

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA ORGANICKÉ A JADERNÉ CHEMIE



**Příprava selektivně značených lupanových triterpenoidů
s cytotoxickou aktivitou**

**Synthesis of selectively labelled lupane triterpenoids
with cytotoxic activity**

MARTIN VLK

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Jaderná chemie

Praha 2008

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně a že jsem uvedl veškerou použitou literaturu.

V Praze, 4. září 2008

ABSTRACT

Synthesis of selectively labelled compound, with coincidence with suitable analytical methods, result an unique information about structure, stereochemistry and mechanism of action. Labelled compounds play important role in the modern medicine as radiopharmaceuticals and they assist in study of interaction biologically active compounds in the life science and contribute to explanation of their mechanism of action a metabolic pathways. Derivatives of betulinic acid and betulin are studying for their significant cytotoxic and virostatic activity. For tests of metabolic processus and incorporation of the isotopes to the tissues culture and their detection, have been synthetise labelled compounds with significant cytotoxicity. The primary screenig already have been made in cooperation with LEM FN in Olomouc. The substrate for labelling have been selected and they have had an interesting cytotoxicity in several cancer line. Some of the of the compounds have been labelled with isotopes ^2H , ^{13}C , ^{15}N and for incorporation study by ^3H and ^{14}C .

ABSTRAKT

Syntéza selektivně značených sloučenin poskytuje v součinnosti s vhodnými analytickými metodami jedinečné informace nejen o struktuře sloučenin, ale rovněž o stereochemii a reakčních mechanismech. Značené sloučeniny nacházejí uplatnění v moderní medicíně nejen jako radiofarmaka, ale pomáhají při studiu interakcí biologicky aktivních látek v živých soustavách, čím přispívají k objasnění jejich mechanismu účinku a metabolickým procesům. Deriváty kyseliny betulinové (3 β -hydroxylup-20(29)-en-28-ová kyselina) a betulinu (lup-20(29)-en-3 β ,28-diol) jsou studovány pro svou významnou cytotoxickou a virostatickou aktivitu. Aby mohly být provedeny metabolické studie a aby mohla být studována inkorporace radionuklidů do biomolekul v tkáňových kulturách a provedena jejich detekce, bylo zapotřebí připravit značené sloučeniny cytotoxicky nejvýznamnějších látek. Výběru primárních substrátů pro přípravu značených sloučenin předcházel prvotní screening cytotoxických aktivit prováděný ve spolupráci LEM FN v Olomouci. Byly pečlivě vybrány ty, jež vykazovaly zajímavou cytotoxickou aktivitu na testovaných nádorových liniích. Pro účely metabolických studií bylo značení prováděno pomocí izotopů ^2H , ^{13}C a ^{15}N , pro studium inkorporace byly použity izotopy ^3H a ^{14}C .

Obsah

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	2
SEZNAM NÁDOROVÝCH LINIÍ	3
POZNÁMKY K ČÍSLOVÁNÍ	3
TEORETICKÁ ČÁST	4
1 Úvod	5
2 Současný stav studované problematiky	6
2.1 Biologické aktivity triterpenoidů	6
2.2 Cytotoxicky aktivní deriváty z našeho pracoviště	7
2.3 Využití izotopů ke studiu biologických aktivit terpenů	9
2.4 Izotopy vybrané pro syntézu značených betulininů	16
3 Příprava výchozích sloučenin	18
3.1 Kyselina betulinová (5) a betulin (4)	18
3.2 Kyselina betulonová (D1) a dihydrobetulonová (54)	18
3.3 3β-acetoxy-21-oxolup-18-en-28-ová kyselina (58)	19
4 Příprava selektivně značených betulininů	21
4.1 Syntéza deuterovaných a tritiových sloučenin 1a - 3a a 1b - 3b	21
4.2 Příprava deuterovaných sloučenin 4a - 6 a ¹⁴ C značeného esteru 4b	23
4.3 Syntéza deuterovaných methyletherů 7 a 8	25
4.4 Syntéza ¹⁵ N-pyrazinových derivátů 9a, 10a	26
4.5 Příprava značených derivátů 12 - 15 katalytickou deuterací	28
5 Obecné poznámky k experimentální části	32
5.1 Experimentální vybavení pro práci s neradioaktivním materiálem	32
5.2 Experimentální zařízení pro práci s radioaktivním materiálem	34
5.3 Tabulky ¹³ C NMR spekter	51
6 Závěr	55
7 Seznam použité literatury	56
8 Přílohy	60

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Ac	acetyl
Ac ₂ O	acetanhydrid
AcOH	octová kyselina
Bn	benzyl
D	² H
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
DMS	dimethylsulfid
EtOH	ethanol
EtOAc	ethyl-acetát
FSA	průtoková scintilační detekce
HMG-CoA	hydroxymethylglutaryl CoA reduktáza
IPO	isopropanol
LDA	lithiumdiisopropylamid
LSC	kapalinová scintilační detekce
MeCN	acetonitril
MeOH	methanol
Mf	morfolin
MS	hmotnostní spektrometrie
Ph	fenyl
PhMe	toluen
Pr	propyl
py	pyridin
P450 _{14DM}	lanosterol 14 α -demethyláza
RP-HPLC	HPLC na reverzní stacionární fázi
r.t.	laboratorní teplota
RVO	rotační vakuová odparka
T	³ H
<i>t</i> -BuOH	2-methylpropan-2-ol
THF	tetrahydrofuran
Ts	<i>p</i> -toulensulfonyl
t.t.	teplota tání

SEZNAM NÁDOROVÝCH LINIÍ

A-549	lidský plicní karcinom
A2780	lidský ovariální karcinom
CEM	lidská T-lymfoblastická leukémie
HCT-15	karcinom tlustého střeva
HT-29	lidský adenokarcinom tlustého střeva
Jurkat	lidská T-lymfoblastická leukémie
K-562	lidská myeloidní leukémie
KB	lidský karcinom ústního epitelu
MEL-1	lidský melanom
MEL-2	lidský melanom
MCF7	lidský adenokarcinom prsu
OVCAR-3	ovariální karcinom
Saos-2	lidský osteosarkom
SK-MEL-2	lidský melanom
XF-498	glyom

POZNÁMKY K ČÍSLOVÁNÍ

Sloučeniny nepřipravované v této práci jsou číslovány arabskými číslicemi zvýrazněnými kurzívou. Již popsané sloučeniny připravované v této práci jsou označeny modrým velkým písmenem s arabským číslem. Látky selektivně značené a jejich prekuzory jsou číslovány modrými arabskými číslicemi.

TEORETICKÁ ČÁST

1 Úvod

Biologické účinky triterpenoidů a jejich derivátů jsou známy již více než dvě desetiletí. Lupanové, oleananové a ursanové deriváty vykazují aktivitu protizánětlivou, analgetickou, hepatoprotektivní, hypoglykemickou, hypolipidemickou, antimikrobiální, antimykotickou, virostatickou, imunomodulační a tonizující aktivitu a hlavně cytotoxickou.¹

Syntéza selektivně značených sloučenin poskytuje v součinnosti s vhodnými analytickými metodami jedinečné informace nejen o struktuře sloučenin, ale rovněž o stereochemii a reakčních mechanismech. Značené sloučeniny nacházejí uplatnění v moderní medicíně nejen jako radiofarmaka, ale pomáhají při studiu interakcí biologicky aktivních látek v živých soustavách, čím přispívají k objasnění jejich mechanismu účinku a probíhajícím metabolickým procesům.²

Deriváty kyseliny betulinové (3 β -hydroxylup-20(29)-en-28-ová kyselina) a betulinu (lup-20(29)-en-3 β ,28-diol) jsou v naší skupině studovány pro svou významnou cytotoxickou a virostatickou aktivitu.^{3,4} Aby mohly být provedeny metabolické studie a aby mohla být studována inkorporace radionuklidů do biomolekul v tkáňových kulturách a provedena jejich detekce, bylo zapotřebí připravit značené sloučeniny cytotoxicky nejvýznamnějších látek⁵. Výběru primárních substrátů pro přípravu značených sloučenin předcházel prvotní screening cytotoxických aktivit prováděný ve spolupráci LEM FN v Olomouci. Byly pečlivě vybrány ty, jež vykazovaly zajímavou cytotoxickou aktivitu na testovaných nádorových liniích.⁶⁻⁸ Pro účely metabolických studií bylo značení prováděno pomocí izotopů ²H, ¹³C a ¹⁵N, pro studium inkorporace byly použity izotopy ³H a ¹⁴C.

Cíle práce:

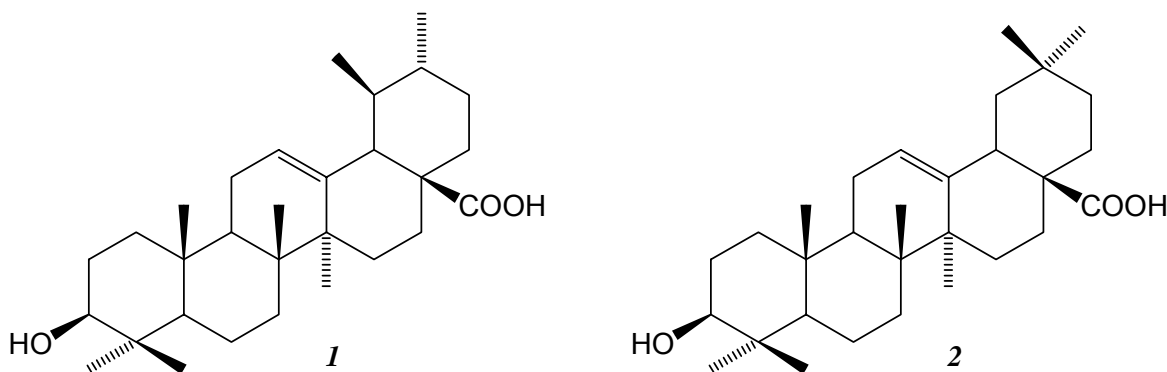
1. Provést literární rešerše přípravy selektivně značených triterpenoidů izotopy H a C.
2. Přisunout výchozí materiál pro syntézu značených derivátů.
3. Syntetizovat selektivně značené betulininy stabilními izotopy ²H a ¹⁵N.
4. Syntetizovat selektivně značené betulininy radioizotopy ³H a ¹⁴C.

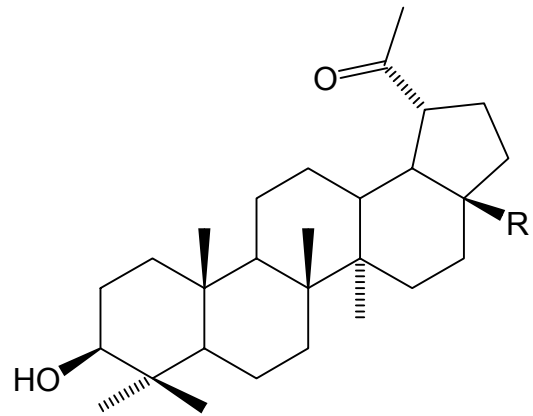
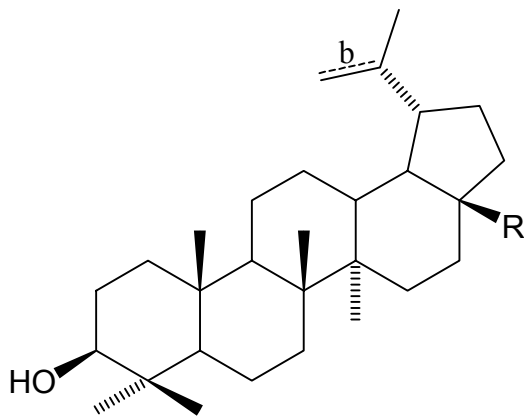
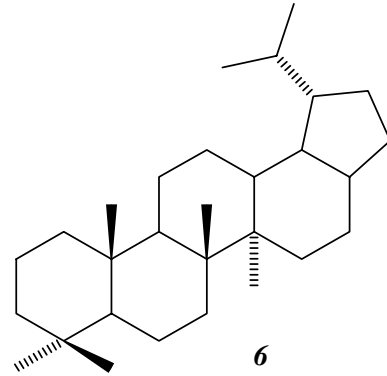
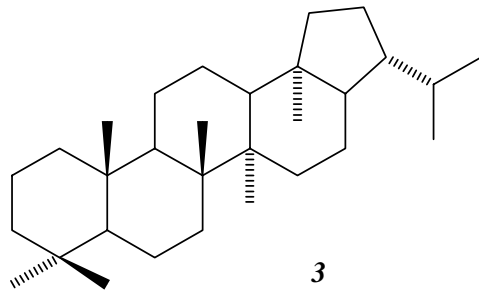
2 Současný stav studované problematiky

2.1 Biologické aktivity triterpenoidů

Terpenoidy reprezentují skupinu přírodních látek, vyskytující se v přírodě ve značném měřítku.^{1,9} V hojném množství se vyskytují v živých systémech (vyšší rostliny, mořské organismy, mikroorganismy, houby) jako složky vonných esencí, olejů, pryskyřic a provitaminů.^{1,9} V přírodních materiálech se terpenoidy vyskytují volné nebo vázané ve formě esterů nebo glykosidů, přičemž je známo více než 4000 terpenoidních sloučenin odvozených od 40 skeletálních typů. Mnohé z nich vykazují rozmanité biologické aktivity např.: kyselina ursolová (**1**) má antiulcerogenní a hepatoprotektivní účinky; kyselina oleanolová (**2**) vykazuje hepatoprotektivní, antiulcerogenní a protizánětlivé účinky, deriváty hopanu (**3**) se vyznačují zajímavými antimikrobiálními účinky.³⁻⁹

Betulin (**4**) a kyselina betulinová (**5**) patří mezi deriváty lupanu (**6**). Betulin (**4**) se vyskytuje ve svrchních vrstvách březové kůry *Betula alba* společně s lupeolem (**7**), kys. betulinovou (**5**), kys. platanovou (**8**). Kyselina betulinová (**5**) se společně s kyselinou platanovou (**8**) vyskytují v borce platanu *Platanus hispanica* (3%). Kyselina betulinová (**5**) a některé její deriváty vykazují signifikantní anti-HIV aktivitu, dále se vyznačují cytotoxickými aktivitami proti T-lymfoblastické leukémii (CEM), lidskému melanomu (MEL-1,2), plicnímu karcinomu (A 549), ovarialnímu karcinomu (OVCAR-3), karcinomu tlustého střeva (HCT-15), a glyomu (XF498).⁶⁻⁹ Betulin (**4**) samotný nevykazuje cytotoxickou aktivitu, ale u některých jeho derivátů byla pozorována.⁷⁻⁹





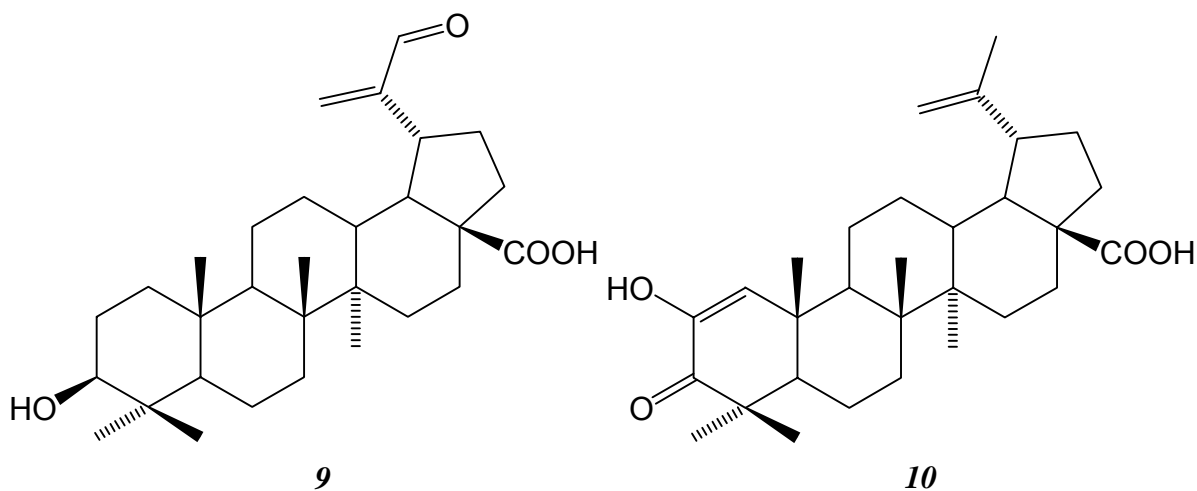
- 4**, R = CH₂OH, b: dvojná vazba
5, R = CO₂H, b: dvojná vazba
7, R = CH₃, b: dvojná vazba
7a, R = CD₃, b: dvojná vazba

8, R = COOH

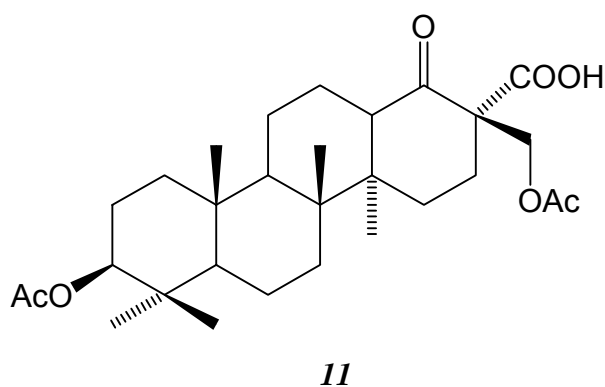
2.2 Cytotoxicky aktivní deriváty z našeho pracoviště

Na našem pracovišti byla v minulých letech připravena řada lupanových, des-E-lupanových, 18 α -oleananových a pyrazinových derivátů se zajímavými biologickými účinky (zvláště cytotoxickými) nesoucí souhrnné pracovní označení betulininy.⁵ Některé betulininy se vyznačují vysokými cytotoxickými aktivitami (IC₅₀ < 10 μ mol/l) proti nádorovým liniím jakými jsou např. CEM, MEL-1 a 2, A-549, OVCAR-3, Saos-2 a rovněž K-562.¹⁰⁻¹²

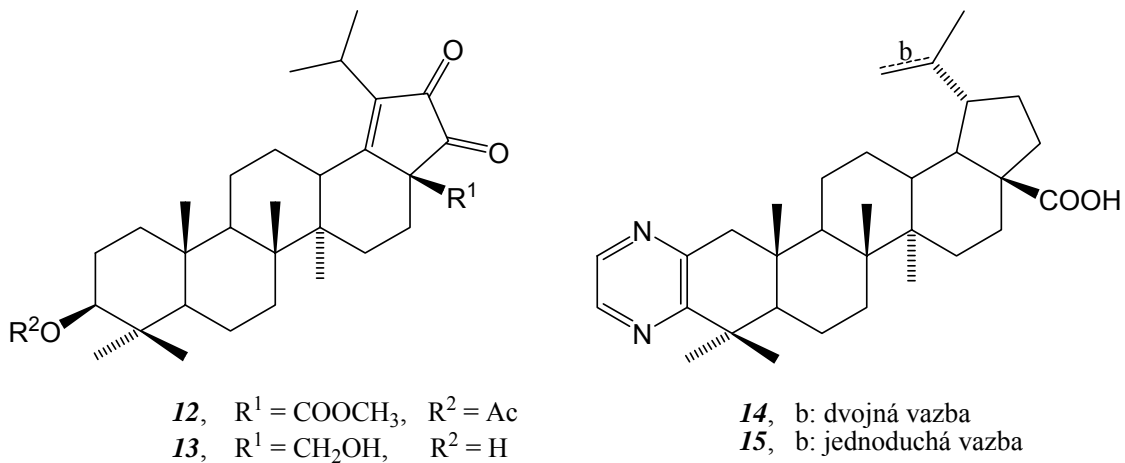
Mezi cytotoxicky neaktivnější deriváty lupanové řady⁵ patří např. aldehyd **9** a hydroxyderivát **10**.



Z des-E-lupanové řady nelze opomenout jednu z neúčinnějších sloučenin připravenou na našem pracovišti⁵ - β -ketokyselinu **11**.



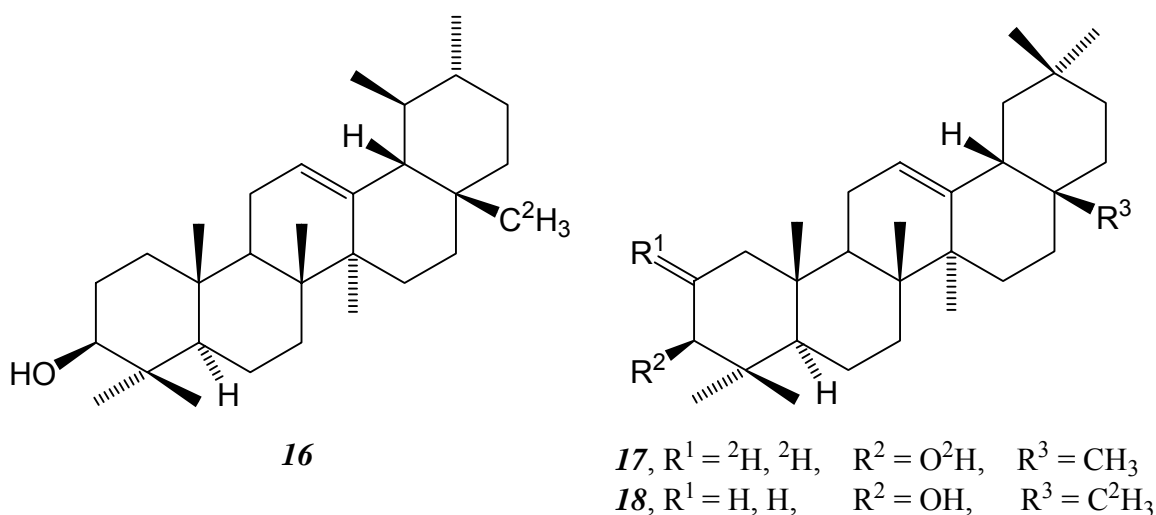
Další významnou skupinu sloučenin tvoří diketony **12**, **13**. Mezi specifické sloučeniny připravené na našem pracovišti patří pyrazinové deriváty např. **14**, **15**, jež vykazují zajímavé cytotoxické aktivity na liniích CEM, A-549 a K-562.^{11,12}



2.3 Využití izotopů ke studiu biologických aktivit terpenů

Deuterované a tritiované přírodní látky představují v segmentu biochemického výzkumu nenahraditelnou skupinu látek.² V kontextu základního výzkumu aplikace značených sloučenin poskytuje informace o funkci různých druhů enzymů a hormonů. Identifikace metabolitů sloučenin obsahujících radioaktivní biogenní prvky (¹⁴C, ³H, ³²P, atd.) nebo jejich stabilní analogy vede k lepšímu poznávání metabolických drah v živých systémech a objasňuje průběh některých biochemických reakcí, které je možné v některých případech i pozorovat s využitím radioanalytických metod (stopovací analýza).^{13,14} Tritiované terpenické sloučeniny jsou využívány hlavně pro studie biodistribuce sloučenin v tkáňových kulturách jak *in vitro* tak *in vivo*, pro sledování aktivity a funkce enzymů na substrátech terpenického charakteru a rovněž pro studium geochemických bioukazatelů.^{2,14} Deuterované triterpeny jsou využívány jako standardy pro MS při studiu strukturních a vazebných vlastností.^{15,16}

Rostliny produkují širokou škálu cyklických triterpenů a sterolů, které jsou hlavními produkty mevalonátové cesty. Enzym, regulující rychlost této přírodní syntetické cesty, byl identifikován jako HMG-CoA reduktáza.¹⁷ Pro biochemické studie funkce tohoto enzymu byly syntetizovány deuterované sloučeniny [28-²H]α-amyrin (**16**), [2,2,3-²H]β-amyrin (**17**), [28-²H]β-amyrin (**18**) a [28-²H]lupeol (**7a**). Jako výchozí sloučenina pro syntézu byla použita oleanolová kyselina (**2**).



Deuterované β-amyriny **17**, **18** byly rovněž využity ke studii syntézy glykosidů, vyskytujících se v obranných vakuolách rostlinného druhu *Doryphorina*.¹⁸ β-Amyrin je

totiž jedním ze základních stavebních bloků tohoto obranného glykosidu, jež vykazuje protipožerové účinky.

