

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY V
PRAZE**

Katedra organické a jaderné chemie



**PŘÍPRAVA KVARTERNÍCH AMONIOVÝCH SOLÍ
TRITERPENOIDŮ**

David Biedermann

Dizertační práce

Praha 2008

Tato dizertační práce byla vypracována na katedře organické a jaderné chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v letech 2003 – 2008 pod vedením RNDr. Jana Šarka, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem nepředložil tuto dizertační práci ani její podstatnou část k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

David Biedermann

OBSAH

Seznam použitých zkratk	4
Seznam buněčných linií	6
Poznámka k textu	8
<i>Číslování sloučenin</i>	8
<i>Číslování skeletů</i>	8
<i>Používání desetinných teček</i>	9
Úvod	10
Teoretická část	11
Současný stav studované problematiky	12
Historie použití isoprenoidů	12
Biosyntéza isoprenoidů	14
Biologické aktivity isoprenoidů	18
<i>Monoterpeny</i>	18
<i>Seskviterpeny</i>	19
<i>Diterpeny</i>	20
<i>Sesterterpeny</i>	21
Biologické aktivity triterpenoidů	21
<i>Cykloartanové triterpenoidy</i>	23
<i>Lupanové triterpenoidy</i>	23
<i>Oleananové triterpenoidy</i>	24
<i>Ursanové triterpenoidy</i>	26
<i>Friedelanové triterpenoidy</i>	27
<i>Cucurbitanové triterpenoidy</i>	28
Cytotoxická aktivita sloučenin z našeho pracoviště	19
Mechanismus účinku sloučenin z našeho pracoviště	32
Syntetické kvarterní amoniové soli triterpenoidů	33
Cíle dizertační práce	37
Příprava výchozích látek	39
Betulin (Ia)	39
<i>Skladování a příprava materiálu</i>	40
<i>Extrakce</i>	41
<i>Diskuze</i>	41
2'-bromethyl-estery triterpenických kyselin	42

Příprava kvarterních solí vycházejících z betulinu (1a)	45
<i>2'-halogenethyl-estery kyseliny 3e</i>	45
<i>Kvarterní sole esterů 3f, 3g a 3i</i>	47
<i>Hydrochloridy a soli heterocyklických esterů</i>	53
<i>Pokus o přípravu hemisukcinátů kvarterních solí</i>	56
<i>Pokus o přípravu kvarterních solí v poloze 30</i>	57
<i>Příprava soli aminu 9c</i>	59
<i>Reakce 2ξ-brom-19β,28-epoxy-18α-olean-3-onu (10d)...</i>	60
Příprava solí vycházejících z kyseliny betulinové (1b)	62
<i>Kvarterní soli esterů kyseliny betulinové (1b)...</i>	62
Příprava solí vycházející z kyseliny oleanolové (1c)	69
<i>Pokusy o přípravu kvarterní soli v poloze 11 a 12...</i>	69
<i>Příprava kvarterních solí bromethyl-esteru 14a</i>	70
Příprava solí vycházející z kyseliny ursolové (1d)	73
<i>Příprava kvarterních solí bromethyl-esteru 15a</i>	73
Biologická aktivita připravených sloučenin	76
<i>Anti-HIV aktivita připravených sloučenin</i>	76
<i>Protizánětlivá aktivita připravených sloučenin</i>	76
<i>Antimikrobiální aktivita připravených sloučenin</i>	77
<i>Cytotoxická aktivita připravených sloučenin</i>	78
Experimentální část	81
Obecné poznámky k experimentální části	82
Obvyklá zpracování reakčních směsí	84
Obecné postupy	85
Experimentální postupy	86
Závěry	116
Výstupy	118
Příloha	120
Použitá literatura	121
Poděkování	130

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Ac	acetyl
Ac ₂ O	acetanhydrid
AVČR	Akademie Věd České Republiky
DBU	1,8-diazabicyklo[5,4,0]undec-7-en
DMAP	4-dimethylaminopyridin
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
DRIFT	diffuse reflectance infrared fourier transform spectroscopy
EI	electron impact
ESI	electrospray ionisation
Et	ethyl
Et ₂ O	diethylether
EtOH	ethanol
FN	fakultní nemocnice
<i>i</i> -PrOH	propan-2-ol
IC	inhibiční koncentrace (index cytotoxicity)
LEM	laboratoř experimentální medicíny
Me	methyl
MeBr	methylbromid
MeCN	acetonitril
MeOH	methanol
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MRSA	methicilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid
MS	hmotnostní spektroskopie
NBS	<i>N</i> -bromsukcinimid
PCC	pyridiniumchlorochromát
Py	pyridin
r.t.	laboratorní teplota
RaNi	Raneyův nikl
refl.	reflux (var pod zpětným chladičem)
RVO	rotační vakuová odparka
SD	standartní odchylka
<i>t</i> -BuOH	2-methylpropan-2-ol
t.t.	teplota tání
TEA	triethylamin
TI	terapeutický index
TMA	trimethylamin

