

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra organické a jaderné chemie



**Ozonizace lupanových triterpenoidů jako způsob přípravy
nových sloučenin s cytotoxickou aktivitou**

Ondřej Štěpánek

Bakalářská práce
Chemie v přírodních vědách

Praha 2006

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně pod vedením školitele RNDr. Jana Šarka Ph.D. a veškeré použité prameny jsem řádně citoval.

V Praze dne 12.6.2006

.....
Ondřej Štěpánek

podpis

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

BT549	karcinom prsu
CEM	T-lymfoblastická leukemie
DMS	dimethylsulfid
DU145	karcinom prostaty
HCT15	karcinom tlustého střeva
HeLa	karcinom močového měchýře
K526	promyelocytická leukemie
MCPBA	3-chlorperoxybenzoová kyselina
Me	methyl
MEL-2	lidský melanom
NR	nereaguje
OVCAR-3	ovariální karcinom
P-388	lymphocytická leukémie
Pom	pivaloyloxymethyl
Py	pyridin
r.t.	laboratorní teplot
RVO	rotační vakuová odparka
Saos2	rhabdomyosarkom
Tf ₂ O	anhydrid kyseliny trifluormethansulfonové
TFA	kyselina trifluoroctová
THF	tetrahydrofuran
XF498	karcinom centrálního nervového systému

Poznámka k číslování:

V této práci budou použity dva druhy číslování sloučenin. Látky v této práci nepřipravené budou značeny římskými číslicemi. Sloučeniny nově připravené nebo již v literatuře popsané, které byly v rámci této práce připravené, budou značeny číslicemi arabskými.

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	3
OBSAH.....	4
ÚVOD.....	5
CÍLE BAKALÁŘSKÉ PRÁCE.....	5
TEORETICKÁ ČÁST.....	6
1. Úvod do studované problematiky.....	7
1.1. Lupanové triterpenoidy.....	7
1.2. Biologické účinky.....	8
1.3. Betulininy.....	10
1.4. Ozonizace.....	12
1.5. Literární rešerše ozonizací triterpenoidů.....	13
2. Příprava výchozích olefinů.....	20
3. Ozonizace triterpenoidů.....	22
3.1. Ozonizace lupanových derivátů.....	22
3.2. Ozonizace allobetulinových derivátů.....	26
4. Cytotoxická aktivita připravených sloučenin.....	28
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	29
TABULKY ¹³ C NMR SPEKTER.....	37
ZÁVĚR.....	38
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	39
PODĚKOVÁNÍ.....	41
PŘÍLOHY.....	42

ÚVOD

Terpeny jsou látky přírodního původu, jejichž struktura je odvozena od isoprenu (2-methylbut-1,3-dienu), mající značný význam pro životní funkce organismů. Podle počtu základních isoprenových jednotek je možné rozdělit terpeny na monoterpeny, seskvi-, di-, sester-, tri-, tetra- a polyterpeny a spolu se steroly tvoří rozsáhlou skupinu isoprenoidů¹. V přírodě se nejčastěji vyskytují v rostlinách a houbách a vzácněji jsou akumulovány a metabolizovány bakteriemi, či syntetizovány živočichy¹.

Za posledních dvacet let se značně rozšířil zájem o triterpeneoidy, neboť v této skupině látek byla objevena řada biologicky aktivních sloučenin². Již v roce 1976 jako jedna z prvních prokázala své účinky kyselina betulinová (3 β -hydroxy-lup-20(29)-en-28-ová kyselina), když byla společně s uvaolem (urs-12-en-3 β ,28-diol) a kyselinou ursolovou (3 α -hydroxyurs-12-en-28-ová kyselina) uvedena jako cytotoxicky účinná látka extraktu z *Vauquelinia corymbosa* vůči lymfocytární leukémii P-388¹.

Díky pozdějšímu vzrůstu zájmu o tuto skupinu látek se postupem času rozšířila škála známých biologických účinků a triterpenoidy jsou nyní studovány také v souvislosti s účinky protizánětlivými, hepatoprotektivními, analgetickými, hypoglykemickými, hypolipidemickými, antimikrobiálními, antimykotickými, analgetickými, antivirovými a anti-HIV^{1,3}. V popředí zájmu se však nachází jejich cytotoxická aktivita, která je u různých derivátů lupanu a kyseliny betulinové pozorována na nádorových liniích odlišného histogenetického původu – např. lidského melanomu, glioblastomu, či ovariálního karcinomu.

Cílem dalšího výzkumu je také příprava nových derivátů výše zmíněných lupanových terpenoidů, které by měly vysoký terapeutický index, byly schopné odolávat mechanismům odpovědným za vznik rezistence nádoru na dané cytostatikum a jejichž výroba by byla ekonomická a ekologická. Takovými úkoly se zabývá i naše pracoviště a v nedávné době zde byla připravena řada cytotoxicky aktivních derivátů triterpenoidů lupanové a 18 α -oleananové řady – betulininů⁴.

CÍLE BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

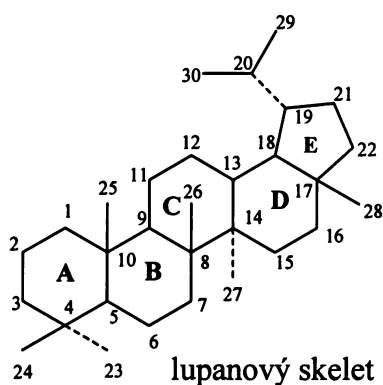
- literární rešerše ozonizací triterpenoidů
- příprava výchozích olefinů pro ozonizace
- ozonizace připravených nenasycených triterpenoidů

TEORETICKÁ ČÁST

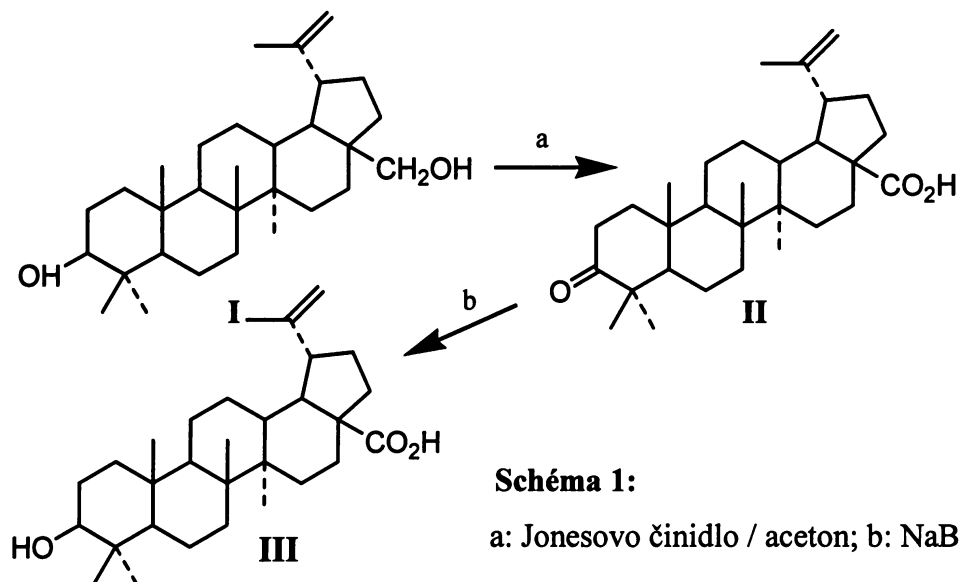
1. Úvod do studované problematiky

1.1. Lupanové triterpenoidy

Triterpenoidy se v přírodě vyskytují volné, nebo vázané ve formě esterů a glykosidů. Celkem bylo izolováno z přírodních zdrojů přes třicet tisíc sloučenin odvozených od různých terpenických skeletů⁵. Mezi nejvýznamnější triterpenoidní skelety patří lupanový, oleananový, ursanový, taraxeranový a dammaran-eufanový. Z hlediska cytotoxicity má významné postavení skelet lupanový.



První zástupce z této řady – betulin (I), byl izolovaný z březové kůry již roku 1788⁶. Po řadu let však nebyla známa jeho přesná struktura. Později se dostalo do popředí zájmu zkoumání biosyntézy⁷ lupanového skeletu, v jehož rámci byla provedena řada reakcí a bylo takto připraveno množství derivátů. Příkladem může být příprava kyseliny betulinové (III) z betulinu⁸ (I), kdy oxidací Jonesovým činidlem vzniká kyselina betulonová (II) a ta redukcí tetrahydridoboritanem sodným poskytuje kyselinu betulinovou (III).



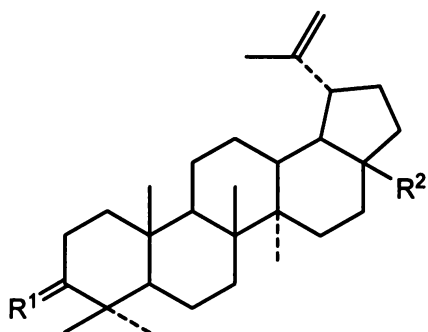
1.2. Biologické účinky

Lupanové triterpenoidy disponují širokou škálou biologických účinků, přičemž nejzajímavější vlastností je jejich cytotoxicita. Cytotoxicita je mírou selektivní protinádorové aktivity, a je vyjadřována pomocí indexů udávajících minimální koncentraci cytostatika potřebnou k usmrcení většinou 50% nádorových buněk. Látka bývá považována za významně cytotoxicky aktivní, je-li její cytotoxická aktivita $IC_{50} < 10 \mu\text{mol/l}$. Jestliže je cytotoxicita prokázána *in vivo*, hovoříme pak o této látce jako o protinádorově aktivní.

Cytotoxické účinky *in vitro* jsou nejdéle známy u kyseliny betulinové (**III**) a jejích derivátů. Kyselina betulinová (**III**) vykazuje selektivní cytotoxickou aktivitu ($IC_{50} < 7 \mu\text{mol/l}$) vůči buňkám Mel-2,⁹ XF498,⁹ proti neuroblastomu¹⁰, medulloblastomu¹⁰ a glioblastomu¹⁰. Dále prokazuje též méně významné antibakteriální^{1,3} a protizánětlivé^{1,3} vlastnosti a u amidických derivátů i anti-HIV^{1,3} aktivitu.

Cytotoxická aktivita lupanových triterpenoidů je závislá na přítomnosti volné karboxylové funkce v pozici C-28² a je prokázáno, že její n-alkyl esterifikací dochází k několikanásobnému snížení aktivity^{8,9}. Tento fakt býval vysvětlován obtížnější hydrolyzovatelností alkyl-esterů za fyziologických podmínek⁴. Avšak jedná-li se o Acn estery, je aktivita srovnatelná s aktivitou volné kyseliny.^{11,12} Také analogická oxidace 3 β -hydroxyskupiny betulinu (**I**) na keton **II** vede k derivátům jejichž aktivita proti buňkám Mel-2, XF498, A549, HCT-15, OVCAR-3 je vyšší² než u kyseliny betulinové. V případě aminoderivátu **IV** nedochází^{2,8} k výrazné změně cytotoxické aktivity a je srovnatelná s aktivitou kyseliny betulinové (**I**).

V pracích^{8,13} byl zkoumán vliv funkcionalizace kyseliny betulinové (**III**) v polohách 3⁸ a 20^{8,13} na cytotoxicitu vůči MEL-2. Methyloximové deriváty **V**, **VI** vykazaly nižší aktivitu než v případě kyseliny betulinové (**III**). Ostatní C-3 deriváty, jako oxim **VII**, amin **IV** byly srovnatelně cytotoxicky aktivní s kyselinou betulinovou (**III**), a v případě ketonu **II** se cytotoxicita zvýšila. Hydrogenace dvojné vazby v pozici 20(29) taktéž nepřinesla požadované zvýšení cytotoxicity vůči MEL-2, protože nasycené deriváty **VIII**, **IX** projevíly značný pokles cytotoxické aktivity v porovnání s nenasycenými analogy **III** a **VII**. Na druhou stranu literatura¹³ poukazuje na značný nárůst cytotoxicity proti liniím HeLa a OVCAR-3 právě u nasycených sloučenin. Dále byly připraveny¹³ čtyři deriváty substituované v poloze 20 – kyselina platanová (**X**), dva oximy **XI**, **XII** a hydroxykyselina **XIII**. Z práce¹³ vyplývá, že derivatizace v poloze 20 nepřináší požadované zvýšení cytotoxicity.

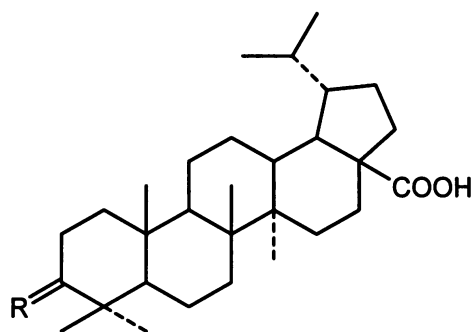


IV, R¹ = α -H, β -NH₂, R² = COOH

V, R¹ = NOMe, R² = COOH

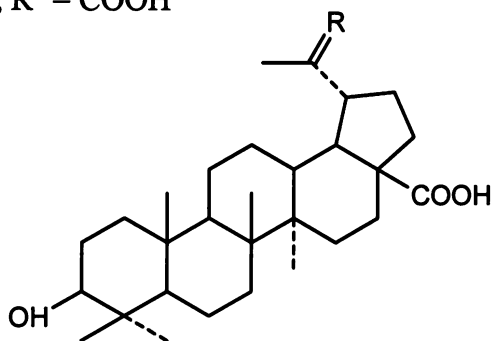
VI, R¹ = NOMe, R² = CHNOCH₃

VII, R¹ = NOH, R² = COOH



VIII, R = α -H, β -OH

IX, R = NOCH₃



X, R = O

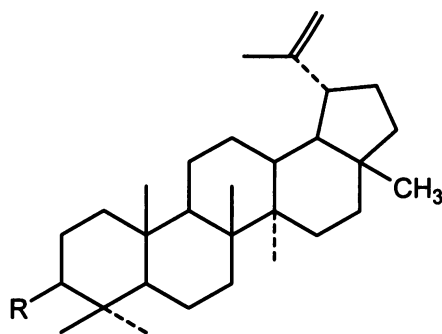
XI, R = NOH

XII, R = NOCH₃

XIII, R = OH, H

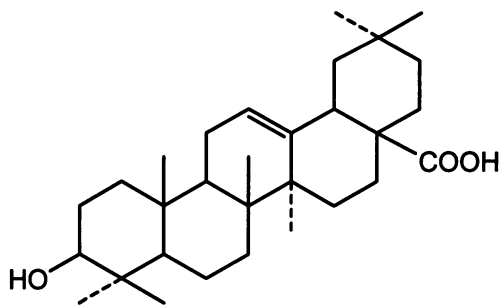
V řadě léčivých rostlin a plodů ovocných stromů¹ (například mango, jablko) se vyskytuje lupanový derivát lupeol (**XIV**), který rovněž vykazuje cytotoxické účinky a kromě nich též chemopreventivní³ a protipožerové účinky¹⁴. Taktéž působí antioxidantně a jako 3 β -palmitát **XV** je využíván k zlepšení stavu jater poškozených halogenovanými uhlovodíky¹⁴.

Biologicky významným derivátem odvozeným od oleananového skeletu je kyselina oleanolová (**XVI**), která vykazuje jak cytotoxickou aktivitu¹, tak i protizánětlivé¹⁵ a anti-HIV^{3,14} účinky.