Pro studium geochemických bioukazatelů sedimentů jsou značené lupanové deriváty rovněž velmi potřebné. V třetihorních sedimentech byly nalezeny sloučeniny lupanového a hopanového skeletu, jež byly identifikovány jako 28-nor-, 24-nor- a 24,28-dinorlupany.¹⁹ $[3^2\text{H}]\alpha$ -lupan (**21**) byl připraven ve dvou krocích z lup-20(29)-en-3-onu (**19**). Nejprve byl z ketonu **19** připraven tosylhydrazon **20**, jehož redukcí nadbytkem LiAlD_4 byl získán $[3^2\text{H}]\alpha$ -lupan (**21**). (schéma 1)

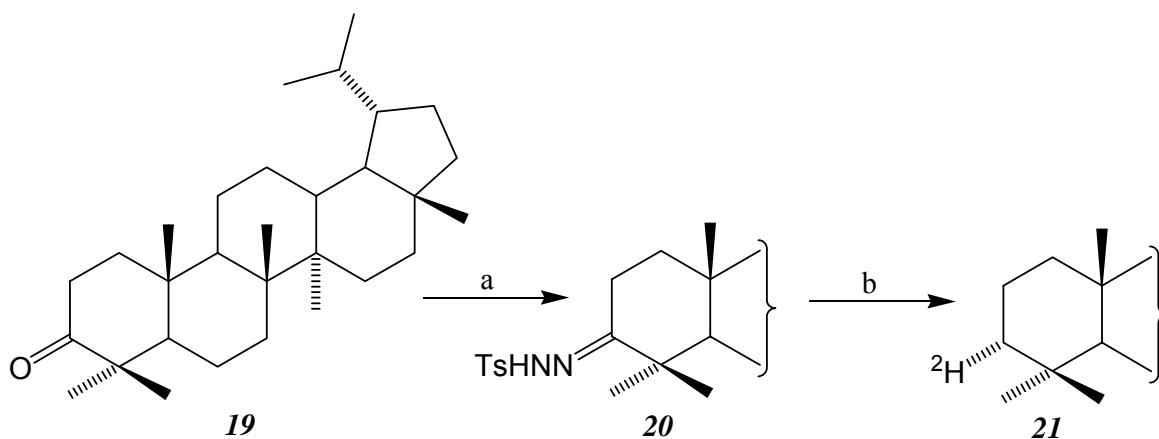


Schéma 1: a: tosylhydrazin, acetylchlorid/methanol; b: 1. LiAlD_4 /dioxan, 2. voda

Reakcí ketonu **22** s LDA a DCl v THF vznikla sloučenina **23**, která následnou redukcí poskytla $[2,3\text{-}^2\text{H}]$ -betulin (**24**). (schéma 2)

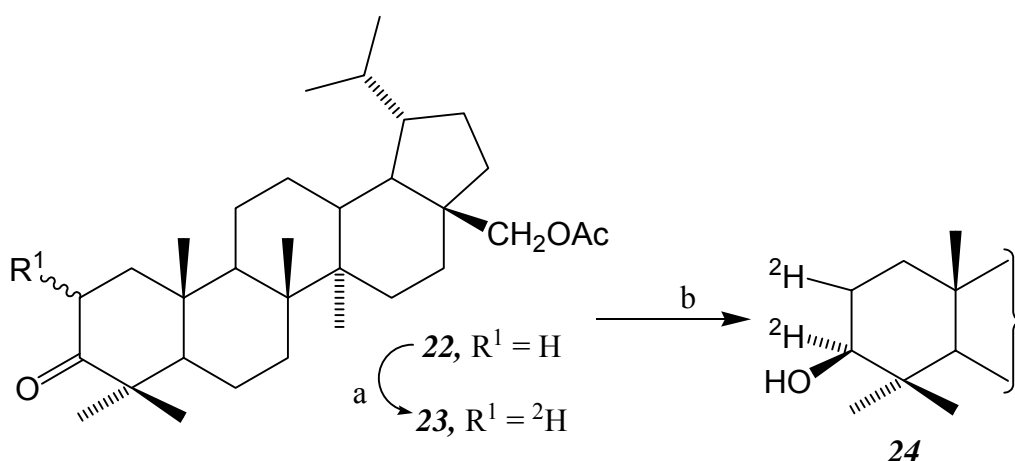


Schéma 2: a: LDA, DCl/THF; b: NaBD_4 /THF, EtOH

Dideuterovaný $[2,3\text{-}^2\text{H}]$ lupan (**28**) byl získán hydrogenací $[2,3\text{-}^2\text{H}]$ lup-2-enu (**27**),

který byl připraven z prekursoru **23**. (schéma 3)

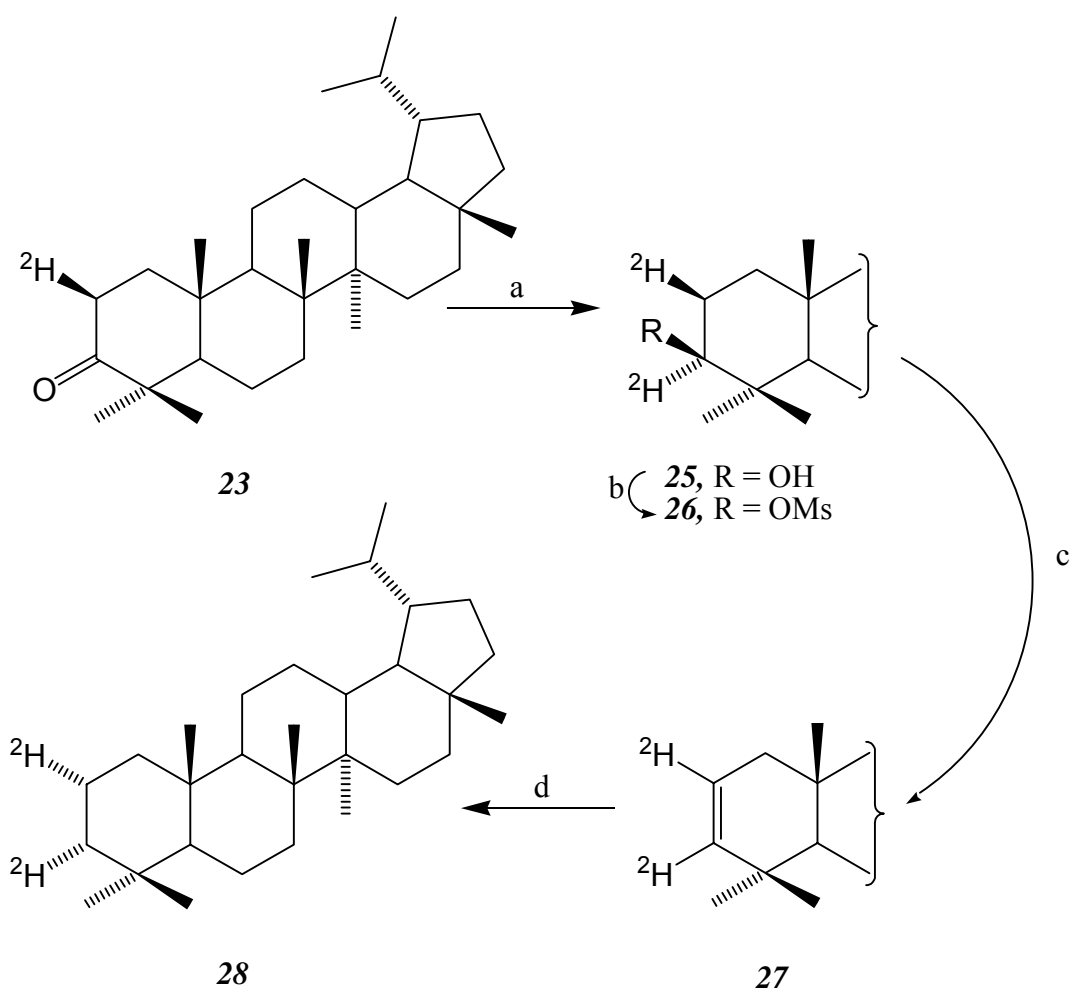
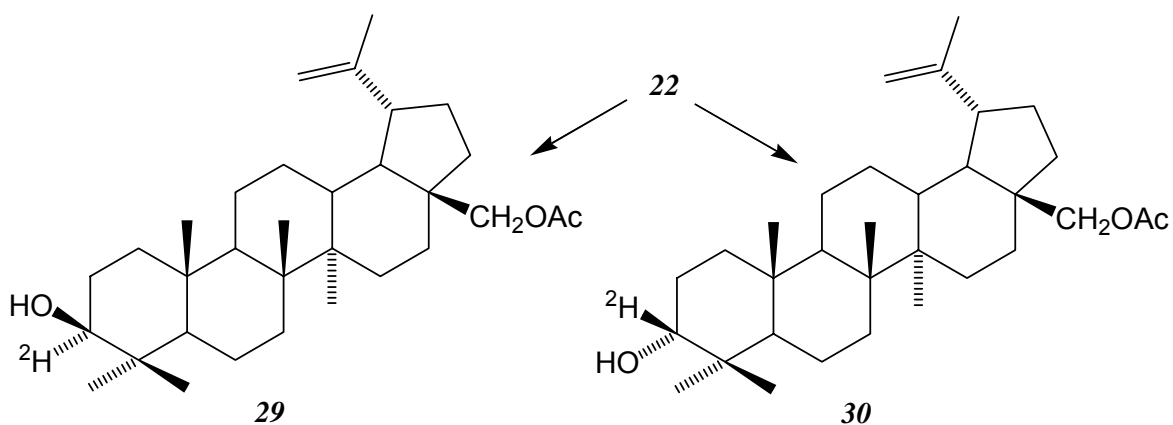


Schéma 3: a: LiAlD_4 ; b: MsCl , py; c: kolidin, refl.; d: H_2 , 10% Pd/C , EtOAc

Redukcí ketonu **22** NaBD_4 v ethanolu nebo LiAlD_4 v THF vznikají deuterované alkoholy $[3\text{-}^2\text{H}]$ betulin (**29**) a $[3\text{-}^2\text{H}]$ epibetulin (**30**). Stereo selektivita redukce použitím LiAlD_4 je nízká, neboť byly izolovány alkoholy **29** a **30** v poměru 57:43, kdežto při redukci NaBD_4 byla pozorována selektivita 98% a vznikal převážně $[3\text{-}^2\text{H}]\alpha$ -betulin (**29**).^{2,19}



Homogenní deuterace terminálních dvojných vazeb v postranních řetězcích kruhů A a E pentacyklických triterpenů byly studovány s použitím tris(triphenylfosfin)rhodium chloridu jako katalyzátoru.^{15,20,21} Reakční podmínky (rychlost redukce, rozpouštědla, množství katalyzátoru) byly zkoumány na substrátu betulin-diacetát (**V33**).

Jak udává literatura,^{15,20,21} bylo připraveno touto metodou několik selektivně deuterovaných derivátů 20(29)-lupenu a 30-nor-20(29)-lupenu **31** - **40**. (Tabulka 1) Kde výchozí sloučeniny **V** byly deuterovány a byly získány deriváty **P**, jak uvádí tabulka 1.

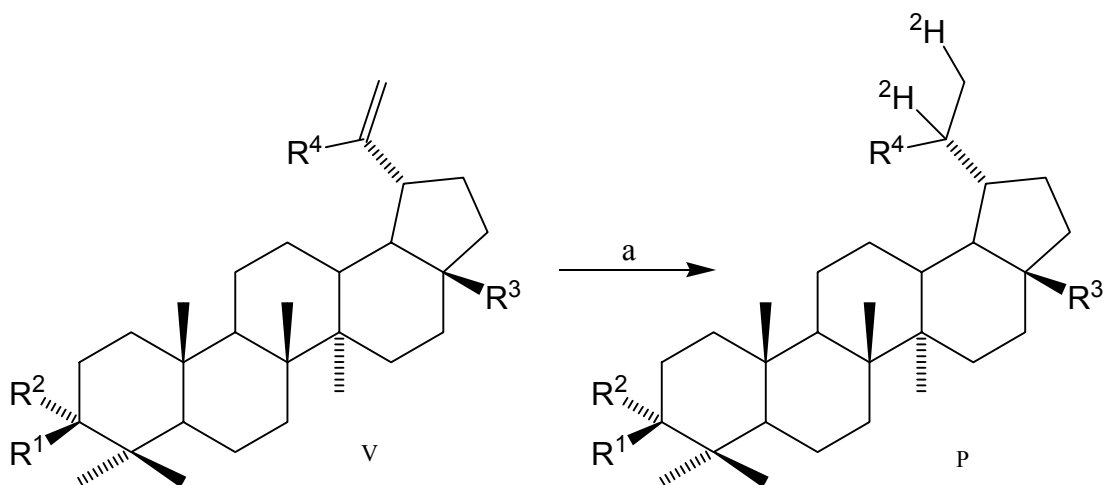
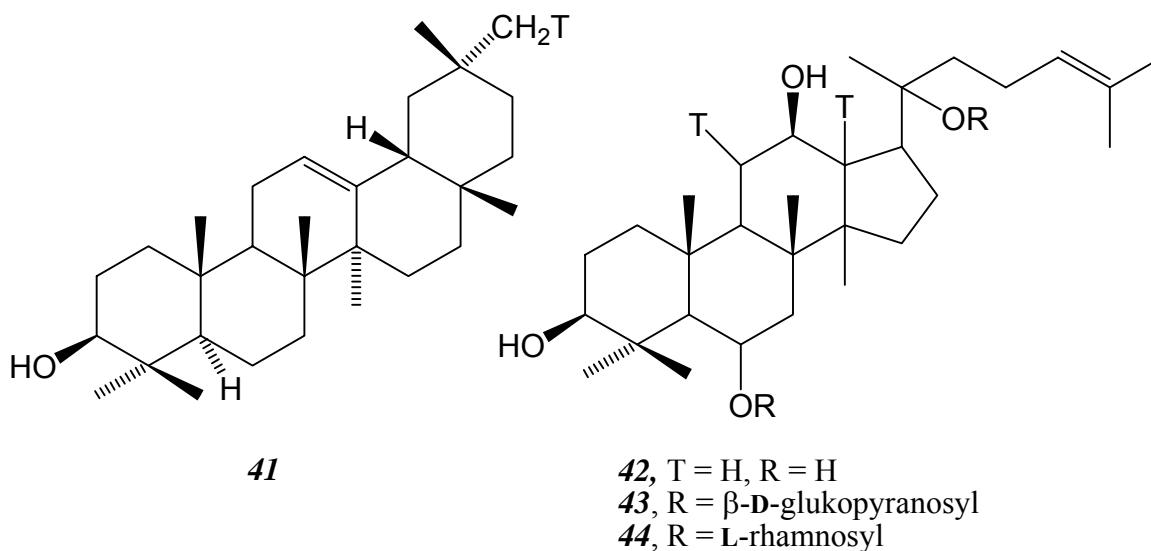


Schéma 4: a: D₂, benzen, EtOH, tris(triphenylfosfin)rhodium chlorid

Tabulka 1: Produkty homogenní deuterace dle schématu 4

	V				P			
	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
31	OH	H	CH ₂ OH	CH ₃	OH	H	CH ₂ OH	CH ₃
32	OH	H	CH ₂ OAc	CH ₃	OH	H	CH ₂ OAc	CH ₃
33	OAc	H	CH ₂ OAc	CH ₃	OAc	H	CH ₂ OAc	CH ₃
34	OAc	H	CH ₂ OH	CH ₃	OAc	H	CH ₂ OH	CH ₃
35	OAc	H	COOH	CH ₃	OAc	H	COOH	CH ₃
36	H	H	CH ₂ OH	CH ₃	H	H	CH ₂ OH	CH ₃
37	OAc	H	COOCH ₃	CH ₃	OAc	H	COOCH ₃	CH ₃
38	=O		COOCH ₃	CH ₃	=O		COOCH ₃	CH ₃
39	H	H	CH ₃	CH ₃	H	H	CH ₃	CH ₃
40	OAc	H	CH ₂ OAc	H	OAc	H	CH ₂ OAc	H

Při výzkumu mikrobiálně indukované aromatické cyklizace kruhu A triterpenů v geologických sedimentech rostlin byl použit jako bioukazatel C-29 tritiováný β -amyryin **41** o specifické aktivitě 550 GBq/mmol.^{22,23} β -Amyryin **41** byl připraven v šesti krocích jak je uvedeno v lit.²²



Literatura^{24,25} uvádí syntézu tritiováných dammaranových glykosidů v pěti krocích. 12-ketoginsenosid Rg1 byl připraven parciální acetylací ginsenosidu Rg1. Vodíkové atomy

H-11 a H-13 aglyconů **42** byly izotopově vyměněny za tritium keto-enol tautomerizací 12-ketoginsenosidu Rg1 v T₂O. Následnou redukcí 12-ketoginsenosidu, byly získány tritiované ginsenosidy Rg1 **43** a **44** v radiochemickém výtěžku 2 - 3 %. Uvedené ginsenosidy **43**, **43** byly použity pro biodistribuční studie.

Inhibice enzymu P450_{14DM} byla studována pomocí tritiového substrátu [24,25-³H]dihydrolanosterolu (**46**).²⁶ Dihydrolanosterol (**46**) byl připraven katalytickou tritiací lanosterolu (**45**) za tlaku 101 kPa tritia. Připravený dihydrolanosterol (**46**) měl specifickou aktivitu 23 Ci/mmol.²⁷ (schéma 5)

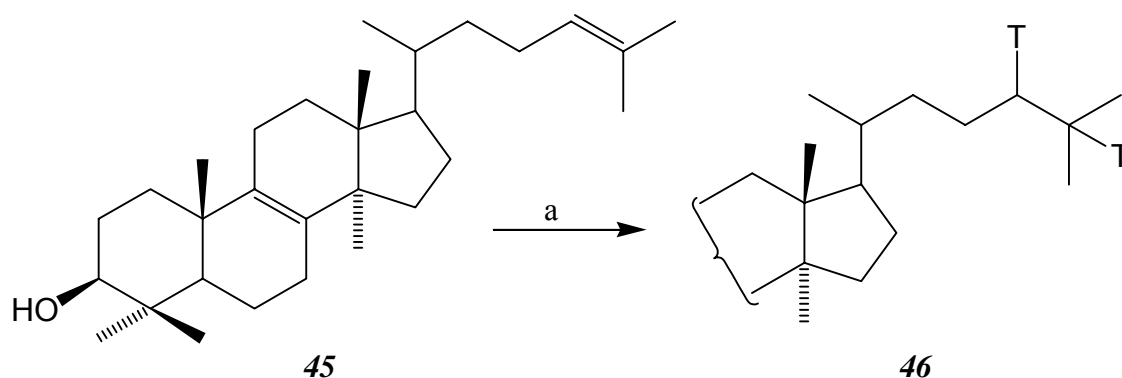


Schéma 5: a: T₂, 1 atm, 10% Pd/C, THF

Zavedení uhlíku ¹³C na skelet betulinu (**4**) bylo prováděno Wittigovou reakcí, Oshia-Lombardovou reakcí nebo Petersonovou methylací v lit.²

Nejprve byl připraven diacetát **47**, který byl ozonolyzován. Vzniklý 29-norketon **48** byl převeden na [29-¹³C]betulin-diacetát **49**. Parciální hydrolyzáza poskytla monoacetát **50** a po úplné hydrolyzáze byl získán [29-¹³C]betulin (**51**). (schéma 6)

[29-¹³C]betulin-monoacetát (**48**) byl rovněž připraven Wittigovou reakcí z diacetátu **49** s použitím [¹³CH₃]methyltrifenylfosfonium jodidu.² Diacetát **49** byl dále hydrolyzován analogickým postupem jak je uvedeno výše. Byly získány **50** a **51**. (schéma 7)

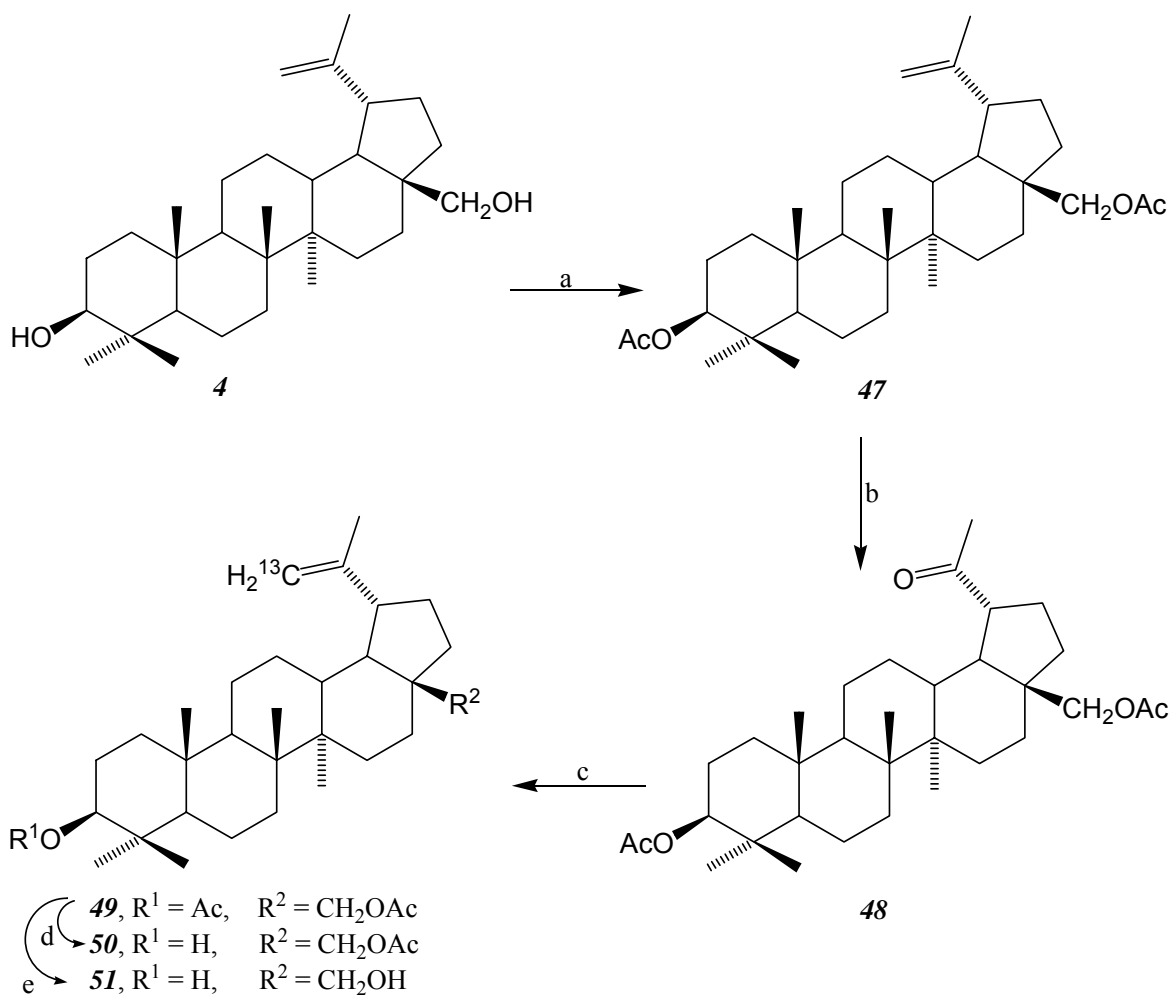


Schéma 6: a: AcOH, Ac₂O, py; b: 1. O₃/EtOAc, MeOH, -78 °C 2. Me₂S; c: ¹³CH₂Br₂, TiCl₄, Zn/THF;
 d: KOH/MeOH; e: 2 ekv. K₂CO₃/MeOH

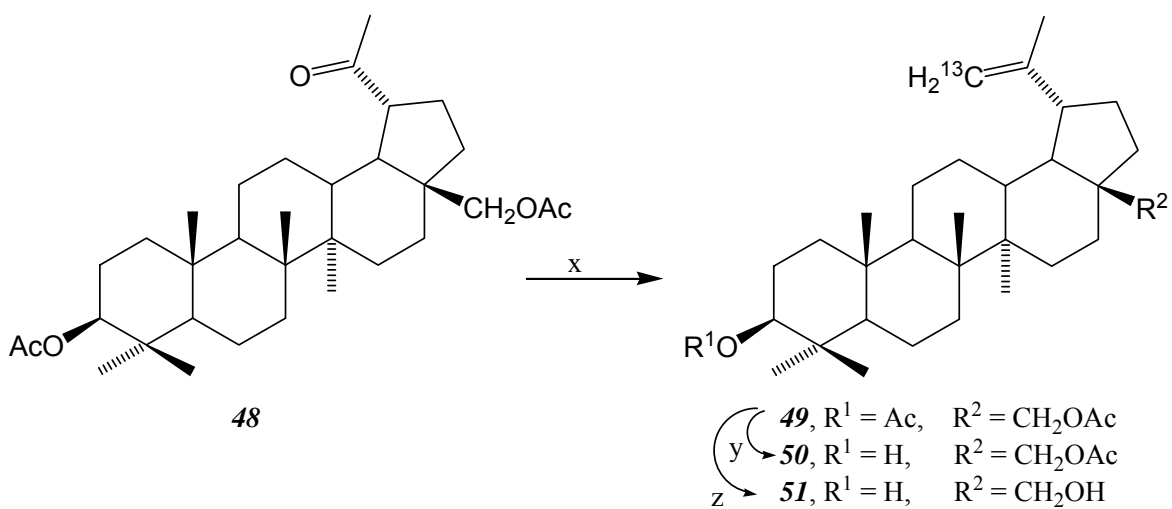
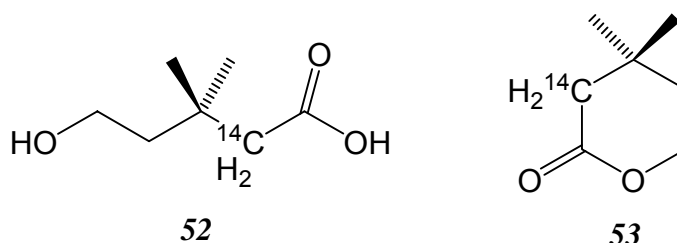


Schéma 7: x: [¹³CH₃]methyltrifenylofosfonium jodid, THF; y: K₂CO₃/MeOH;
 z: 2 ekv. K₂CO₃/MeOH

V lit.^{28,29} byly popsány enzymatické preparace phytoenu, squalenu s inkorporací radiouhlíku ^{14}C . Jako výchozí enzymatický substrát byla použita [2- ^{14}C]mevalonová kyselina (**52**). Kyselina **52** a její lakton **53** jsou základní stavební jednotkou při výzkumu biosyntézy také nižších terpenů.^{27,29,30}



2.4 Izotopy vybrané pro syntézu značených betulininů

Od počátku padesátých let minulého století přetrvává zájem o přípravu značených sloučenin izotopy biogenních prvků jakými jsou uhlík, vodík, síra, fosfor nebo dusík.^{14,31} Za tuto dobu bylo připraveno velké množství značených sloučenin a postupně byly vyvíjeny nové procedury a postupy přípravy.^{2,14,31,32}

Pro experimenty *in vivo* byly připraveny některé nukleové kyseliny o specifické aktivitě 15 GBq/mmol, mastné kyseliny o specifické aktivitě 35 GBq/mmol a aminokyseliny o specifické aktivitě 20 GBq/mmol.³²

Tabulka 2: Charakteristiky použitých izotopů

Izotop	Typ rozpadu	E_{max} (MeV)	Poločas rozpadu	Oblast použití
^2H	stab.	-	-	MS standardy
^3H	β -	0,019	12,25 r.	biochemický výzkum, farmakologie
^{13}C	stab.	-	-	MS standardy
^{14}C	β -	0,156	5730 r.	farmakologické studie
^{15}N	stab.	-	-	MS standardy

Tabulka 2 obsahuje charakteristiky izotopů použitých pro přípravu značených sloučenin v této práci. Stabilní izotopy vodíku (D), uhlíku (^{13}C) a dusíku (^{15}N) jsou využívány pro studium strukturních vlastností, vazebných interakcí, ale také jako standardy

pro biomedicíncký výzkum. Sloučeniny značené radioaktivními izotopy ^{14}C a ^3H slouží především jako stopovače při studiu metabolických procesů v živých systémech.