SEZNAM BUNĚČNÝCH LINIÍ

1A9	lidská rakovina vaječníku
21-MT-1	karcinom prsu
21-MT-2	karcinom prsu
21-NT	karcinom prsu
21-PT	karcinom prsu
26-L5	myší rakovina střev
70N	nenádorové buňky savčího epitelu
A2058	lidský metastázující melanom
A549	lidská rakovina plicního epitelu
ACHN	lidský renální karcinom
AML 193	akutní myelocytální leukémie
AsPC-1	lidský adenokarcinom pankreatu
B16	myší melanom
B16F	myší melanom - metastázující
BT549	lidská rakovina prsu
Caco-2	lidský karcinom střeva
CAPAN-1	karcinom pankreatu
CCRF-CEM	lidská lymfoblastická leukémie
CEM	lidská T-lymfoblastická leukémie
CEM-DNR 1/C2	lidská T-lymfoblastická leukémie, daunorubicin rezistentní
CEM-DNR bulk	lidská T-lymfoblastická leukémie, daunorubicin rezistentní
CEM-VCR 1/F3	lidská T-lymfoblastická leukémie, vinkristin rezistentní
CEM-VCR 3/D5	lidská T-lymfoblastická leukémie, vinkristin rezistentní
CEM-VCR bulk	lidská T-lymfoblastická leukémie, vinkristin rezistentní
Co-115	lidský karcinom střev
COLO-205	lidský kolorektální karcinom
DU145	lidský karcinom prostaty
HeLa	lidský cervikální adenokarcinom
Hep G2	lidský hepatocelulární karcinom
HL-60	monocytální leukémie
HL-60	lidská promyelocytická leukémie
HONE-1	nasofaryngeální karcinom
HT-29	lidský adenokarcinom střev
HTC116p53mut	lidská rakovina střev se změnou exprese p53
HTC116p53wt	lidská rakovina střev se změnou exprese p53
HTC-15	lidská rakovina střev
HTC-8	lidská rakovina střev
K562	lidská chronická myelogenní leukémie
K562 Tax	lidská chronická myelogenní leukémie, taxol rezistentní
K562-ARA-C	lidská chronická myelogenní leukémie, cytarabin rezistentní
K562-CdA	lidská chronická myelogenní leukémie, cladribin rezistentní
K562-FLU D	lidská chronická myelogenní leukémie, fludarabin rezistentní
K562-GEM	lidská chronická myelogenní leukémie, gemcitabin rezistentní
KB	orální epidermoidní karcinom

KB-VIN	orální epidermoidní karcinom vinkristin rezistentní
KG-1	akutní myeloidní leukémie
L-1210	myši lymfatická leukémie
L132	lidské fetální nenádorové plicní buňky
LN-18	lidský glioblastom
LN-229	lidský glioblastom
LN-308	lidský maligní gliom
LNCaP	lidský karcinom prostaty
lymphocytes	lidské lymfocyty
MCF-7	karcinom prsu
MDA-MB-2 38	lidská rakovina prsu
MDA-MB-231	lidský prsní adenokarcinom
MDA-MB-435	karcinom prsu
MDA-MB-486	karcinom prsu
MEL-2	lidský melanom
MEL-3	lidský melanom
ML-1	myeloblastická leukémie
MOLT-4	lidská akutní lymfoblastická leukémie
NB4	promyelocytální leukémie
NCI-H23	lidský karcinom plic
NIH3T3	myši imortalizované fibroblasty
NT2/D1	embryonální karcinom
OVCAR-3	lidský karcinom vaječníku
OVCAR-5	lidský karcinom vaječníku
P-388	myši lymfatická leukémie
PA-1	lidský ovariální teratokarcinom
PC-3	lidský karcinom prostaty
PTX10	lidská rakovina vaječníku
RPMI8226	lidský myelom
Saos2	lidský rhabdomyosarkom
SF539	lidský karcinom centrálního nervového systému
SK-MEL-3	lidský maligní melanom
SK-Mel2	lidský maligní melanom
SK-OV-3	lidský adenokarcinom vaječníku
SW620	lidský karcinom střev
SW626	karcinom vaječníku
T98G	lidský glioblastom
THP-1	monocytální leukémie
U-87-MG	lidský glioblastom
U-937	lidský monocytální lymfom
U2OS	lidský osteosarkom
U87MG	lidský glioblastom
U937	monocytální leukémie
UACC62	lidský melanom
UI50	lidský cervikální karcinom
UO-31	lidský renální karcinom
XF498	lidský karcinom mozku