XIV, R = OH

XV, R = OOC(CH₂)₁₄CH₃



XVI

Tabulka 1: *In vitro* cytotoxická aktivita kyseliny betulinové (III) a některých derivátů na vybraných nádorových liniích^{8,9}

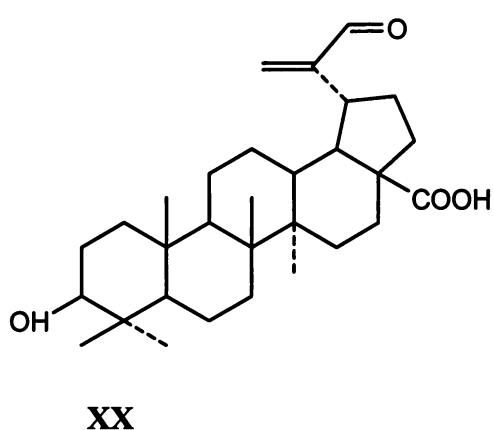
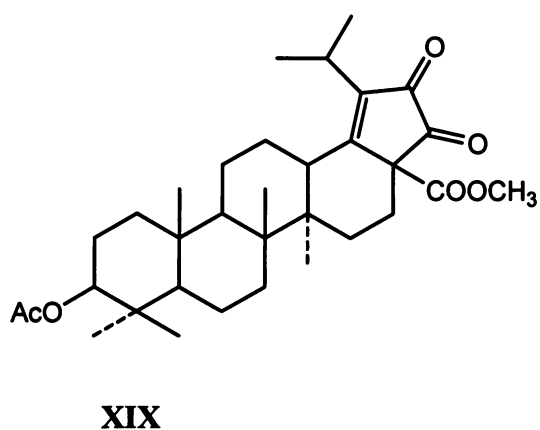
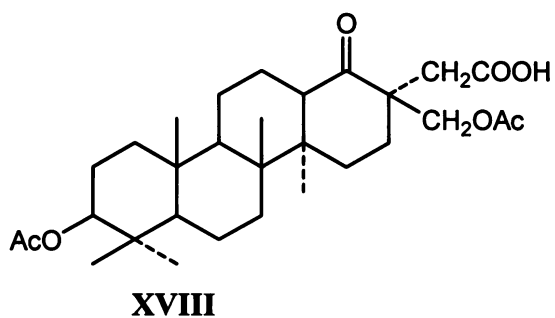
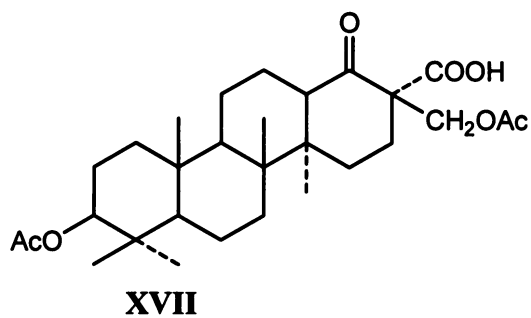
Sloučenina	<i>In vitro</i> cytotoxická aktivita vůči nádorovým liniím, IC ₅₀ [μg/ml]					
	Mel-2	OVCAR-3	HeLa	A549	HCT-15	XF498
III	1.2	3.8	0.8	2.0	5.3	4.8
II	0.9	2.3	-	1.1	0.8	2.5
IV	1.3	-	-	-	-	-
VIII	5.8	-	-	-	-	-
IX	210	-	-	-	-	-

1.3. Betulininy⁴

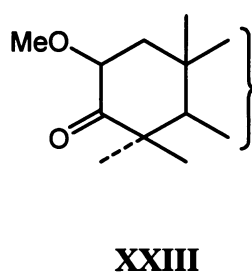
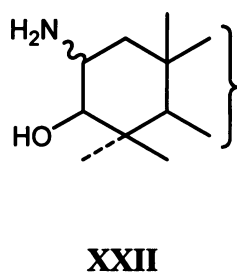
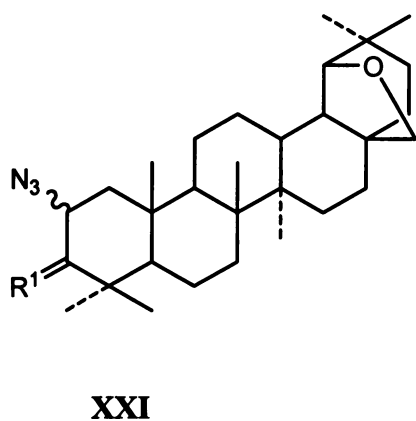
Betulininy⁴ je označení pro deriváty lupanového, des-E-lupanového a oleananového skeletu, které se vyznačují významnou protinádorovou aktivitou a byly připraveny v naší laboratoři. Protinádorová aktivita těchto látek není narozdíl od kyseliny betulinové (III) omezena pouze na nádorové linie Mel-2, betulininy jsou významně cytotoxicky aktivní taktéž vůči dalším nádorovým liniím jako A549, Saos2, BT549, DU145, OVCAR-3, K562, CEM atd.

Jako nejúčinnější sloučeniny se projevíly β-ketokyselina XVII a tetranorkyselina XVIII, které jsou odvozeny od des-E lupanového skeletu^{4,14}.

Některé výše oxoderiváty deriváty lup-18-enu a lup-20(29)-enu mají také vysokou cytotoxickou aktivitu, např. methylester XIX a nenasycený aldehyd XX.



Dále byly připraveny 18 α -oleananové deriváty, které též vykazují poměrně značnou cytotoxicitu,¹⁶ hlavně v případě azidoketonů **XXI**, aminoalkoholů **XXII** a methoxyderivátu **XXIII**.



sloučenina	IC ₅₀ (μmol/l)
XVII	0.24
XVIII	2.30
XIX	6.10
XX	7.20
XXI	8.10
XXII	5.30
XXIII	1.12

Tabulka 2:

Cytotoxická aktivita sloučenin z našeho pracoviště vůči T – lymfoblastické leukémii CEM

1.4. Ozonizace

Vlastnosti přírodních terpenoidů, z hlediska farmaceutického a farmakologického, nejsou často ideální, a proto je zájem také o jejich deriváty, které mají vyšší terapeutický index a schopnost odolávat mechanismům vyvolávajícím rezistenci nádoru na cytostatikum. Zde se naskýtá možnost připravit takové látky pomocí vhodné funkcionalizace. Jednou z možností modifikace terpenoidů je jejich reakce s ozonem – ozonolýza.

Ozonolýza, tedy oxidativní štěpení dvojných vazeb ozonem, byla objevena roku 1840 Christianem Friedrichem Schönbeinem^{16a} a původně sloužila hlavně jako prostředek k určování chemické struktury organických látek. Mechanismus ozonizací byl navržen Rudolfem Criegee^{16b} v roce 1975 (schéma 2) a později ověřen¹⁷ pomocí ¹⁷O NMR spektroskopie. Nejprve dochází k 1,3 dipolární cykloadici ozonu na dvojnou vazbu za vzniku molozonidu, který se rozpadá na zwitterion. Z něj dále vzniká ozonid, který však obvykle bývá natolik nestabilní (explozivní), že se ihned dále zpracovává – produkty jsou buď aldehydy a ketony v případě redukčního zpracování, nebo kyseliny a ketony v případě oxidativního zpracování.

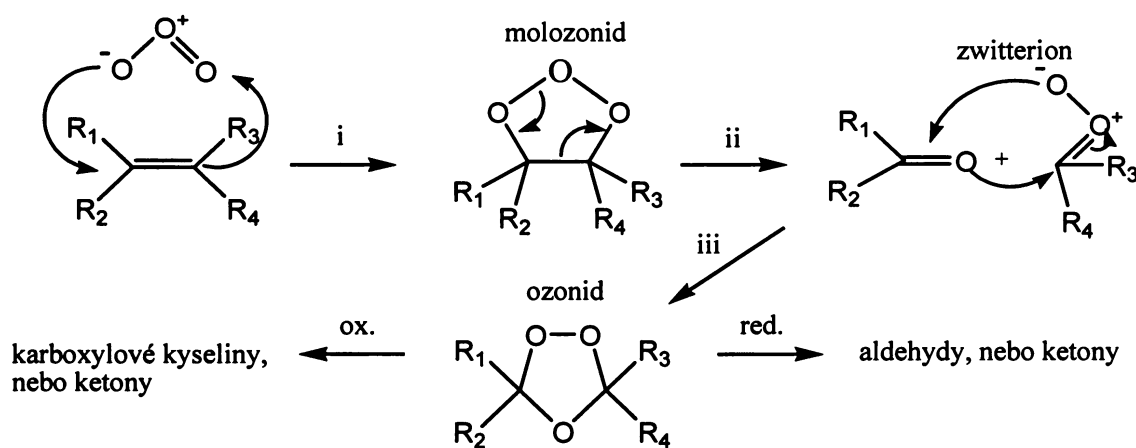


Schéma 2 : mechanismus ozonizace

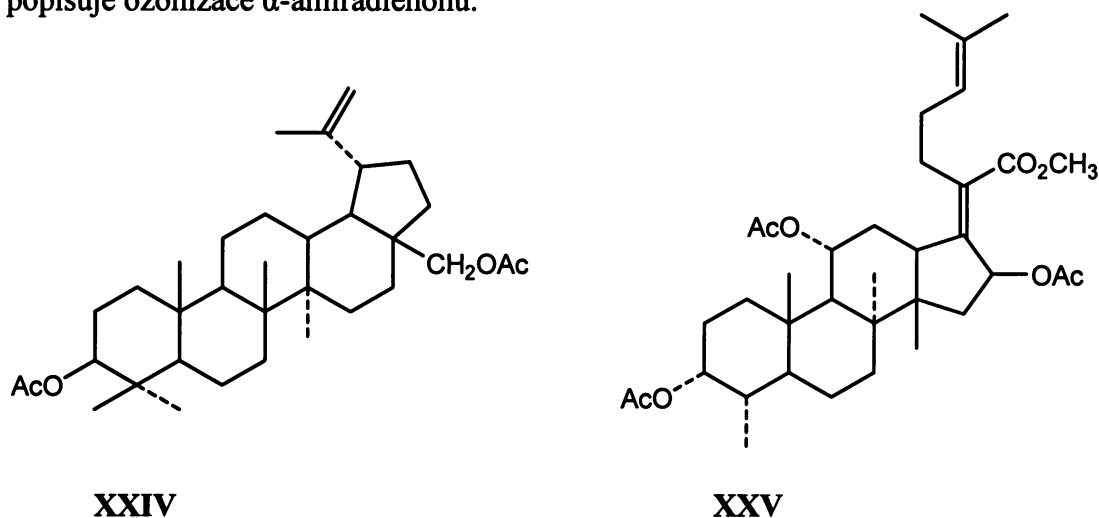
i. 1,3 cykloadice, ii. rozpad molozonidu, iii. karbonylový flip

U triterpenoidů však existuje řada výjimek z tohoto mechanismu, neboť bylo popsáno množství jiných produktů. Literatura¹⁸⁻²³ popisuje příklady stabilních ozonidů^{20,22,23} a častým produktem ozonizací jsou epoxidy,^{18,19,21,23} nebo laktony.²³ Vznik těchto produktů souvisí s rigidním skeletem, který je pravděpodobně odpovědný za často odlišný průběh ozonizací triterpenoidů, ale i dalších reakcí jako např. fluorace³⁰. V případě exocyklických dvojných vazeb je tvorba výše popsaných struktur méně obvyklá, nicméně není vyloučená. Jsou

popsány dokonce z přírodního materiálu izolované ozonidy na postraních řetězcích.²² Běžnější je však štěpení nenasycených postraních řetězců, ale i to skýtá možnost využití této reakce. Spočívá ve snadném odbourání řetězce za vzniku karbonylové skupiny, což může být alternativou v řadě syntéz, neboť takto by bylo možné nahradit jiná oxidační činidla jako například NaIO₄/RuCl₃, nebo MCPBA.

1.5. Literární rešerše ozonizací triterpenoidů

První zmínky o ozonizacích triterpenoidů se objevují již v průkopnických pracích Ruzicky^{20,21} ze třicátých a čtyřicátých let minulého století. V článku²⁰ z roku 1942 je popisována ozonizace betulin-diacetátu (XXIV) a její různé zpracování vedlo ke vzniku diacetoxy-nor-lupanonu a methylesteru diacetoxy-bisnorlupanové kyseliny, avšak struktury těchto sloučenin jsou v publikaci uvedeny chybně (včetně betulin-diacetátu), přičemž postrádají jakýkoliv důkaz struktury. Obdobná situace je v práci²¹ z roku 1945, kde se popisuje ozonizace α -amiradienonu.



Jako účinné štěpící činidlo pro dvojné vazby je využit ozón v práci²⁴ z roku 1977. Autoři původně používali k odbourání postranního řetězce v poloze 17 u methyl-diacetoxyfusidátu (XXV) oxid rutheničitý s jodistanem sodným, nebo s chlornanem sodným, ale reakční doba byla až tři týdny. Při použití ozonu se při srovnatelných výtěžcích reakční doba zkrátila na 8 hodin.

Z roku 1977 pocházejí dvě práce^{18,19} finských autorů popisující přípravu epoxidů lupenu XXVI a jeho derivátu XXVII. Bylo zjištěno, že je-li 18-lupen XXVI epoxidován

pomocí MCPBA, je hlavním produktem β -epoxid **XXVIIIa**, zatímco při reakci s ozonem byl produktem α -epoxid **XXVIIIb** (Schéma 3). Obdobně je tomu i u sloučeniny **XXVII**.