S využitím moderních radioanalytických metod (^3H NMR, MS, HPLC-FSA/MS) je docíleno lepší charakterizace struktury připravených sloučenin a je sledována selektivita přípravy.^{13,14} Tím je následná interpretace výsledků aplikace značených sloučenin mnohem přesnější a odkrývá hlouběji mechanismy probíhající v živých systémech.

3 Příprava výchozích sloučenin

3.1 Kyselina betulinová (5) a betulin (4)

Kyselina betulinová (5) a betulin (4) byly získány z přírodních zdrojů dle lit.^{33,34} Příslušy betulinu (4) byly realizovány extrakcí z březové kůry, která obsahovala 15 - 20 % surového betulinu (4). Kyselina betulinová (5) je minoritní složkou platanové kůry. Její získávání z platanové kůry v kilogramových množstvích je namáhavé a ekonomicky nerentabilní. Pro potřeby izolace ve stovkách gramů je však dostačující.

Izolace obou výchozích surovin byly prováděny rozpouštědlovou extrakcí. Betulin (4) byl získán macerací 600 kg mleté síťované březové kůry za studena bezvodým lihem ve spolupráci s firmou První Jílovská a. s., divize Exar, Jílové u Prahy. Kyselina betulinová (5) byla získána macerací platanové kůry methanolem za studena. Surové extrakty byly dále zpracovávány zahuštěním.

3.2 Kyselina betulonová (D1) a dihydrobetulonová (54)

Kyselina betulonová (D1) byla získána oxidací surové kyseliny betulinové (5) oxidem chromovým v DMF s přidávkem H₂SO₄ modifikovaným literárním postupem.³³ (schéma 9, postup a)

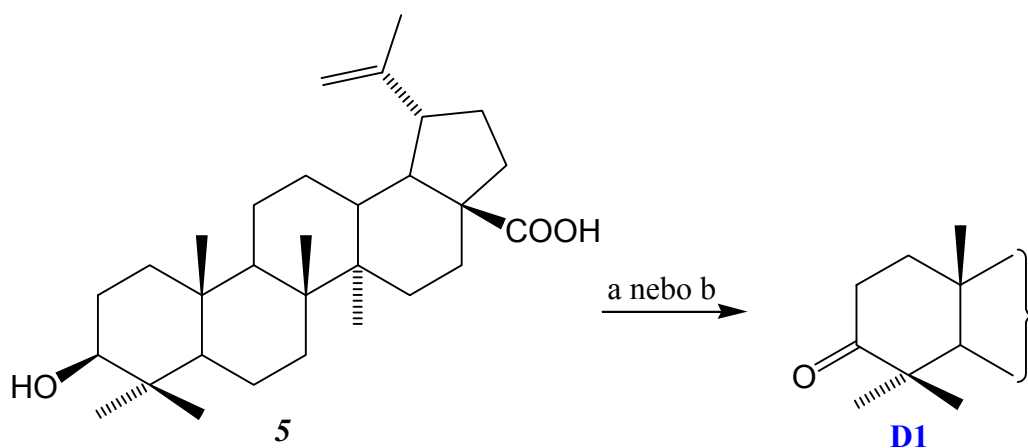


Schéma 8: a: CrO₃, DMF, H₂SO₄; b: Na₂Cr₂O₇·2H₂O, AcOH, Ac₂O, MeCN

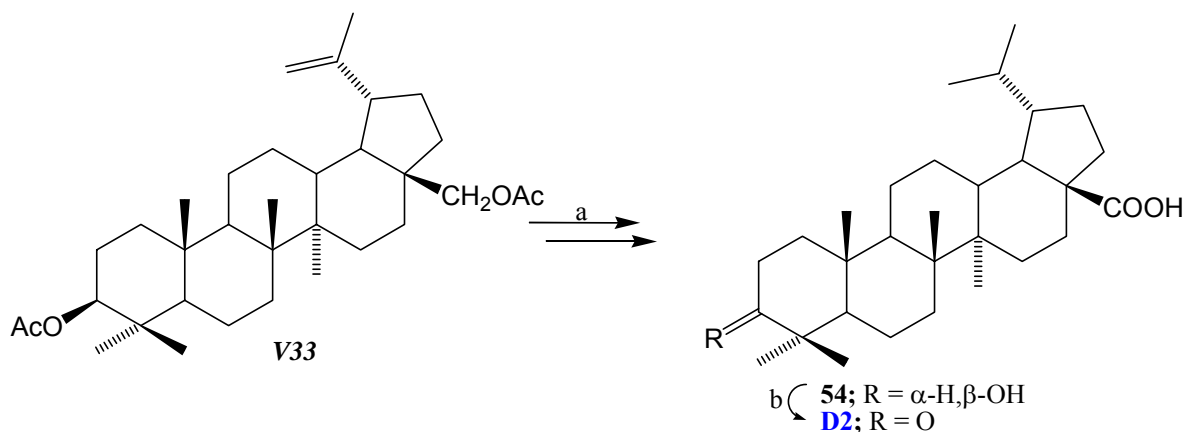
Zakoncentrování reakční směsi a nadbytek oxidačního činidla vedly k nežádoucím reakcím, tudíž ke snížení výtěžku.

Zvýšení výtěžku reakce a kvality produktu bylo dosaženo optimalizací činidla - mírná oxidace dichromanem sodným ve směsi kyseliny octové a acetanhydridu

s přidavkem acetonitrilu. (schéma 9, postup b)

Reakční časy obou reakcí jsou přibližně shodné. Výtěžek mírné oxidace dichromanem sodným je však vyšší, asi 80 % v porovnání s oxidací oxidem chromovým, jejíž výtěžek se pohybuje v rozmezí 30 - 40 %.

Příprava kyselina dihydrobetulinové (**D2**) byla popsána v lit.³⁴ katalytickou hydrogenací dvojné vazby v poloze 20(29).



Kyselina dihydrobetulonová (**D2**) byla následně připravena z kyseliny dihydrobetulinové (**54**) mírnou oxidací dichromanem sodným ve směsi kyseliny octové a acetanhydridu. (schéma 10, postup b) Postup přípravy dle uvedeného schématu poskytuje výborné výtěžky 70 - 80 %.

3.3 3β-acetoxy-21-oxolup-18-en-28-ová kyselina (**58**)

Výchozí látkou pro syntézu kyseliny **58** byl acetát **V33**. Příprava kyseliny **58** byla provedena dle lit.³⁵ v čtyřech krocích. Betulin (**4**) byl acetylací převeden na acetát **V33**, který byl dále kysele katalyzovanou izomerizací dvojné vazby z polohy 20(29) do polohy 18 převeden na olefin **55**. Allylovou oxidací olefinu **55** byl připraven keton **56**, jehož následnou parciální hydrolyzou byla odstraněna acetoxykupina v poloze 28 za vzniku alkoholu **57**. Oxidací alkoholu **57** oxidem rutheničelým za laboratorní teploty byla získána kyselina **58**, která byla následně hydrolyzována na hydroxykyselinu **59**. (schéma 12)

Samotná oxidace (schéma 12, postup b) a následná deacetylace (schéma 12, postup c) byly provedeny ve skleněném jednoplášťovém kotlíku o objemu 40 l s hřídelovým míchadlem.

Pro přípravu selektivně značených derivátů byla využita acetoxykyselina **58**, která byla připravena výše uvedenou cestou.

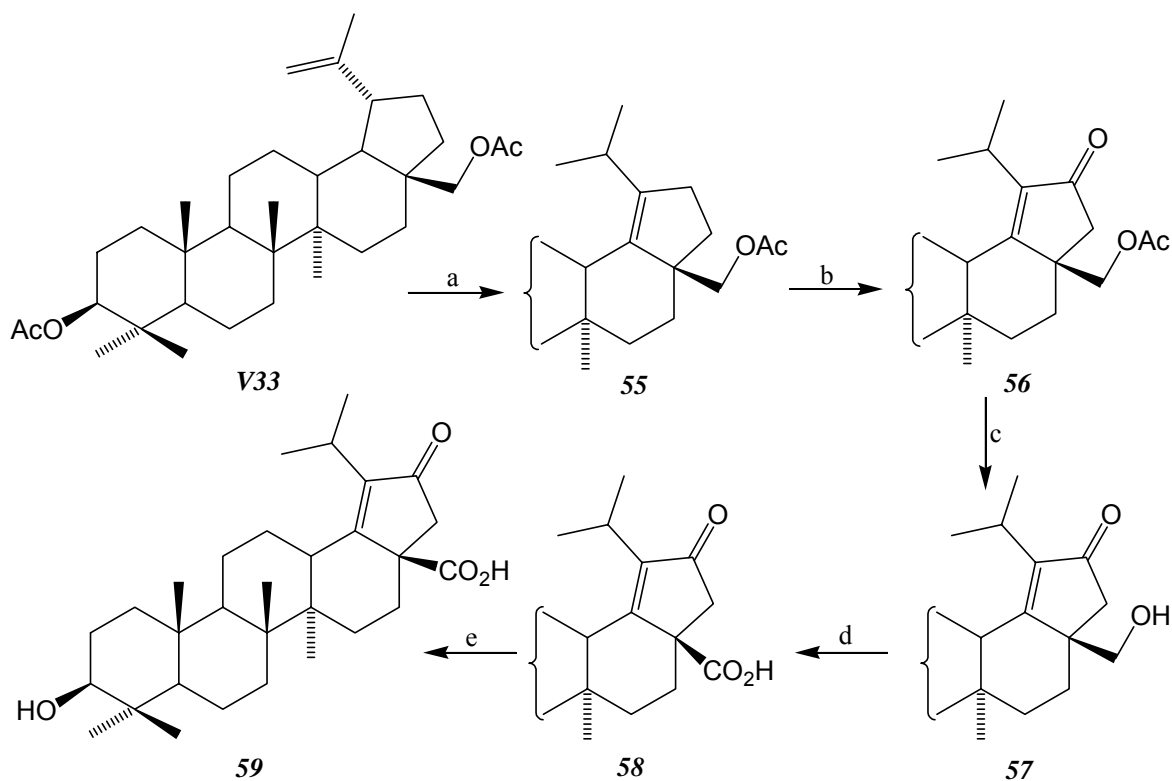


Schéma 10: **a:** HBr/C₆H₆, AcOH, Ac₂O, refl., **b:** Na₂Cr₂O₇, AcONa/C₆H₆, AcOH, r.t.,
c: KOH/PhMe, EtOH, r.t., **d:** RuO₂, NaIO₄/EtOAc, H₂O, r.t., **e:** KOH/EtOH, PhMe

4 Příprava selektivně značených betulininů

Pro přípravu značených derivátů byly vybrány betuliny vykazující na některé testované linie zajímavou cytotoxickou aktivitu. Jako příklad jsou uvedeny v Tabulce 3 některé betuliny, od kterých byly připraveny značené sloučeniny.

Tabulka 3: Cytotoxicita na linii CEM vybraných betulininů

Sloučenina	IC ₅₀
	[$\mu\text{mol/l}$]
aldehyd 9	6
diosfenol 10	4
β -ketokyselina 11	1
diketon 12	10
pyrazin 14	23

Všechny reakční kroky byly z ekonomických důvodů optimalizovány a vyzkoušeny se studenými preparáty.

Připravené deriváty značené stabilními izotopy budou použity jako MS - standardy pro další analýzu ve spolupráci s PřF UP Olomouc a pro studie farmakologické studie ve spolupráci s LEM, FN Olomouc. Deriváty značené tritiem byly vybrány pro biochemické studie ve spolupráci s LEM, FN Olomouc.

4.1 Syntéza deuterovaných a tritiových sloučenin 1a - 3a a 1b - 3b

Vlastní příprava 3 α -deuterovaných a tritiových derivátů vycházela z redukce 3-ketoderivátů.³⁶ Autoři popisují redukce ketonů NaBD₄ a LiAlD₄, porovnávající stereoselektivitu obou činidel.

Pro přípravu značených sloučenin bylo zapotřebí přisunout výchozí materiál pro další syntézy. Alkylací kyseliny **58** methylbromidem byl připraven methyl-ester **A1**, jehož kyselý katalyzovanou hydrolýzou byl syntetizován methyl-ester **A2**. Oxidací methyl-esteru **A2** dichromanem sodným ve směsi AcOH a dioxanu byl získán keton **A3**, který byl použit jako substrát pro vlastní značení. (schéma 13)

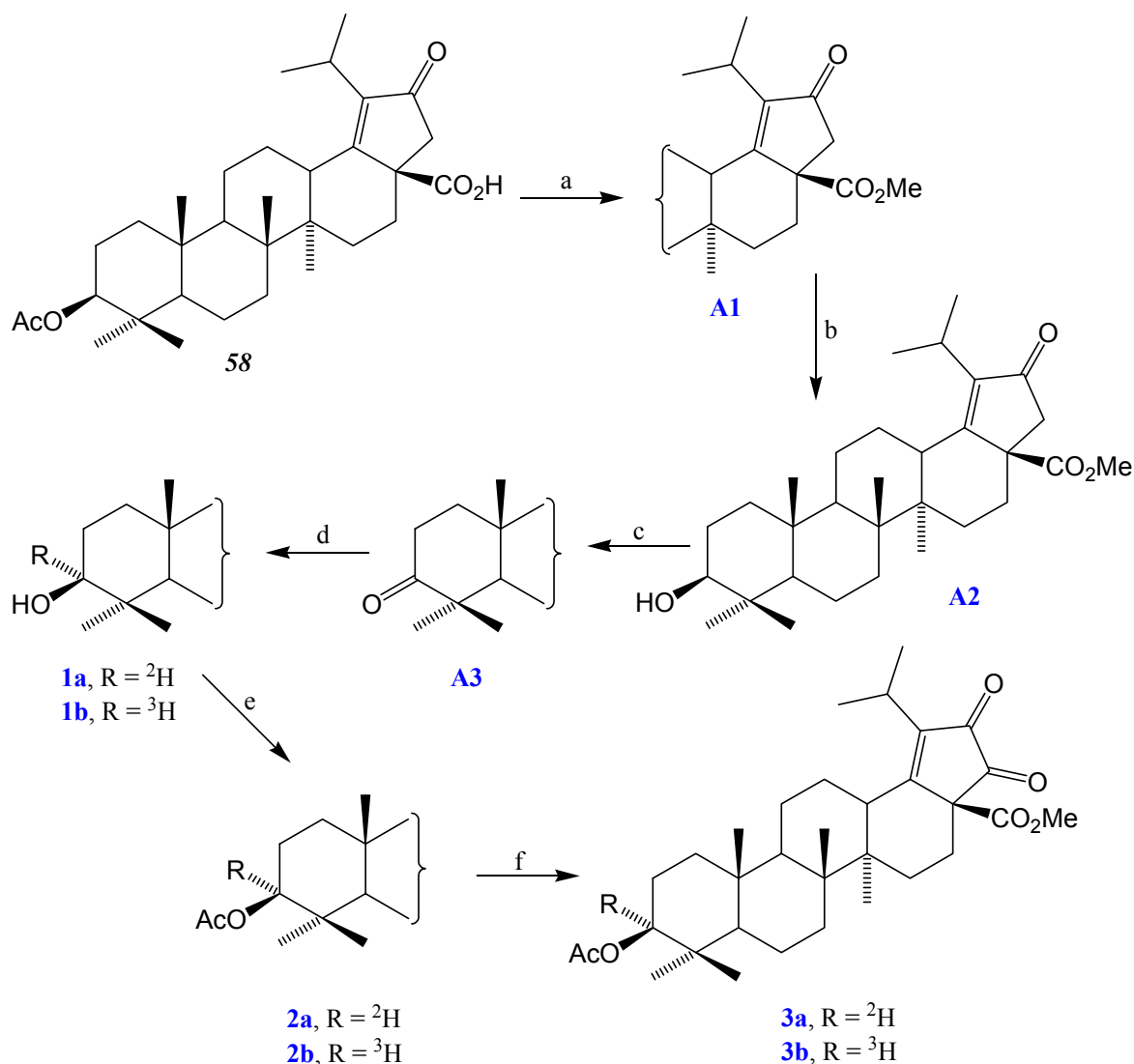


Schéma 11: **a:** MeBr, $\text{K}_2\text{CO}_3/\text{MeCN}$, DMF; **b:** HCl, HBr/dioxan, MeOH; **c:** $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7/\text{AcOH}$, dioxan; **d:** $\text{Na}[\text{B}^2\text{H}_4]$ nebo $\text{Na}[\text{B}^3\text{H}_4]$, THF, MeOH; **e:** $\text{Ac}_2\text{O}/\text{py}$; **f:** $\text{SeO}_2/\text{dioxan}$, AcOH, Ac_2O

Redukcí substrátu **A3** NaBD_4 v THF a MeOH byl připraven deuterovaný alkohol **1a**. Alkohol **1a** poskytl po acylaci Ac_2O v pyridinu značený acetát **2a**, který byl dále oxidován oxidem seleničitým v dioxanu na diketon **3a**.

Analogickým způsobem bylo postupováno při přípravě tritiových analogů. Substrát **A3** byl redukován NaBT_4 , o specifické aktivitě 6.4 Ci/mmol, za vzniku alkoholu **1b**. Acylací alkoholu **1b** byl získán tritiový acetát **2b**, který oxidací oxidem seleničitým za stejných podmínek poskytl diketon **3b**.

Derivát **1a** byl připraven s chemickým výtěžkem 96 % a s izotopickým obohacením 98%. Tritiový derivát **1b** byl připraven s radiochemickým výtěžkem 30%. Radiochemická čistota preparátu **1b** byla stanovena pomocí kapalinové scintilační

detekce 95 %. Celková aktivita připraveného preparátu **1a** byla stanovena pomocí LSC 30 mCi. Radiochromatogramy látek **1b**, **2b** a **3b** jsou uvedeny v příloze (strana 57 - 58).

Struktury všech připravených derivátů byly potvrzeny spektrálními daty. U deuterovaných derivátů byly změřeny kromě ^1H a ^{13}C NMR i ^2H NMR spektra a MS-EI spektra. V MS-EI látky **1a** byl nalezen molekulový iont m/z 485(15). V MS-EI studené látky **A2** byl nalezen molekulový iont m/z 484(20). Z rozdílu molekulové hmoty je patrné, že alkohol **1a** obsahuje jeden atom deuteria. V ^{13}C NMR spektru bylo pozorováno ve spektrech všech deuterovaných derivátů **1a**, **2a** a **3a** štěpení signálu C-3 při $\delta \approx 78.95 - 80.18$ ppm. V ^1H NMR spektrech sloučenin **1a**, **2a** a **3a** chybí charakteristické signály H-3 α posuny při $\delta \approx 4.45 - 4.55$ ppm. Naopak chemické posuny v ^2H NMR spektrech sloučenin **1a**, **2a** a **3a** při $\delta \approx 4.45 - 4.55$ ppm odpovídají přítomnosti atomu deuteria ^2H -3 α .

4.2 Příprava deuterovaných sloučenin **4a** - **6** a ^{14}C značeného esteru **4b**

Syntéza značených sloučenin **4a** a **4b** byla realizována Wittigovou reakcí modifikací literárního postupu.²

Výchozím materiálem pro syntézu byla kyselina betulinová (**5**), která reakcí s benzyl-bromidem ve směsi DMF a MeCN poskytla benzyl-betulinát (**B1**). Ester **B1** byl ozonolyzován zaváděním ozonu do roztoku esteru **B1** v chloroformu při -80 °C za vzniku norketonu **B2**. Se substrátem **B2** byly nejprve provedeny optimalizační experimenty se studenými činidly.

Jak udává lit.², Wittigova reakce methylenfosforanu se substrátem **B2** probíhá v roztoku toluenu. Aplikací reakčních podmínek uvedených v lit.² bylo zjištěno, že tato reakce v toluenu neprobíhá. Reakce substrátu **B2** v čerstvě destilovaném THF a pod mírným přetlakem argonu naopak probíhala v 80% výtěžku. Optimalizací reakčních podmínek a změnou rozpouštědla bylo dosaženo vyššího výtěžku Wittigovy reakce se studeným methyltrifenylfosfonium jodidem. Fosfoniová sůl $\text{CH}_3[\text{Ph}_3\text{P}]\text{I}$ (**B3**) byla připravována v suché aparatuře, den před reakcí.

Deuterovaný ester **4a** byl připraven reakcí substrátu **B2** s $[\text{CD}_3]$ methyltrifenylfosfoniovou solí za vzniku esteru **4a** ve výtěžku 80 % a s 98% deuteriovým značením. Debenzylací esteru **4a** v nerezovém autoklávu na 10% Pd/C katalyzátoru za přetlaku vodíku 500 kPa byla připravena kyselina **5**. Z kyseliny **5** byl

allylovou oxidací dvojně vazby v poloze 20(29) připraven aldehyd **6**. (schéma 14)

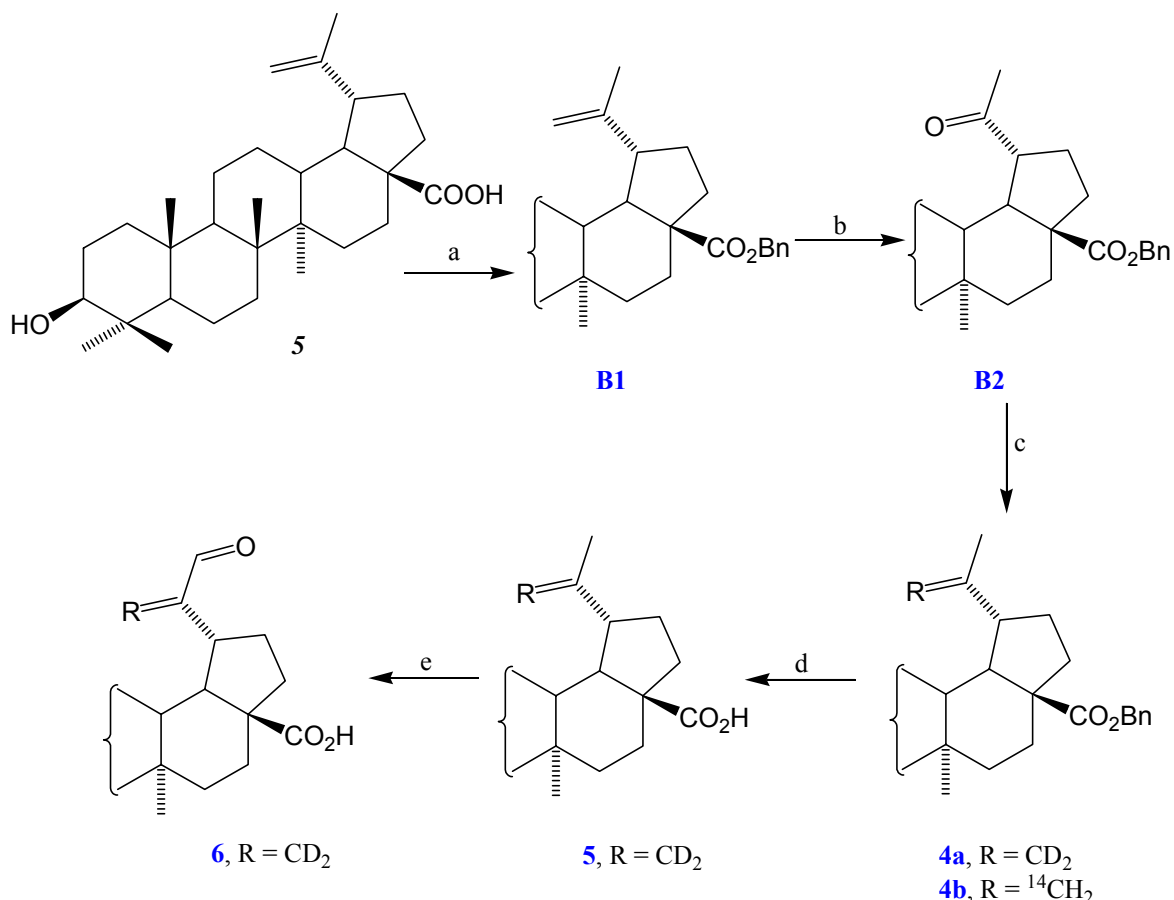


Schéma 12: **a:** BnBr/DMF, MeCN, K₂CO₃, NaI; **b:** 1. O₃/CHCl₃, -70 °C 2. Me₂S;
c: 1. C[D₃]I, Ph₃P, PhMe, -30 °C 2. *t*-BuOK; 3. EtOH, **d:** H₂, 10% Pd/C/ THF, EtOH;
e: SeO₂/ 2-methoxy-ethanol, refl.

