *J*=2.08 Hz, 1 H) 8.41 (t, *J*=5.37 Hz, 1 H); ¹³C NMR (125.77 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 11.33, 20.55, 22.93, 37.72, 39.95, 43.65, 55.68, 64.17, 70.20, 97.29, 104.81, 108.26, 121.49, 122.35, 123.56, 124.49, 128.89, 129.20, 130.51, 130.80, 131.59, 132.26, 132.90, 140.83, 147.52, 148.38, 153.02, 153.78, 164.10, 167.52. MS *m/z* pro C₄₃H₄₆N₆O₆: 742.86, nalezeno 743.75 [M+H]⁺.

***N*-(2-(3',6'-bis(diethylamino)-3-oxospiro[isoindoline-1,9'-xanthen]-2-yl)ethyl)-4-(4-methyl-3,6-dihydro-2*H*-1,2-oxazin-2-yl)-3-nitrobenzamide (49)**

Hydroxylamin **14** (175 mg, 0,26 mmol) byl rozpuštěn v roztoku MeOH:voda 1:1 (30 ml) o pH 3 (dosaženo pomocí kyseliny octové). Do tohoto roztoku byl následně přidán isopren (105 mg, 1,05 mmol) a 30% peroxid vodíku (215 μl, 2,10 mmol). Reakce probíhala za laboratorní teploty po dobu 22 hodin. Po odstavení byl produkt extrahován do DCM a tato fáze byla vytřepána 3x nasyceným roztokem NaHCO₃, 3x vodou a 3x solankou. Po vysušení bezvodým Na₂SO₄ byl odpařen DCM. Odparek byl podroben purifikaci na semipreparativním HPLC. Mobilní fáze byla složena z (A) 0.01 mol.dm⁻³ octanu amonného ve vodě a (B) AcCN s lineárně programovaným gradientem od 70% B do 90% B během 6 minut. Produkt byl získán ve formě růžové pevné látky. Výtěžek činil 77 mg což je 48%.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.03 (t, *J*=6.87 Hz, 12 H) 1.78 (s, 3 H) 3.08 - 3.16 (m, 4 H) 3.24 (q, *J*=6.87 Hz, 8 H) 3.77 - 3.82 (m, 2 H) 4.22 - 4.26 (m, 2 H) 5.62 - 5.66 (m, 1 H) 6.30 (dd, *J*=9.02, 2.15 Hz, 2 H) 6.36 (d, *J*=2.15 Hz, 2 H) 6.39 (d, *J*=9.02 Hz, 2 H) 6.92 - 6.98 (m, 1 H) 7.20 (d, *J*=8.72 Hz, 1 H) 7.43 - 7.50 (m, 2 H) 7.73 - 7.80 (m, 1 H) 7.88 (dd, *J*=8.72, 1.43 Hz, 1 H) 8.02 (d, *J*=1.43 Hz, 1 H) 8.41 (t, *J*=4.73 Hz, 1 H); ¹³C NMR (125.77 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 12.95, 20.25, 37.65, 39.35, 44.17, 52.90, 64.81, 67.95, 97.82, 105.26, 108.63, 116.41, 119.49, 122.84, 123.56, 124.13, 128.11, 128.19,

128.23, 129.20, 129.73, 130.57, 131.86, 140.95, 142.99, 148.85, 153.09, 154.45, 163.98, 167.52. MS m/z pro C₄₂H₄₆N₆O₆: 730.85, nalezeno 731.74 [M+H]⁺.

***N*-(2-(3',6'-bis(diethylamino)-3-oxospiro[isoindoline-1,9'-xanthen]-2-yl)ethyl)-4-(4,5-dimethyl-3,6-dihydro-2*H*-1,2-oxazin-2-yl)-3-nitrobenzamide (50)**