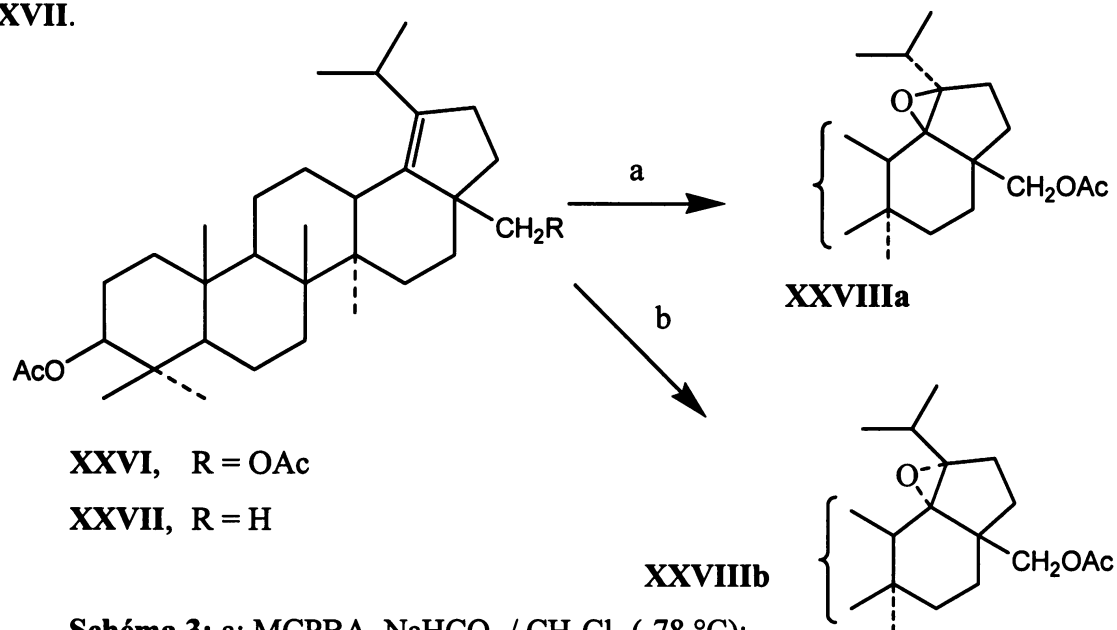
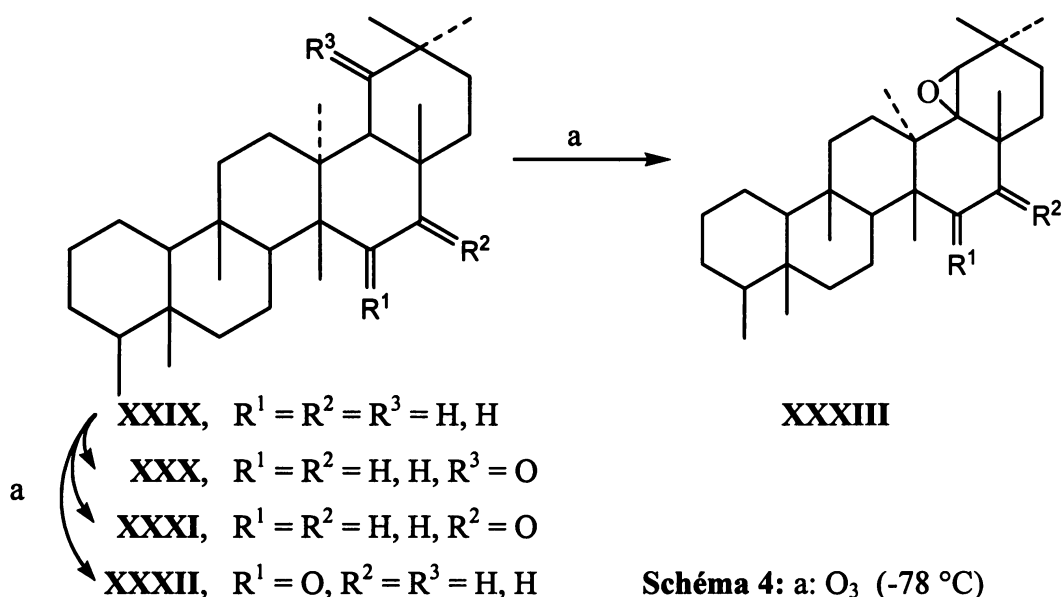


Schéma 3: a: MCPBA, NaHCO₃ / CH₂Cl₂ (-78 °C);

b: O₃ / CH₂Cl₂ (-78 °C)

O rok novější je publikace²⁵ zabývající se takzvanou suchou ozonizací friedelanu (**XXIX**). Suchá ozonizace je metoda, kterou vyvinul Y. Mazur et al.²⁶ a jedná se v podstatě o běžnou ozonizaci, avšak substrátu adsorbovaného na silikagelu. Tímto postupem byl připraven²⁵ 18 β ,19 β -epoxyfriedelan (**XXXIII**), friedelan-19-on (**XXX**), friedelan-16-on (**XXXII**) a friedelan-15-on (**XXXI**) (Schéma 4). Nicméně vzhledem k nízké výtěžnosti této metody (konverze 18%) je tento postup nevýhodný.



Práce²⁷ z roku 1988 přináší poznatky o vlivu rozpouštědel na reakci ozonu s tetrasubstituovanými triterpenoidními olefiny. Překvapivý je vznik ketodienů **XXXV** z dienu **XXXIV** (schéma 5). Výzkum²⁷ ukázal, že izolovanými produkty ozonizace jsou epoxyketon **XXXVI** a ketodien **XXXV**, který ale pravděpodobně vzniká až při zpracování. Tento fakt byl potvrzen provedením reakce ve stejném rozpouštědle, avšak za přídavku pyridinu, kdy produktem byl pouze epoxyketon **XXXVI** (schéma 5). Obdobně reaguje s ozonem i nenasycený keton **XXXVII** za vzniku dienonu **XXXV**, probíhá-li reakce v kyselém prostředí; ve směsi dichlormethanu a pyridinu vzniká epoxid **XXXVI** (schéma 5). Tato analogie platí i u dalších látek zmíněných v této práci.²⁷

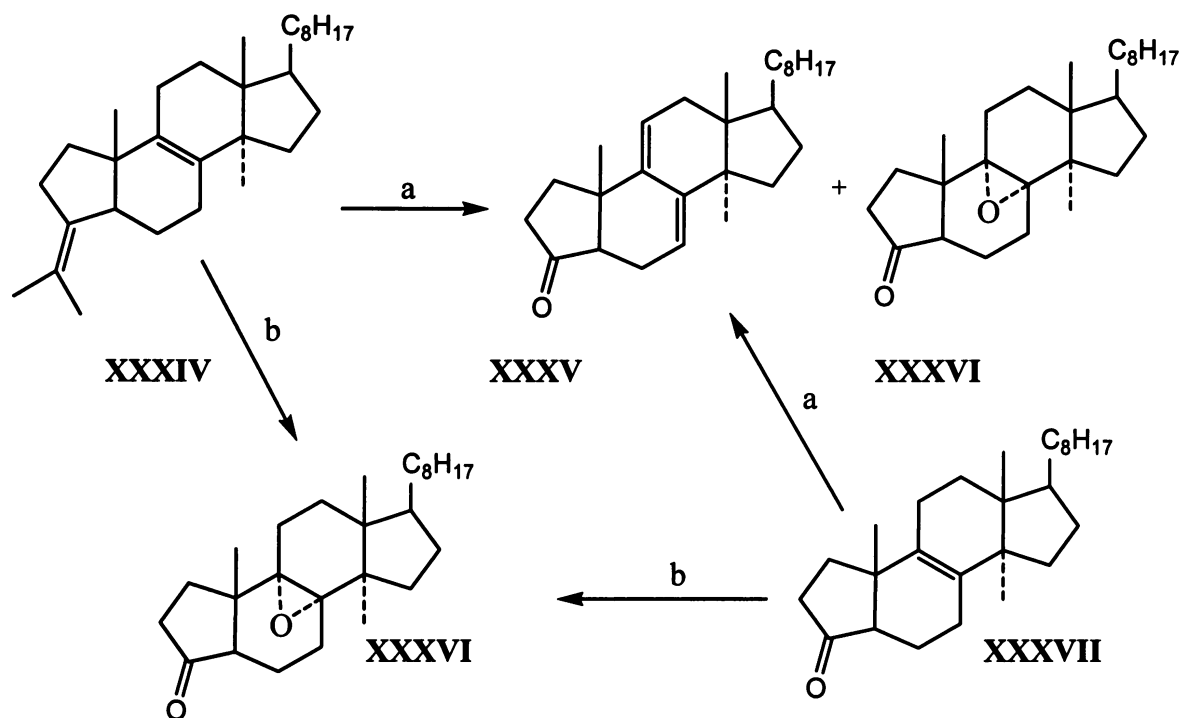


Schéma 5: a: 1. O₃ / CH₂Cl₂ (-78 °C) 2. DMS; b: 1. O₃ / CH₂Cl₂, py. (-78 °C) 2. DMS

Dále byl zkoumán²⁷ vliv polaritý použitého rozpouštědla na složení ozonizačních produktů. Během všech ozonizací prováděných v dichlormethanu byl pozorován vznik komplikované směsi produktů. Autoři²⁷ jako možné vysvětlení uvádějí atak ozonu na deaktivovanou C-H vazbu, přičemž je tento efekt zřetelnější u derivátů s kontrahovaným (pětičlenným) kruhem A, který má vyšší pnutí než šestičlenný. Pakliže byla ozonizace látky **XXXIV** prováděna n-hexanu, nebyly tyto vedlejší reakce (vznik směsi) pozorovány a produktem byl pouze keton **XXXVII** s nepatrným množstvím epoxidu **XXXVI** a ozonid **XXXVIII** (schéma 6), který byl nereaktivní vůči redukci DMS a jeho redukce bylo dosaženo až zinkem v kyselině octové, nebo hydroxidem draselným v methanolu.

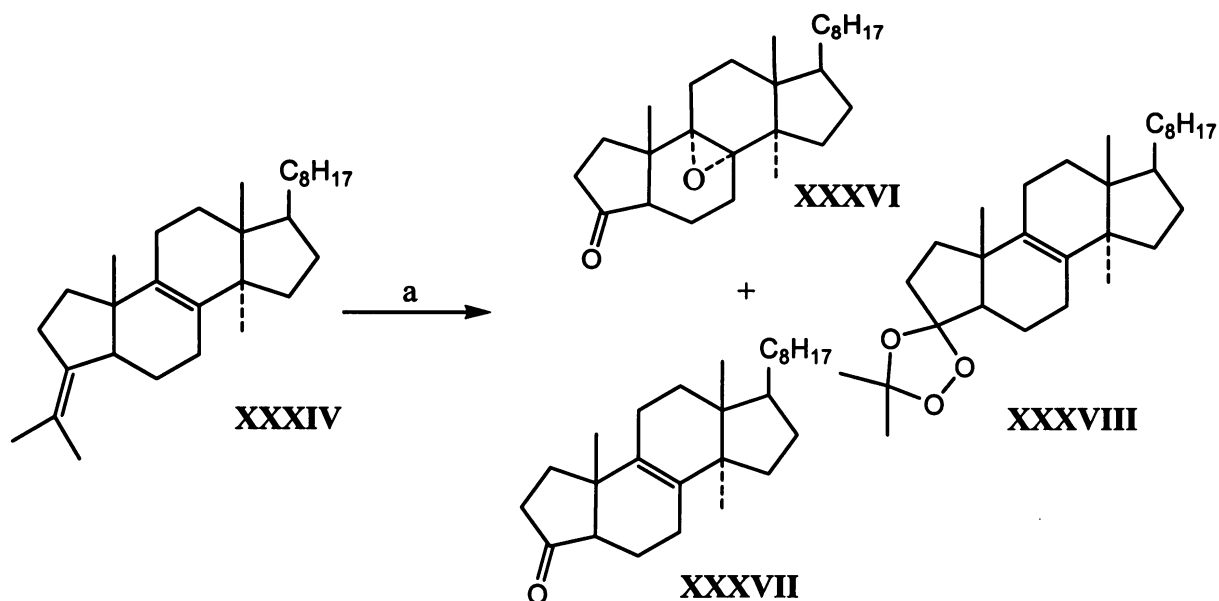


Schéma 6: a: 1. O_3 / n-hexan (-78°C) 2. DMS

Ozonizace olefinu **XXXIX** (schéma 7) v ethyl-acetátu za přídavku pyridinu vedla ke směsi dvou produktů. První byl identifikován jako epoxid **XL** a druhým byl enon **XLI**. Za podobných podmínek poskytovala sloučenina **XLII** obdobnou směs produktů – epoxid **XLIII** a enon **XLIV**.

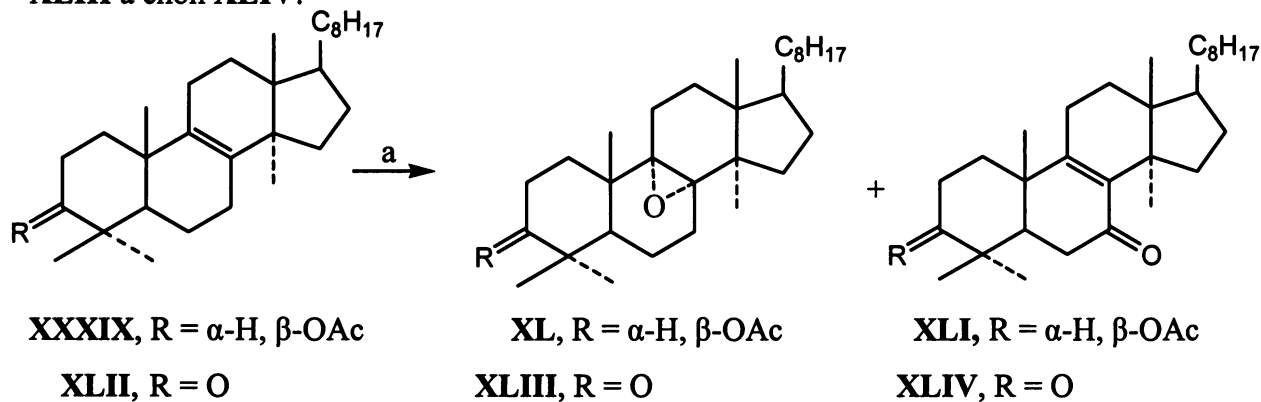


Schéma 7: a: 1. O_3 / EtOAc (-78°C) 2. DMS

Z nedávné doby pochází práce²² zabývající oxidací triterpenoidních dienu a trienů odvozených od oleanolové kyseliny (**XVI**). Mimo jiných oxidačních činidel, byla řada těchto derivátů podrobena reakci s ozonem, přičemž výsledkem byla zpravidla směs produktů. Takto byl z dienu **XLV** atakem C-28 methoxykarbonylové skupiny na dříve vznikající 12,13 epoxid získán lakton **XLVI** jako hlavní produkt (30 %), dále pak diepoxid **XLVII** (15 %), hydroxyepoxid **XLVIII** (15 %) a ještě minoritní lakton **XLIX** (7 %) (schéma 8). Obdobně

reagoval²² také oleananový derivát, který byl navíc substituován v poloze 2 α methoxylovou skupinou.