Struktury sloučenin **4a** - **6** byly potvrzeny spektrálními daty. V MS-EI esteru **4a** byl identifikován molekulový iont o *m/z* 548 (17). V MS-EI studeného preparátu **B1** byl identifikován molekulový iont o *m/z* 546 (20). Z rozdílu dvou hmotnostních jednotek lze usuzovat na přítomnost dvou atomů deuteria v molekule sloučeniny **4a**, jejichž přítomnost byla potvrzena ²H NMR spektry. V ²H NMR spektrech **4a** a **5** byly zaznamenány charakteristické signály při δ ≈ 4.58 - 4.72 ppm, odpovídající přítomnosti dvou atomů deuteria na dvojně vazbě 20(29).

Ester **4b** byl připravován analogicky jako **4a** s použitím [¹⁴CH₃]methyltrisphenylfosfoniové soli, připravené z [¹⁴C]H₃I o specifické aktivitě 2.16 GBq/mmol (1. 2. 1993). Reakce byla prováděna v mikrosoupravě Kontes za mírného přetlaku argonu. Aparatura byla bezprostředně před reakcí sušena v sušárně.

Jak ukazuje radiochromatogram (viz. Příloha, Obrázek 1) pořízený pomocí elektronické autoradiografie, byly v reakční směsi přítomny tři sloučeniny vykazující emisi β^- . Izolovaný ester **4b** (R_f 0.77) byl identifikován pomocí ^1H a ^{13}C NMR. Signály uhlíků byly přiřazeny pomocí APT spektra. Z reakční směsi byl dále izolován výchozí keton **B2** (R_f 0.20). Značná část aktivity zůstala na startu TLC, což lze vysvětlit radiolýzou a dále radiolýzou indukovaným chemickým rozkladem [^{14}C]H₃I.

4.3 Syntéza deuterovaných methyletherů 7 a 8

Autooxidace (schéma 13, postup a) probíhá v silně bazickém prostředí zaváděním vzduchu do reakční směsi.^{11,39} Autooxidací benzyl-esteru **C1** v *t*-BuOH za přítomnosti *t*-BuOK při teplotě 50 °C byl připraven diosfenol **C2**. Diosfenol **C2** sloužil jako výchozí materiál pro přípravu methyl-etherů **7**, **7a**, **8**, **8a**, **8b** a **8c**. Reakcí diosfenolu **C2** s C[D₃]I ve směsi dioxanu s vodou v přítomnosti KOH za teploty 120 °C byl získán methylether **7**, který dále redukcí vodíkem na 10% Pd/C v THF poskytl kyselinu **8**. (schéma 13)

Průběh autooxidace (schéma 13, postup a) byl sledován on-line ^1H NMR analýzou. Vzorky reakční směsi byly odebírány v intervalech dvaceti minut. V ^1H NMR spektrech sloučenin **C1** a **C2** jsou patrné rozdíly v chemických posunech methylových vodíků při $\delta \approx 0.80 - 1.00$ ppm. Ve ^1H NMR spektru **C1** je viditelný signál methylové skupiny při $\delta \approx 0.92 - 0.94$ ppm, který ve spektru methyletheru **C2** nebyl pozorován a při on-line NMR analýze byl pozorován jeho úbytek až konečné vymizení. Naopak u **C2** byl v oblasti $\delta \approx 3.50 - 3.60$ pozorován charakteristický signál hydroxyly, který u sloučeniny **C1** není přítomen.

Struktura etheru **7** byla potvrzena spektrální analýzou včetně ^2H NMR. Přítomnost tří atomů deuteria v molekule etheru **7** je patrná z MS-EI, kde byl identifikován molekulový iont o m/z 575. V MS-EI spektru studeného etheru **7a** byl nalezen molekulový iont o m/z 572.

Hydrogenací etherů **7**, **7a** v ocelovém autoklávu na 10% Pd/C za přetlaku vodíku 500 kPa byly připraveny kyseliny **8**, **8a**. Struktury kyselin **8**, **8a** byly potvrzeny spektrálními údaji ^1H , ^{13}C , ^2H NMR a MS. V MS-EI kyseliny **8** byl identifikován M^+ 489. V ^2H NMR spektru kyseliny **8** je viditelný signál při $\delta \approx 3.53$ ppm charakteristický pro methoxyskupinu vázanou na C-2.

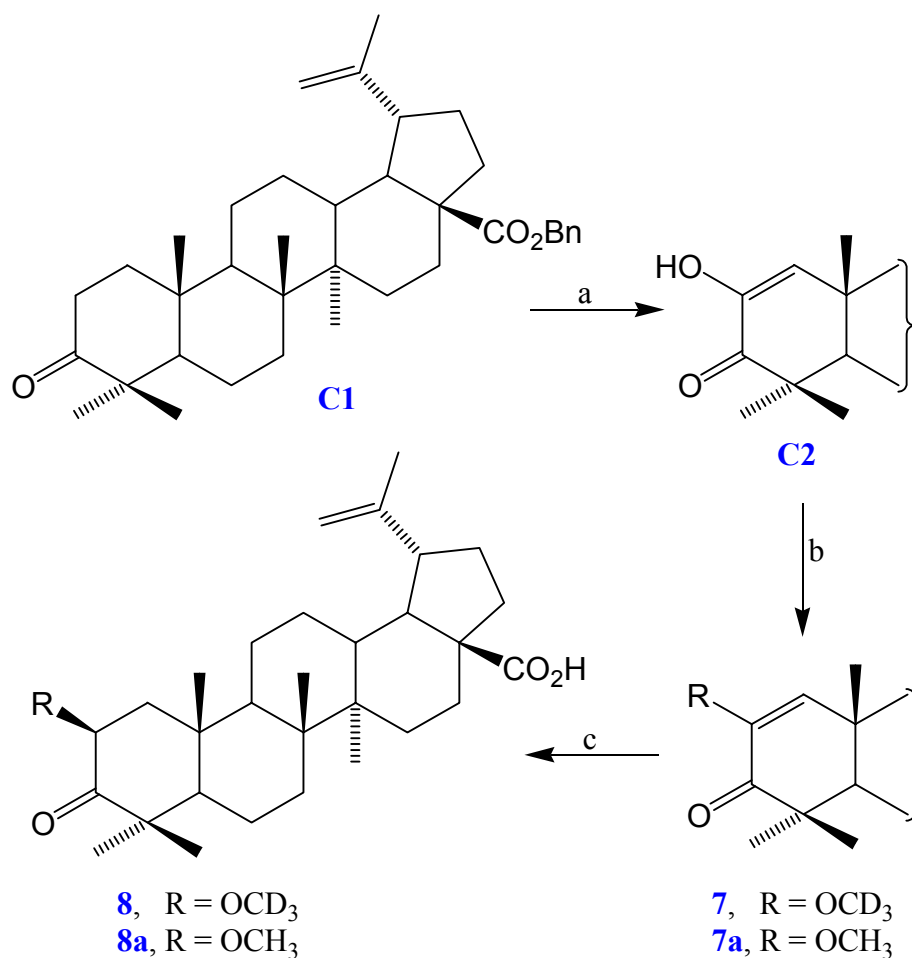


Schéma 13: a: O₂, KOH, *t*-BuOH, 45 °C; b: C[D]₃I nebo CH₃I, KOH, dioxan, H₂O, 120 °C;
c: H₂, 10% Pd/C, THF, EtOH

4.4 Syntéza ¹⁵N-pyrazinových derivátů 9a, 10a

V rámci této práce byly připraveny pyrazinové deriváty **9**, **10** heterocyklickým jádrem přikondenzovaným ke kruhu A lupanového skeletu, které byly značeny nuklidem dusíku ¹⁵N. (schéma 14) Návrh syntetických prací vycházel z lit.^{11,12,38,39,40,41}

Studené deriváty **9**, **10** byly připravovány dle lit.^{11,12} rozpuštěním kyselin **D1**, **D2** v morfolinu s ethylendiaminem. Poté byla do reakční směsi přidána síra a směs byla refluxována 2 hodiny. Deriváty **9**, **10** byly izolovány ve výtěžcích 95 %. (schéma 14)

Deriváty **9a**, **10a** byly připraveny modifikovaným postupem - hydrolýzou [¹⁵N]ethylendiamin dihydrochloridu „one-pot“.

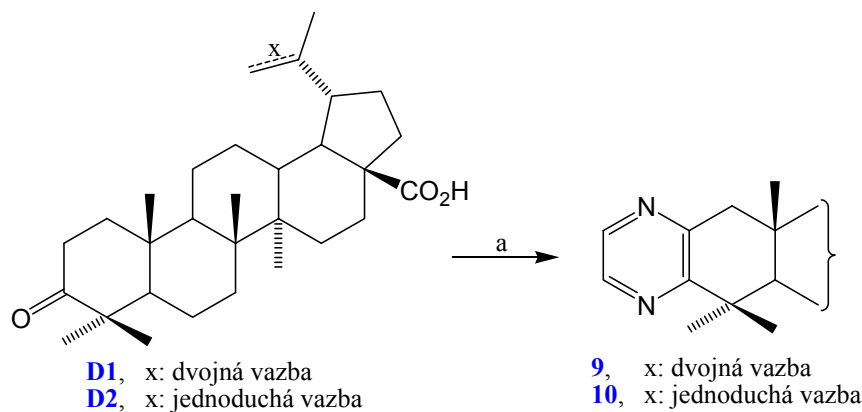


Schéma 14: a: $(\text{CH}_2)_2(\text{NH}_2)_2$, Mf, S, refl.

Pro přípravu značených pyrazinů **9a**, **10a** byl použit ^{15}N ethylendiamin dihydrochlorid, který byl nejprve bazicky hydrolyzován hydroxidem draselným v morfolinu. Následně byla do reakční směsi přidána kyselina **D1**, **D2** a směs byla refluxována se sírou 2 hodiny. (schéma 15)

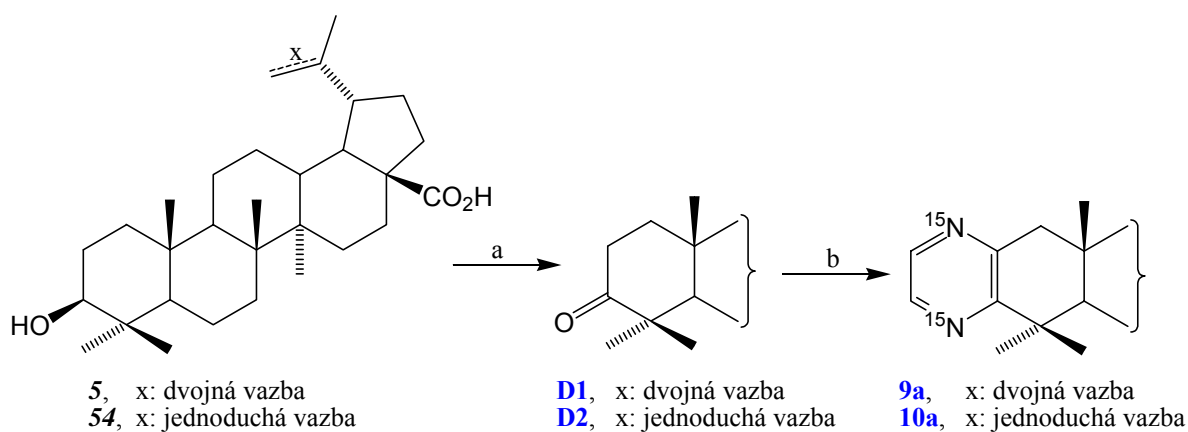


Schéma 15: a: CrO_3 , DMF, H_2SO_4 ; b: $(\text{CH}_2)_2(^{15}\text{N})_2\cdot 2\text{HCl}$, KOH, Mf, S, refl.

Struktury sloučenin **9a**, **10a** byly potvrzeny spektrálními údaji. V MS-EI pyrazinu **9a** byl identifikován molekulový iont M^+ 492. V MS-EI spektru studeného pyrazinu **9** byl identifikován molekulový iont o m/z 490. Rozdíl v molekulových hmotnostech ukazuje přítomnost dvou atomů dusíku ^{15}N v molekule pyrazinu **9a**. V MS-EI spektru pyrazinu **10a** byl nalezen molekulový iont o m/z 494 a ve spektru studeného preparátu **10** byl identifikován molekulový iont o m/z 492. Rozdíl v molekulových hmotnostech opět ukazuje izotopovou modifikaci pyrazinu **10a**.

V ^{15}N NMR spektrech látek **9a**, **10a** byly identifikovány posuny v oblasti

$\delta \approx 209.40 - 212.22$ ppm, které náleží izotopům dusíku ^{15}N heterocyklického aromatického jádra. V ^{13}C NMR spektrech látek **9a**, **10a** jsou patrné signály při $\delta \approx 150.70 - 151.42$ ppm uhlíků C-2 a při $\delta \approx 159.71 - 161.10$ uhlíků C-3.

4.5 Příprava značených derivátů **12** - **15** katalytickou deuterací

Příprava sloučenin **12** - **15** vycházela z lit.^{15,16,20,21}, kde byla popsána deuterace dvojných vazeb v postranních řetězcích derivátů 20(29)-lupenu a 30-nor-20(29)-lupenu **31** - **40**.

Pro heterogenní katalytickou deuteraci byly vybrány substráty **11**, **61**, **62**, **D1**, které byly rozpuštěny v THF a hydrogenovány plynným deuteriem na Adamsově katalyzátoru. Deuterace probíhala v jednoduché aparatuře sestavené z apollo baňky o objemu 50 ml uzavřené septem. Takto uzavřená aparatura s reakční směsí a katalyzátorem byla evakuována membránovou vývěvou a promyta proudem deuteria z balonku plněného z tlakové lahve. Poté byla znovu evakuována a byla naplněna deuteriem z balonku za prudkého míchání.

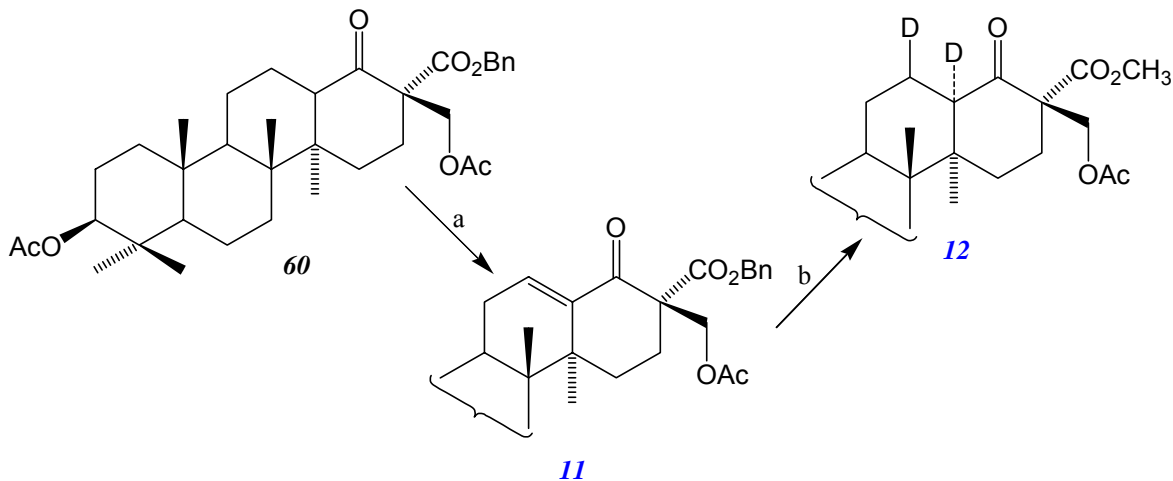


Schéma 16: a: SeO_2/AcOH , dioxan; b: D_2 , $\text{PtO}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}/\text{THF}$

Olefin **11** byl připraven dehydrogenací esteru **60** oxidem seleničitým ve směsi dioxanu a kyseliny octové modifikovaným postupem dle lit.⁴² Ester **11** byl poté deuterován plynným deuteriem za katalýzy Adamsovým katalyzátorem ve směsi THF, EtOH a AcOH a následně methylován diazomethanem. Dipropionát **61**, acetát **62** a kyselina **D1** byly deuterovány za katalýzy Adamsovým katalyzátorem ve směsi THF a AcOH. (schéma 16 a 17) Deuterace dvojných vazeb 20(29) kyseliny **D1** za popsaných podmínek

neprobíhá.(schéma 18) Byly připraveny sloučeniny **12** - **14**.

Struktury sloučenin **12** - **14** byly potvrzeny spektrálními údaji včetně ^2H NMR spekter. V MS-ESI derivátu **12** byl identifikován molekulový iont o m/z 518 (25). V ^2H NMR spektru esteru **12** je patrný signál $\delta \approx 2.28$ s ppm charakteristický pro D-13. Signál charakteristický pro D-12 však nebyl pozorován. V MS-ESI dipropionátu **13** byl nalezen molekulový iont o m/z 530. V ^2H NMR spektru **13** jsou patrné signály $\delta \approx 1.75$ ppm a $\delta \approx 3.40$ ppm charakteristické pro vodíky H-20 a H-29. V MS-EI acetátu **14** byl identifikován molekulový iont o m/z 472. V ^2H NMR spektru **14** je patrný signál $\delta \approx 1.78$ ppm charakteristický pro vodík H-29.

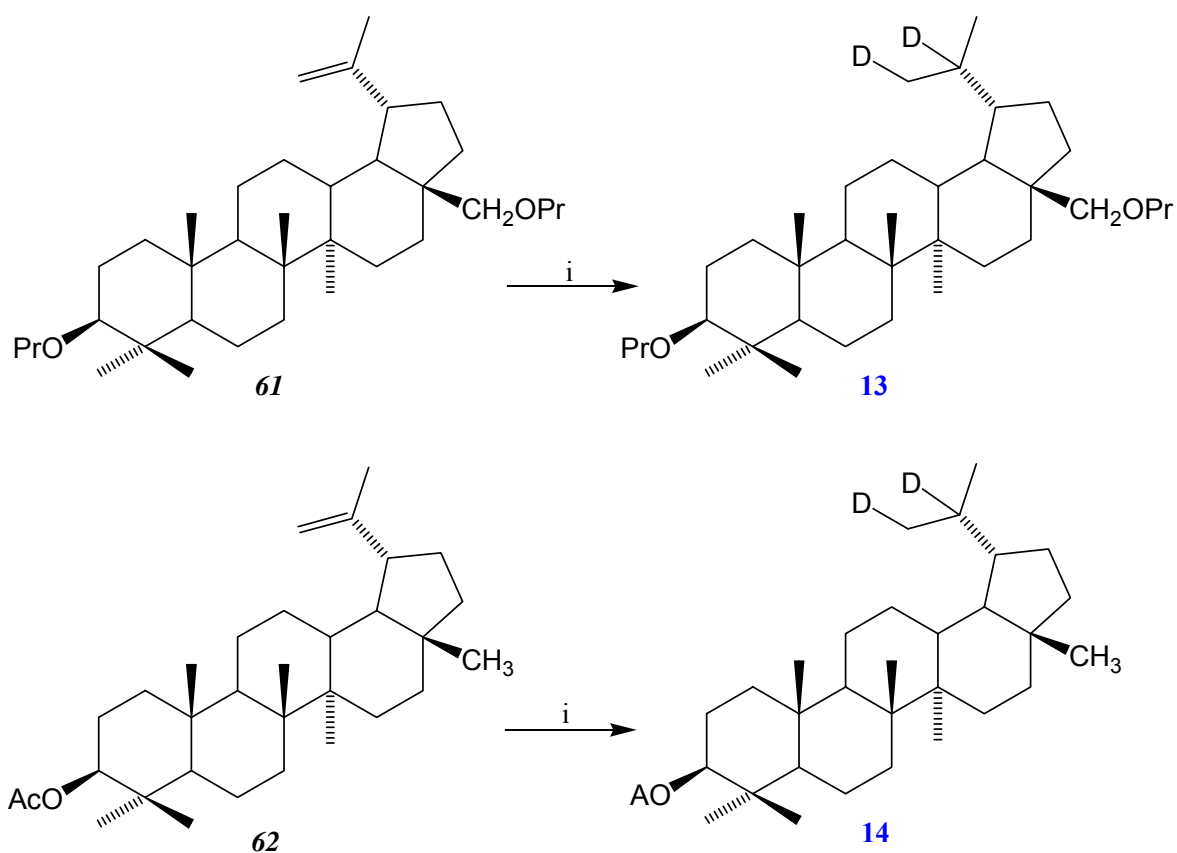


Schéma 17: i: D_2 , $\text{PtO}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}/\text{THF}$, AcOH

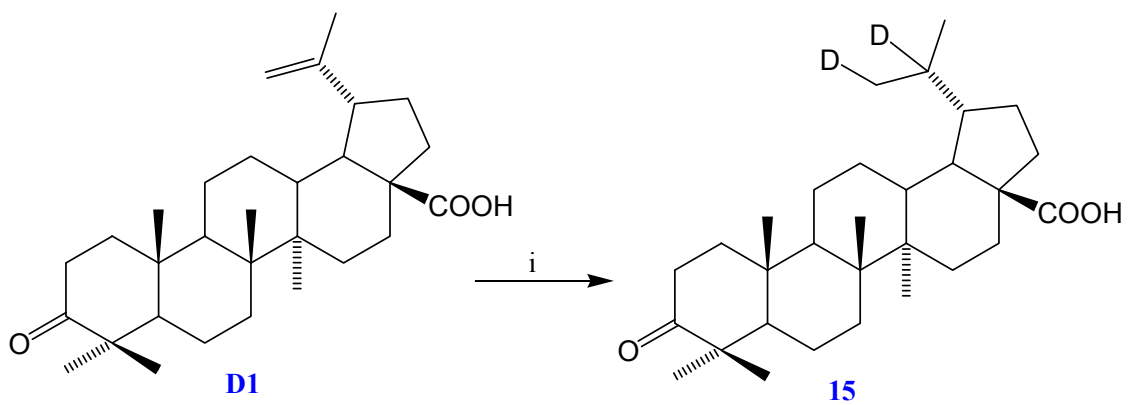


Schéma 18: i: D_2 , $PtO_2 \cdot 2H_2O$ /THF, AcOH

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5 Obecné poznámky k experimentální části

5.1 Experimentální vybavení pro práci s neradioaktivním materiálem

Teploty tání byly stanoveny na bodotávku Kofler blok nebo Büchi B-545 a nejsou korigovány.

Specifické optické otáčivosti byly měřeny v chloroformu na polarimetru Automatic Polarimeter, Autopol III (Rudolph research, Flanders, New Jersey) a jsou uváděny v jednotkách [$\text{deg cm}^2 \text{g}^{-1}$], koncentrace c [$\text{g}/100 \text{ ml}$] jsou udávány u každé hodnoty specifické optické otáčivosti.

IČ spektra byla měřena na FTIR spektrometru Magna 760 Nicolet (střední infračervená oblast v rozsahu vlnočtů $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ s rozlišením 2 cm^{-1}). Vzorky byly měřeny odrazovou technikou DRIFTS v matrici KBr. Spektra byla zpracována programem OMNIC 7.1.

UV spektra byly měřeny na dvoupaprskovém UV/VIS spektrofotometru CARRY 100, měřícím v rozsahu vlnových délek $190-900 \text{ nm}$ s nastavitelnou délkou kroku od $0,1 \text{ nm}$ na pracovišti KJCh FJFI ČVUT Praha.