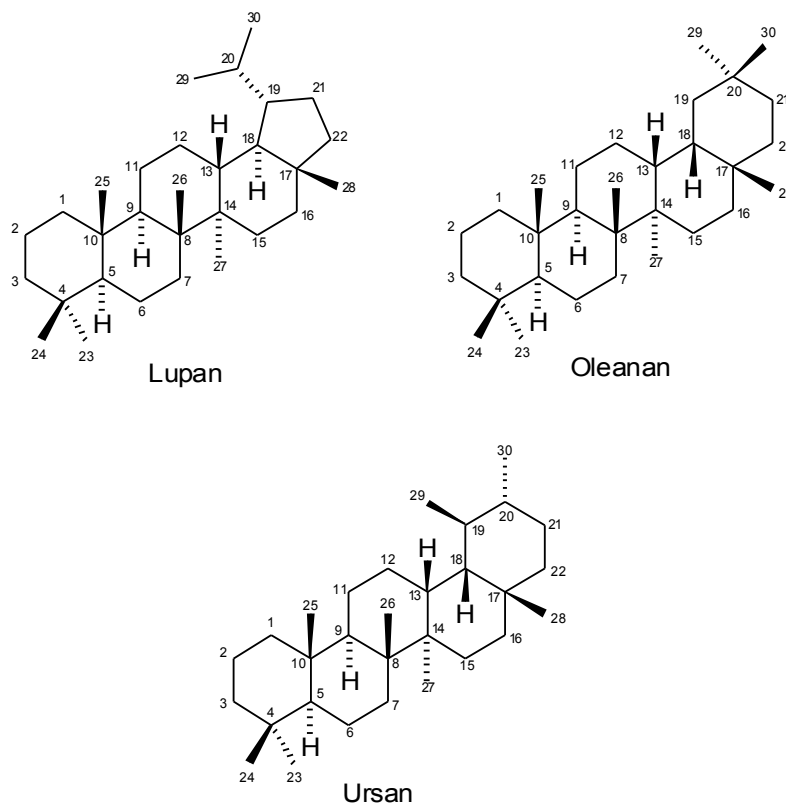
POZNÁMKA K TEXTU

Číslování sloučenin

Sloučeniny v této práci jsou označeny jedním ze dvou způsobů číslování. V kapitole „Současný stav studované problematiky“ jsou sloučeniny označeny písmenem A a arabskou číslicí, v dalších kapitolách jsou sloučeniny označeny arabskou číslicí a malým písmenem. Pro nově připravené sloučeniny je použit normální řez písma, pro sloučeniny v literatuře již popsané je použita kurzíva.

Číslování skeletů

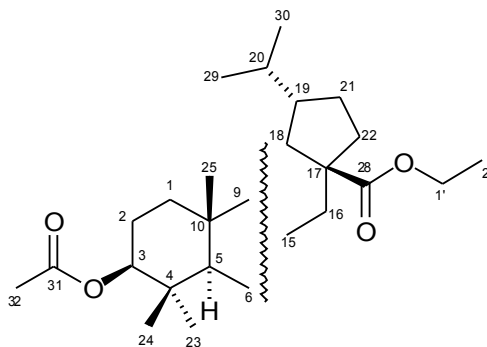
Pro číslování lupanového, oleananového a ursanového skeletu je použito standardní číslování podle doporučení IUPAC.



V dalším textu není ve schématech a vzorcích explicitně znázorněna přítomnost a stereochemie vodíků H-5, H-9 a H-13. Jejich konfigurace je ve sloučeninách v této práci vždy taková, jak je znázorněno výše.

Stereochemie vodíku H-18, nebude explicitně uváděna pro lupanový skelet, bude však vždy uvedena u oleananového a ursanového skeletu.

Číslování atomů uhlíku u substituentů v polohách 3 a 28 triterpenických skeletů je zavedeno následovně: uhlíkatým substituentům v poloze 3 jsou přiřazena čísla větší než 30 a uhlíkatým substituentům v poloze 28 jsou přiřazena čísla od jedné s čárkou (případně více čárkami) (viz příklad), pokud nebude v textu uvedeno jinak.



Příklad číslování triterpenického skeletu se substituenty.