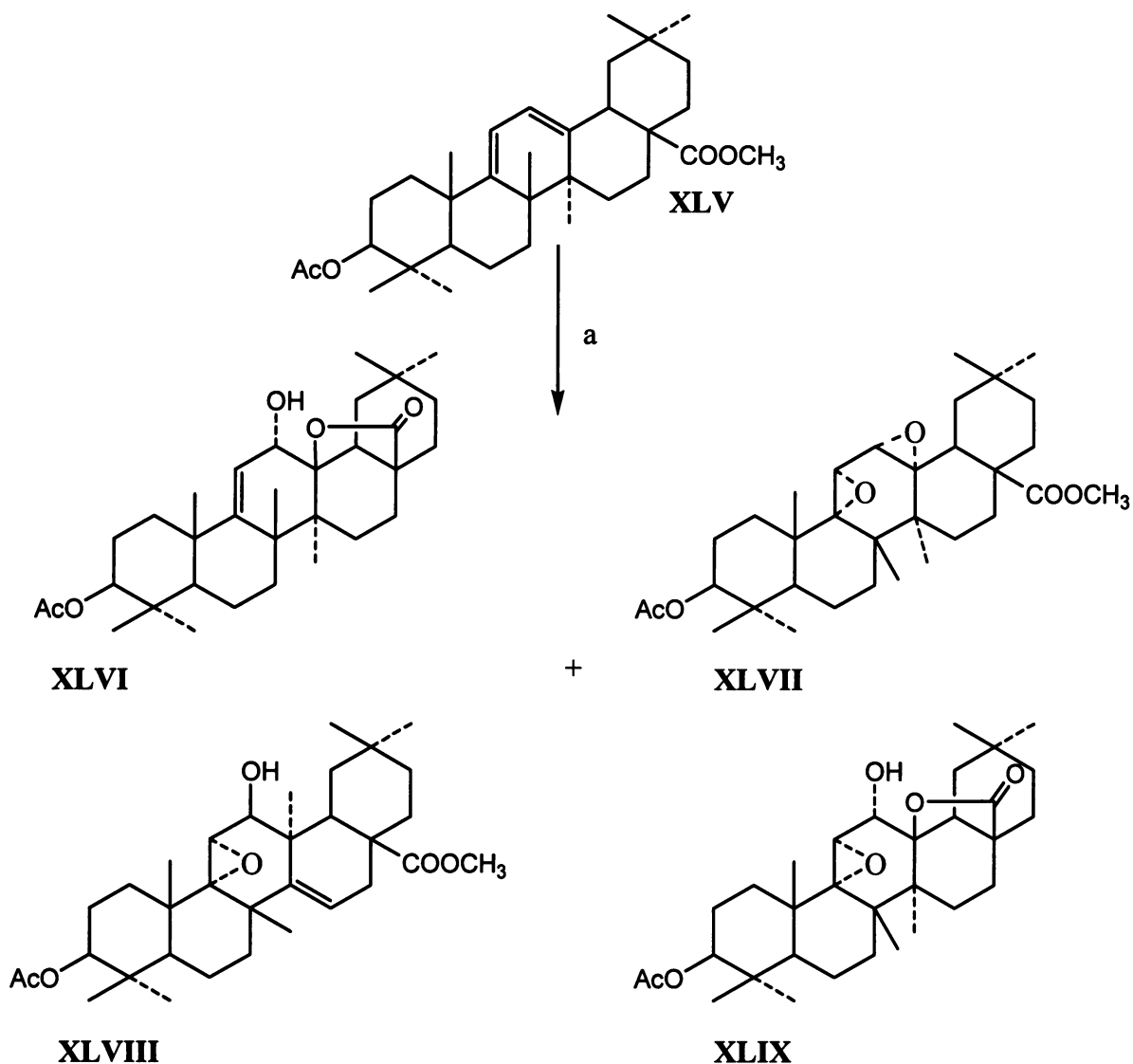


Schéma 8: a: 1. O₃ / CH₂Cl₂ (-78 °C) 2. DMS

Při pokusech o štěpení triterpenu v oblasti kruhu C byl ozonizován trien L, výsledkem však byla velice komplikovaná směs produktů. Při přidavku pyridinu jako ko-solventu byl identifikován jediný produkt, epoxydion LI (12 %) (schéma 9). Ozonizací epoxidu LII v CH₂Cl₂ a poté v témže rozpouštědle za přidavku pyridinu byla v prvním případě produktem sloučenina LIII (schéma 10), v případě reakce prováděné v přítomnosti pyridinu byl produktem diepoxid LIV (schéma 10). Ale ani další ozonizace diepoxidu LIV (schéma 11) nevedla ke štěpení dvojné vazby v poloze 11,12 a produkty byly lakton LV a keton LVI (schéma 11). Sloučenina LIII se vzhledem k přítomnosti jedné dvojné vazby zdála

být vhodná k rozštěpení skeletu, její další reakce s ozonem však vedla pouze k oxidaci 3 β -hydroxyskupiny na keton LVI.

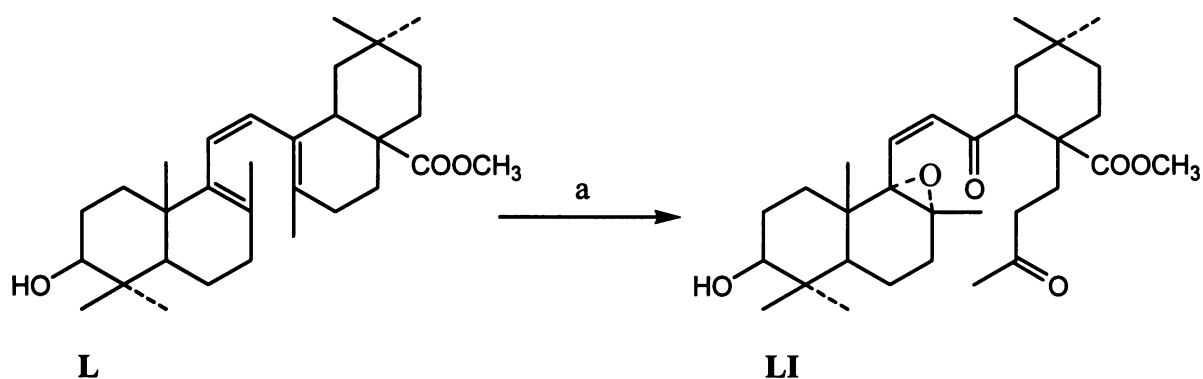


Schéma 9: a: 1. O₃ / CH₂Cl₂, py. (-78 °C) 2. DMS

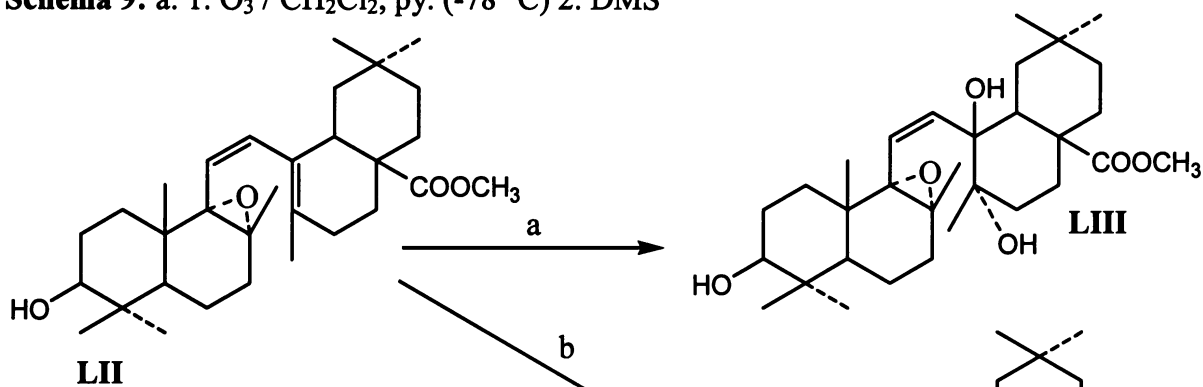


Schéma 10: a: 1. O₃ / CH₂Cl₂ (-78 °C) 2. DMS;
b: 1. O₃ / C₂H₂, py. (-78 °C) 2. DMS

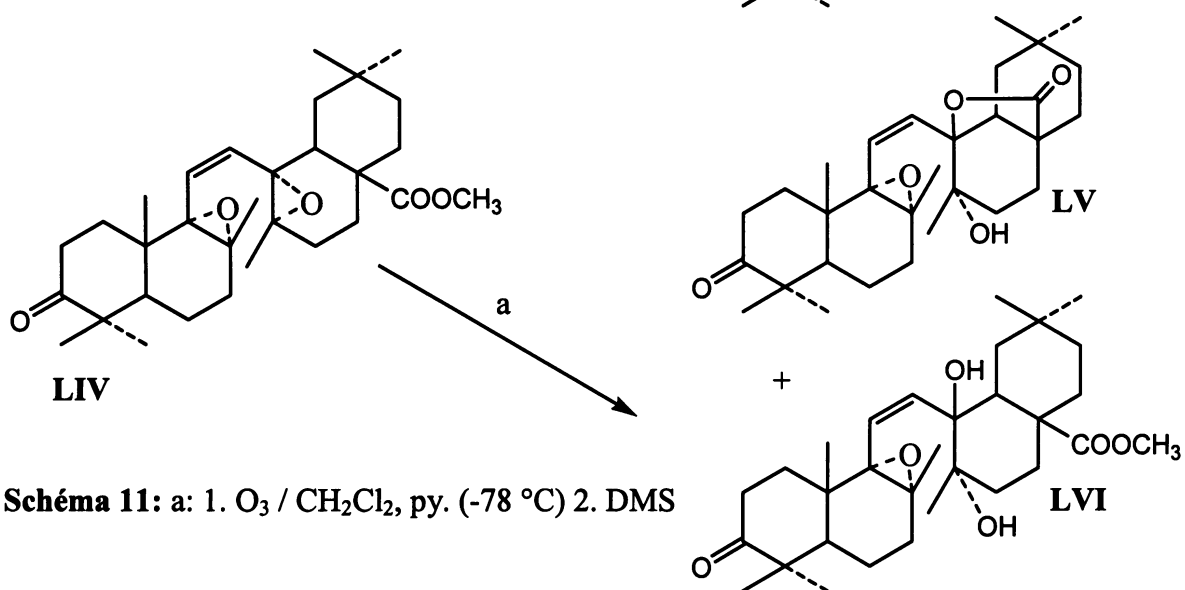


Schéma 11: a: 1. O₃ / CH₂Cl₂, py. (-78 °C) 2. DMS

Ani při pokusech o rozštěpení trienu LVII nebylo dosaženo požadovaného výsledku. Jeho ozonizací vznikly v nízkém výtěžku dva diepoxidy LVIII (10 %) a LIX (10 %) (schéma 12) a směs výše oxidovaných sloučenin.

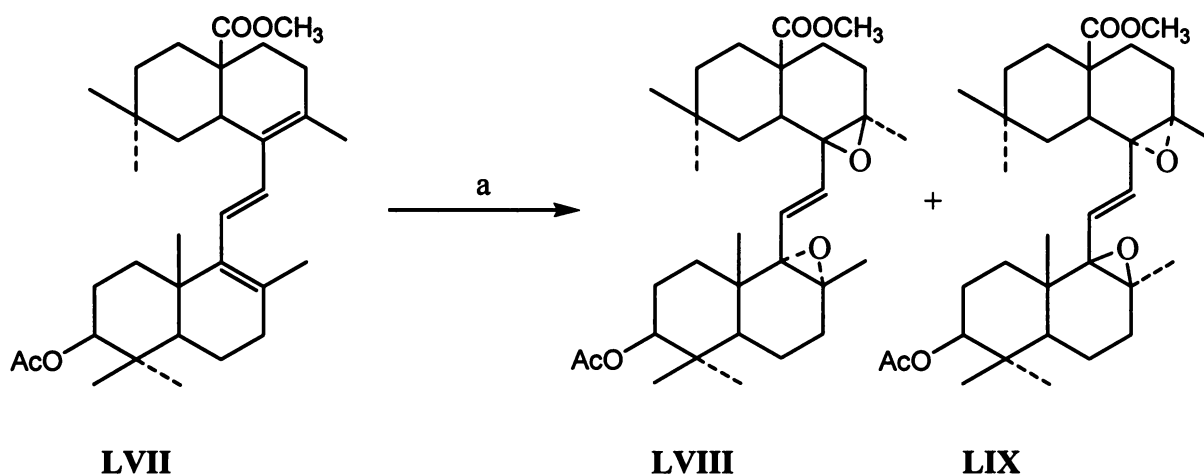


Schéma 12: a: 1. O₃ / CH₂Cl₂ (-78 °C) 2. DMS

Teprve ozonizace epoxydienu LX (schéma 13) vedla ke štěpení a ke čtyřem produktům LXI (31 %), LXII (3 %), LXIII (10 %) a LXIV (35 %).

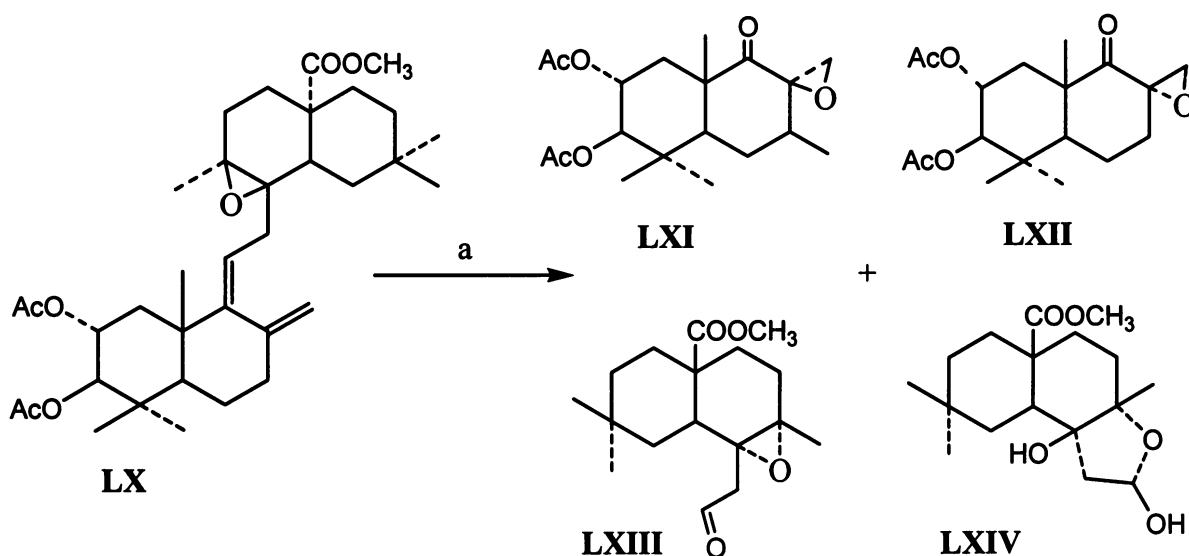


Schéma 13: a: 1. O₃ / CH₂Cl₂ (-78 °C) 2. DMS

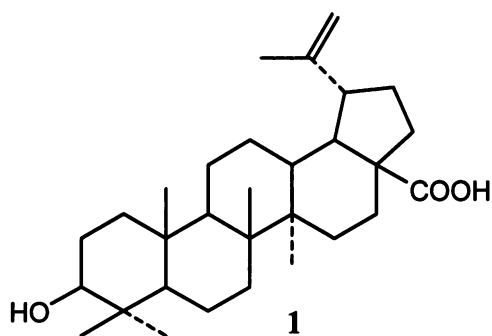
2. Příprava výchozích olefinů

V rámci této bakalářské práce bylo připraveno nebo izolováno 5 nenasycených sloučenin – kyselina betulinová (1), betulin-diacetát (2), lup-18-en (3), dien 4 a olefin 5.

2.1. Příprava kyseliny betulinové (1) a betulin-diacetátu (2)

Kyselina betulinová (1) byla získána extrakcí platanové kůry methanolem¹⁶ a pro další reakce byla čištěna rekrystalizací z methanolu.

Výchozí látkou pro přípravu betulin-diacetátu (2), byl betulin (I), který byl acetylován acetanhydridem v pyridinu¹⁴ (Schéma 14). Betulin-diacetát (2) byl zároveň výchozí látkou pro přípravu lup-18-enu 3.



2.2. Příprava 18-lupenu 3

Izomerizace dvojné vazby z polohy 20(29) ve výchozím betulin-diacetátu (2) do polohy 18 v 18-lupenu 3 byla provedena působením bromovodíku (Schéma 14) ve směsi benzenu, kyseliny octové a acetanhydridu dle literatury¹⁴.