NMR spektra byla měřena na přístroji Varian ^{UNITY}INOVA 400 (^1H při 399.95 MHz , ^{13}C při 100.58 MHz) a na přístroji Varian ^{UNITY}INOVA 300 (^1H při 299.94 MHz , ^{13}C při 75.42 MHz) v roztoku v CDCl_3 . Pro ^1H NMR spektra byl jako vnitřní standard použit tetramethylsilan. Chemické posuny ^{13}C NMR spekter byly referencovány vůči $\delta(\text{CDCl}_3) = 77.00 \text{ ppm}$. Multiplicita signálů v ^{13}C NMR spektrech byla určena z DEPT spekter. ^2H a ^{15}N NMR spektra byla měřena na přístroji Varian ^{UNITY}INOVA 400 (^2H při 61.4 MHz , ^{15}N při 40.5 MHz). (Dále označovány v textu 400 MHz a 300 MHz .) Hodnoty chemických posunů (δ stupnice) a interakčních konstant (Hz) v ^1H NMR byly určeny pomocí analýzy prvního řádu. Chemické posuny byly zaokrouhleny na dvě desetinná místa, interakční konstanty v jednotkách Hz na jedno desetinné místo.

Hmotnostní spektra ESI byla měřena na přístroji BRUKER esquire 3000, zavedení vzorku bylo provedeno v methanolickém roztoku. U vzorků měřených tímto způsobem je uveden pouze ion $[\text{M}+\text{Na}]^+$, eventuelně jeden nebo dva ionty dceřinné. Hmotnostní spektra EI byla měřena na přístroji SCHIMADZU QP 2010. Vzorek byl nanesen přímým vstupem v dichlormethanu, teplota iontového zdroje byla $200 \text{ }^\circ\text{C}$, měření probíhalo v ionizačním módu SEI. Relativní intenzity jsou vztaženy na nejintenzivnější iont v oblasti $m/z > 35$.

Průběh reakcí a čistota vzorků byla sledována pomocí TLC na fóliích Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck) bez impregnace, pokud není uvedeno jinak nebo s impregnací nasyceným roztokem dusičnanu stříbrného v methanolu, dále na skleněných TLC deskách Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck) nebo na TLC fóliích s reverzní stacionární fází RP-18 F_{254s} (Merck). Detekce TLC fólií byla prováděna nejprve UV zářením (model UVS - 54; 254 nm) a poté postřikem 10% kyselinou sírovou a zahřátím na 150 – 200 °C.

Pro sloupcovou chromatografii byl používán Kieselgel 60 (63 - 200 µm; Merck 7734). Používaný HPLC systém měl toto uspořádání: vysokotlaké čerpadlo Gilson (model 321-322), preparativní HPLC kolona (Labio 25 × 250 mm nebo 50 × 250 mm, sorbent Biospher Si 120, 7 µm) nebo preparativní RP-HPLC kolona (Labio 25 × 250 mm, sorbent Biospher PSI 200 C18, 10 µm), refraktometrický detektor IOTA 2 (Precision Instruments), propojený přes RS-232 s PC s programem Chromulan 1.20 a automatický sběrač frakcí Gilson (model 206).

Ozon byl generován ze sušeného vzduchu ozonizátorem Azcozon VMUS-4 OZONE GENERATOR (AZCO INDUSTRIES LIMITED, G - Servis Praha, s. r. o.). Koncentrace ozonu činila 4 g/h při průtoku vzduchu 5l/min (0.1 % ozonu v ozonizovaném vzduchu). Průtok vzduchu byl zajišťován akvarijním vzduchovacím motorkem TZ 604-00.

Pro přísuny v řádu stovek gramů byl použit skleněný dvouplášťový kotlík o objemu 2.2 l s hřídelovým míchadlem poháněným motorem IKA[®] RW 20. Vytápění kotlíku bylo realizováno vodní párou o teplotě 100 °C, která byla vyvíjena v parogenerátoru SIAL DIAVOLO o příkonu 2 kW.

K odpařování rozpouštědel byla použita RVO (Büchi Rotavapor R-200). Pro chlazení reakcí za snížené teploty byl používán cryocooler Huber TC 100E.

Eluční soustavy pro vyvíjení TLC fólií (jsou vždy uvedeny u experimentu):

- A toluen : diethylether 6:1 (obj.)
- B toluen : diethylether 10:1 (obj.)
- C toluen : diethylether 1:1 (obj.)
- D hexan : diethylether 100:1 (obj.)
- E THF : 1% AcOH ve vodě 2:1 (obj.)

Veškerá rozpouštědla používaná pro reakce, krystalizace a chromatografie byla předem predestilována. THF použitý do reakce byl predestilován v destilační smyčce se sodíkem a benzofenonem pod argonovou atmosférou.

Složení mobilní fáze použité pro HPLC jsou uvedeny u konkrétních experimentů.

Analytické vzorky byly sušeny za sníženého tlaku nad oxidem fosforečným. Oxid seleničitý, Adamsův katalyzátor a dimethylsulfid byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich, s.r.o., jodistan sodný, uhličitan draselný a silikagel byly zakoupeny od firmy Verkon, s.r.o.

Výchozí sloučenina **60** byla poskytnuta Mgr. Lenkou Markovou. Sloučeniny **61**, **62**, **D1**, **D2** byly poskytnuty RNDr. Janem Šarkem, Ph.D.

5.2 Experimentální zařízení pro práci s radioaktivním materiálem

NMR spektra radioaktivních preparátů byla měřena na spektrometru ^3H NMR BRUKER Avance II 300 MHz UltraShielded (Laboratoř radioisotopů ÚOCHB AV ČR, ^1H při 300.13 MHz, ^{13}C při 75.48 MHz) v roztoku v CDCl_3 . Pro ^1H NMR spektra byl jako vnitřní standard použit tetramethylsilan. Chemické posuny ^{13}C NMR spekter byly referencovány vůči $\delta(\text{CDCl}_3) = 77.20$ ppm. (Dále označován v textu jako BK 300 MHz.)

Jako HPLC pro radiochemickou analýzu bylo použito pilotní sestavy DeltaChrom Instruments v tomto uspořádání: vysokotlaká pumpa SDS 150, analytická HPLC kolona (WATREX 250×4 mm, sorbent REPOSIL 100 C18 $5\mu\text{m}$), UV detektor DeltaChrom s proměnnou vlnovou délkou, průtokový scintilační detektor PACKARD RADIOMATICTM 150TR (Canberra Company), propojený přes RS-232 s PC s programem Clarity.

Průběh reakcí a čistota vzorků byla sledována pomocí TLC na fóliích Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck). Separace a purifikace značených sloučenin byla prováděna na analytických skleněných deskách 10×20 cm Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck). Detekce TLC fólií byla prováděna nejprve UV zářením (model UVS - 54; 254 nm) a parami jódu.

Radiochemická detekce pro analýzu sloučenin značených radiouhlíkem ^{14}C byla prováděna na elektronickém autoradiografu Instant Imager (Packard Instrument Company) s integrovaným plynovým proporcionálním počítačem. Pro analýzu byla použita komerční směs plynu LINDEGAS UN1956 o složení: 1 % isobutan, 2.5 % oxid uhličitý a 96.5 % argon za pracovního tlaku 220-240 kPa. Při zpracování výsledků pořízených z elektronické autoradiografie bylo postupováno takto: TLC fólie přelepená tenkou průsvitnou lepicí páskou byla vložena do podavače zařízení Instant Imager, kde byla detekována automaticky. Radiochromatogram byl vyhodnocen pomocí příslušného řídicího softwaru. Referencování linií start a konec eluční zóny bylo prováděno manuálně. Výpočet retenčních parametrů, počet impulzů a výpočet plochy píků byl proveden automaticky řídicím systémem a byl korigován na pozadí.

Radiochemická detekce pro analýzu sloučenin značených izotopem vodíku ^3H byla prováděna na kapalinovém scintilačním detektoru BECKMANN LS 6000 SE. Při měření bylo postupováno následovně: TLC fólie byla rozstříhána na proužky o šířce 0,4 – 0,5 cm. Každý proužek byl změřen s přidavkem 1 ml kapalného scintilátoru. Hodnoty četnosti impulzů byly zapisovány do tabulky a následně vyhodnocovány v aplikaci MS EXCEL. Do radiochromatogramu byla zaznamenána závislost četnosti impulzů korigovaných na pozadí v závislosti na délce dráhy na TLC desce. Z grafu byly posléze určeny jednotlivé retenční parametry.

K odpařování rozpouštědel byla použita RVO (Büchi Rotavapor-M HB-140). Na míchání reakcí byla použita vibrační míchačka IKA VIBRAX-VXR. Reakce se značenými činidly byly prováděny v mikrosouprave Kontes.

Výtěžky reakcí radioaktivních sloučenin jsou uvedeny jako radiochemické výtěžky.

Použitá izotopově modifikovaná činidla

Borodeuterid sodný - $\text{NaB}[^2\text{H}]_4$, 98 % ^2H ; deuterium - $^2\text{H}_2$, 99.8 % ^2H ; methyljodid - $\text{C}[^2\text{H}]_3\text{I}$, 99.5 % ^2H byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (ISOTEC), s.r.o.

Borotritid sodný - $\text{NaB}[^3\text{H}]_4$; o celkové aktivitě 100 mCi (1. 12. 2007) a specifické aktivitě 6.4 Ci/mmol, byl zakoupen od firmy Moravek Biochemicals and Radiopharmaceuticals, INC.

Ethylendiamin dihydrochlorid - $(\text{CH}_2)_2([^{15}\text{N}]\text{H}_2)_2 \cdot 2\text{HCl}$, 98 % ^{15}N byl zakoupen od firmy Sigma-Aldrich (ISOTEC), s.r.o.

Methyljodid - $[^{14}\text{C}]\text{H}_3\text{I}$ v 700 μl toluenu; o celkové aktivitě 40 MBq a specifické aktivitě 2.16 GBq/mmol byl vyroben v UJV Řež a poskytnut pro syntézu doc. L. Lešetickým.

S veškerým radioaktivním materiálem bylo nakládáno v souladu se zákonem č. 18/1997 Sb. a všemi prováděcími předpisy.

Obecný postup zpracování reakčních směsí

Postup A

Reakční směs byla zpracována nalitím do 200 ml vody okyselené zředěnou kyselinou chlorovodíkovou (1:4) a extrahována ethyl-acetátem. Spojené organické podíly byly promyty vodou do pH 7, po té byly vysušeny síranem hořečnatým a odpařeny na RVO.

Postup B

Reakční směs byla zpracována nalitím do 500 ml vody s chloridem sodným a extrahována ethyl-acetátem.

Postup C

Reakční směs byla nalita do pětinasobného objemu studené vody se smáčedlem (JAR) a míchána. Vysrážený produkt byl odsán na fritě a promyt pětkrát vodou.

Postup D

Reakční směs byla zfiltrována přes skládaný filtr v argonové atmosféře. Filtr byl promyt 20 ml methanolu a organický podíl byl odpařen na RVO.

Postup E

Reakční směs byla nalita do stejného objemu HCl (1:5) a extrahována třikrát ethyl-acetátem. Spojené organické podíly byly promyty dvakrát vodou, následně dvakrát kyselinou chlorovodíkovou (1:5) a opět vodou do pH 7. Spojené organické podíly byly sušeny síranem hořečnatým a odpařeny na RVO. Odparek byl rozpuštěn v toluenu a zfiltrován přes sloupec silikagelu (10.00 g).

Postup F

Reakční směs byla přes septum odsáta injekční stříkačkou a přefiltrována přes syringe filtr (PTFE 5 μ m). Ten byl promyt THF (5 ml) a spojen s filtrátem.

Obecný postup přípravy methyl-esterů

Výchozí kyselina byla rozpuštěna v chloroformu a k roztoku byl v digestoři přidán

nadbytek etherického roztoku diazomethanu. Průběh reakce a množství diazomethanu bylo kontrolováno pomocí TLC (soustava A). Po zreagování veškeré výchozí kyseliny byla směs ponechána stát 30 min. za r.t. a organická rozpouštědla byla oddestilována (v digestoři). Methyl-ester byl obvykle čištěn filtrací přes silikagel (desetinásobek hmotnosti terpenu) v toluenu a krystalizací z MeOH.

1. Methyl-3 β -acetoxy-21-oxolup-18-en-28-oát (A1)

Methyl-ester **A1** byl připraven dle modifikovaného literárního postupu.³⁵ Výchozí 3 β -acetoxy-21-oxolup-18-en-28-ová kyselina **58** (15.00 g, 30 mmol) byla rozpuštěna v DMF (100 ml) a acetonirilu (12 ml) s přídavkem bezvodého uhličitanu draselného (5.00 g; 43 mmol) za chlazení (0 °C). Do reakční směsi byl poté přidán methylbromid (5 ml; 44 mmol). Reakční směs byla po tři dny míchána. Průběh reakce byl sledován na TLC (soustava A).

Reakční směs byla zpracována postupem A. Spojené organické podíly byly odpařeny na RVO. Surový **A1** byl krystalizován ze směsi methanol – aceton. Byl získán bílý krystalický methyl-ester **A1** (13.4 g; 87 %) o t.t. 220 - 222 °C; $[\alpha]_D -33^\circ$ (CHCl₃, 0.70). Literatura⁴¹ udává t.t. 238 - 241 °C (CHCl₃/MeOH); $[\alpha]_D -29^\circ$ (CHCl₃). ¹H a ¹³C NMR spektra byla shodná se spektry autentického preparátu.³⁵

2. Methyl-3 β -hydroxy-21-oxolup-18-en-28-oát (A2)

Methyl-ester **A1** (12.90 g; 24 mmol) byl dle literárního postupu³⁵ rozpuštěn ve směsi dioxanu (150 ml), methanolu (60 ml), kyseliny bromovodíkové (4 ml; 65%), kyseliny chlorovodíkové (4 ml; 36%) a vody (10 ml). Směs byla míchána pod argonem za teploty 45 °C dva dny. Průběh reakce byl monitorován TLC (soustava A).

Reakční směs byla zpracována postupem A. Byl získán surový hydroxyderivát **A2** (10.60 g; 95 %) o t.t. 209 - 211 °C; $[\alpha]_D -52^\circ$ (CHCl₃, 0.73), který nebyl krystalizován ani dále čištěn. Literatura³⁵ udává t.t. 207 - 209 °C (CHCl₃/MeOH); $[\alpha]_D -54^\circ$ (CHCl₃). ¹H a ¹³C NMR spektra byla shodná se spektry autentického preparátu.³⁵

3. Methyl-3,21-dioxolup-18-en-28-oát (A3)

Ester **A2** (9.30 g; 19 mmol) oxidován dichromanem sodným (4.70 g; 16 mmol) dle literárního postupu³⁵ ve směsi kyseliny octové (250 ml) a dioxanu (250 ml) za přídavku octanu sodného (9.30 g; 113 mmol). Reakční směs byla míchána za r. t. 3 dny.

Průběh reakce byl monitorován TLC (soustava A).

Reakční směs byla zpracována postupem B. Spojené organické podíly byly promyty vodou do pH 7, následně byly zfiltrány přes sloupec oxidu hlinitého (30.00 g) a odpařeny na RVO. Byl získán surový ester **A3** (7.80 g; 85 %) o t.t. 177 - 183 °C; $[\alpha]_D -50^\circ$ (CHCl₃, 0.71), který byl vysušen ve vakuu a nebyl krystalizován ani dále čištěn. Literatura³⁵ udává t.t. 207 - 209 °C (CHCl₃/MeOH); $[\alpha]_D -51^\circ$ (CHCl₃). ¹H a ¹³C NMR spektra byla shodná se spektry autentického preparátu.³⁵

4. Benzyl-betulinát (B1)

Ester **B1** byl připraven modifikací literárního postupu^{11,35} z kyseliny betulinové (**5**). Kyselina betulinová (**5**) (100.0 g; 219 mmol) byla rozpuštěna ve skleněném dvouplášťovém kotlíku s hřídelovým míchadlem (2.2 l) ve směsi DMF (1.0 l), acetonitrilu (175 ml) s přísadkou bezvodého uhličitanu draselného (40.00 g, 290 mmol) a jodidu sodného (1.00 g; 7 mmol). Do reakční směsi byl postupně přidáván benzyl-bromid (celkově bylo přidáno 40 ml; 337 mmol) za chlazení. Reakční směs byla míchána přes noc a na druhý den byla zahřátá na teplotu 40 – 50 °C po dobu 4 hodin. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC (soustava C, detekce UV).

Reakční směs byla zpracována postupem C. Surový ester **B1** byl sušen v sušárně při 80 °C. Byl získán ester **B1** (110.0 g; 92 %) o t.t. 177 - 183 °C; $[\alpha]_D 13^\circ$ (CHCl₃, 0.80), který byl vysušen ve vakuu a nebyl krystalizován ani dále čištěn. Literatura³⁵ udává t.t. 207 - 209 °C (CHCl₃/MeOH); $[\alpha]_D 12^\circ$ (CHCl₃). ¹H a ¹³C NMR spektra byla shodná se spektry autentického preparátu.³⁵

5. Benzyl-20-oxo-29-norlupan-28-oát (B2)

Keton **B2** byl připraven modifikací literárního postupu^{2,35,42,43} ve dvou šaržích. Benzylester **B1** (11.00 g; 20 mmol) byl rozpuštěn v chloroformu (450 ml) pomocí ultrazvuku. Reakční směs byla poté ochlazená na teplotu -80 °C v acetonové lázni s cryocoolerem a do reakční směsi byl vřáněn ozon z ozonizátoru. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC (soustava A).

Reakční směs byla zpracována přísadkou DMS a odpařena na RVO. Spojený surový norketon **B2** byl čištěn chromatograficky na sloupci silikagelu (150.0 g) a následně krystalizován z methanolu. Byl získán benzyl-platanát (**B2**) (17.50 g; 80 %) ve formě bílých krystalků o t.t. 191 - 193 °C (MeOH); $[\alpha]_D 12^\circ$ (CHCl₃, 0.70). ¹H a ¹³C NMR

spektra byla shodná se spektry autentického preparátu.⁴²

6. Benzyl-betulonát (C1)

Benzyl-ester **C1** byl připraven dle optimalizovaného postupu^{11,12} z benzyl-esteru **B1**. Do dvouplášťového kotlíku o objemu 2.2 litru s hřídelovým míchadlem byl nalit DMF (1200 ml) a za míchání přidáván ester **B1** (123.0 g; 226 mmol). Za mírného průtoku argonu byla dále přidána koncentrovaná kyselina sírová (8 ml) a postupně po malých dávkách oxid chromový (celkově 180.0 g; 1.80 mol). Reakční směs byla míchána nejprve za chlazení, po té ponechána za r. t. do druhého dne. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC (soustava A).

Reakční směs byla zpracována postupem C. Surový produkt byl sušen v sušárně při 70 °C 20 hodin. Produkt byl dále čištěn filtrací přes sloupec oxidu hlinitého (500.0 g) s florisilem (50.00 g) a následně krystalizován z IPO. Byl získán ester **C1** (70.00 g; 57 %) o t.t. 110 - 121 °C (IPO); $[\alpha]_D$ 82° (CHCl₃, 0.71). Literatura³⁹ udává t.t. 119 - 122 °C (CHCl₃/MeOH); $[\alpha]_D$ 80° (CHCl₃). ¹H a ¹³C NMR spektra byla shodná se spektry autentického preparátu.³⁹

7. Benzyl-2-hydroxy-3-oxo-lup-1,20(29)-dien-28-oát (C2)

Benzyl-ester **C2** byl připraven optimalizovaným postupem¹¹. Ve dvouplášťovém kotlíku o objemu 2.2 l s hřídelovým míchadlem, temperovaném na 45 °C, byl rozpuštěn benzyl-ester **C1** (30.00 g; 55 mmol) v *t*-BuOH (1.0 l) a byl přidán *t*-BuOK (45.00 g; 402 mmol). Reakční směs byla zahřívána párou na teplotu 45 °C a byl do ní současně vhnán vzduch peristaltickým čerpadlem. Průběh reakce byl sledován pomocí ¹H NMR (odběr vzorků každých 20 minut) a reverzních TLC (soustava E).

Reakční směs byla zpracována nalitím do dvojnásobného objemu vody, okyselena zředěnou kyselinou chlorovodíkovou (1:4) a extrahována diethyletherem. Spojené organické podíly byly promyty vodou do pH 7, prolity přes sloupec silikagelu (25.00 g) a odpařeny na RVO. Surový produkt byl vysušen na olejové vývěvě a uchováván dále v lednici. Byl získán ester **C2** (25.00 g; 81 %) o t.t. 83 - 86 °C (ether); $[\alpha]_D$ 17° (CHCl₃, 0.70). Literatura³⁹ udává t.t. 84 - 85 °C (lyofilizát *t*-BuOH); $[\alpha]_D$ 16° (CHCl₃). ¹H a ¹³C NMR spektra byla shodná se spektry autentického preparátu.³⁹

8. Kyselina betulonová (D1)

Kyselina **D1** byla připravována dle literárního postupu¹². Surová kyselina betulonová (**5**) (100.0 g, 219 mmol) byla rozpuštěna v DMF (1.0 l) s přidavkem koncentrované kyseliny sírové (5 ml). Za chlazení a pod argonem byl přidáván do reakční směsi po malých dávkách oxid chromový (celkově 150.0 g; 1.5 mol). Reakční směs byla míchána do druhého dne. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC (soustava A).

Reakční směs byla zpracována postupem C. Surový produkt byl sušen v sušárně při 75 °C a krystalizován z EtOH. Byla získána kyselina **D1** (31.60 g; 32 %) o t.t. 256 - 260 °C (EtOH); $[\alpha]_D^{25}$ 34° (CHCl₃, 0.74). Literatura⁴⁵ udává t.t. 250 - 254 °C (MeOH); $[\alpha]_D^{25}$ 32° (CHCl₃). ¹H a ¹³C NMR spektra byla shodná se spektry autentického preparátu.³⁵

9. Dihydrobetulonová kyselina (D2)

Kyselina **D2** byla připravována z kyseliny dihydrobetulonové analogickým literárním postupem.¹² Kyselina dihydrobetulonová (**62**) (2.00 g; 4 mmol) byla rozpuštěna ve směsi kyseliny octové (50 ml) a dioxanu (50 ml) s přidavkem bezvodého octanu sodného (2.00 g; 24 mmol). Do reakční směsi byl přidáván po malých dávkách dichroman sodný (celkově 700 mg; 2 mmol). Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC (soustava A).

Reakční směs byla po 4 hodinách zpracována postupem B. Surový produkt byl sušen v sušárně při 75 °C a krystalizován z EtOH. Byla získána kyselina **D2** (2.00 g; 93 %) o t.t. 239 - 244 °C (EtOH); $[\alpha]_D^{25}$ 8° (CHCl₃, c 0.7). Literatura⁴³ udává t.t. 262 - 263 °C (MeOH); $[\alpha]_D^{25}$ 9° (CHCl₃, c 0.8). ¹H a ¹³C NMR spektra byla shodná se spektry autentického preparátu.³⁵

10. [3 α -²H]methyl-3 β -hydroxy-21-oxolup-18-en-28-oát (1a)

Deuterovaný derivát **1a** byl získán redukcí ketonu **A3** (2.00 g; 4 mmol) ve směsi THF (20 ml) a methanolu (20 ml) borodeuteridem sodným. Směs byla nejprve ochlazená na teplotu -10 °C a poté byl za míchání přidán borodeuterid sodný (1.00 g; 23 mmol). Reakce byla monitorována pomocí TLC (soustava A).

Reakční směs byla zpracována nalitím do dvojnásobného objemu vody, okyselená 10% kyselinou sírovou a extrahována ethylacetátem. Spojené organické podíly byly promyty vodou do pH 7, sušeny síranem hořečnatým a odpařeny na RVO. Surový produkt byl čištěn chromatograficky pomocí HPLC a lyofilizován z *t*-BuOH. Byl získán derivát **1a**

(1.90 g; 96 %) o t.t. 177 - 183 °C (lyofilizát *t*-BuOH), $[\alpha]_D -54^\circ$ (CHCl₃, c 0.72). IČ spektrum: 1258, 1455, 1611, 1734, 2949, 3436. UV_{max}: 260 nm. ¹H NMR (400 MHz): 0.77 s, 3H; 0.89 s, 3H; 0.94 s, 3H; 0.98 s, 3H; 1.03 s, 3H; 1.21 d, 3H (J=4.4); 1.22 d, 3H (J=4.0) (7×CH₃); 2.03 m, 1H (H-16α); 2.15 d, 1H (J=18.4, J'~1, H-22a); 2.44 d, 1H (J=18.4, H-22b); 2.46 m, 1H (H-16β); 2.66 dd, 1H (J=3.6, J'=13.2, H-13β); 3.20 septet, 1H (J=9.6, H-20); 3.70 s, 3H (OCH₃). ¹³C NMR (400 MHz) viz str. 51 - 54. ²H NMR (400 MHz) 5.05 s, 1H (D-3α). MS-EI, m/z (%): [C₃₁H₄₇DO₄, M⁺ 485], 485 (M⁺, 15), 442 (5), 424 (7), 276 (12), 263 (73), 249 (7), 203 (12), 191 (19).