Hydroxylamin **14** (448 mg, 0,67 mmol) byl rozpuštěn v roztoku MeOH:voda 1:1 (30 ml) o pH 3 (dosaženo pomocí kyseliny octové). Do tohoto roztoku byl následně přidán 2,3-dimethylbuta-1,3-dien (308 mg, 2,68 mmol) a 30% peroxid vodíku (551 µl, 5,36 mmol). Reakce probíhala za laboratorní teploty po dobu 22 hodin. Po odstavení byl produkt extrahován do DCM a tato fáze byla vytřepána 3x nasyceným roztokem NaHCO₃, 3x vodou a 3x solankou. Po vysušení bezvodým Na₂SO₄ byl odpařen DCM. Odparek byl podroben purifikaci na semipreparativním HPLC. Mobilní fáze byla složena z (A) 0.01 mol.dm⁻³ octanu amonného ve vodě a (B) AcCN s lineárně programovaným gradientem od 90% B do 95% B během 6 minut. Produkt byl získán ve formě růžové pevné látky. Výtěžek činil 54 mg což je 13%.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.02 (t, *J*=6.87 Hz, 12 H) 1.55 (s, 3 H) 1.67 (s, 3 H) 3.11 – 3.20 (m, 4 H) 3.24 (q, *J*=6.87 Hz, 8 H) 3.71 (br. s., 2 H) 4.08 (br. s., 2 H) 6.24 - 6.30 (m, 2 H) 6.31 - 6.38 (m, 2 H) 6.39 (d, *J*=8.72 Hz, 2 H) 6.92 - 6.97 (m, 1 H) 7.19 (d, *J*=8.88 Hz, 1 H) 7.42 - 7.49 (m, 2 H) 7.73 - 7.79 (m, 1 H) 7.87 (d, *J*=8.88 Hz, 1 H) 8.02 (s, 1 H) 8.40 (t, *J*=4.52 Hz, 1 H); ¹³C NMR (125.77 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 12.94, 13.80, 16.03, 38.23, 40.99, 44.18, 52.89, 64.82, 72.18, 97.82, 105.23, 108.63, 116.49, 121.40, 122.84, 124.13, 124.17, 124.57, 128.64, 128.75, 128.81, 130.57, 131.89, 133.28, 140.88, 143.01, 148.84, 153.09, 154.45, 163.99, 168.18. MS m/z pro C₄₃H₄₈N₆O₆: 744.87, nalezeno 745.65 [M+H]⁺.

6-(2-oxa-3-azabicyclo[2.2.2]oct-5-en-2-yl)-*N*-(2-(3',6'-bis(diethylamino)-3-oxospiro[isoindoline-1,9'-xanthen]-2-yl)ethyl)nicotinamid (51)

Hydroxylamin **33** (145 mg, 0,23 mmol) byl rozpuštěn v roztoku MeOH:voda 1:1 (20 ml) o pH 3 (dosaženo pomocí kyseliny octové). Do tohoto roztoku byl následně přidán cyklohexadien (44 mg, 0,46 mmol) a 30% peroxid vodíku (96 µl, 0,92 mmol). Reakce probíhala za laboratorní teploty po dobu 22 hodin. Po odstavení byl produkt extrahován do DCM a tato fáze byla vytřepána 3x nasyceným roztokem NaHCO₃, 3x vodou a 3x solankou. Po vysušení bezvodým Na₂SO₄ byl odpařen DCM. Odparek byl podroben purifikaci na semipreparativním HPLC. Mobilní fáze byla složena z (A) 0.01 mol.dm⁻³ octanu amonného ve vodě a (B) AcCN s lineárně programovaným gradientem od 70%

B do 90% B během 6 minut. Produkt byl získán ve formě oranžovohnědé pevné látky. Výtěžek činil 24 mg což je 15%.

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1.03 (t, $J=7.35$ Hz, 12 H) 1.27 - 1.34 (m, 1 H) 1.51 (tt, $J=12.00, 3.00$ Hz, 1 H) 1.96 - 2.09 (m, 2 H) 3.00 - 3.07 (m, 2 H) 3.11 - 3.18 (m, 2 H) 3.25 (q, $J=7.35$ Hz, 8 H) 4.76 - 4.79 (m, 1 H) 5.22 - 5.27 (m, 1 H) 6.30 - 6.32 (m, 1 H) 6.32 - 6.34 (m, 1 H) 6.34 - 6.36 (m, 1 H) 6.36 - 6.38 (m, 3 H) 6.39 (d, $J=2.02$ Hz, 1 H) 6.46 (ddd, $J=7.88, 5.87, 1.72$ Hz, 1 H) 6.70 (dd, $J=8.74, 0.72$ Hz, 1 H) 6.92 - 6.98 (m, 1 H) 7.42 - 7.48 (m, 2 H) 7.78 - 7.81 (m, 1 H) 7.84 (dd, $J=8.74, 2.43$ Hz, 1 H) 8.20 (t, $J=5.44$ Hz, 1 H) 8.48 (dd, $J=2.43, 0.72$ Hz, 1 H); ^{13}C NMR (125.77 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 12.94, 20.58, 24.25, 38.25, 39.08, 44.17, 51.53, 64.79, 70.17, 97.84, 105.28, 108.63, 109.59, 122.64, 122.87, 124.11, 128.75, 128.78, 130.48, 131.95, 132.63, 133.28, 137.14, 147.59, 148.89, 153.10, 154.47, 164.92, 165.31, 168.17. MS m/z pro $\text{C}_{42}\text{H}_{46}\text{N}_6\text{O}_6$: 700.87, nalezeno 699.47 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