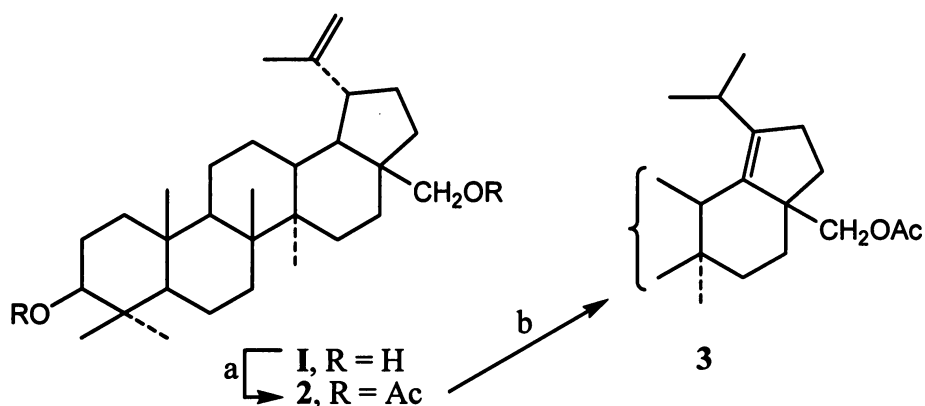


Schéma 14: a: Ac₂O / py.; b: HBr, HOAc, Ac₂O / benzen

2.3. Příprava dienu 4

Dien 4 byl připraven dle literatury³⁰ (schéma 15) z nenasyceného ketonu LXV, který byl redukován komplexem boranu s dimethylsulfidem za vzniku allylového alkoholu A1, jehož dehydratací kyselinou chlorovodíkovou byl získán dien 4, který byl acetylován na dien 4.

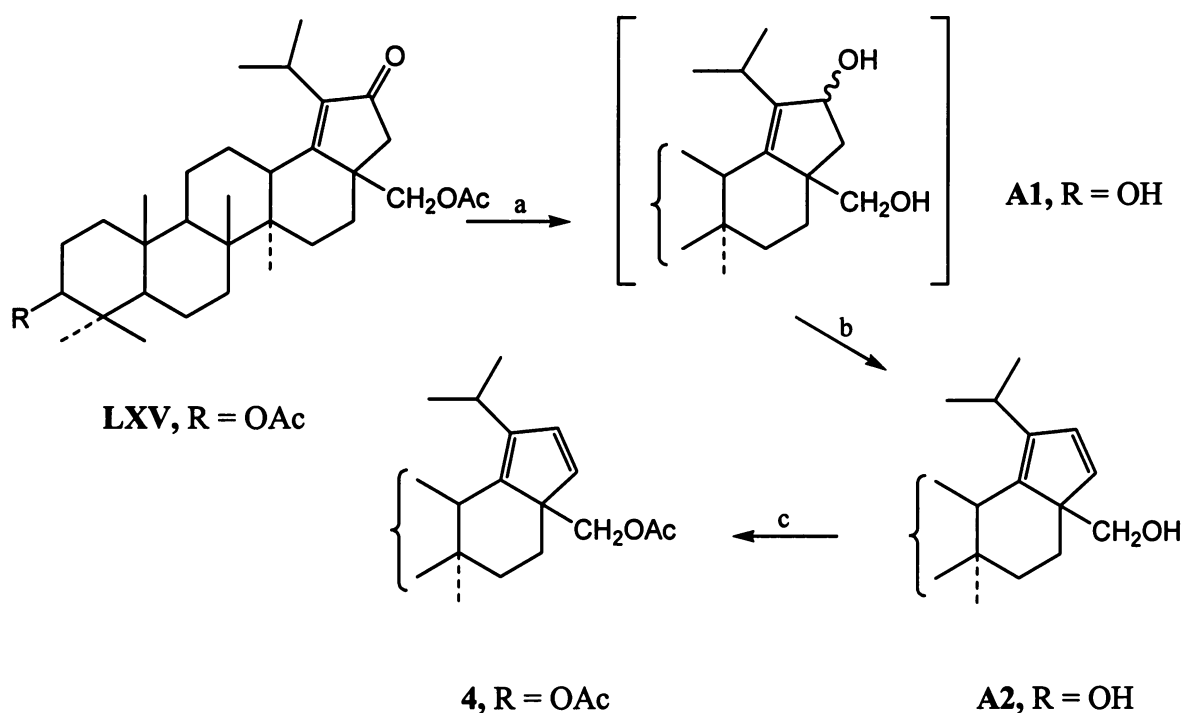


Schéma 15: a: B₂H₆-Me₂S / THF (0 °C), b: HCl / THF (r.t.), c: Ac₂O / py (r.t.)

2.4. Příprava olefinu 5

Olefin 5 byl připraven dehydratací allobetulinu (LXVI) podle modifikovaného literárního postupu²⁸ (schéma 16).

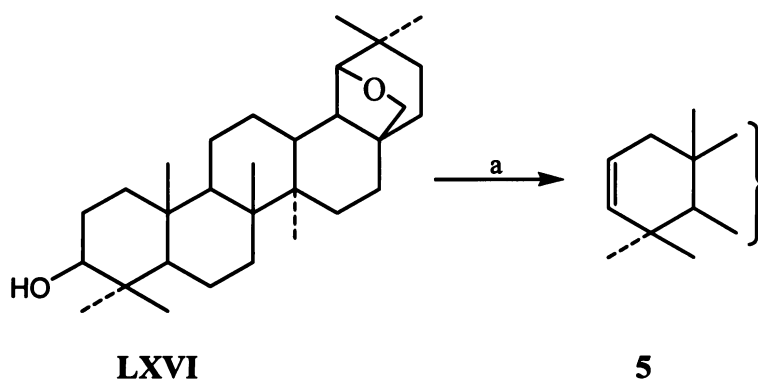


Schéma 16: a: Tf₂O / CH₂Cl₂ (r.t.)

3. Ozonizace triterpenoidů

3.1. Ozonizace lupanových derivátů

Pro ozonizace triterpenoidů odvozených od lupanu (I) byl použit modifikovaný postup,^{18,19,28} spočívající v průchodu ozonizovaného vzduchu chlazeným roztokem výchozí látky ve směsi chloroformu a methanolu a následném redukčním zpracování reakční směsi DMS za laboratorní teploty.

3.1.1. Betulin-diacetát (2)

Ozonizace betulin diacetátu (2) vedla dle TLC ke třem produktům, přičemž dva měly blízké R_F . Po zpracování DMS byl získán chromatograficky jednotný produkt –známý²⁸ 29-norketon-diacetát 6 ve výtěžku 14 % (schéma 17).

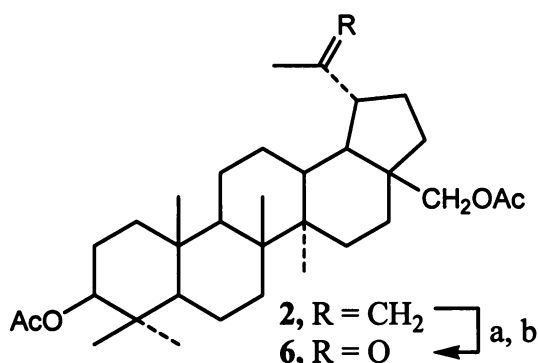


Schéma 17:

a: O₃ / CHCl₃, MeOH (-80 °C); b: DMS (r.t.)

3.1.2. 18-lupen 3

Ozonizace 18-lupenu 3 (schéma 18) měla dle literatury^{18,19} poskytnout známý epoxid 7, avšak byla získána směs produktů o dvou majoritních složkách, separovaných pomocí HPLC. Jako hlavní produkt byl získán známý^{18,19} epoxid 7 a ačkoliv se jedná o látku známou třicet let, byla jeho struktura vůbec poprvé jednoznačně prokázána pomocí spektrálních dat. ¹H NMR spektrum obsahovalo signály charakteristické pro lupanové deriváty a v ¹³C NMR spektru byly nalezeny signály při δ 73.58 ppm a δ 72.87 ppm odpovídající C-18 a C-19. IČ spektrum obsahovalo pásy vibrací ν (C-O) a ν (C=O). V MS byl

nalezen molekulový ion a dále ionty odpovídající ztrátám methylového radikálu, 43 hmotnostních jednotek, molekuly kyseliny octové a vzájemným kombinacím uvedených ztrát. α -konfigurace epoxidu **7** vyplývá z RTG difrakce získaného monokrystalu. Druhá separovaná látka byl stabilní ozonid **8** jehož struktura byla navržena na základě analogie spektrálních dat s literaturou.³² V jeho ^{13}C NMR spektru byly nalezeny, kromě signálů charakteristických pro deriváty lupanu, dva signály uhlíků C-18 a C-19 při δ 111.13 ppm a δ 111.21 ppm typické pro uhlíky, na něž jsou σ vazbou vázány dva kyslíkové atomy. ^1H NMR spektrum obsahovalo pouze signály charakteristické pro tento skelet. V MS byl nalezen molekulový ion a dále ionty odpovídající ztrátám methylového radikálu, 43 hmotnostních jednotek, molekuly kyseliny octové a vzájemným kombinacím uvedených ztrát. Pro určení konfigurace produktů na C-18 a C-19 by bylo zapotřebí též 2D NMR spekter, jejichž měření je však nad rámec této práce a bude součástí diplomové práce.

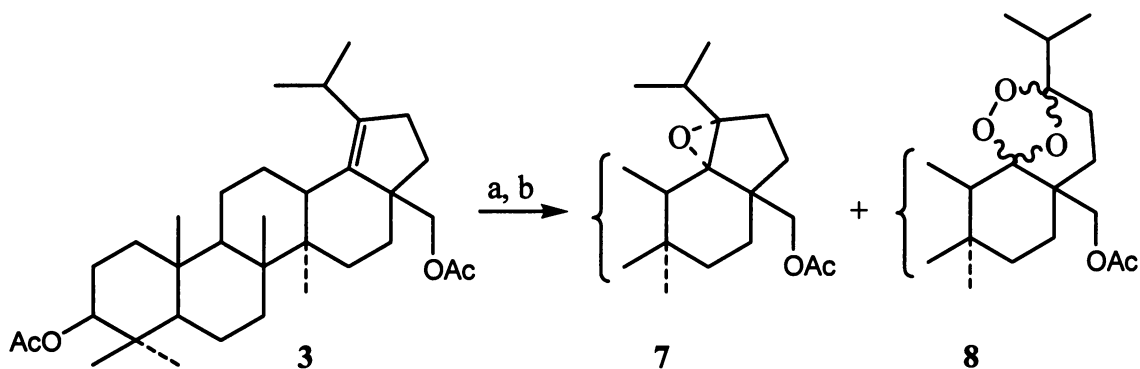


Schéma 18: a: $\text{O}_3 / \text{CHCl}_3, \text{MeOH} (-80^\circ\text{C})$; b: $\text{DMS} (\text{r.t.})$

3.1.3. Výše oxidované deriváty LXV, LXVII, LXVIII

Dále byly ozonizaci podrobeny výše oxidované lupanové deriváty – nenasyčený keton **LXV**, diketon **LXVII** a anhydrid **LXVIII** (schéma 19). Všechny tyto sloučeniny se ukázaly být zcela nereaktivní vůči ozonu a to jak při -80°C , tak i při laboratorní teplotě a také za přítomnosti TFA. Tento závěr plyne z TLC a následného zpracování reakce v případě ketonu **LXV**, kdy byl dle ^1H NMR spektra izolován pouze výchozí keton **LXV**. U látek **LXVII** a **LXVIII** byla nereaktivnost ověřena pomocí TLC. Nereaktivnost těchto sloučenin je v souladu s poznatky v literatuře²⁷.

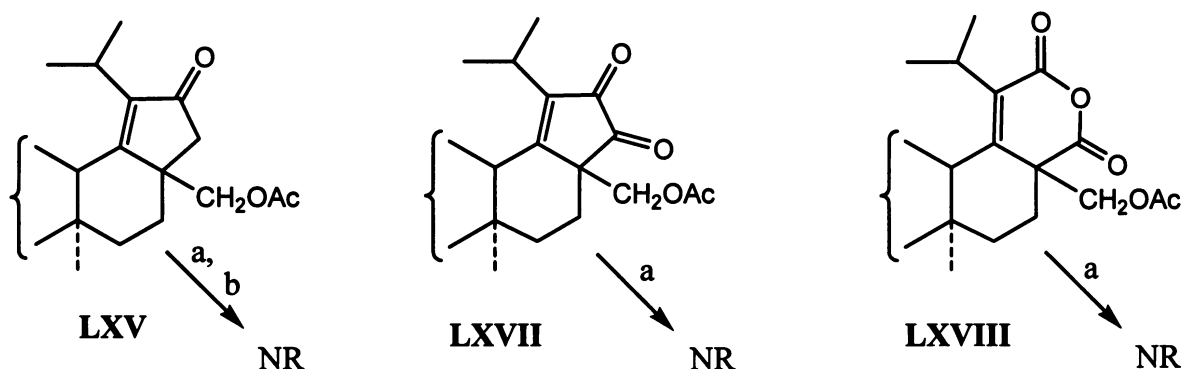


Schéma 19: a: O₃ / CHCl₃, MeOH (-80°C); b: DMS (r.t.)

3.1.4. Kyselina betulinová (1) a hydroxyketon LXIX

Kyselina betulinová (1) poskytla ozonizaci podle očekávání kyselinu platanovou (9) (schéma 20), ¹H NMR spektrum je shodné se spektrem autentického preparátu.³⁵ Před zpracováním DMS byly patrné dva produkty, které se po zpracování sjednotily.

Při reakci 28-hydroxyketonu LXIX s ozonem (schéma 21) nedošlo k žádné reakci ani při -80° C, ani při laboratorní teplotě po 45 min ozonizace a z reakční směsi byl izolován zpět výchozí hydroxyketon LXIX.

Při ozonizaci hydroxyketonu LXIX, v souladu s výsledkem ozonizací ostatních nenasycených ketonů LXV, LXVII a LXVIII, nedošlo ke štěpení dvojné vazby v poloze 18,19. Nedošlo však ani k oxidaci 28-hydroxyskupiny, stejně jako v případě 3β-hydroxyskupiny kyseliny betulinové (1). Je tedy patrné, že hydroxyskupiny v poloze 3β a 28 jsou vůči ozonu inertní, což má značnou potenciální možnost využití v budoucích syntézách.

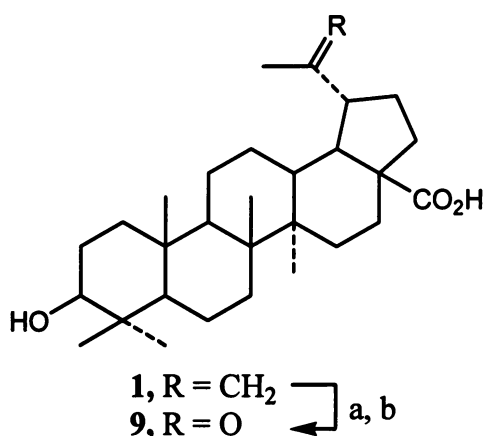


Schéma 20:

a: O₃ / CHCl₃, MeOH (-80°C.); b: DMS (r.t.)

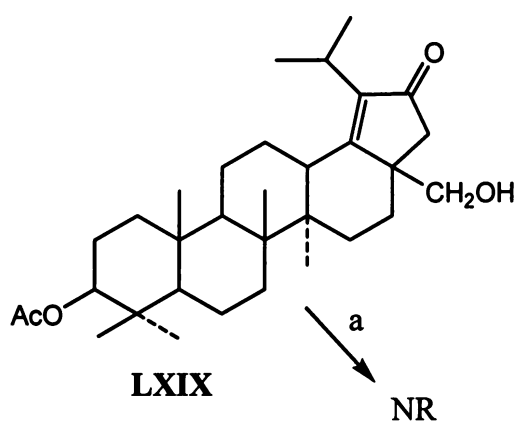


Schéma 21:

a: O₃ / CHCl₃, MeOH (r.t.); b: DMS (r.t.)