11. [3α-²H]methyl-3β-acetoxy-21-oxolup-18-en-28-oát (2a)

Acetát **2a** byl získán acetylací hydroxyderivátu **1a** (1.00 g; 2 mmol) v pyridinu (4 ml) s acetanhydridu (3 ml) za míchání za r.t. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC (soustava A).

Zpracování reakční směsi bylo po 3 hodinách provedeno nalitím do dvojnásobného objemu vody a extrahováno ethyl-acetátem. Spojené organické podíly byly promyty vodou do pH 7. Surový produkt byl krystalizován z methanolu a získán ester **2a** (800 mg; 73 %) o t.t. 220 - 222 °C (MeOH), $[\alpha]_D -33^\circ$ (CHCl₃, c 0.71). IČ spektrum: 1250, 1707, 1727, 2952. UV_{max}: 256 nm. ¹H NMR (400 MHz): 0.84 s, 3H; 0.85 s, 3H; 0.91 s, 3H; 0.93 s, 3H; 1.03 s, 3H; 1.21 d, 6H (J=7.0); (7×CH₃); 2.05 s, 3H (OAc); 2.13 d, 1H (J=18.7, H-22a); 2.46 d, 1H (J=18.7, H-22b); 2.48 ddd, 1H (J=13.5, J'=3.9, J''=2.7, H-16β); 2.64 dd, 1H (J=12.7, J'=3.2, H-13β); 3.20 septet, 1H (J=7.0, H-20); 3.70 s, 3H (OCH₃). ¹³C NMR (400 MHz) viz str. 51 - 54. ²H NMR (400 MHz) 5.54 s, 1H (D-3α). MS-EI, m/z (%): [C₃₃H₄₉DO₅, M⁺ 527], 527 (M⁺, 20), 484 (5), 467 (13), 424 (17), 276 (5), 263 (100), 205 (14), 191 (16).

12. [3α-²H]methyl-3β-acetoxy-21,22-dioxolup-18-en-28-oát (3a)

Diketon **3a** byl syntetizován oxidací ketonu **2a** (600 mg, 1 mmol) ve směsi dioxanu (2.4 ml), kyseliny octové (1.2 ml), acetanhydridu (120 μl) oxidem seleničitým (180 mg; 1.6 mmol). Reakční směs byla refluxována pod argonem 3 hodiny. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC (soustava A).

Zpracování bylo provedeno zředěním 10 ml ethyl-acetátu a filtrací přes sloupec silikagelu (5.00 g). Organické podíly byly promyty vodou do pH 7, sušeny síranem

hořečnatým a odpařeny na RVO. Surový produkt byl čištěn pomocí HPLC a lyofilizován z *t*-butanolu. Byl získán diketon **3a** (550 mg, 89 %) o t.t. 228 - 234 °C za rozkl. (lyofilizát *t*-BuOH); $[\alpha]_D -100^\circ$ (CHCl₃, c 0.7). IČ spektrum: 1255, 1711 b, 1735 sh, 1769. UV_{max}: 300 nm. ¹H NMR (400 MHz): 0.85 s, 3H; 0.86 s, 3H; 0.92 s, 3H; 0.97 s, 3H; 1.06 s, 3H; 1.26 d, 3H (J=7.0); 1.29 d, 3H (J=7.0); (7×CH₃); 2.05 s, 3H (OAc); 2.54 ddd, 1H (J=13.5, J'=4.4, J''=2.2, H-16β); 2.78 dd, 1H (J=12.7, J'=3.3, H-13β); 3.36 septet, 1H (J=7.0, H-20); 3.72 s, 3H (OCH₃). ¹³C NMR (400 MHz) viz str. 51 - 54. ²H NMR (400 MHz) 5.54 s, 1H (D-3α). MS-ESI, m/z (%): [C₃₃H₄₇DO₆, M⁺ 541], 541 (M⁺, 40).

13. [3α-³H]methyl-3β-hydroxy-21-oxolup-18-en-28-oát (1b)

Tritiovaný derivát **1b** byl získán redukcí ketonu **A3** modifikací postupu přípravy **1a**. Keton **A3** (10 mg, 15 μmol) byl rozpuštěn ve směsi THF (500 μl) a methanolu (100 μl). Roztok byl napipetován do vychlazené ampule s borotritidem sodným o celkové aktivitě 100 mCi (specifická aktivita 6,4 Ci/mmol), jež byla uzavřena ve vialce Supelco se šroubovacím uzávěrem a míchána na vibrační míchačce 3 hodiny. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC (soustava A, LSC).

Reakční směs byla zpracována následovně: do ampule byl přidán 1 ml vody, roztok byl okyselen kapkou 10% kyseliny sírové a extrahován ethyl-acetátem. Organické podíly byly promyty vodou a odpařeny na RVO. Surový produkt byl čištěn chromatograficky na preparativní TLC desce 10 × 20 cm (soustava A). Radiochemický výtěžek byl stanoven pomocí LSC (30 mCi, 30%). RP-HPLC: mobilní fáze acetonitril-voda (80%), t_r 15.0 min. ¹H NMR (BK 300 MHz): 0.77 s, 3H; 0.89 s, 3H; 0.94 s, 3H; 0.98 s, 3H; 1.03 s, 3H; 1.21 d, 3H (J=4.4); 1.22 d, 3H (J=4.0) (7×CH₃); 2.03 m, 1H (H-16α); 2.15 d, 1H (J=15, J'~1, H-22a); 2.45 m, 1H (H-16β); 2.50 d, 1H (J=15, H-22b); 2.65 dd, 1H (J=6.0, J'=15.0, H-13β); 3.20 septet, 1H (J=9.6, H-20); 3.70 s, 3H (OCH₃). ¹H NMR (BK 300 MHz): 4.47 m, 1T (T-3α). ¹³C NMR (BK 300 MHz) viz str. 51 - 54.

14. [3α-³H]methyl-3β-acetoxy-21-oxolup-18-en-28-oát (2b)

Ester **2b** byl syntetizován analogicky jako derivát **2a**. Do šroubovací mikro-vialky Kontes obsahující hydroxyderivát **1b** (10 mg; 2 μmol, 0.22 mCi) byla nepipetována směs pyridinu (40 μl) a acetanhydridu (30 μl). Směs byla míchána na vibrační míchačce přes noc. Průběh reakce byl monitorován TLC (soustava A, LSC).

Reakční směs byla zpracována přidáním 1 ml vody a extrakcí ethyl-acetátem.

Organické podíly byly spojeny, promyty vodou do pH 7 a odpařeny na RVO. Surový produkt byl čištěn chromatograficky na preparativní TLC desce 10 × 20 cm (soustava A). Radiochemický výtěžek byl stanoven pomocí LSC (30 mCi, 100 %). RP-HPLC: mobilní fáze methanol-voda (70%), t_r 11.3 min. ^1H NMR (BK 300 MHz): 0.84 s, 3H; 0.85 s, 3H; 0.91 s, 3H; 0.93 s, 3H; 1.03 s, 3H; 1.21 d, 6H ($J=4.4$); ($7\times\text{CH}_3$); 2.05 s, 3H (OAc); 2.13 d, 1H ($J=15.0$, H-22a); 2.46 d, 1H ($J=15.0$, H-22b); 2.48 ddd, 1H ($J=13.5$, $J'=3.9$, $J''=2.7$, H-16 β); 2.64 dd, 1H ($J=12.7$, $J'=3.2$, H-13 β); 3.20 septet, 1H ($J=7.0$, H-20); 3.70 s, 3H (OCH₃). ^{13}C NMR (BK 300 MHz) viz str. 51 - 54. ^3H NMR (BK 300 MHz): 4.47 s, 1T (T-3 α).

15. $[3\alpha\text{-}^3\text{H}]$ methyl-3 β -acetoxy-21, 22-dioxolup-18-en-28-oát (3b)

Diketon **3b** byl připraven oxidací derivátu **2b** oxidem seleničitým analogickým postupem jako derivát **3a**. Ester **2b** (10 mg, 30 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$) byl rozpuštěn ve směsi dioxanu (120 μl), kyseliny octové (60 μl) a acethydridu (8 μl). Do reakční směsi byl přidán oxid seleničitý (15 mg) a směs byla refluxována po dobu 3 hodin pod argonem. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (soustava A).

Zpracování bylo provedeno zředěním 2 ml ethylacetátu a filtrací přes malý sloupec silikagelu (500 mg). Organické podíly byly odpařeny a surový produkt byl čištěn chromatograficky na preparativní TLC desce 10 × 20 cm (soustava A). Radiochemická čistota a výtěžek byly stanoveny pomocí LSC (29 mCi, 96 %). RP-HPLC: mobilní fáze methanol-voda (60%), t_r 12.0 min. ^1H NMR (BK 300 MHz) spektrum: 0.85 s, 3H; 0.86 s, 3H; 0.92 s, 3H; 0.97 s, 3H; 1.06 s, 3H; 1.26 d, 3H ($J=4.4$); 1.29 d, 3H ($J=4.4$); ($7\times\text{CH}_3$); 2.05 s, 3H (OAc); 3.48 s, 3H (OCH₃). ^{13}C NMR (BK 300 MHz) viz str. 51 - 54. ^3H NMR (BK 300 MHz): 4.47 s, 1T (T-3 α).

16. $[29,29\text{-}^2\text{H}]$ benzyl-betulinát (4a)

Benzyl-ester **4a** byl připraven Wittigovou reakcí dle modifikovaného literárního postupu² z nor-ketonu **B2**. Nejprve byla připravena methyltrifenylfosfoniová sůl **B3** následujícím postupem: trifenylfosfin (4.00 g; 15 mmol) byl rozpuštěn v toluenu (4 ml) za chlazení cryocoolerem na -30 °C. Po té byl přidán perdeuteromethyljodid (2 ml; 21.0 mmol), směs byla ponechána volně za míchání až do zahřátí na r.t. a následně byla odsáta na fritě, promyta toluenem a sušena v exikátoru nad oxidem fosforečným přes noc.

Při přípravě esteru **4a** bylo postupováno takto: Všechny části aparatury byly sušeny

v sušárně při 110 °C. Samotná aparatura byla instalována těsně před samotnou reakcí. Do suché 100 ml baňky byla navážena fosfoniová sůl (4.00 g; 9.9 mmol), *t*-butoxid draselný (840 mg; 7.5 mmol) a byl nalit suchý THF (10 ml) ze smyčky. Baňka byla opatřena magnetickým míchadlem a uzavřena septem. Směs byla míchána při teplotě 85°C po dobu 30 minut. Do suché dvouhrdlé 100 ml baňky byl navážen ester **B2** (1.00 g, 2.0 mmol), jež byl rozpuštěn v suchém THF (10 ml). Vzniklý roztok **B2** byl injekční stříkačkou vpraven do baňky obsahující reakční směs s ylidem. Směs byla pod mírným průtokem argonu refluxována 12 hodin. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (soustava A).

Reakce byla po 12 hodinách ukončena přidáním ethanolu (10 ml) a rozpouštědla byla odpařena na RVO. Surový produkt byl rozpuštěn v ethyl-acetátu (10 ml) a nalit do děličky s dvojnásobným objemem vody. Organický podíl byl promyt vodou do pH 7, následně vysušen síranem hořečnatým a odpařen na RVO. Surový produkt byl čištěn chromatograficky na koloně přes sloupec silikagelu (60.00 g) v toluenu a dále lyofilizován z *t*-BuOH. Byl získán produkt **4a** (800 mg; 80 %) o t.t. 191 - 193 °C, $[\alpha]_D +12.7^\circ$ (CHCl₃, c 0.8). IČ spektrum: 1185, 1691, 2958, 3534. ¹H NMR (400 MHz): 0.75 s, 3H; 0.76 s, 3H; 0.79 s, 3H; 0.94 s, 3H; 0.96 s, 3H; 1.56 s, 3H; (6×CH₃); 2.18 td, 2H (J=2.4, J'=12.8, J''=20.8, H-12); 2.26 dd, 1H (J=3.2, J'=9.6, H-13β), 2.98 td, 1H (J=4.4, J'=10.8, J''=22, H-19); 3.16 m, 1H (H-3a); 5.07 dd, 2H (J=12.4, J'=23.2, Bn); 7.35 - 7.37 m, 5H (Ph). ¹³C NMR (400 MHz) viz 51 - 54. ²H NMR (400 MHz): 1.31 s, 2H (=CH₂). MS-EI, m/z (%): [C₃₇H₅₂D₂O₃, M⁺ 548], 548 (M⁺, 17), 458 (14), 440 (41), 413 (22), 328 (13), 250 (28), 237 (20), 220 (49), 191 (41).

17. [29-¹⁴C]benzyl-betulinát (**4b**)

Ampule obsahující roztok [¹⁴C]methyljodidu v toluenu (o specifické aktivitě 2.16 GBq/mmol) byla vychlazená v acetonové lázni na teplotu -30 °C cryocoolerem. Trifenylofosfin (2.4 mg; 6 μmol) byl rozpuštěn v toluenu (250 μl) za chlazení cryocoolerem na -30 °C v mikrovialce. Po té byl přidán vychlazený roztok methyljodidu z ampule (700 μl; 2.16 GBq/mmol), směs byla ponechána volně za míchání až do zahřátí na r.t. Přebytková rozpouštědla byla oddestilována na RVO.

K takto připravené fosfoniové soli byl přidán THF (250 μl) a *t*-BuOK (8.4 mg; 75 μmol). Směs byla míchána při teplotě 85 °C. Postranním septem byl přidán homogenní roztok benzyl-esteru **B2** (10 mg; 21 μmol) v THF (250 μl) a reakční směs byla pod

mírným průtokem argonu refluxována 12 hodin. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (soustava A, autoradiograficky). Reakce byla ukončena přidavkem ethanolu (100 μ l) a rozpouštědla byla odpařena na RVO. Surový produkt byl rozpuštěn v ethylacetátu (250 μ l) a smíšen v téže vialce s dvojnásobným objemem vody. Organický podíl byl promyt vodou dvakrát a odpařen na RVO. Surový produkt byl čištěn chromatograficky na preparativní desce 10 \times 20 cm (soustava A). Byl získán produkt **4b** (4 MBq; 10 %). ^1H NMR (BK 300 MHz): 0.75 s, 3H; 0.76 s, 3H; 0.79 s, 3H; 0.94 s, 3H; 0.96 s, 3H; 1.56 s, 3H; (6 \times CH₃); 2.18 td, 2H (J=2.4, J'=12.8, J''=20.8, H-12); 2.26 dd, 1H (J=3.2, J'=9.6, H-13 β), 2.98 td, 1H (J=4.4, J'=10.8, J''=22, H-19); 3.16 m, 1H (H-3a); 5.07 dd, 2H (J=12.4, J'=23.2, Bn); 7.35 - 7.37 m, 5H (Ph). ^{13}C NMR (BK 300 MHz) viz 51 - 54.

18. [29,29- ^2H]betulinová kyselina (**5**)

Kyselina **5** byla připravena debenzylací esteru **4** za atmosférického tlaku vodíkem. Ester **4** (700 mg; 13 mmol) byl rozpuštěn v THF (5 ml) ze smyčky v baňce se septem s přidavkem katalyzátoru 5% Pd/C (80 mg). Baňka byla poté mírně evakuována a z balónku přes septum byl přiveden vodík. Reakční směs byla ponechána za r.t. a prudkého míchání 3 hodiny. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC (soustava A).

Reakční směs byla zpracována postupem D. Surový produkt byl krystalizován z IPO. Byla získána kyselina **5** (500 mg; 85 %) ve formě bílých jehliček o t.t. 297 - 299 $^{\circ}\text{C}$ (IPO), $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ 8 $^{\circ}$ (MeOH, c 0.72). IČ spektrum: 1234, 1449, 1682, 2942, 3245. ^1H NMR (400 MHz): 0.75 s, 3H; 0.82 s, 3H; 0.94 s, 3H; 0.96 s, 3H; 0.97 s, 3H; 1.19 s, 3H; 1.20 s, 3H; (7 \times CH₃); 1.66 m, 1H (H-13 β); 1.93 td, 1H (J=2.8, J'=5.2, J''=14.4, H-18); 2.19 td, 1H (J=3.6, J'=12.4, J''=22, H-12); 2.98 td, 1H (J=4.8, J'=10.8, J''=16.8, H-19 α); 3.15 dd, 1H (J=6, J'=9.6, H-3 α). ^{13}C NMR (400 MHz) viz 51 - 54. ^2H NMR (400 MHz): 4.58 d, 1H (J=6.0, ^2H -29b); 4.72 d, 1H (J=6.0, ^2H -29a). MS-EI, m/z (%): [C₃₀H₄₆D₂O₃, M⁺ 458], 458 (M⁺, 16), 441 (11), 425 (5), 413 (7), 397 (9), 249 (30), 234 (16), 220 (35), 207 (85), 189 (87).

19. [29,29- ^2H]30-oxo-lup-20(29)-en-28-ová kyselina (**6**)

Aldehyd **6** byl připraven allylovou oxidací kyseliny **5** oxidem seleničitým modifikací postupu^{11,35}. Kyselina **5** (200 mg; 437 μ mol) byla rozpuštěna v 2-methoxyethanolu s přidavkem oxidu seleničitého (80 mg; 720 μ mol) a refluxována po dobu 3 hodin. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC (soustava C).

Reakční směs byla za horka zfiltrována přes skládaný filtr a ponechána krystalizovat do druhého dne. Vzniklé žluté krystalky **6** byly odsáty a promyty. Byl získán aldehyd **6** (160 mg; 77 %) o t.t. 44 - 45 °C a rozkl. (2-methoxyethanol), $[\alpha]_D^{20}$ (CHCl₃, c 0.7). IČ spektrum: 1224, 1685, 2942. ¹H NMR (400 MHz): 0.69 s, 3H; 0.77 s, 3H; 0.88 s, 3H; 0.90 s, 3H; 1.32 s, 3H; (5×CH₃); 2.01 m, 1H (H-16a); 2.16 m, 2H (H-22); 3.08 t, 1H (J=8, H-3α); 3.26 sp, 5.91 s, 1H; 6.28 s, 1H, 9.45 s, 1H (COOH). ¹³C NMR (400 MHz) viz 51 - 54. ²H NMR (400 MHz): 4.08 s, 2H (D-29). MS-EI, m/z (%): [C₃₀H₄₄D₂O₄, M⁺ 472], 472 (M⁺, 46), 452 (64), 437 (30), 425 (36), 409 (42), 391 (6), 273 (10), 260 (8), 248 (25), 233 (55), 217 (13), 207 (69), 189 (100), 175 (12).

20. [31-²H]Benzyl-2-methoxy-3-oxolupa-1,20(29)-dien-28-oát (7)

Diosfenol **C2** (1.00 g; 1.7 μmol) byl rozpuštěn ve směsi dioxanu (4 ml) s vodou (2 ml) a s přidavkem hydroxidu draselného (500 mg; 9 mmol) a zahřát na 100 °C. Následně byl do reakční směsi přidán perdeuteromethyljodid (600 μl; 6.3 μmol) a zahříván 1 hodinu na 100 °C. Průběh reakce byl sledován pomocí skleněných TLC (soustava A).

Reakční směs byla zpracována nalitím do dvojnásobného objemu vody a extrahována etherem. Spojené organické podíly byly promyty vodou do pH 7 a odpařeny na RVO. Surový produkt byl čištěn chromatograficky na sloupci silikagelu (50.00 g) v toluenu. Byl získán methyl-ether **7** (603 mg; 60 %) o t.t. 109 - 112 °C a rozkl. (ether), $[\alpha]_D^{20}$ +37° (CHCl₃, c 0.71). IČ spektrum: 1724, 1130, 2945, 1683, 1150. ¹H NMR (400 MHz): 0.82 s, 3H; 0.97 s, 3H; 1.05 s, 3H, 1.11 s, 3H; 1.19 s, 3H, (5xCH₃); 1.69 s, 3H (H-30); 1.91 td, 1H (J=2.0, J'=6.8, J''=15.2); 2.26 dt, 1H (J=4.0, J'=12.8, J''=24.4); 3.01 td, 1H (J=4.4, J'=10.8, H-19β, H-18α); 4.62 d, 1H (J=1.6, H-29b); 4.6 d, 1H (J=1.6, H-29a); 5.1 d, 1H (J=12.4); 5.18 d, 1H (J=12.4); 6.03 s, 1H (H-1); 7.33-7.37 m, 5H (Bn). ¹³C NMR (400 MHz) viz 51 - 54. ²H NMR (400 MHz): 3.53 s, 3D (OCD₃). MS-EI, m/z (%): [C₃₈H₄₉D₃O₄, M⁺ 575], 575 (M⁺, 28), 560 (3), 484 (12), 449 (5), 438 (13), 421 (5), 313 (6), 269 (6), 239 (8), 182 (20).

21. [31-²H]-2-methoxy-3-oxolupan-28-ová kyselina (8)

Kyselina **8** byla připravena hydrogenací nenasyceného etheru **7** v ocelovém autoklávu. Diosfenol **7** (500 mg, 8.6 μmol) byl rozpuštěn ve směsi THF (1 ml) a bezvodý ethanol (1 ml) s přidavkem 5% katalyzátoru Pd/C (50 mg). Reakční směs byla míchána za r.t. v autoklávu, který byl nejprve evakuován a následně přeplněn vodíkem. Reakční

směs byla ponechána míchat za přetlaku vodíku 800 kPa do druhého dne. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (soustava A).

Zpracování reakční směsi bylo provedeno dle postupu D. Surový produkt byl čištěn chromatograficky pomocí RP-HPLC (MeOH : voda 8:2 (obj.)). Byla získána chromatograficky jednotná frakce **8** (300 mg; 70 %) o t.t. 221 - 226 °C (CHCl₃); [α]_D + 68° (CHCl₃, c 0.72). IČ spektrum: 3513, 1721, 1696, 1645. ¹H NMR (400 MHz): 0.82 s, 3H; 0.97 s, 3H; 1.05 s, 3H, 1.11 s, 3H; 1.19 s, 3H, (5×CH₃); 1.69 s, 3H (H-30); 1.91 td, 1H (J=2.0, J'=6.8, J''=15.2); 2.26 dt, 1H (J=4.0, J'=12.8, J''=24.4); 3.01 td, 1H (J=4.4, J'=10.8, H-19 β , H-18 α); 4.62 d, 1H (J=1.6, H-29b); 4.6 d, 1H (J=1.6, H-29a). ¹³C NMR (400 MHz) viz 51 - 54. ²H NMR (400 MHz): 3.53 s, 3H (OCD₃). MS-EI, m/z (%): [C₃₁H₄₇D₃O₄, M⁺ 489], 489 (M⁺, 20), 475 (42), 455 (16), 441 (25), 427 (22), 396 (18), 355 (20), 269 (10), 259 (25), 248 (44), 213 (23), 203 (30), 189 (40).

22. [¹⁵N]pyrazinový derivát **9a**

[¹⁵N]ethylendiamin dihydrochlorid (125 mg; 940 μ mol) byl rozpuštěn za varu v Mf (1.6 ml) s přidavkem hydroxidu draselného (50 mg; 892 μ mol). Následně byla do reakční směsi přidána kyselina **D1** (200 mg; 440 μ mol) a směs byla refluxována při 110 °C po dobu 30 minut. Poté byla do reakční směsi přidána síra (140 mg; 4.4 mmol) a směs byla refluxována 2 hodiny. Reakce byla sledována pomocí TLC (soustava B).

Zpracování reakční směsi bylo provedeno dle postupu E. Surový produkt byl krystalizován ze směsi CHCl₃/MeOH. Byl získán pyrazin **9a** (173 mg; 80 %) ve formě bílých krystalků o t.t. 240 - 243 °C (CHCl₃/MeOH); [α]_D +27° (CHCl₃, c 0.8). IČ spektrum: 1118, 1398, 1697, 2949. ¹H NMR (400 MHz): 0.81 s, 3H; 1.02 s, 3H; 1.03 s, 3H, 1.27 s, 3H; 1.31 s, 3H, (5×CH₃); 1.72 s, 3H (H-30); 2.23-2.35 m, 2H; 2.45 d, 1H (J=16, H-1a); 3.04 td, 1H (J=4.4, J'=10.4, J''=21.6, H-19 β); 3.07 d, 1H (J=16.8); 4.64 s, 1H (H-29b); 4.76 s, 1H (H-29b); 8.29 dd, 1H (J=1.6, J'=10; H-pyrazin); 8.45 d, 1H (J=10.8, H-pyrazin). ¹³C NMR (400 MHz) viz 51 - 54. ¹⁵N NMR (400 MHz): 209.47 s, 1N (¹⁵N-pyrazin); 216.79 s, 1N (¹⁵N-pyrazin). MS-EI, m/z (%): [C₃₂H₄₆¹⁵N₂O₂, M⁺ 492], 492 (M⁺, 35), 477 (100), 448 (20), 443 (25), 379 (6), 365 (5), 258 (35), 245 (30), 203 (5), 189 (12).