2-(5-((2-(3',6'-bis(diethylamino)-3-oxospiro[isoindoline-1,9'-xanthen]-2-yl)ethyl)carbonyl)pyridin-2-yl)-3-methyl-3,6-dihydro-2H-1,2-oxazine-6-karboxylová kyselina (52)

Hydroxylamin **33** (145 mg, 0,23 mmol) byl rozpuštěn v roztoku MeOH:voda 1:1 (20 ml) o pH 3 (dosaženo pomocí kyseliny octové). Do tohoto roztoku byla následně přidána kyselina sorbová (52 mg, 0,46 mmol) a 30% peroxid vodíku (96 μl , 0,92 mmol). Reakce probíhala za laboratorní teploty po dobu 22 hodin. Po odstavení byl produkt extrahován do DCM a tato fáze byla vytřepána 3x nasyceným roztokem NaHCO_3 , 3x vodou a 3x solankou. Po vysušení bezvodým Na_2SO_4 byl odpařen DCM. Odparek byl podroben purifikaci na semipreparativním HPLC. Mobilní fáze byla složena z (A) 0.01 mol. dm^{-3} octanu amonného ve vodě a (B) AcCN s lineárně programovaným gradientem od 30% B do 60% B během 6 minut. Produkt byl získán ve formě světle červené pevné látky. Výtěžek činil 22 mg což je 13%.

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1.03 (t, $J=7.02$ Hz, 12 H) 1.11 (d, $J=6.48$ Hz, 3 H) 3.04 - 3.10 (m, 2 H) 3.13 - 3.18 (m, 2 H) 3.25 (q, $J=7.02$ Hz, 8 H) 4.76 - 4.82 (m, 1 H) 4.97 (q, $J=2.33$ Hz, 1 H) 5.91 - 5.95 (m, 1 H) 5.98 - 6.03 (m, 1 H) 6.26 - 6.31 (m, 2 H) 6.33 (dd, $J=2.42, 1.06$ Hz, 2 H) 6.35 (dd, $J=8.88, 0.64$ Hz, 2 H) 6.92 - 6.97 (m, 1 H) 7.00 (dd, $J=8.88, 0.64$ Hz, 1 H) 7.43 - 7.47 (m, 2 H) 7.75 - 7.79 (m, 1 H) 7.93 (dd, $J=8.84, 2.36$ Hz, 1 H) 8.20 (t, $J=5.41$ Hz, 1 H) 8.52 (dd, $J=2.36, 0.64$ Hz, 1 H); ^{13}C NMR (125.77 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 12.95, 16.50, 38.19, 40.16, 44.17, 50.71, 64.82, 77.30, 97.84, 105.29, 108.17, 108.63, 121.86, 122.87, 124.13, 124.80, 128.19, 128.23 130.25,

130.51, 133.28, 137.37, 148.07, 148.87, 153.10, 154.50, 160.59, 164.97, 168.22, 169.45. MS m/z pro C₄₂H₄₆N₆O₄: 730.85, nalezeno 731.66 [M+H]⁺.

***N*-(2-(3',6'-bis(diethylamino)-3-oxospiro[isoindoline-1,9'-xanthen]-2-yl)ethyl)-6-(4-methyl-3,6-dihydro-2*H*-1,2-oxazin-2-yl)nicotinamid (53)**

Hydroxylamin **33** (117 mg, 0,19 mmol) byl rozpuštěn v roztoku MeOH:voda 1:1 (20 ml) o pH 3 (dosaženo pomocí kyseliny octové). Do tohoto roztoku byl následně přidán isopren (38 mg, 0,38 mmol) a 30% peroxid vodíku (78 µl, 0,76 mmol). Reakce probíhala za laboratorní teploty po dobu 22 hodin. Po odstavení byl produkt extrahován do DCM a tato fáze byla vytřepána 3x nasyceným roztokem NaHCO₃, 3x vodou a 3x solankou. Po vysušení bezvodým Na₂SO₄ byl odpařen DCM. Odparek byl podroben purifikaci na semipreparativním HPLC. Mobilní fáze byla složena z (A) 0.01 mol.dm⁻³ octanu amonného ve vodě a (B) AcCN s lineárně programovaným gradientem od 70% B do 90% B během 6 minut. Produkt byl získán ve formě oranžovohnědé Výtěžek činil 11 mg což je 9%.