3.1.5. Kyselina 3 β -acetoxybetulinová (LXX)

Kyselina 3 β -acetoxybetulinová (LXX) reagovala s ozonem za vzniku dvou majoritních produktů, které se po redukčním zpracování sjednotily v kyselinu 3 β -acetoxyplatanovou (10) (schéma 22). ^1H NMR spektrum je shodné se spektrem autentického preparátu.³⁵

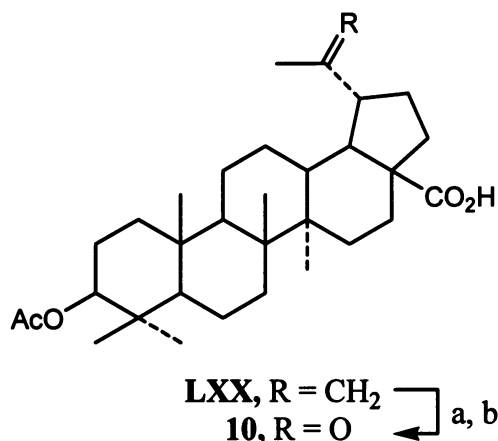


Schéma 22:

a: O₃ / CHCl₃, MeOH (-80°C.); b: DMS (r.t.)

3.1.6. Dien 4

Ozonizaci dienu 4 by bylo teoreticky možné použít jako alternativní způsob syntézy vysoce cytotoxicky aktivní β -ketokyseliny XVII (schéma 23), avšak došlo pouze ke štěpení dvojné vazby v pozici 21, 22 za vzniku dvou majoritních produktů (schéma 24). Struktura těchto produktů byla navržena na základě spektrálních dat. Jedná o stereoizomerní methylethery 11 a 12.

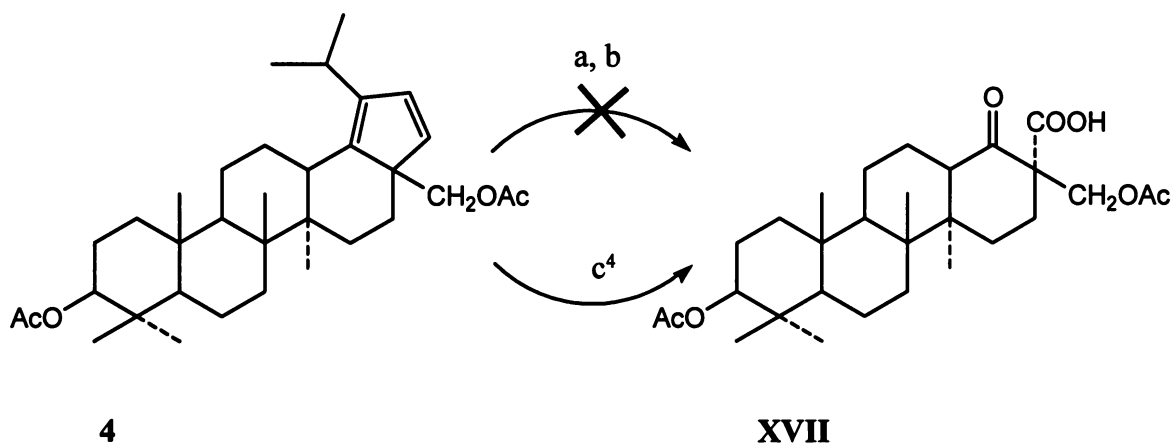


Schéma 23: a: O₃ / CHCl₃, MeOH (-80°C.); b: DMS (r.t.); c: RuO₄ / EtOAc, H₂O (r.t.)

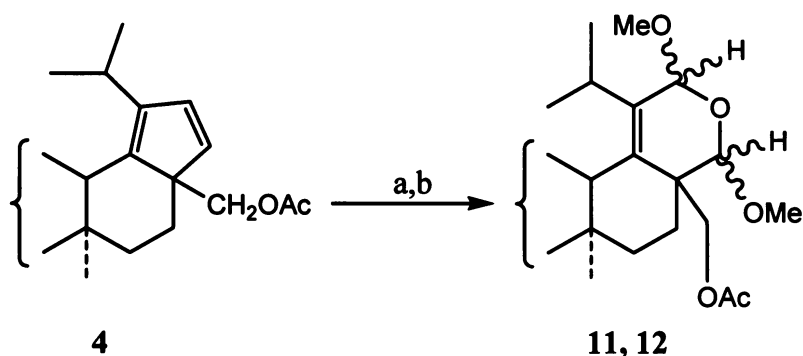


Schéma 24: a: O₃ / CHCl₃, MeOH (-80°C); b: DMS (r.t.)

V IČ spektrech obou látek byly přítomny pásy odpovídající vibracím $\nu(\text{C-O})$ a $\nu(\text{C=C})$ a nebyl nalezen pás odpovídající vibraci $\nu(\text{O-H})$. V ¹H NMR spektrech byly nalezeny kromě signálů typických pro deriváty lupanu též dva singlety methoxylových skupin při $\delta \sim 3.5$ ppm resp. $\delta \sim 3.51$ ppm. ¹³C NMR spektra obou látek obsahovala dva signály C-18 a C-19 při $\delta \sim 137$ ppm indikující přítomnost dvojné vazby, signály dvou methoxylových skupin při $\delta \sim 55$ ppm a signály C-21 a C-22 při $\delta \sim 98$ ppm typické pro uhlíky, na něž jsou σ vazbou vázány dva kyslíkové atomy. V MS obou látek nebyly nalezeny molekulové ionty, byly však nalezeny ionty odpovídající ztrátám methoxylového radikálu, molekuly methanolu, kyseliny octové, 43 hmotnostních jednotek a ionty odpovídající kombinacím uvedených ztrát. Pro určení konfigurace produktů na C-21 a C-22 by bylo zapotřebí též 2D NMR spekter, jejichž měření je však nad rámec této práce a bude součástí diplomové práce.

3.2. Ozonizace allobetulinových derivátů

Pro ozonizace derivátů allobetulinu byl použit tentýž modifikovaný postup,^{18,19,28} jako v případě ozonizací lupanových derivátů.

3.2.1. Methylenketon LXXI

V případě ozonizace methylenketonu LXXI byl získán známý³³ diosfenol 13 (453 mg; 87 %) (schéma 25), jehož struktura byla potvrzena shodou ¹H NMR spektra s dřívějším preparátem³³.

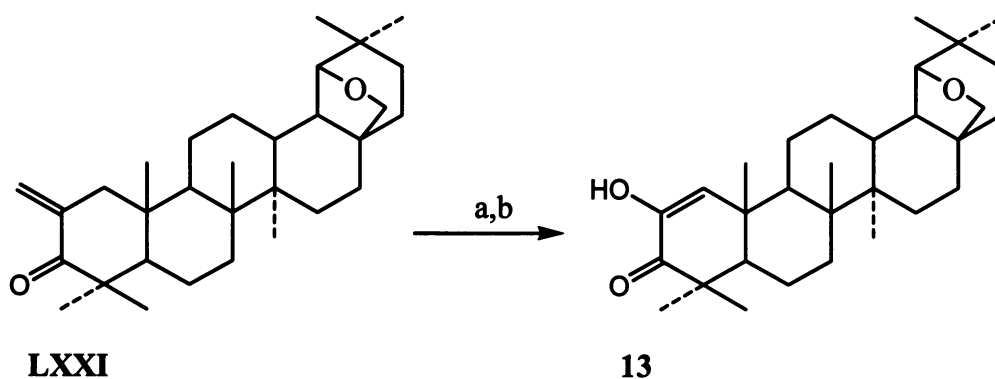


Schéma 25: a: $O_3 / CHCl_3, MeOH (-80^\circ C.)$; b: DMS (r.t.)

3.2.2. Olefin 5

Ozonizací derivátu **5** (schéma 26) s dvojnou vazbou v poloze 1,2 a následným zpracováním DMS vznikla směs produktů výrazně polárnějších než výchozí olefin **5**. V úvahu připadalo štěpení dvojně vazby za vzniku dikyseliny jako jednoho z produktů, proto byla směs methylována diazomethanem. Následným dělením dvou majoritních složek pomocí HPLC byly získány dva stereoizomery **14** a **15**, jejichž struktura byla navržena na základě spektrálních dat. V IČ spektrech obou methyletherů nebyly přítomny $\nu(O-H)$. V 1H NMR spektrech obou methyletherů **14** a **15** byly kromě signálů typických pro tento typ skeletu nalezeny také dva singlety methoxylových skupin při $\delta \sim 3.45$ ppm resp. $\delta \sim 3.5$ ppm. ^{13}C NMR spektra obou stereoizomerů **14** a **15** obsahovala signály C-2 a C-3 při $\delta \sim 100$ ppm, charakteristické pro uhlík nesoucí dva kyslíky vázané σ vazbou a dále signály dvou methoxylových skupin při $\delta \sim 55$ ppm. V MS spektrech nebyl nalezen molekulový iont, byly však přítomny ionty odpovídající ztrátám methoxylového radikálu, methylového radikálu, molekuly methanolu, molekuly formaldehydu a vzájemným kombinacím uvedených ztrát. Pro určení konfigurace produktů na C-2 a C-3 by bylo zapotřebí též 2D NMR spekter, jejichž měření je však nad rámec této práce a bude součástí diplomové práce.

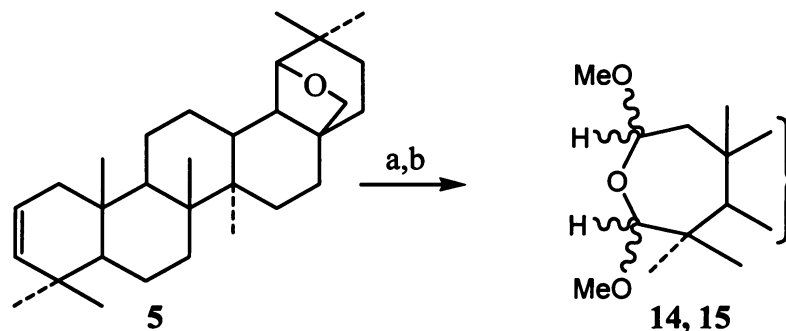


Schéma 26: a: $O_3 / CHCl_3, MeOH (-80^\circ C.)$; b: DMS (r.t.)

4. Cytotoxická aktivita připravených sloučenin

Celkem bylo na *in vitro* cytotoxickou aktivitu metodou MTT-testu³⁷ na nádorové linii CEM (T-lymfoblastická leukémie) testováno 5 připravených sloučenin 4, 7 - 10. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 1. Cytotoxickou aktivitu charakterizuje index IC_{50} , který představuje minimální koncentraci testované sloučeniny (v $\mu\text{mol/l}$) usmrcující právě 50 % nádorových buněk. Za aktivní se považuje sloučenina, jejíž $IC_{50} < 10 \mu\text{mol/l}$. Derivát s hodnotou $IC_{50} = 250 \mu\text{mol/l}$ se již považuje za zcela neúčinný.

Tabulka3: *In vitro* cytotoxické aktivity sloučenin připravených v rámci této práce na buněčné linii CEM

sloučenina	IC_{50} ($\mu\text{mol/l}$) CEM
4	250.00
7	250.00
8	130.42
9	71.27
10	114.52

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Obecné poznámky k experimentální části

Teploty tání byly stanoveny na bodotávku Büchi B-545 a jsou korigovány.

Specifické optické otáčivosti byly měřeny v chloroformu na polarimetru AUTOMATIC POLARIMETER, Autopol III (Rudolph research, Flanders, New Jersey) a jsou uváděny v jednotkách [10^{-1} Deg $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$], koncentrace, c [g/100 ml] jsou udávány u každé hodnoty specifické optické otáčivosti.

IR spektra byla měřena v chloroformu na spektrometru Nicolet Avatar 370 FTIR. Vlnočty jsou uvedeny v cm^{-1} .

NMR spektra byla měřena na přístroji Varian ^{UNITY}INOVA – 400 (^1H při 399.95 MHz, ^{13}C při 100.58 MHz) v roztoku v CDCl_3 , v případě látek obtížně rozpustných s přídavkem CD_3OD , což je uvedeno u výpisu spektra. Pro ^1H MNR spektra byl jako vnitřní standard použit tetramethylsilan. Chemické posuny ^{13}C NMR spekter byly referencovány vůči $\delta(\text{CDCl}_3) = 77.00$ ppm. Multiplicita signálů v ^{13}C NMR spektrech byla určena z DEPT spekter. 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 na jedno místo.

MS EI byla měřena na přístroji Shimadzu QP 2010, teplota iontového zdroje byla 150 °C, zavedení vzorku bylo provedeno přímým vstupem, energie ionizujících elektronů byla 75 eV.

Průběh reakcí a čistota vzorků byla sledována pomocí TLC na fóliích Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck). Detekce TLC fólií byla prováděna nejprve UV zářením (model UVS – 54; 254 nm) a poté postřikem 10 % kyselinou sírovou a zahřátím na 110 – 200 °C. Eluční soustavy pro vyvíjení TLC fólií jsou vždy uvedeny u experimentu.

Pro sloupcovou chromatografii byl používán Kieselgel 60 (63 – 200 μm ; Merck 7734). Mobilní fáze pro sloupcovou chromatografii jsou taktéž uvedeny vždy u experimentu.

Používaný HPLC systém měl následující uspořádání: vysokotlaké čerpadlo Gilson (model 321-322), nástřikový ventil RHEODYNE, preparativní HPLC kolona (Labio 50x250 mm, sorbent Biospher Si120, 7 μm), RI-detektor (Lab. přístroje Praha), propojený přes RS-232 s PC s programem Chromulan 1.20 a automatický sběrač frakcí Gilson (model 206). Mobilní fáze pro HPLC jsou označeny čísly, které udávají objemové procento ethyl-acetátu v n-hexanu.

K odpařování byla použita RVO (Büchi Rotovapor R-200).

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

Chlazení roztoku během ozonizace bylo zajišťováno cryocoolerem Huber TC 100 E (Merci, s.r.o.).

Veškerá rozpouštědla používaná pro reakce, krystalizace a chromatografie byla předem destilována. Suchý THF byl získáván destilací v destilační smyčce s draslíkem a benzofenonem. DMS, TF_2O a komplex $\text{BH}_3\text{-DMS}$ v THF byly zakoupen od firmy Sigma-Aldrich, s.r.o. Výchozí látky I, LXV, LXVI, LXVII, LXVIII, LXIX, LXX, LXXI, které nebyly připraveny v rámci této práce, jsou majetkem laboratoře RNDr. Jana Šarka Ph.D.