23. [¹⁵N]pyrazinový derivát **10a**

[¹⁵N]ethylendiamin dihydrochlorid (120 mg; 902 μ mol) byl rozpuštěn za varu v Mf

(1.6 ml) s přídatkem hydroxidu draselného (50 mg; 892 μmol). Následně byla do reakční směsi přidána kyselina **D2** (180 mg; 395 μmol) a směs byla refluxována při 110 °C po dobu 30 minut. Poté byla do reakční směsi přidána síra (125 mg; 3.9 mmol) a směs byla refluxována 2 hodiny. Reakce byla sledována pomocí TLC (soustava B).

Zpracování reakční směsi bylo provedeno dle postupu E. Surový produkt byl krystalizován ze směsi $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$. Byl získán produkt **10a** (155 mg; 80 %) ve formě bílých krystalků o t.t. 266 - 268 °C ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$); $[\alpha]_{\text{D}}$ -8° (CHCl_3 , c 0.75). IČ spektrum: 2953, 1695, 1397, 1234. ^1H NMR (400 MHz): 0.77 d, 3H (J=6.8); 0.82 s, 3H; 0.87 d, 3H (J=6.8); 1.02 m, 6H; 1.26 d, 3H (J=5.2); 1.30 s, 3H, (7 \times CH₃); 2.27 m, 3H (H-19); 2.45 d, 1H (J=16.8, H-1a); 3.04 dd, 1H (J=1.6, J'=16.8, H-1a); 8.27 bd, 1H (J=1.2, H-pyrazin); 8.41 dd, 1H (J=0.8, J'=10.8, H-pyrazin). ^{13}C NMR (400 MHz) viz 51 - 54. ^{15}N NMR (400 MHz): 210.44 s, 1N (^{15}N -31); 212.21 s, 1N (^{15}N -34). MS-EI, m/z (%): [$\text{C}_{32}\text{H}_{48}^{15}\text{N}_2\text{O}_2$, M⁺ 494], 494 (M⁺, 38), 479 (75), 450 (15), 435 (42), 405 (6), 259 (18), 243 (21), 205 (5), 189 (17), 177 (20), 161 (25).

24. Benzyl-3 β ,28-diacetoxy-18-oxo-19,20,21,29,30-pentanorlup-12-en-22-oát (**11**)

Směs benzyl-esteru **60** (500 mg; 842 μmol) a oxidu seleničitého (600 mg; 5.4 mmol) v dioxanu (18 ml), kyselině octové (6.5 ml) byla zahřívána na teplotu 100 °C za míchání. Průběh reakce byl sledován pomocí skleněné TLC desky (soustava A). Po 30 hodinách byl v reakční směsi nadále přítomen výchozí benzyl-ester **69**, proto byl přidán oxid seleničitý (200 mg; 1.8 mmol) a směs byla dále zahřívána za míchání.

Reakční směs byla po 40 hodinách ochlazená a vyloučený selen byl odstraněn filtrací přes sloupec silikagelu (10.00 g) v toluenu a filtrát byl odpařen na RVO. Surový produkt byl čištěn chromatograficky pomocí HPLC (EtOAc : hexan – 5:1). Byl získán chromatograficky jednotný ester **11** (223 mg; 45 %) o t.t. 220 - 229 °C a rozkl. (lyofilizát z *t*-BuOH); $[\alpha]_{\text{D}}$ $+70^\circ$ (CHCl_3 , c 0.71). IČ spektrum: 1742, 1249, 1030, 2944. ^1H NMR (300 MHz): 0.87 s, 3H; 0.88 s, 3H; 0.95 s, 3H, 0.98 s, 3H, 1.14 s, 3H, (5 \times CH₃); 1.99 s, 3H, 2.05, 3H (2 \times OAc); 2.44 m, 1H (H-16); 4.39 d, 1H (J=0.6, H-28a); 4.42 d, 1H (J=0.6, H-28b); 4.49 s, 1H (H-3 α); 5.21 s, 2H (H-Bn); 6.72 dd, 1H (J=4.2, J'=8.1; H-12); 7.32 m, 5H (Ph). ^{13}C NMR (300 MHz) viz 51 - 54. MS-EI, m/z (%): [$\text{C}_{36}\text{H}_{48}\text{O}_7$, M⁺ 592], 592 (M⁺, 10), 532 (11), 489 (5), 441 (6), 343 (30), 301 (5), 239 (20), 190 (30), 175 (22), 149 (20).

25. [12,13-²H]-methyl-3 β ,28-diacetoxy-18-oxo-19,20,21,29,30-pentanorlup-22-oát (12)

Benzyl-ester **11** (100 mg, 169 μ mol) byl rozpuštěn ve směsi THF (2.5 ml), absolutním EtOH (2.5 ml) a kyseliny octové (50 μ l) s přidavkem PtO₂.2H₂O (10 mg). Reakční směs byla prudce míchána v baňce uzavřená septem za r.t. Směs byla nejprve mírně evakuována a následně bylo přes hydrogenační aparaturu s balónkem zavedeno plynné deuterium z tlakové láhve. Průběh reakce byl monitorován pomocí skleněných TLC (soustava A)

Reakční směs byla zpracována postupem F. Filtrát byl odpařen na RVO a surový produkt byl rozpuštěn v etheru a methylován dle obecného návodu. Surový produkt byl čištěn chromatograficky pomocí HPLC (mobilní fáze EtOAc : hexan 9:1) a získaný jednotný podíl **12** byl lyofilizován z *t*-BuOH. Byl získán ester **12** (75 mg; 88 %). o t.t. 240 - 243 °C (lyofilizát z *t*-BuOH); $[\alpha]_D^{+27}$ (CHCl₃, c 0.7). IČ spektrum: 1027, 1248, 1729, 2943. ¹H NMR (400 MHz): 0.78 s, 3H; 0.84 s, 3H; 1.11 s, 3H, 1.24 s, 3H, 1.28 s, 3H, (5 \times CH₃); 1.38 s, 3H, 2.04, 3H (2 \times OAc); 2.44 m, 1H (H-16); 3.35 s, 3H (OCH₃); 4.37 t, 1H (J=0.6, H-28a); 4.42 d, 1H (J=0.6, H-28b); 4.43 s, 1H (H-3 α). ¹³C NMR (400 MHz) viz 51 - 54. ²H NMR (400 MHz): 2.28 s, 1H (D-13). MS-ESI, m/z (%): [C₃₆H₄₈D₂O₇, M⁺ 518], 582 (M⁺+Na⁺+MeCN, 50)

26. [20,29-²H]dihydrobetulin-dipropionát (13)

Betulin-dipropionát **6I** (100 mg, 190 μ mol) byl rozpuštěn ve směsi THF (2.5 ml) a kyseliny octové (100 μ l) s přidavkem katalyzátoru PtO₂.2H₂O (10 mg). Reakční směs byla prudce míchána v baňce uzavřená septem za r.t. Směs byla nejprve mírně evakuována a následně bylo přes hydrogenační aparaturu s balónkem zavedeno plynné deuterium z tlakové láhve. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC impregnovaných dusičnanem stříbrným (10% AgNO₃; soustava D).

Reakční směs byla zpracována postupem F. Filtrát byl odpařen na RVO a surový produkt byl lyofilizován z *t*-BuOH. Byl získán dipropionát **13** (95 mg; 94%) o t.t. 250 - 253 °C (lyofilizát z *t*-BuOH); $[\alpha]_D^{+30}$ (CHCl₃, c 0.71). IČ spektrum: 1118, 1398, 1697, 2949. ¹H NMR (400 MHz): 0.76 s, 3H; 0.84 t, 3H (J=5.6); 0.95 s, 3H, 1.04 s, 3H, 1.15 dt, 15H (J=0.8, J'=7.6), (9 \times CH₃); 2.33 m, 3H (2 \times OPr); 3.81 d, 1H (J=11.2, H-28a); 4.26 d, 1H (J=10.8, H-28b) 4.48 m, 1H (H-3 α). ¹³C NMR (400 MHz) viz 51 - 54. ²H NMR (400 MHz): 1.75 s, 1H (D-29), 3.40 s, 1H (D-20). MS-ESI, m/z (%): [C₃₆H₆₂D₂O₂,

M^+ 530], 552 ($[M^+Na]$, 25), 530 (M^+ , 10).

27. [20,29-²H]dihydrolupeol-acetát (14)

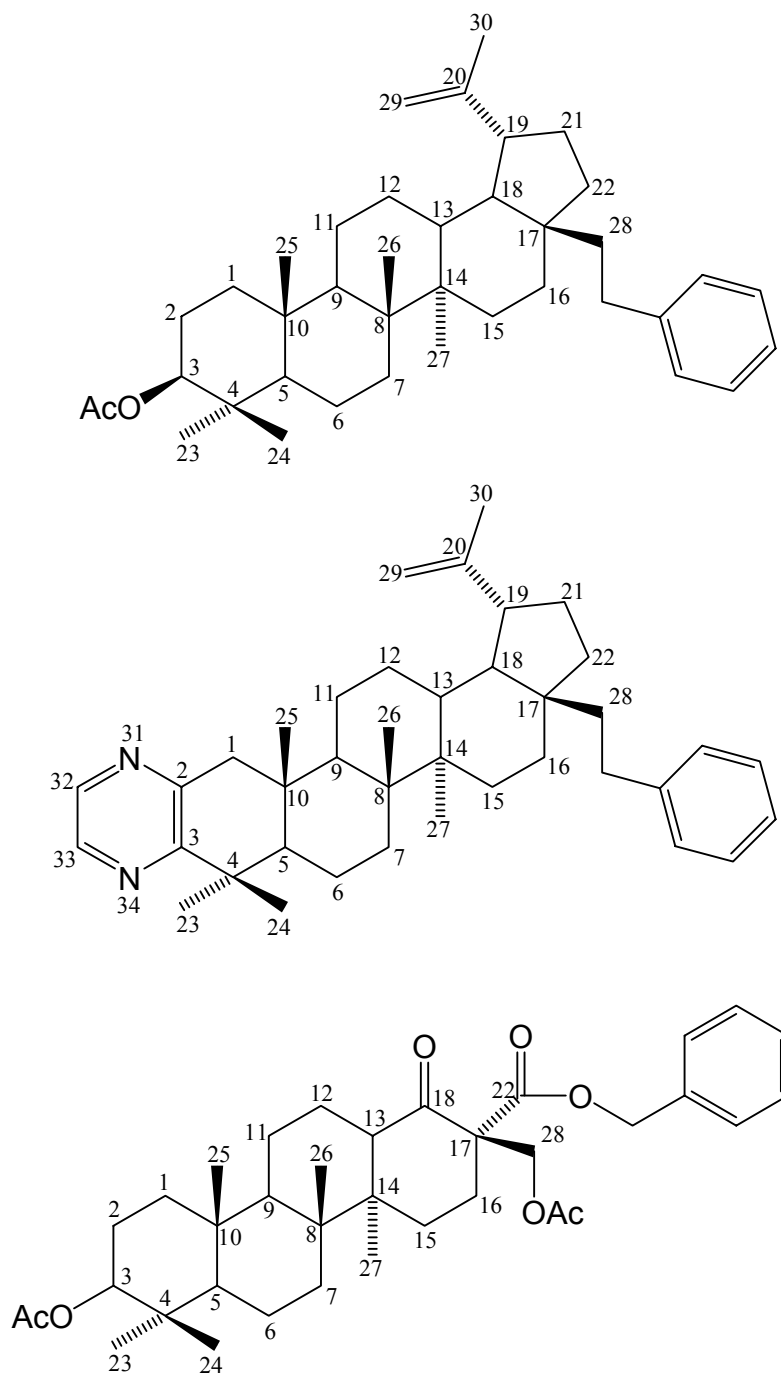
Lupeol-acetát **62** (500 mg, 1.2 mmol) byl rozpuštěn ve směsi THF (5 ml) a kyseliny octové (100 μ l) s přidavkem katalyzátoru $PtO_2 \cdot 2H_2O$ (50 mg). Reakční směs byla prudce míchána v baňce uzavřená septem za r.t. Směs byla nejprve mírně evakuována a následně bylo přes hydrogenační aparaturu s balónkem zavedeno plynné deuterium z tlakové láhve. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC impregnovaných dusičnanem stříbrným (10% $AgNO_3$; soustava D).

Reakční směs byla zpracována postupem F. Filtrát byl odpařen na RVO a surový produkt byl lyofilizován z *t*-BuOH. Byl získán acetát **14** (470 mg; 93%) o t.t. 240 - 243 °C; $[\alpha]_D +23^\circ$ ($CHCl_3$, c 0.7). IČ spektrum: 1731, 2941, 1253, 1365. ¹H NMR (400 MHz): 0.75 s, 3H; 0.83 s, 3H; 0.84 s, 3H; 0.85 s, 3H; 0.87 s, 3H; 0.92 s, 3H; 1.04 s, 3H, (7 \times CH₃); 2.05 s, 3H (OAc); 4.47 m, 1H (H-3 α). ¹³C NMR (400 MHz) viz 51 - 54. ²H NMR (400 MHz): 1.78 s, 1H (D-29), 3.42 s, 1H (D-20). MS-EI, m/z (%): [$C_{32}H_{52}D_2O_2$, M^+ 472], 494 ($[M^+Na]$, 94), 459 (30), 430 (27), 413 (35).

5.3 Tabulky ^{13}C NMR spekter

Přiřazení signálů ^{13}C NMR spekter bylo provedeno na základě DEPT spekter a podle analogií (pouze u sloučeniny **4b** bylo přiřazeno na základě APT spekter). Signály označené stejnými písmeny mohou být zaměněny. Vzhledem k malému množství látky a relativně krátké době měření radioaktivních preparátů nebyly některé signály ve spektrech pozorovány.

Uhlíkové a dusíkové atomy v NMR spektrech byly číslovány takto:



Obrázek 1: Číslování atomů uhlíku a dusíku

Atom C	1a	1b	2a	2b	3a	3b
1	38.88	38.90	38.55	38.60	38.56	38.55
2	27.21	27.41	23.51	23.63	23.48	23.47
3	78.95	78.90	79.99	80.70	80.18	80.19
4	38.75	37.30	37.68	37.80	37.69	37.66
5	55.35	55.41	55.42	55.52	55.39	55.37
6	18.23	18.30	18.16	18.10	18.90	18.91
7	34.89	34.90	34.81	34.83	34.57	34.55
8	41.26	41.30	41.27	41.30	41.55	41.57
9	51.12	51.20	51.01	51.00	50.88	50.88
10	37.21	33.12	37.13	37.10	37.16	37.17
11	21.19	21.20	21.21	21.20	20.03	20.04
12	27.67	27.70	27.62	27.90	27.86 ^a	27.85 ^a
13	45.20	45.23	45.15	45.22	46.13	46.13
14	45.17	45.20	45.15	45.20	45.53	45.54
15	29.12	29.20	29.10	29.72	29.69 ^a	29.68 ^a
16	33.69	33.70	33.67	33.70	27.44 ^a	27.42 ^a
17	53.05	53.10	53.04	53.12	58.45	58.48
18	171.71 ^a	171.70 ^a	171.55 ^a	171.92 ^a	168.15 ^b	168.15 ^b
19	145.67	145.74	145.72	145.71	150.66	150.68
20	25.09	25.10	25.90	25.10	25.90	25.92
21	207.14	207.10	207.11	207.12	189.26 ^c	189.25 ^c
22	47.62	47.70	47.61	47.65	194.27 ^c	194.26 ^c
23	27.09	28.02	27.86	29.11	27.95	27.96
24	15.36	15.41	16.49	16.54	16.50	16.51
25	16.66 ^b	16.70 ^b	16.64 ^b	16.66 ^b	16.68 ^d	16.69 ^d
26	16.73 ^b	16.80 ^b	16.79 ^b	16.81 ^b	16.81 ^d	16.82 ^d
27	15.94	16.01	15.89	15.98	16.10	16.11
28	174.90 ^a	174.90 ^a	174.91 ^a	174.98 ^a	170.98 ^b	170.97 ^b
29	19.99	20.01	19.92	20.00	19.74	19.75
30	20.12	20.21	20.12	20.11	19.82	19.83
3: AcO: CH ₃	-	-	21.28	21.32	21.30	21.31
3: AcO: C=O	-	-	170.97	171.62	170.91	170.92
28: OCH ₃	52.45	52.50	52.44	52.43	53.37	53.38

Atom C	4a	4b	5	6	7	8
1	38.72	38.72	38.64	38.39	49.87	49.88
2	27.41	27.42	27.77	27.37	76.68	78.08
3	78.98	78.99	78.75	78.24	200.07	216.62
4	38.85	38.86	38.69	38.42	45.90	46.48
5	55.35	nenalezen	55.25	55.34	63.14	51.98
6	18.27	18.28	18.17	18.18	20.80	19.88
7	34.32	34.33	34.22	33.93	32.05	32.86
8	40.65	40.66	40.56	40.21	44.44	40.52
9	50.57	50.55	50.54	50.00	49.36	50.03
10	37.18	37.17	37.05	37.79	36.90	37.15
11	20.84	20.85	20.77	20.77	19.09	22.01
12	25.54	25.55	25.42	25.62	25.62	25.53
13	38.20	38.21	38.19	38.20	38.35	38.66
14	42.39	42.40	42.47	41.93	42.69	42.45
15	29.57	29.58	29.55	29.19	29.44	29.64
16	32.12	32.13	32.15	31.65	30.55	32.01
17	56.55	56.56	56.10	55.90	56.49	56.34
18	49.44	49.45	49.29	49.09	49.34	49.13
19	46.87	46.88	46.85	47.38	46.87	46.81
20	150.05	nenalezen	150.61	150.50	150.51	150.19
21	30.57	30.58	30.47	31.60	33.74	30.53
22	36.93	36.94	37.01	36.55	36.90	37.16
23	14.67	14.68	14.51	14.87	19.39	18.51
24	27.97	27.98	26.94	26.95	28.34	29.22
25	16.11 ^a	16.11 ^a	15.95	15.54	21.44	19.20
26	15.83 ^a	15.83 ^a	15.76	15.40	16.15	15.32
27	15.33	15.34	15.19	15.39	14.54	14.51
28	175.79	nenalezen	179.09	178.40	175.72	182.05
29	109.81	109.80	109.34	109.35	20.82	19.40
30	19.47	nenalezen	19.45	195.33	109.67	109.79
2: OCH ₃	-	-	-	-	57.48	57.51
28: CH ₂ Bn	65.71	nenalezen	-	-	65.78	-
28: CH ₂ Bn	136.49	137.10	-	-	136.45	-
28: Ph	128.47	128.70	-	-	128.28	-
	128.22	128.60	-	-	128.01	-
	128.04	128.30	-	-	126.71	-
	128.21	128.60	-	-	128.09	-
	128.48	128.70	-	-	128.50	-
30: C=O	-	-	-	-	-	-

Atom C	9a	10a	11	12	13	14
1	49.13	47.57	38.59	38.61	37.87	38.31
2	151.42 ^a	150.70	23.68	23.60	27.72	27.56
3	161.10	159.71	80.74	80.63	80.61	81.09
4	39.45	39.51	37.95	38.34	38.35	40.33
5	53.97	52.99	55.67	55.42	55.32	55.28
6	20.39	20.05	18.30	18.12	18.15	18.15
7	33.09	33.41	33.66	33.58	34.18	34.23
8	40.55	40.56	38.99	38.91	40.92	40.82
9	47.86	48.69	47.16	47.13	49.94	49.77
10	37.74	36.76	37.09	37.70	37.11	37.73
11	21.01	21.43	24.62	24.05	23.69	20.82
12	24.94	26.88	135.89	25.51	28.06	26.69
13	38.00	38.34	140.97	44.47	37.02	36.96
14	41.54	42.65	44.19	45.17	42.85	42.97
15	30.65	29.72 ^a	25.66	29.19	28.07	27.27
16	32.43	32.02	24.40	24.53	29.87	23.62
17	57.36	56.84	59.31	55.45	46.56	47.54
18	49.20	48.52	197.03	197.01	48.12	49.56
19	47.86	44.15	-	-	44.01	49.34
20	151.22 ^a	29.67 ^a	-	-	29.42	29.50
21	30.69	22.76	-	-	29.87	29.45
22	37.75	37.40	171.19	170.98	34.66	35.45
23	22.39	23.97	28.24	28.58	27.94	27.89
24	31.58	31.46	16.95	16.70	14.76	15.91
25	17.11 ^b	16.07	17.19	17.24	16.53	16.04 ^a
26	16.63 ^b	15.70	24.84	28.18	22.88	16.43 ^a
27	15.63	14.68	16.22	19.91	14.61	14.32
28	182.25	181.68	64.52	64.50	62.58	22.79
29	20.39	14.58 ^b	-	-	14.87	14.96 ^b
30	110.76	23.00 ^b	-	-	-	17.98 ^b
32	141.64 ^c	141.34 ^c	-	-	-	-
33	143.40 ^c	142.32 ^c	-	-	-	-
28: AcO: <u>C</u> H ₃	-	-	21.52	21.53	-	21.24
28: AcO: <u>C</u> =O	-	-	171.19	171.20	-	171.21
28: COOCH ₃	-	-	-	53.45	-	-
28:PrO: CH ₃ CH ₂ CH ₂ O	-	-	-	-	9.24	-
28:PrO: <u>C</u> H ₃ CH ₂ CH ₂ O	-	-	-	-	26.79	-
28:PrO: CH ₃ CH ₂ CH ₂ O	-	-	-	-	76.08	-
28: <u>C</u> H ₂ Bn	-	-	67.31	-	-	-
28: CH ₂ Bn	-	-	138.27	-	-	-
28: Ph	-	-	128.75	-	-	-
	-	-	128.41	-	-	-
	-	-	128.15	-	-	-
	-	-	128.41	-	-	-
	-	-	128.75	-	-	-
3: AcO: <u>C</u> H ₃	-	-	21.02	21.03	-	-
3: AcO: <u>C</u> =O	-	-	171.19	171.20	-	-
3:PrO: CH ₃ CH ₂ CH ₂ O	-	-	-	-	9.32	-
3:PrO: <u>C</u> H ₃ CH ₂ CH ₂ O	-	-	-	-	26.93	-
3:PrO: CH ₃ CH ₂ CH ₂ O	-	-	-	-	76.68	-

6 Závěr

1. Byla provedena literární rešerše přípravy selektivně značených triterpenoidů izotopy H a C.
2. Byly připraveny výchozí sloučeniny **A1 - A3**, **B1**, **B2**, **C1**, **C2**, **D1**, **D2** a **11** pro syntézu značených derivátů.
3. Byly připraveny sloučeniny **1a**, **1b**, **2a**, **2b**, **3a**, **3b** značené deuteriem a tritiem v poloze 3 α -terpenického skeletu a byla změřena a interpretována jejich veškerá spektrální data včetně ^2H a ^3H NMR spekter.
4. Byly připraveny deuterované sloučeniny **4a**, **5** a **6** a byla změřena a interpretována jejich veškerá spektrální data včetně ^2H NMR spektra.
5. Byl učiněn pokus o syntézu ^{14}C značené sloučeniny **4b**.
6. Byly připraveny značené methoxyderiváty **7** a **8** a byla změřena a interpretována jejich veškerá spektrální data včetně ^2H NMR spektra.
7. Jako jedinečná skupina látek byly připraveny ^{15}N značené pyrazinové deriváty **9a**, **10a**. Byla změřena a interpretována jejich veškerá spektrální data včetně ^{15}N NMR spekter.
8. Katalytickou deuterací byly připraveny sloučeniny **12 - 14** a byla změřena a interpretována jejich veškerá spektrální data včetně ^2H NMR spektra.
9. Sloučeniny **B2**, **7**, **8** a **11** byly dodány na pracoviště LEM, FN Olomouc k dalšímu testování.
10. Celkově bylo připraveno 18 selektivně značených sloučenin, z toho 11 bylo selektivně označeno deuteriem (**1a**, **2a**, **3a**, **4a**, **5 - 8**, **12 - 14**), 3 byly označeny ^3H (**1b**, **2b**, **3b**) o celkové aktivitě 0.22 mCi; 2 byly označeny ^{15}N (**9a**, **10a**) a jedna byla označena ^{14}C (**4b**) o celkové aktivitě 0.11 mCi (4 MBq).