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.06 (t, *J*=7.20 Hz, 12 H) 1.76 (d, *J*=1.43 Hz, 3 H) 3.06 - 3.11 (m, 2 H) 3.13 - 3.18 (m, 2 H) 3.24 (q, *J*=7.20 Hz, 8 H) 4.03 - 4.07 (m, 2 H) 4.36 - 4.41 (m, 2 H) 5.59 (td, *J*=2.79, 1.43 Hz, 1 H) 6.30 (dd, *J*=8.90, 2.58 Hz, 2 H) 6.36 (d, *J*=2.58 Hz, 2 H) 6.39 (d, *J*=8.90 Hz, 2 H) 6.92 - 6.96 (m, 1 H) 7.02 (dd, *J*=8.81, 0.64 Hz, 1 H) 7.43 - 7.46 (m, 2 H) 7.79 - 7.81 (m, 1 H) 7.94 (dd, *J*=8.81, 2.36 Hz, 1 H) 8.22 (t, *J*=5.37 Hz, 1 H) 8.51 (dd, *J*=2.36, 0.64 Hz, 1 H); ¹³C NMR (125.77 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 12.94, 20.25, 38.20, 39.98, 44.16, 50.67, 64.83, 68.10, 97.82, 105.28, 108.24, 108.62, 119.11, 122.48, 122.85, 124.12, 128.73, 128.93, 130.52, 130.76, 133.27, 137.37, 147.91, 148.85, 153.10, 154.50, 161.62, 164.87, 168.24. MS m/z pro C₄₁H₄₆N₆O₄: 686.85, nalezeno 687.44 [M+H]⁺.

***N*-(2-(3',6'-bis(diethylamino)-3-oxospiro[isoindoline-1,9'-xanthen]-2-yl)ethyl)-6-(4,5-dimethyl-3,6-dihydro-2*H*-1,2-oxazin-2-yl)nicotinamid (54)**

Hydroxylamin **33** (134 mg, 0,22 mmol) byl rozpuštěn v roztoku MeOH:voda 1:1 (20 ml) o pH 3 (dosaženo pomocí kyseliny octové). Do tohoto roztoku byl následně přidán 2,3-dimethylbuta-1,3-dien (43 mg, 0,43 mmol) a 30% peroxid vodíku (88 µl, 0,86 mmol). Reakce probíhala za laboratorní teploty po dobu 22 hodin. Po odstavení byl produkt extrahován do DCM a tato fáze byla vytřepána 3x nasyceným roztokem NaHCO₃, 3x vodou a 3x solankou. Po vysušení bezvodým Na₂SO₄ byl odpařen DCM. Odparek byl podroben purifikaci na semipreparativním HPLC. Mobilní fáze byla složena z (A) 0.01 mol.dm⁻³ octanu amonného ve vodě a (B) AcCN s lineárně programovaným gradientem od 90% B do 95% B během 6 minut. Produkt byl získán ve formě fialové pevné látky.

Výtěžek činil 74 mg což je 49%. ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm 1.06 (t, $J=7.18$ Hz, 12 H) 1.57 (d, $J=0.86$ Hz, 3 H) 1.69 (d, $J=0.57$ Hz, 3 H) 3.07 - 3.14 (m, 2 H) 3.16 - 3.21 (m, 2 H) 3.28 (q, $J=7.18$ Hz, 8 H) 4.02 (d, $J=0.72$ Hz, 2 H) 4.27 (d, $J=0.86$ Hz, 2 H) 6.31 (dd, $J=8.95, 2.58$ Hz, 2 H) 6.36 (d, $J=2.58$ Hz, 2 H) 6.39 (d, $J=8.95$ Hz, 2 H) 6.96 - 7.00 (m, 1 H) 7.04 (dd, $J=8.88, 0.72$ Hz, 1 H) 7.46 - 7.51 (m, 2 H) 7.77 - 7.83 (m, 1 H) 7.96 (dd, $J=8.88, 2.36$ Hz, 1 H) 8.24 (t, $J=5.30$ Hz, 1 H) 8.53 (dd, $J=2.36, 0.72$ Hz, 1 H); ^{13}C NMR (125.77 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm 12.95, 13.97, 15.92, 38.20, 40.08, 44.16, 50.59, 64.83, 71.06, 97.82, 105.28, 108.11, 108.62, 122.40, 122.44, 122.85, 123.97, 124.13, 128.74, 128.80, 130.52, 133.28, 137.36, 147.94, 148.86, 153.09, 154.50, 161.60, 164.88, 168.24. MS m/z pro $\text{C}_{42}\text{H}_{48}\text{N}_6\text{O}_6$: 700.87, nalezeno 701.56 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