Obecný postup ozonizace

Veškeré ozonizace triterpenoidů byly prováděny v digestoři (rovněž zpracování reakčních směsí) v roztoku chloroformu (50 ml) a MeOH (10 ml) na 0.1 mmol výchozí látky. Roztok byl vychlazen v ethanolické lázni cryocoolerem na $-80\text{ }^\circ\text{C}$ a poté byl z ozonizátoru do roztoku zaváděn ozonizovaný vzduch při průtoku 5 l/min (0.1 % ozonu v ozonizovaném vzduchu). Doba reakce činila obvykle 10 – 30 min. Přebytečný ozon byl odveden proudem čistého vzduchu po dobu alespoň 5 min. Zpracování reakční směsi bylo prováděno přidávkem 2 ml DMS do reakční směsi a ta byla za míchání ponechána vytemperovat na r.t., (kontrola pomocí TLC). Reakční směs byla vytřepána vodou (3 x 25 ml) do neutrální reakce a rozpouštědla byla odpařena na RVO.

1. Izolace kyseliny betulinové (1)

Kyselina betulinová (1) byla izolována¹⁶ extrakcí vysušené platanové kůry (1.50 kg) methanolem a po odpaření rozpouštědel byla získána surová kyselina 1 (15.07 g; 1 %), která

byla pro další reakce čištěna krystalizací z methanolu. T.t $306\text{ }^\circ\text{C}$ (MeOH), $[\alpha]_{\text{D}} +8$ (c 0,27)

Lit.¹⁶ udává t.t. $305 - 306\text{ }^\circ\text{C}$ (MeOH), $[\alpha]_{\text{D}} +8$ (c 0,37; CHCl_3)

2. Příprava betulin-diacetátu (2)

Podle literárního postupu¹⁴ byl surový betulin (I) (50.00 g; 0.11 mol) acetylován acetanhydridem v pyridinu při $100\text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 3 hod a směs byla poté ponechána zchladnout

na r.t.. Produkt vykrytalizoval z reakční směsi a dále byl čištěn filtrací pře sloupec oxidu hlinitého a rekrystalizací z butanonu. Byl získán chromatograficky jednotný betulin-diacetát (**2**) (10.60 g; 25 %) o t.t. 224 °C (CHCl₃/MeOH), [α]_D +21 (c 0.26).

Lit.¹⁴ uvádí t.t. 222 – 224 °C (CHCl₃/MeOH), [α]_D +21 (c 0.45; CHCl₃);

3. Příprava lup-18-enu **3**

Betulín-diacetát (**2**) (5.07 g; 9.51 mmol) byl izomerizován podle literárního postupu¹⁴ bromovodíkem ve směsi benzenu, acetanhydridu a kyseliny octové, přičemž byl získán lup-18-en **3** (3.54 g; 70 %) jako bezbarvé krystalky o t.t. 215 °C, [α]_D +14 (c 0.24). ¹H NMR je shodné s autentickým preparátem¹⁴.

Lit.¹⁴ uvádí t.t. 215 – 217 °C, [α]_D +15°(c 0,25; CHCl₃)

4. Příprava dienu **4**

Dien **4** byl připraven podle literárního postupu.³⁰

K roztoku ketosloučeniny **LXIX** (10.00 g; 18.50 mmol) v suchém THF (100 ml), vychlazeného v ledové lázni, byl přidán komplex BH₃-Me₂S (30 ml; 60.00 mmol; 2M). Reakce byla míchána 15 min; kontrola dle TLC (EtOAc:toluen, 1:1). Reakce byla ukončena přidáním EtOH a H₂O a po odeznění reakce byla do směsi přidána zředěná HCl (50 ml; 1:4) a reakční směs byla extrahována EtOAc. Spojené organické fáze byly vytřepány nasyceným roztokem NaHCO₃ a vodou do neutrální reakce a rozpouštědla byla odpařena na RVO. Takto připravený dien **A2** byl acetylován Ac₂O (30 ml) v pyridinu (30 ml) přes noc. Po zředění vodou (100 ml) a přidavku HCl (50 ml; 1:4) byl produkt extrahován do EtOAc a spojené organické fáze byly vytřepány HCl (1:4), H₂O a nasyceným roztokem NaHCO₃ do neutrální reakce. Chromatografií na silikagelu (eluce toluenem) a krystalizací z butanonu byl získán chromatograficky jednotný dien **4** (7.90 g; 81 %) o t.t. 257 °C, [α]_D + 5 (c 0.21), který byl dle ¹H NMR spektra identický s dřívějším vzorkem³⁰.

Lit.³⁰ uvádí t.t. 253 – 258 °C, [α]_D +5 (c 0.36).

5. Příprava olefinu **5**

Olefin **5** byl připraven modifikovaným literárním postupem²⁹. Do roztoku allobetulinu (**LXVI**) (1.00 g; 2.25 mmol) v dichlormethanu (20 ml) byl za r.t. pomalu přidáván Tf₂O (0.5 ml; 2.98 mmol) a směs byla ponechána 30 min reagovat. Reakční směs byla zředěna vodou (50 ml) a 5× vytřepána vodou. Organická fáze byla odpařena na RVO a

po krystalizaci z CHCl_3 a MeOH byl získán olefin **5** (877 mg; 91 %) o t.t. 242 °C, $[\alpha]_{\text{D}} +81$ (c 0.28). ^1H NMR spektrum se shoduje se spektrem autentického preparátu²⁹.

Lit.²⁹ uvádí t.t. 240-243, $[\alpha]_{\text{D}} +81$ (c 0.22).

6. Ozonizace betulin-diacetátu (**2**)

Podle obecného postupu ozonizace byl z betulin-diacetátu (**2**) (510 mg; 0.97 mmol) získán norketon **6** (70 mg; 14 %) o t.t. 189 °C (MeOH), $[\alpha]_{\text{D}} -11,3$ (c 0.21), ^1H NMR spektrum je shodné se spektrem autentického preparátu.²⁸

Lit.²⁸ uvádí t.t. 188 -189 °C, $[\alpha]_{\text{D}} -11$ (c 1; CHCl_3).

7. Ozonizace 18-lupenu **3**

Lupen **3** (2.00 g; 3.80 mmol) byl ozonizován podle obecného postupu za vzniku komplikované směsi produktů, která byla chromatografována na silikagelu (mobilní fáze toluen). Byly získány dvě frakce s různou majoritní složkou. Z první frakce (925 mg) byl separací HPLC (mobilní fáze 10) a krystalizací ze směsi MeOH/acetone izolován epoxid **7** (712 mg; 35 %) ve formě bílých monokrystalů o t.t. 208 °C, $[\alpha]_{\text{D}} +37$ (c 0.25). Lit.¹⁹ uvádí t.t. 210 °C, $[\alpha]_{\text{D}} +36.6$.

IČ spektrum: 1255 (C-O), 1724 (C=O). ^1H NMR spektrum: 0.84 s, 0.86 d (J=6,8), 0.96 s, 0.98 s, 1.03 d (J=6.8), 1.06 s, 1.12 s, 7x 3H (7x CH_3); 2.05 s, 2.08 s, 2x 3H (2x OAc); 2.31 m, 1H ($\Sigma J=6.9$, H-13 β); 3.81 d, 1H (J=11.2, H-28a); 4.19 d, 1H (J=11.0, H-28b); 4.47 m, 1H ($\Sigma J=16.1$, H-3 α). ^{13}C NMR spektrum je uvedeno v tabulce 4. MS, m/z (%): [Pro $\text{C}_{34}\text{H}_{54}\text{O}_5$, M^+ 542], 542 (M^+ , 15), 527 (1), 499 (3), 483 (7), 469 (27), 439 (2), 407 (3), 379 (1), 323 (1), 279 (20), 249 (3), 229 (3), 219 (18), 210 (8), 203 (9), 189 (13).

Z druhé frakce (397 mg) byl separací HPLC (mobilní fáze 17) a následnou lyofilizací získán ozonid **8** (346 mg; 16 %) o t.t. 161 °C, $[\alpha]_{\text{D}} +15$ (c 0.21). IČ spektrum: 1255 (C-O), 1725 (C=O). ^1H NMR spektrum: 0.84 s, 3H; 0.85 s, 3H; 1.01 m, 12H; 1.13 s, 3H; (7x CH_3); 2.05 s, 2.07 s, 2x 3H (2x OAc); 3.98 d, 1H (J=10.5, H-28a); 4.41 d, 1H (J=10.7, H-28b); 4.48 m, 1H ($\Sigma J=16.4$, H-3 α). ^{13}C NMR spektrum je uvedeno v tabulce 4. MS, m/z (%): [Pro $\text{C}_{34}\text{H}_{54}\text{O}_7$, M^+ 574], 574 (M^+ , 4), 514 (3), 499 (2), 471 (3), 455 (2), 443 (3), 414 (1), 395 (2), 284 (1), 267 (1), 239 (2), 225 (2), 211 (3), 197 (4), 189 (16).

8. Ozonizace 21-oxo-lupenu LXV

Ozonizace 21-oxo-lupenu LXV (1.10 g; 2.04 mmol) byla prováděna podle obecného postupu, dle kontroly TLC (hexan:EtOAc, 1:1) reakční směs obsahovala pouze výchozí keton LXV. Reakce byla prováděna analogicky také při teplotách -30 °C, -10 °C, 0 °C a při r.t.. Dle TLC reakční směs obsahovala vždy pouze keton LXV. Po zpracování DMS a krystalizaci z methanolu bylo ¹H NMR spektrum izolované sloučeniny shodné se spektrem výchozího ketonu LXV.

9. Ozonizace 21,22-dioxo-lupenu (LXVII)

Podle obecného postupu byl ozonizován dion LXVII (2.00 g; 3.61 mmol), dle kontroly TLC (toluen:ether, 6:1) obsahovala reakční směs pouze výchozí dion LXVII. Reakce byla opakována při -30 °C, 0 °C a při r.t., v reakční směsi byl však vždy přítomen pouze výchozí dion LXVII.

10. Ozonizace anhydridu LXVIII

Podle obecného postupu byl ozonizován anhydrid LXVIII (1.00 g; 1.75 mmol), dle kontroly TLC (toluen:ether, 10:1) obsahovala reakční směs pouze výchozí anhydrid LXVIII.

11. Ozonizace kyseliny betulinové (1)

Kyselina 1 (354 mg; 0.77 mmol) byla ozonizována podle obecného postupu. Po odpaření rozpouštědel a krystalizaci ze směsi MeOH/acetone byla získána kyselina platanová (9) (298 mg; 84 %) ve formě bílých krystalků o t.t. 282 °C, $[\alpha]_D -31$ (c 0.23). ¹H NMR spektrum je shodné se spektrem autentického preparátu.³⁵

Lit.^{34,35} uvádí t.t. 280-282 °C, $[\alpha]_D -31$

12. Ozonizace kyseliny 3β-acetoxylupenu (LXX)

Ozonizací kyseliny LXX (5.00 g; 10.04 mmol) podle obecného postupu a krystalizací surového produktu ze směsi MeOH/acetone byla získána kyselina 3β-acetoxylupenu (10) (3.75 g; 75 %) ve formě drobných krystalků o t.t. 253 °C, $[\alpha]_D -9$ (c 0.26). ¹H NMR spektrum je shodné se spektrem autentického preparátu.³⁵

Lit.³⁶ uvádí t.t. 252 - 255 °C, $[\alpha]_D -10$

13. Ozonizace hydroxyketonu LXIX

Podle obecného postupu byl ozonizován nenasycený hydroxyketon LXIX (1.05 g, 2.10 mmol). Dle kontroly TLC (toluen: EtOAc, 2:1) obsahovala reakční směs pouze výchozí keton LXIX a to i v případě opakování ozonizace při -30 °C a při r.t. po dobu 45 min.

14. Ozonizace dienu 4

Dien 4 (500 mg; 0.95 mmol) byl ozonizován podle obecného postupu za vzniku dvou majoritních produktů, které byly děleny HPLC (mobilní fáze 19) a po následné krystalizaci z MeOH byly získány methyletery 11 (22 mg; 4 %) a 12 (186 mg; 32 %). Methylether 11 měl t.t. 218 °C, $[\alpha]_D +130$ (c 0.23). IČ spektrum: 1255 (C-O), 1608 (C=C), 1725 (C=O). ^1H NMR spektrum: 0.84 s, 0.84 s, 0.88 s, 0.95 s, 0.99 d (J=6.8), 1.03 d (J=6.4), 1.09 s, 7x 3H (7x CH₃); 2.02 s, 2.05 s, 2x 3H (2x OAc); 2.71 m, 1H ($\Sigma J=15.4$, H-13); 3.25 sept., 1H ($\Sigma J=15.2$, H-20); 3.46 s, 3.51 s, 2x 3H (2x OCH₃); 4.08 d, 1H (J=11.2, H-28a); 4.40 d, 1H (J=11.2, H-28b); 4.48 m, 1H ($\Sigma J=20.5$, H-3 α); 4.65 s, 1H (H-21); 5.07 s, 1H (H-22). ^{13}C NMR spektrum je uvedeno v tabulce 4. MS, m/z (%): [Pro C₃₆H₅₈O₇, M⁺ 602], 571 (8), 559 (58), 539 (2), 510 (10), 497 (1), 482 (22), 467 (2), 450 (11), 439 (10), 407 (2), 321 (3), 307 (7), 279 (2), 265 (4), 249 (5), 235 (5), 219 (13), 203 (13), 189 (25).

Methylether 12 měl t.t. 159 °C, $[\alpha]_D +81$ (c 0.23). IČ spektrum: 1255 (C-O), 1608 (C=C), 1725 (C=O). ^1H NMR spektrum: 0.74 s, 0.90 s, 0.90 s, 1.03 s, 1.07 s, 1.15 d (J=7.2), 1.30 d (J=6.8), 7x 3H (7x CH₃); 1.67 s, 1.76 s, 2x 3H (2x OAc); 2.71 dd, 1H (J=3.05, J'=12.82, H-13 β); 3.32 s, 3.35 s, 2x 3H (2x OCH₃); 3.36 m, 1H ($\Sigma J=21.1$, H-20); 4.48 d, 1H (J=11.0, H-28a); 4.71 d, 1H (J=4.6, H-28b); 4.76 m, 1H ($\Sigma J=22.9$, H-3 α); 4.92 s, 1H (H-21); 5.22 s, 1H (H-22). ^{13}C NMR spektrum je uvedeno v tabulce 4. MS, m/z (%): [Pro C₃₆H₅₈O₇, M⁺ 602], 571 (27), 559 (97), 539 (2), 527 (2), 510 (3), 479 (7), 482 (25), 467 (2), 450 (11), 439 (7), 425 (1), 407 (2), 307 (20), 280 (3), 265 (12), 251 (6), 235 (7), 219 (10), 203 (14), 189 (24).

15. Ozonizace methylenketonu LXXI

Podle obecného postupu byl ozonizován methylenketon LXXI (518 mg, 1.15 mmol) za vzniku směsi produktů, kde majoritu tvořil diosfenol 13. Dělení surového odparku HPLC (mobilní fáze 15) a následná krystalizace ze směsi MeOH / aceton poskytla diosfenol 13 (353 mg; 68 %) o t.t. 234 °C, $[\alpha]_D +83$ (c 0.29), který byl dle ^1H NMR spektra identický s dřívějším preparátem³³.