7 Seznam použité literatury

1. Džubák P., Hajduch M., Vydra D., Húšťová A., Kvasnica M., Biedermann D., Marková L., Urban M., Šarek J.: *Nat. Prod. Rep.* **23**, 394 (2006).
2. Tietze L. F., Heinzen H., Moyna P., Rischer M., Neunaber H.: *Liebigs Ann. Chem.* 1245, (1991).
3. Pisha E., Chai H., Lee I. S., Chagwedera T. E., Farnsworth N. R., Cordell G. A., Beecher C. W. W., Fong H. H. S., Kinghorn A. D., Brown D. M., Wani M. C., Wall M. E., Hieken T. J., Dasgupta T. K., Pezzuto J. M.: *Nat. Med.* **1**, 1046 (1995).
4. Fulda S., Jeremias I., Pietsch T. Debatin K. M.: *Int. J. Cancer* **82**, 435 (1999).
5. Pezzuto J. N., Kosmeder J. W., Xu Ze-Qi, Zhou N. E., Goldsmith M. E. : US 2007072835, 29th March 2007.
6. Hajduch M., Sarek J.: Triterpenoid derivates. PCT Int. Patent Appl. WO0190136, 23 May 2001.
7. Hajduch M., Sarek J.: Triterpenoid derivates. PCT Int. Patent Appl. WO0190046, 23 May 2001.
8. Hajduch M., Sarek J.: Triterpenoid derivates. PCT Int. Patent Appl. WO0190096, 23 May 2001.
9. Hajduch M., Džubák P., Šarek J.: *Klin. Farmakol. Farm.* **18**, 14 (2004).
10. Urban M., Klinot J., Tislerova I., Biedermann D., Hajduch M., Cisarova I., Sarek J.: *Synthesis* **2006**, 3979 (2006).
11. Urban M.: Dizertační práce. Univerzita Karlova v Praze, Praha 2005.
12. Urban M., Sarek J., Kvasnica M., Tislerova I., Hajduch M.: *J. Nat. Prod.* **70**, 526 (2007).
13. L'Aannunziata M. F. . *Handbook of Radioactivity Analysis*. s. 500-518, 1090-1099, ISBN 0-12-43660-3, 2. vyd., Academic Press London, 2003.
14. Vértes A., Nagy S., Klencsár Z., Eds.: *Handbook of Nuclear Chemistry*. s. 119-157, ISBN 1-4020-1316-7, Vol. 4, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 2003.
15. Protiva J., Lepša L., Klinotová E., Klinot J., Křeček V., Vystrčil A.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* **46**, 2734 (1981).
16. Klinot J., Podlaha J., Podlahová J., Hilgard S., Klinotova E.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* **54**, 737 (1989).
17. Ohyama K., Suzuki M., Masuda K., Yoshida S., Muranaka T.: *Chemical & Pharmaceutical Bulletin.* **55**, 1518 (2007).

18. Laurent P., Dooms C., Braekman J.-C., Daloz D., Habib-Jiwan J.-L., Rozenberg R., Termonia A., Pasteels J. M.: *Naturwissenschaften*. **90**(11), 524 (2003).
19. Wahhab A., Ottosen M., Bachelor F. W.: *Canadian Journal of Chemistry*. **69**, 570 (1991).
20. Lepša L.: Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Praha 1980.
21. Očadlík M.: Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Praha 1984.
22. Lohmann F., Trendel J. M., Hetru Ch., Albrecht P.: *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*. **28**, 377 (1990).
23. Schaeffer P., Trendel J.-M., Albrecht, P.: *Org. Geochem.* **23**, 273 (1995).
24. Han B. H., Woo L. K.: *Taehakkyo Saengyak Yonguso Opjukjip*. **18**, 259 (1979).
25. Han B. H., Woo L. K.: *Archives of Pharmacal Research*. **1**, 27 (1978).
26. Tuck S. F., Patel H., Safi E., Robinson C. H.: *Journal of Lipid Research*. **32**, 893 (1991).
27. Nicolas A.; Bascoul J., Crastes de Paulet A., Pichat L.: *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*. **14**, 469 (1978).
28. Sandmann G., Hilgenberg W., Boeger P.: *Journal of Biosciences*. **35**, 927 (1980).
29. Croteau R.; Loomis W. D.: *Phytochemistry*. **12**, 1957 (1973).
30. Hanson J. R.: *Advances in Steroid Biochemistry and Pharmacology*. **1**, 51 (1972).
31. Welch M. J., Redvanly C. S.: *Handbook of Radiopharmaceuticals. Radiochemistry and Applications*. s. 141-170, ISBN 0-471-49560-3, John Wiley & Sons Inc., New York 2003.
32. Elbert T.: Habilitační práce. Univerzita Karlova v Praze, Praha 1996.
33. Šarek J., Klinot J., Džubák P., Klinotová E., Nosková V., Křeček V., Kořínková G., Thomson J. O., Janošťáková A., Wang S., Parsons S., Fisher P. M., Zhelev N. Z., Hajdúch M.: *J. Med. Chem.* **46**, 5402 (2003).
34. Akihisha T., Takamine Z., Yoshizumi K., Tokuda H., Kimura Y., Ukyia M., Nakahara T., Yokochi T., Ichiishi E., Nishino H.: *J. Nat. Prod.* **65**, 278 (2002).
35. Šarek J.: Dizertační práce. Univerzita Karlova v Praze, Praha 2002.
36. Šarek J.: Soukromé sdělení.
37. Urban M., Sarek J., Klinot J., Korinkova G., Hajduch M.: *J. Nat. Prod.* **67**, 1100 (2005).
38. Pradhan B. P.; Ghosh P.: *Ind. J. Chem., Sect B* **32**, 1068 (1993).
39. Urban M.: Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Praha 2005.

40. Marková L.: Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Praha 2005.
41. Baddeley G. V., Simes J. J. H., Watson T. G.: *Aust. J. Chem.* **24**, 2639 (1971).
42. Štěpánek O.: Bakalářská práce. Univerzita Karlova v Praze, Praha 2005.
43. Fujioka T., Kashiwada Y., Kilkuskie R. E., Cosentino L. M., Ballas L. M., Jiang J. B., Janzen W. P., Chen I. S., Lee K. H.: *J. Nat. Prod.* **57**, 243 (1994).

PODĚKOVÁNÍ

Závěrem bych rád poděkoval především svému školiteli RNDr. Janu Šarkovi, Ph. D. za pomoc, podporu, cenné rady při realizaci experimentů, četné konzultace, ale hlavně za motivaci do dalšího výzkumu.

Děkuji RNDr. Ivě Rudovské, PhD., Mgr. Simoně Hybelbauerové, RNDr. Zdeňkovi Tošnerovi, Ph. D. za speciální měření ^2H a ^{15}N NMR spekter a za cenné rady a pomoc při realizaci vlastních měření, Mgr. Michaele Fridrichové za měření IČ spekter, RNDr. Martinu Štichovi za měření MS-ESI spekter a pomoc při realizaci vlastních měření, Mgr. Bohunce Šperlichové a Jaroslavě Čečrdlové za měření teplot tání a optických rotací.

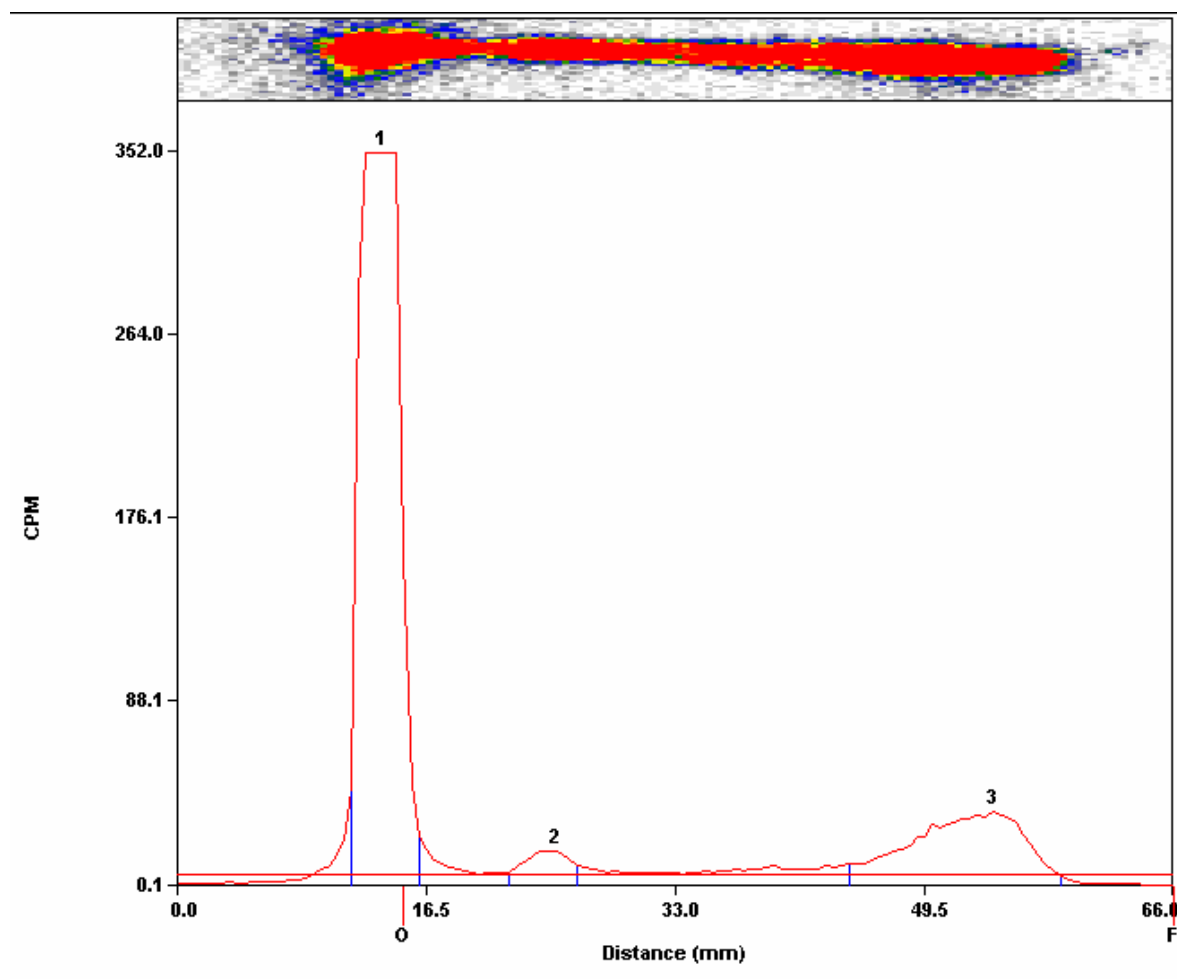
Rád bych poděkoval kolegům z laboratoře radioizotopů ÚOCHB AV ČR za měření ^3H NMR spekter a spekter značených sloučenin, RNDr. Vaškovi Čubovi, Ph.D., ing. Mojmíru Němcovi, PhD. a kolegům z KJCh FJFI ČVUT za měření UV spekter a poskytnuté cenné rady a nápady. Rád bych také poděkoval doc. ing. Stanislavu Smrčkovi, CSc., doc. RNDr. Ladislavu Lešetickému, CSc. a kolegům z LIV PřF UK za neustálý zájem, cenné rady a pomoc při práci v LIV.

Slova díky patří v neposlední řadě mým kolegům z teamu Betulininů, jmenovitě RNDr. Milanovi Urbanovi, Ph. D. a RNDr. Mirkovi Kvasnicovi, Ph. D. za pomoc, cenné rady a inspiraci pro další experimenty, dále Mgr. Davidu Biedermannovi, Mgr. Pavle Spáčilové, Bc. Tomáši Kubelkovi, Bc. Ondřeji Štěpánkovi, Bc. Michalu Tichému, Bc. Luce Ducháčkové a Markovi Remešovi za vytvoření příjemného pracovního prostředí a zázemí.

Děkuji také všem svým přátelům a známým za podporu při studiu a trpělivost v těžkých chvílích a při realizaci některých odvážných nápadů.

Nejvíce však děkuji svému otci za umožnění studia na vysoké škole a podporu po celou dobu studia.

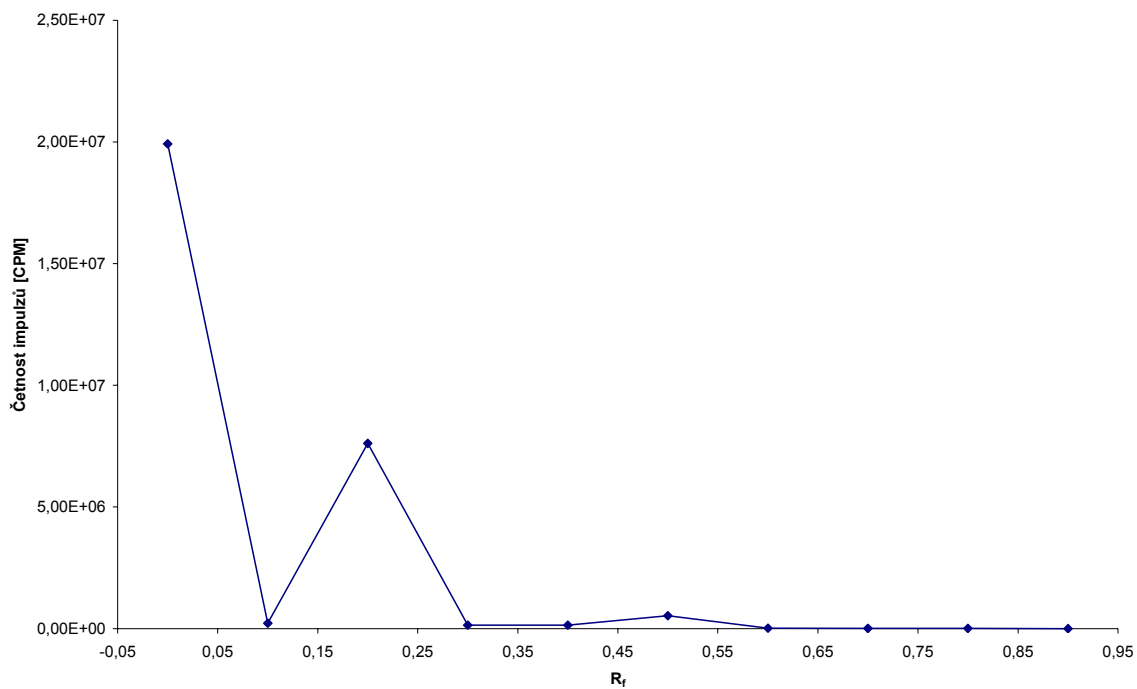
8 Přílohy



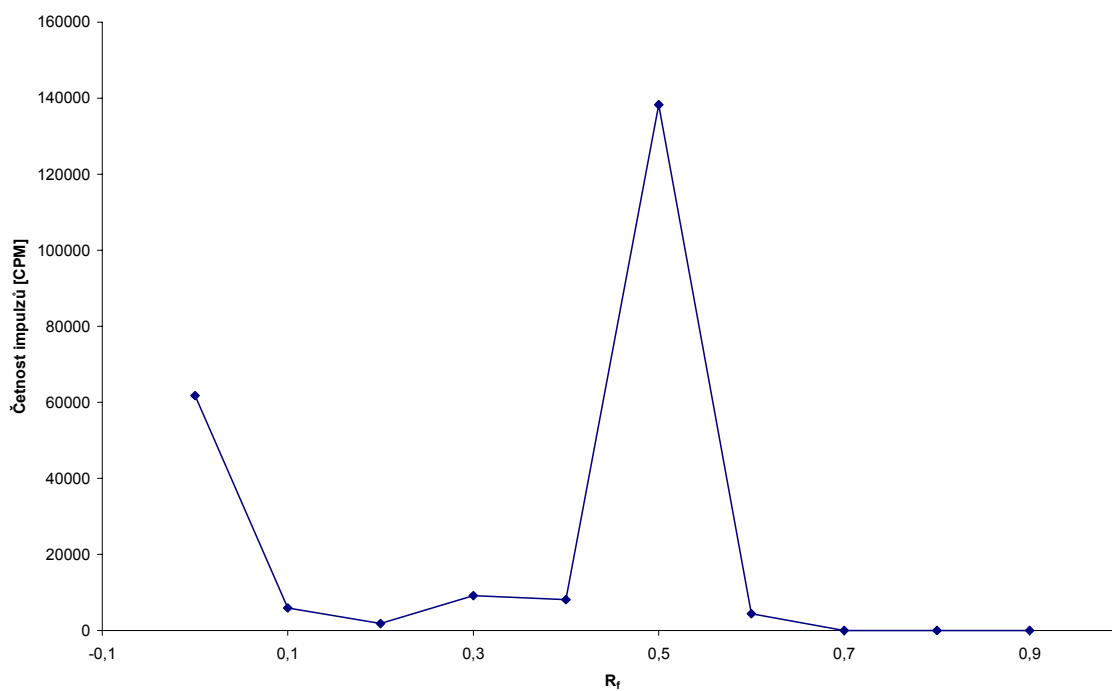
Obrázek 2: Radiochromatogram esteru **4b**

Tabulka 4: Autoradiografie **4b**

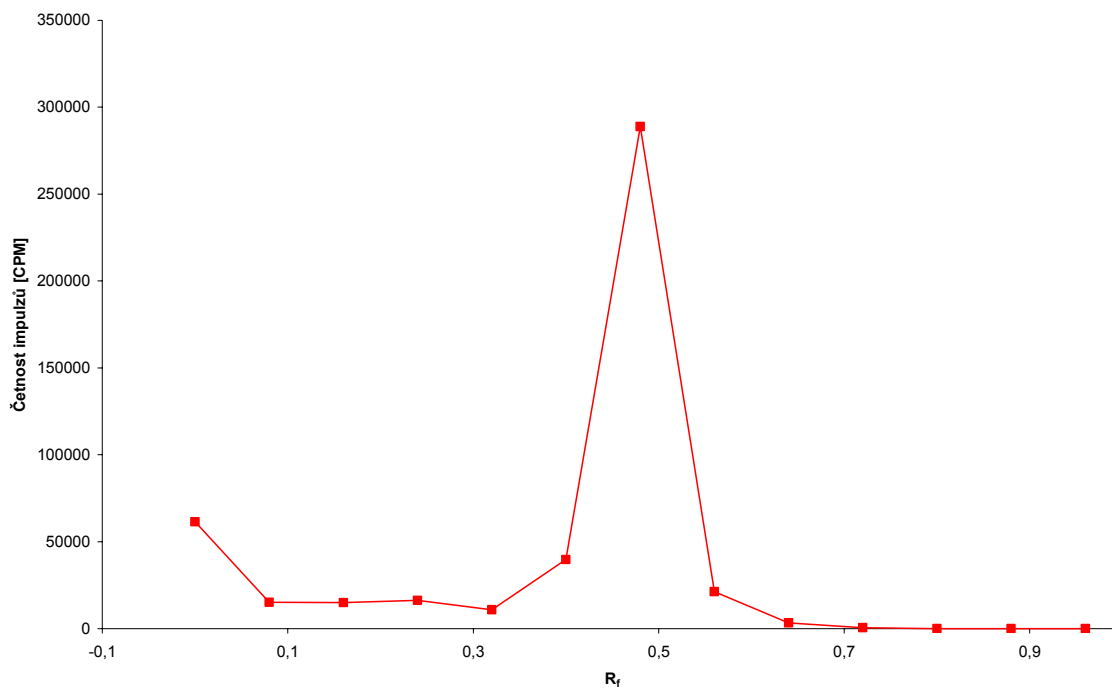
R_f	Gross Counts	Error (%)	CPM
0.000	431777	0.31	11161
0.196	2473	5.82	70
0.765	18557	1.86	479



Obrázek 3: Radiochromatogram 1b



Obrázek 4: Radiochromatogram 2b

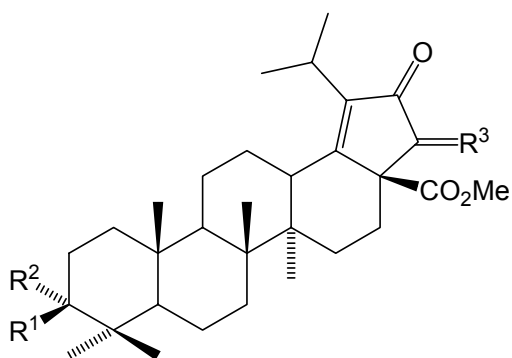


Obrázek 5: Radiochromatogram 3b

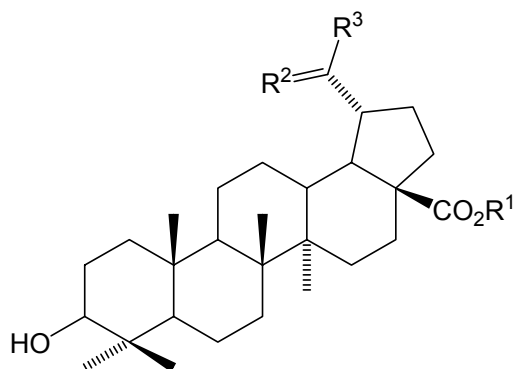
Tabulka 5: Naměřené hodnoty CPM pro 1b, 2b, 3b

R _f	1b [CPM]	2b [CPM]	R _f	3b [CPM]
0	19923262	63165	0	62538
0,10	220586	7324	0,08	16231
0,20	7612124	3263	0,16	16046
0,30	142485	10591	0,24	17321
0,40	138723	9503	0,32	11901
0,50	526570	139713	0,40	40811
0,60	12749	5818	0,48	289919
0,70	5786	1361	0,56	22394
0,80	4251	401	0,64	4455
0,90	3247	490	0,72	1615
			0,80	509
			0,88	382
			0,96	220

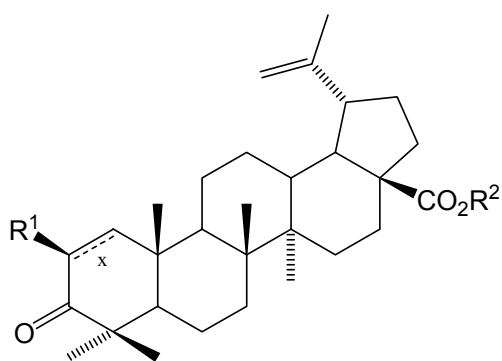
VZORCE PŘIPRAVENÝCH SLOUČENIN



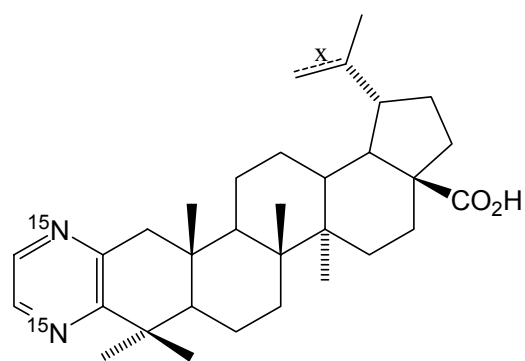
- 1a**, $R^1 = \text{OH}$, $R^2 = {}^2\text{H}$, $R^3 = \text{H,H}$
1b, $R^1 = \text{OH}$, $R^2 = {}^3\text{H}$, $R^3 = \text{H,H}$
2a, $R^1 = \text{OAc}$, $R^2 = {}^2\text{H}$, $R^3 = \text{H,H}$
2b, $R^1 = \text{OAc}$, $R^2 = {}^3\text{H}$, $R^3 = \text{H,H}$
3a, $R^1 = \text{OAc}$, $R^2 = {}^3\text{H}$, $R^3 = \text{O}$
3b, $R^1 = \text{OAc}$, $R^2 = {}^3\text{H}$, $R^3 = \text{O}$



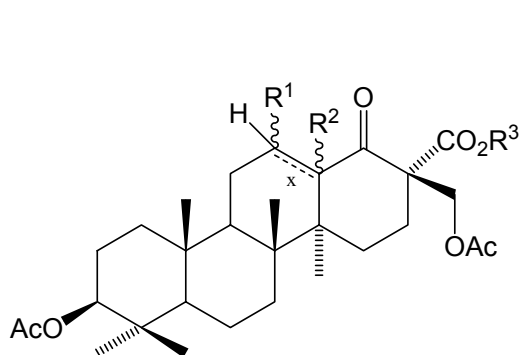
- 4a**, $R^1 = \text{Bn}$, $R^2 = \text{C}^2\text{H}_2$, $R^3 = \text{CH}_3$
4b, $R^1 = \text{Bn}$, $R^2 = {}^{14}\text{CH}_2$, $R^3 = \text{CH}_3$
5, $R^1 = \text{H}$, $R^2 = \text{C}^2\text{H}_2$, $R^3 = \text{CH}_3$
6, $R^1 = \text{H}$, $R^2 = \text{C}^2\text{H}_2$, $R^3 = \text{COH}$



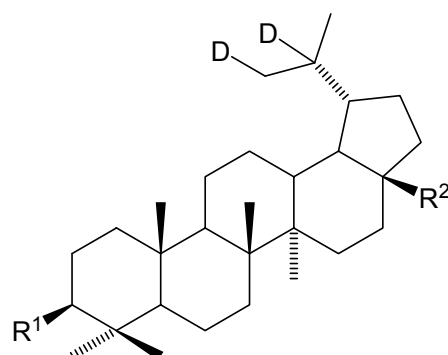
- 7**, $R^1 = \text{C}^2\text{H}_3$, $R^2 = \text{Bn}$, x : dvojná vazba
8, $R^1 = \text{C}^2\text{H}_3$, $R^2 = \text{H}$, x : jednoduchá vazba



- 9a**, x : dvojná vazba
10a, x : jednoduchá vazba



- 11**, $R^1 = \text{--}$, $R^2 = \text{--}$, $R^3 = \text{Bn}$, x : dvojná vazba
12, $R^1 = \text{D}$, $R^2 = \text{D}$, $R^3 = \text{Me}$, x : jednoduchá vazba



- 13**, $R^1 = \text{OPr}$, $R^2 = \text{CH}_2\text{OPr}$
14, $R^1 = \text{OAc}$, $R^2 = \text{CH}_3$