6. Závěr

Cílem předložené diplomové práce bylo připravit hydroxylaminové deriváty nesoucí fluorescenční značku. U takto připravených derivátů měla být dále studována možnost oxidace hydroxylaminové skupiny pomocí peroxidu vodíku a následná hetero-Diels-Alderova reakce s vhodně zvolenými dieny. U připravených hydroxylaminů měly být také studovány jejich spektrální vlastnosti.

Jako skelet pro navázání hydroxylaminové skupiny a fluorescenční značky posloužily kyseliny 4-fluor-3-nitrobenzoová a 6-fluornikotinová. Jako fluorescenční značka měly sloužit Rhodamin B a Fluorescein. Skelet a značka byly propojeny pomocí ethylendiaminového linkeru. Pro přípravu obou typů derivátů bylo nutné nejprve navázat linker na Rhodamin B a Fluorescein a následně ho podrobit reakci s chloridem kyseliny (v případě 4-fluor-3-nitrobenzoové) nebo kyselinou samotnou (v případě 6-fluornikotinové). V případě fluoresceinu se bohužel nepodařilo navázat Fluorescein-ethylendiamin ani na jednu z použitých karboxylových kyselin. Fluor-deriváty nesoucí Rhodamin B byly následně převedeny na odpovídající hydroxylaminy **14** a **33**.

Takto připravené značené hydroxylaminové deriváty byly následně podrobeny studiu oxidace peroxidem vodíku a reakcím s dieny. Jako dieny byly zvoleny cyklohexadien, kyselina sorbová, isopren a 2,3-dimethylbuta-1,3-dien. Podrobnou optimalizací bylo zjištěno, že oxidace a následná hetero-Diels-Alderova reakce nejlépe probíhá v roztoku složeném z methanolu a vody 1:1 o pH 3. Takto bylo připraveno celkem osm oxazinových derivátů **45,46** a **49-54** ve výtěžku 7-49%, které byly izolovány a identifikovány pomocí základních analytických metod.

U hydroxylaminů **14** a **33** byly studovány také jejich spektrální vlastnosti. Ačkoliv nebylo možné z neznámých příčin získat fluorescenční spektra derivátu **33**, hydroxylamin **14** vykazuje excitační maxima 460 a 535 nm. Excitací při 525 nm bylo získáno emisní spektrum s maximem 540 nm. Kvantový výtěžek činí 0,31%. Měření pH závislosti ukázalo mírný posun emisního maxima z 580 nm na 550 nm v oblasti pH 6 - 12. Absorpční spektra obou hydroxylaminů vykazují absorpční maxima při 242 a 276 nm. Hydroxylamin **33** pak vykazuje další absorpční maximum při 317 nm a hydroxylamin **14** při 420 nm. V případě hydroxylaminu **33** není absorpční spektrum závislé na pH; v případě derivátu **14** dochází v alkalické oblasti pH (9-12) k zániku absorpčního maxima při 420 nm a vzniku nového při 580 nm.