Lit.³³ uvádí t.t. 235 °C (ether), $[\alpha]_D +83$ (c 0.27)

16. Ozonizace olefinu 5

Ozonizace olefinu 5 (509 mg; 1.20 mmol) podle obecného postupu vedla ke komplikované směsi produktů, výrazně polárnějších než výchozí olefin 5, přičemž obsahovala dvě majoritní složky o blízkém R_F . Po odpaření rozpouštědel na RVO a methyloci surového odparku diazomethanem v pyridinu byly dělením reakční směsi HPLC (mobilní fáze 19) a následnou krystalizací ze směsi methanolu a acetonu izolovány dvě sloučeniny – stereoizomerní methyletery 14 (123 mg; 20 %) a 15 (96 mg; 15 %). Methylether 14 měl t.t. 260 °C, $[\alpha]_D + 122$ (c 0.27). IČ spektrum: 1024 (C-O), 1111 (C-O). ^1H NMR spektrum: 0.78 s, 0.88 s, 0.91 s, 0.93 s, 0.98 s, 1.04 s, 1.06 s, 7× 3H (7× CH₃); 2.18 m, 1H ($\Sigma J=20.5$, H-1b); 3.43 s, 3.51 s, 2× 3H (2× OCH₃); 3.45 s, 1H (H-19 α); 3.52 d, 1H ($J=9.2$, H-28b); 3.76 d, 1H ($J=9.2$, H-28a); 4.45 s, 1H (H-3); 4.58 dd, 1H ($J=10.4$, $J'=5.2$, H-2). ^{13}C NMR spektrum je uvedeno v tabulce 4. MS, m/z (%): [Pro C₃₂H₅₄O₄, M⁺ 502], 471 (3), 442 (55), 427 (4), 410 (47), 395 (16), 379 (7), 371 (13), 343 (7), 301 (5), 273 (17), 257 (6), 245 (32), 232 (6), 215 (14), 207 (55), 191 (29), 175 (75).

Methylether 15 měl t.t. 201.3 °C, $[\alpha]_D + 68.5$ (c 0.23). IČ spektrum: 1030 (C-O), 1106 (C-O). ^1H NMR spektrum: 0.80 s, 0.88 s, 0.93 s, 0.93 s, 0.95 s, 1.00 s, 1.02 s, 7× 3H (7× CH₃); 1.73 dd, 1H ($J=14.4$, $J'=10.4$, H-1 α); 2.14 dd, 1H ($J=14.4$, $J'=3.7$, H-1 β); 3.44 d, 1H ($J=7.9$, H-28b); 3.49 s, 3.49 s, 2× 3H (2× OCH₃); 3.53 s, 1H (H-19 α); 3.77 d, 1H ($J=7.6$, H-28a); 4.27 s, 1H (H-3); 4.59 dd, 1H ($J=10.4$, $J'=3.7$, H-2). ^{13}C NMR spektrum je uvedeno v tabulce 4. MS, m/z (%): [Pro C₃₂H₅₄O₄, M⁺ 502], 471 (3), 456 (1), 442 (42), 427 (3), 410 (43), 395 (15), 379 (6), 371 (12), 341 (5), 323 (4), 301 (4), 273 (12), 257 (5), 245 (23), 232 (5), 215 (12), 207 (55), 190 (24), 175 (79).

TABULKY ¹³C NMR SPEKTER

Přiřazení signálů ¹³C NMR spekter bylo provedeno na základě DEPT spekter a podle analogií. Signály označené stejnými písmeny mohou být zaměněny.

Tabulka 4:

Atom C	Sloučenina					
	7	8	11	12	14	15
1	38.27	38.29	38.61	39.38	44.61	46.77
2	22.85	23.61	23.65	24.80	99.89	102.00
3	80.79	80.77	80.80	81.16	103.09	111.04
4	37.71	37.75	37.81	38.69	43.89	43.43
5	55.15	55.30	55.68	56.59	59.40	53.81
6	18.13	18.13	18.05	18.99	19.86	20.15
7	33.56	32.99	34.42	35.19	34.06	33.62
8	40.95	40.14	42.15	43.07	41.22 ^a	40.92 ^a
9	49.53	49.86	52.17	53.08	47.81	48.37
10	36.94	36.97	37.09	37.88	40.92	40.04
11	20.32	19.21	22.71	23.52	22.53	22.66
12	23.36	20.10	28.67	29.85	26.26 ^b	26.24 ^b
13	34.43	36.07	42.80	44.16	34.31	34.39
14	44.36	41.61	44.09	45.71	41.11 ^a	40.86 ^a
15	26.68	25.98	26.66	28.96	26.65	26.63
16	26.87	26.13	28.96	30.23	36.64	36.62
17	45.16	43.42	44.83	45.74	41.43	41.42
18	73.59	111.21	138.12	138.94	46.52	46.53
19	72.87	111.13	135.64	137.82	87.70	87.76
20	28.91	33.53	27.13	29.11	36.21	36.22
21	28.04	27.81	97.70	97.33	32.65	32.67
22	23.59	25.66	98.65	102.82	26.23 ^b	26.24 ^b
23	27.87	27.90	27.86	28.73	27.97	27.64
24	16.05	15.92	19.48	20.16	14.55	15.49
25	16.48	16.45	16.95	17.73	16.83	21.51
26	16.16	16.07	16.86	17.49	14.64	16.47
27	14.78	15.32	16.48	17.37	13.10	13.16
28	65.30	67.02	64.45	69.19	71.25	71.25
29	19.24	17.07	21.91	21.57	24.53	24.55
30	19.17	16.90	23.48	24.90	28.76	28.77
28-OCOCH ₃	171.25	171.14	171.04 ^a	170.96	-	-
28-OCOCH ₃	21.04	20.62	21.28	21.16	-	-
3β-OCOCH ₃	170.97	171.02	171.04 ^a	170.71	-	-
3β-OCOCH ₃	21.31	21.32	21.34	21.21	-	-
OCH ₃	-	-	57.22 ^b	56.48 ^a	56.45 ^c	56.45 ^c
OCH ₃	-	-	54.67 ^b	55.17 ^a	55.97 ^c	55.97 ^c

ZÁVĚR

1. Byla provedena literární rešerše ozonizací triterpenoidů.
2. Byly syntetizovány, nebo izolovány z přírodního materiálu tyto výchozí olefiny: kyselina betulinová (1), betulin-diacetát (2), lup-18-en 3, dien 4 a olefin 5.
3. Byly provedeny ozonizace těchto olefinů: kyselina betulinová (1), betulin-diacetát 2, 18-lupen 3, výše oxidované deriváty LXV, LXVII, LXVIII, LXIX, kyselina 3 β -acetoxybetulinová LXX, dien 4, methylenketon LXXI a olefin 5.
4. Bylo připraveno celkem 5 nových látek: ozonid 8, dimethoxyderiváty 11, 12, 14 a 15. Struktura známého epoxidu 7 byla poprvé jednoznačně prokázána na základě rentgenostrukturní analýzy připraveného monokrystalu epoxidu 7.
5. Sloučeniny 4, 7, 8, 9, 10 byly otestovány na *in vitro* cytotoxickou aktivitu vůči buněčné linii CEM metodou MTT testu na pracovišti LEM, FN Olomouc.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Hajdúch M., Džubák P., Šarek J.: *Klin Farmakol Farm*, **18**, 14 (2004)
2. Urban M., Šarek J., Klinot J., Kořínková G., Hajdúch M.: *J. Nat. Prod.*, **67**, 1100 (2004).
3. Džubák P., Šarek J., Cwiertka K., Hajdúch M., Vydra D.: *Klin Farmakol Farm*, **18**, 96 (2004).
4. Šarek J., Klinot J., Džubák P., Klinotová E., Nosková V., Křeček V., Kořínková G., Thomson J. O., Janošťáková A., Wang S., Parsons S., Fischer P. M., Zhelev N. Z., Hajdúch M.: *J. Med. Chem.* **46**, 5402 (2003).
5. Dzubak P., Hajduch M., Vydra D., Hustova A., Kvasnica M., Biedermann D., Markova L., Urban M., Sarek J.: *Nat. Prod. Rep.* **23**, 394 (2006).
6. Simonsen J., Ross W. C. J.: *The Terpenes IV*, vol. 4, Cambridge University Press, (1957).
7. Kasprzyk Z., Sliwowski J., Skwarko B.: *Phytochemistry* **11**, 1961 (1972).
8. Kim D. S. H. L., Pezzuto J. M., Pisha E.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **8**, 1707 (1998).
9. Ryu S. Y., Choi S. U., Lee S. H., Lee Ch. O., No Z., Ahn J. W.: *Arch. Pharm. Res.* **17**, 375 (1994).
10. Fulda S., Jeremias I., Pietsch T., Debatin K. M.: *Int. J. Cancer* **82**, 435 (1999).
11. Urban M., Sarek J., Tislerova I., Dzubak P., Hajduch M.: *Bioorg. Med. Chem.* **13**, 5527 (2005).
12. Hajduch M., Sarek J.: Triterpenoid derivatives. PCT Int. Patent Appl. WO0190046, 23 May 2001.
13. Kim J. Y., Koo H. M., Kim D. S. L.: *Bioorg. Med. Chem. Lett* **11**, 2405 (2001).
14. Šarek J. : Dizertační práce. Univerzita Karlova v Praze, Praha 2003.
15. Delporte C. L., Backhouse C. N., Erazo S., Negrete R. E., Silva C., Hess A., Munoz O., Garcia-Gravalos M. D., San Feliciano A.: *Phytother. Res.* **11**, 504 (1997).
16. Urban M.: Dizertační práce. Univerzita Karlova v Praze, Praha 2005.
- 16a. <http://encyclopedia.thefreedictionary.com/Ozonolysis>
- 16b. Criegee R.: *Angew. Chem.* **87**, 765 (1975)
17. Geletneky, C.; Berger, S.: *Eur. J. Org. Chem.* **8**, 1625-1627 (1998).
18. Sukoas E., Hase T.: *Acta Chem. Scand.* **31**, 331 (1977).
19. Sukoas E., Hase T.: *Acta Chem. Scand.* **31**, 633 (1977).

20. Ruzicka L., Rey E.: *Helv. Chim. Acta*, **25**, 171 (1942).
21. Ruzicka L., Volli E., Jeger O., *Helv. Chim. Acta*, **28**, 1628 (1945).
22. García-Granados A., López E. P., Melguizo E., Parra A., Simeo Y.: *Tetrahedron* **60**, 3831 (2004).
23. Rücker G., Manns D., Schenkel E. P., Hartmann R., Heinzmann B. M.: *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **336**, 205 (2003).
24. Murphy W. S., Cocker D.: *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 2565 (1977).
25. Akiyama E., Tada M., Tsuyuki T., Takahashi T.: *Chemistry Letters* **3**, 305 (1978).
26. Cohen Z., Keinan E., Mazur Y., Ulman A.: *J. Org. Chem.* **41**, 2561 (1976).
27. Paryzek Z., Martynov J.: *Can. J. Chem.* **66**, 2130 (1988).
28. Tietze L. F., Heinzen H., Moyna P., Rischer M., Neunaber H.: *Liebigs Ann. Chem.* 1245 (1991).
29. Biedermann D.: Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Praha 2003.
30. Míšek J.: Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Praha 2004.
31. Biedermann D., Sarek J., Klinot J., Hajduch M., Dzubak P.: *Synthesis* 1157 (2005).
32. Kvasnica M., Tislerova I, Sarek J., Sejbál J. and Cisarova I.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* **70**, 1447 (2005).
33. Urban M.: Nepublikované výsledky.
34. Denisenko M. V., Odinokova L. E., Denisenko V. A., Uvarova N. I.: *Khim. Prir. Soedin.* **3**, 430 (1990).
35. Samoshina N. F., Denisenko M. V., Denisenko V. A., Uvarova N. I.: *Khim. Prir. Soedin.* **6**, 475 (2003)
36. Vystřil A., Budesinsky M.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* **35**, 295 (1970).
37. Hajdúch M., Mihál V., Minařík J., Faber E., Šafářová M., Weigl E., Antálek P.: *Cytotechnology* **19**, 243 (1996).

PODĚKOVÁNÍ

Závěrem této práce bych chtěl poděkovat všem lidem, kteří mi byli nápomocni při jejím sepsování. Nejvíce bych chtěl poděkovat svému školiteli, RNDr. Janu Šarkovi Ph.D., za množství času, které mi věnoval, za nespočet rad a konzultací, za pomoc s interpretací spekter a za trpělivost v mých začátcích.

Dále bych chtěl poděkovat RNDr. Ivě Tišlerové Ph.D. za měření NMR spekter a pomoc při jejich interpretaci, RNDr. Miroslavu Kvasnicovi za ochotu při měření IČ spekter, RNDr. Martinu Štíchovi za rychlé měření MS spekter, RNDr. Ivaně Císařové CSc. za změření RTG struktury epoxidu 7 a Mgr. Bohuně Šperlichové za měření teplot tání a optických rotací.

Také bych chtěl poděkovat Doc. MUDr. Mariánu Hajdúchovi, Ph.D. a MUDr. Petru Džubákovi z Laboratoře experimentální medicíny FN Olomouc za změření cytotoxické aktivity některých sloučenin.

Nemalý dík patří též všem kolegům z laboratoře za přátelský přístup a příjemné pracovní prostředí a zejména pak Mgr. Lence Markové a Mgr. Davidu Biedermannovi za mnohé rady a ochotnou pomoc při práci, Pavle Spáčilové a Tomáši Kubelkovi za trpělivé sdílení společného pracovního prostoru.

Samozřejmě nemohu opominout svou rodinu, jíž vděčím za umožnění vysokoškolského studia a za psychickou i materiální podporu během jeho průběhu.

PŘÍLOHY

Příloha 1:

Krystalografická data pro epoxid 7. Další parametry upřesňování jsou na příloženém CD.

Experimental

Crystal data

$C_{34}H_{54}O_5$

$M_r = 542.77$

Orthorhombic

$P2_12_12_1$

$a = 7.7402$ (11) Å

$b = 10.6300$ (13) Å

$c = 36.623$ (6) Å

$V = 3013.3$ (8) Å³

$Z = 4$

$D_x = 1.196$ Mg m⁻³

D_m not measured

Mo $K\alpha$ radiation

$\lambda = 0.71069$ Å

Cell parameters from 24428 reflections

$\theta = 2.7$ – 26.5°

$\mu = 0.078$ mm⁻¹

$T = 150$ (2) K

Prism

Colourless

$0.405 \times 0.29 \times 0.18$ mm

Crystal source: synthesized by the authors

Data collection

KM4 CCD diffractometer

φ and ω scans to fill the Ewald sphere

Absorption correction: none

40087 measured reflections

6294 independent reflections

5292 reflections with

$I > 2\sigma(I)$

$R_{int} = 0.0309$

$\theta_{max} = 26.59^\circ$

$h = -9 \rightarrow 9$

$k = -13 \rightarrow 13$

$l = -46 \rightarrow 46$

Refinement

Refinement on F^2

$R[F^2 > 2\sigma(F^2)] = 0.0354$

$wR(F^2) = 0.0831$

$S = 1.010$

6294 reflections

361 parameters

H-atom parameters constrained

$w = 1/[\sigma^2(F_o^2) + (0.0550P)^2 + 0.0000P]$

where $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$

$(\Delta/\sigma)_{max} = 0.001$

$\Delta\rho_{max} = 0.159$ e Å⁻³

$\Delta\rho_{min} = -0.179$ e Å⁻³

Extinction correction: none

Scattering factors from *International Tables for Crystallography* (Vol. C)

Absolute structure: Flack H D (1983), *Acta Cryst.* A39, 876-881

Flack parameter = -0.3 (7)

Příloha 2: Projekce znázorňující stereochemii epoxidu 7 zjištěnou pomocí rentgenové difrakce.