7. Seznam literatury:

- 1) Dalleau, S.; Baradat, M.; Gueraud, F.; Huc, L. *Cell Death Differ.* **2013**, *20*, 1615–1630.
- 2) Diels, O.; Alder, K. *J. Li. Anna. Chem.*, **1928**, *460*, 98–122.
- 3) Yao, S.; Saaby, S.; Hazell, R. G.; Jurgensen, K. A. *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*(13), 2435-2448.
- 4) Gresham, T. L.; Steadman, T. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, *71*(2), 737–738.
- 5) King, S.B.; Ganem, B., *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 5089–5090.
- 6) Hudlicky, T.; Olivio, H.F. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 9694–9696.
- 7) Yang, B.; Miller, P.A.; Mollmann, U.; Miller, M. *J. Org Lett.* **2009**, *11*(13), 2828–2831.
- 8) Miller, M. J.; Biswas, A.; Krook, M. A. *Tetrahedron* **1983**, *39*, 2571-2576.
- 9) Keck, G. E.; Fleming, S.; Nickell, D.; Weider, P. *Syn. Commun.* **1979**, *9*, 281-284.
- 10) Bok, J.W.; Lermer, L.; Chilton, J.; Klingeman, H.G.; Towers, G.H.N. *Phytochem.* **1999**, *51*, 891-893.
- 11) Li, J.; Lang, F.; Ganem, B. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 3403–3410.
- 12) Fatig, T.; Soulié, J.; Lallemand, J.Y.; Ricard, L. *Tetrahedron* **1999**, *10*, 2165–2174.
- 13) Yamamoto, Y.; Yamamoto, H. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, *9*, 2031–2043.
- 14) Felber, H.; Kresze, G.; Prewo, R.; Vasella, A; *Helv. Chim. Acta* **1986**, *69*, 1137–1146.
- 15) Aoyagi, S.; Tanaka, R.; Naruse, M.; Kibayashi, C. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 8397–8406.
- 16) Mulvihill, M.J.; Gage, J.L.; Miller, M.J. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 3357–3363.
- 17) Ozawa, T.; Aoyagi, S.; Kibayashi, C. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 3338–3347.
- 18) Li, F.; Brogan, J.B.; Gage, J.L.; Zhang, D.; Miller, M. J. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 4538–4540.
- 19) Defoin, A.; Sarazin, H.; Strehler, C.; Streith, J. *Tetrahedron* **1994**, *35*, 5653-5656.

- 20) Braun, H.; Klier, K.; Kresxe, G.; Sabuni, M.; Werbitzky, O.; Winkler, J. *Liebigs Ann. Chem.* **1986**, *11*, 1360-1367.
- 21) Ozawa, T.; Aoyagi, S.; Kibayashi, C. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 3338–3347.
- 22) Blakemore, P.R.; Kim, S.K.; Schulze, V.K.; White, J.D.; *J. Chem. Soc.*, **2001**, *15*, 1831–1845.
- 23) Kirby, G.W.; Sweeny, J.G.; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1962**, *26*, 704–711.
- 24) Kirby, G.W.; Sweeny, J.G.; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1997**, *14*, 3065-3070.
- 25) Ding, X.; Ukaji, Y.; Fujitani, S.; Inomata, K. *Chem. Lett.* **2003**, *32(7)*, 582–583.
- 26) Miller, C.; Batey, R.A. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 699–702.
- 27) Yamamoto, Y.; Yamamoto, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126(13)*, 4128–4129.
- 28) Yamamoto, Y.; Yamamoto, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44(43)*, 7082–7085.
- 29) Jana, C. K.; Studer, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46(34)*, 6542–6544.
- 30) Merino, P.; Tejero, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43(23)*, 2995–2997.
- 31) Jana, C. K.; Studer, A. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14(21)*, 6326–6328.
- 32) Gardner, H.W. *Free Radic. Biol. Med.* **1989**, *7*, 65–86.
- 33) Tinoco, J. *Prog. Lipid Res.* **1982**, *21*, 1–45.
- 34) Niki, E.. *Free Radic. Biol. Med.* **2009**, *47*, 469–484.
- 35) Sevanian, A., Hochstein, P. *Annu. Rev. Nutr.* **1985**, *5*, 365–390.
- 36) Pederson, T.C.; Aust, S.D. *Biochim. Biophys. Acta*, **1975**, *385*, 232–241.
- 37) Porter, N.A. *M. Enzym.* **1984**, *105*, 273–282.
- 38) Porter, N.A., Caldwell, S.E., Mills, K.A. *Lipids*, **1995**, *30*, 277–290.
- 39) Gueraud, F., Atalay, M., Bresgen, N., Cipak, A., Eckl, P.M., Huc, L., Jouanin, I., Siems, W., Uchida, K. *Free Radic. Res.* **2010**, *44*, 1098–1124.
- 40) Bergstrom, S., *Nature* **1945**, *156*, 717-717.
- 41) Dubois, R.N., Abramson, S.B., Crofford, L., Gupta, R.A., Simon, L.S., Van De Putte, L.B., Lipsky, P.E. *FASEB J*, **1998**, *12*, 1063–1073.
- 42) Samuelsson, B. *Harvey Lect.* **1979**, *75*, 1–40.

- 43) Laneuville, O., Breuer, D.K., Xu, N., Huang, Z.H., Gage, D.A., Watson, J.T., Lagarde, M., DeWitt, D.L., Smith, W.L. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 19330–19336.
- 44) Wada, M., DeLong, C.J., Hong, Y.H., Rieke, C.J., Song, I., Sidhu, R.S., Yuan, C., Warnock, M., Schmaier, A.H., Yokoyama, C., Smyth, E.M., Wilson, S.J., FitzGerald, G.A., Garavito, R.M., Sui de, X., Regan, J.W., Smith, W.L. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 22254–22266.
- 45) Yuan, C., Sidhu, R.S., Kuklev, D.V., Kado, Y., Wada, M., Song, I., Smith, W.L. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 10046–10055.
- 46) Hammond, V.J., O'Donnell, V.B. *Biochim. Biophys. Acta*, **2012**, *18(18)*, 2403–2412.
- 47) Chandrasekharan, N.V., Dai, H., Roos, K.L., Evanson, N.K., Tomsik, J., Elton, T.S., Simmons, D.L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2002**, *99*, 13926–13931.
- 48) Kuhn, H., Banthiya, S., van Leyen, K. *Biochim. Biophys. Acta*, **2015**, *1851*, 308–330.
- 49) Hammarstrom, S., *Annu. Rev. Biochem.* **1983**, *52*, 355–377
- 50) Nigam, S., Zafiriou, M.P., Deva, R., Ciccoli, R., Roux-Van der Merwe, R. *FEBS J.* **2004**, *274*, 3503–3512.
- 51) Serhan, C.N., Hamberg, M., Samuelsson, B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1984**, *81*, 5335–5339.
- 52) Kuhn, H., Banthiya, S., van Leyen, K. *Biochim. Biophys. Acta*, **2015**, *1851*, 308–330.
- 53) Serbinova, E.A.; Kadiiska, M.B.; Bakalova, R.A.; Koynova, G.M.; Stoyanovsky, D.A.; Karakashev, P.C.; Stoytchev, T.S.; Wolinsky, I.; Kagan, V.E. *Toxicol. Lett.* **1989**, *47*, 119–123.
- 54) Roman, R.J. *Physiol. Rev.* **2002**, *82*, 131–185.
- 55) Bayir, H., Tyurin, V.A., Tyurina, Y.Y., Viner, R., Ritov, V., Amoscato, A.A., Zhao, Q., Zhang, X.J., Janesko-Feldman, K.L., Alexander, H., Basova, L.V., Clark, R.S., Kochanek, P.M., Kagan, V.E. *Ann. Neurol.* **2007**, *62*, 154–169.
- 56) Kagan, V.E., Tyurin, V.A., Jiang, J., Tyurina, Y.Y., Ritov, V.B., Amoscato, A.A., Osipov, A.N., Belikova, N.A., Kapralov, A.A., Kini, V. *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 223–232.

- 57) Tyurina, Y.Y., Kini, V., Tyurin, V.A., Vlasova, I.I., Jiang, J., Kapralov, A.A., Belikova, N.A., Yalowich, J.C., Kurnikov, I.V., Kagan, V.E. *Mol. Pharmacol.* **2006**, *70*, 706–717
- 58) Goldman, R., Claycamp, G.H., Sweetland, M.A., Sedlov, A.V., Tyurin, V.A., Kisin, E.R., Tyurina, Y.Y., Ritov, V.B., Wenger, S.L., Grant, S.G., Kagan, V.E. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *27*, 1050–1063.
- 59) Reeder, B.J., Svistunenko, D.A., Wilson, M.T. *Biochem. J.* **2011**, *434*, 483–492
- 60) Grisham, M.B. *J. Free Radic. Biol. Med.* **1985**, *1*, 227–232.
- 61) Szebeni, J., Winterbourn, C.C., Carrell, R.W. *Biochem. J.* **1984**, *220*, 685–692.
- 62) Kappus, H. *Chem. Phys. Lipids* **1987**, *45*, 105–115.
- 63) Fridovich, S.E., Porter, N.A. *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 260–265.
- 64) Kellogg 3rd, E.W.; Fridovich, I. *J. Biol. Chem.* **1975**, *250*, 8812–8817.
- 65) Repetto, M.G., Ferrarotti, N.F., Boveris, A.. *Arch. Toxicol.* **2010**, *84*, 255–262.
- 66) MacKenzie, E.L., Iwasaki, K., Tsuji, Y. *Antioxid. Redox Signal.* **2008**, *10*, 997–1030.
- 67) Papanikolaou, G., Pantopoulos, K. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2005**, *202*, 199–211.
- 68) Beckman, J.S., Beckman, T.W., Chen, J., Marshall, P.A., Freeman, B. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1990**, *87*, 1620–1624.
- 69) Robak, J., Gryglewski, R.J. *Pol. J. Pharmacol.*, **1993**, *45*, 51–58.
- 70) Pryor, W.A., Squadrito, G.L. *Am. J. Physiol.* **1995**, *268*, 699–722
- 71) Repetto, M.G., Ferrarotti, N.F., Boveris, A.. *Arch. Toxicol.* **2010**, *84*, 255–262.
- 72) Pryor, A. W.; Stanley, J. P. *J. Org. Chem.* **1975**, *40*, 3615- 3617
- 73) Fessel, J. P.; Porter, N.A.; Moore, K.P. *Proc Natl Acad Sci USA*, **2002**, *99*, 16713-16718.
- 74) Yagi, K. A. *Biochem. Med.* **1976**, *15*, 212-216.
- 75) Gerard-Monnier, D.; Erdelmeier, I.; Regnard, K.; Moze-Henry, N.; Yadan, J.C.; Chaudiere, J. *Chem. Res. Toxicol.*, **1998**, *11*, 1176-1183.
- 76) Esterbauer, H.; Zollner, H. *Free Radic. Biol. Med.*, **1989**, *7*(2), 197-203.
- 77) Esterbauer, H., Schaur, R.J., Zoher, H. *Free Radic. Biol. Med.*, **1996**, *11*, 81-128.

- 78) Van Kuijk, F.J.G.M., Siakotos, A.N., Fong, L.G., Stephens R.J., Thomas, D.W. *Anal. Biochem*, **1995**, 224, 420-424.
- 79) Daugherty, M.S., Ludden, T.M., Burk, R.F. *Drug Met. Disp.* **1998**, 16, 666-671.
- 80) Wheatley, A.R., *trends in analytical chemistry*, **2000**, 19(10), 617-627.
- 81) Abuja, P. M.; Albertini, R. *Clin. Chim. Acta*, **2001**, 306, 1-17.
- 82) Borghi R, Patriarca S, Traverso N, Piccini A, Storace D, Garuti A, Gabriella C, Patrizio O, Massimo T. *Neurobiol Aging*, **2007**, 28, 1009 – 1014.
- 83) Chinta, S. J.; Mallajosyula, J. K.; Rane, A.; Andersen, J. K. *Neurosci. Lett.*, **2010**, 486, 235–239.
- 84) Bonini, N. M.; Giasson, B.I. *Cell* **2005**, 123, 359–361.
- 85) Lim, K. L. *Expert Rev. Proteomics* **2007**, 4, 769–781.
- 86) Jin, J.; Hulette, C.; Wang, Y.; Zhang, T.; Pan, C.; Wadhwa, R.; Zhang, J. *Mol. Cell. Proteomics* **2006**, 5, 1193–1204.
- 87) Basso, M.; Giraud, S.; Corpillo, D.; Bergamasco, B.; Lopiano, L.; Fasano, M. *Mol. Cell. Proteo*, **2004**, 4, 3943–3952.
- 88) Gibb, W. R.; Lees, A. J. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **1989**, 15, 27–44.
- 89) Ross, R. *Engl J Med.* **1999**, 340, 115–126.
- 90) Fearon, I.M.; Faux, S.P. *J. Mol. Cell. Card.*, **2009**, 47, 372–381.
- 91) Sosa, V.; Moline, T.; Somoza, R.; Kondoh, H.; Leonart, M. E. *Ageing Rev.* **2013**, 376-390
- 92) Salganik, R. I. *J. Am. Coll. Nutr.*, **2001**, 20, 464–472.
- 93) Sinha, R. J., Singh, R., Mehrotra, S., Singh, R. K. *Indian J. Cancer*, **2009**, 46, 146–150.
- 94) Bechtel, W., Bauer, G. *Anticancer Res.* **2009**, 29(11), 4559–4570.
- 95) Grate, J.W.; Mo, K.F.; Daily, M.D. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 3925–3930
- 96) Huang, Ch.; Yin, Q.; Meng, J.; Zhu, W.; Yang, Y. *J. Eu. Chem.* **2013**, 19(24), 7739-7747