Používání desetinných teček

V textu budou v číslech použity místo obvyklých desetinných čárek desetinné tečky, jak je obvyklé v anglosaské literatuře. Toto řešení bylo zvoleno zejména kvůli větší přehlednosti výpisů spektrálních dat v experimentální části.

ÚVOD

Vznik prvních organismů na Zemi se odhaduje na dobu před 3 – 4 miliardami let. Výsledkem miliard let trvajícího vývoje živé přírody je její současná ohromující biodiverzita i chemodiverzita. Všechny živé organismy, od sinic a jednoduchých bakterií až po mnohobuněčné organismy, produkují kromě primárních metabolitů rovněž nesčetné množství chemických sloučenin, jejichž metabolická úloha není vždy zcela zřejmá a pro které se historicky vžil název sekundární metabolity či přírodní látky. Jednou z nejpočetnějších a strukturně nejrozmanitějších skupin těchto přírodních látek jsou isoprenoidy. Vezmeme-li v úvahu rozdílné evoluční tlaky působící na jednotlivé druhy organismů spolu s množstvím způsobů, kterými lze kombinovat základní pětiuhlíkatý isoprenový fragment, není divu, že pozorujeme takový počet a rozmanitost strukturních typů isoprenoidů.

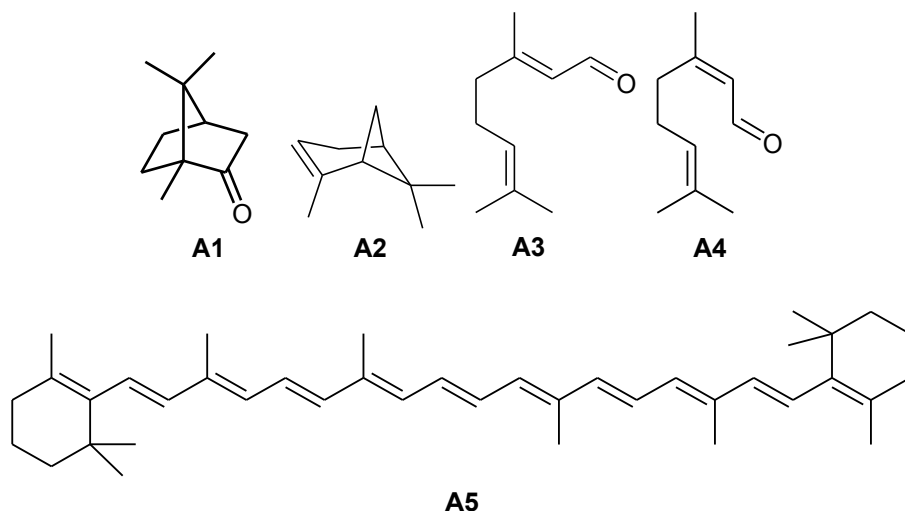
Vzhledem k důležitosti přírodních látek terpenoidní povahy v průmyslu, zemědělství a medicíně vzniká obrovské množství vědeckých publikací, zabývajících se terpeny z hlediska jejich izolace, struktury, syntézy, biosyntézy a biologických aktivit. Relativně málo výzkumného úsilí bylo naproti tomu věnováno odhalování biologické role terpenů v mateřském organismu, což je nepochybně dědictví původní představy o sekundárních metabolitech jako odpadních zplodinách organismu. Počet popsáných terpenů vzrůstá každý rok průměrně téměř o dva tisíce nových sloučenin. Zatímco data¹ z roku 1991 uvádí více než 20 000 popsáných struktur terpenů a v roce 1994 bylo popsáno 25 000 struktur², tak v roce 2007 se již údaje rozcházejí na 50 000³ až 55 000⁴ popsáných terpenických strukturách. Zvyšující se úroveň poznání vyúsťuje ve stále rostoucí počet nových praktických aplikací těchto přírodních látek. Příspěvkem k tomuto bádání je i předkládaná práce, která si klade za cíl přípravu nových terpenických derivátů potenciálně použitelných jako léčiva.

TEORETICKÁ ČÁST

SOUČASNÝ STAV STUDOVANÉ PROBLEMATIKY

Historie použití isoprenoidů

Izolace látek terpenoidní povahy z přírodních zdrojů a jejich použití v rozličných aplikacích sahá hluboko do minulosti. Použití esenciálních olejů, obsahujících jako vonnou složku terpeny, je zaznamenáno při náboženských obřadech již ve starém Egyptě. Kafr (**A1**) poznali jako první evropané křižáci na svých výpravách do Sváté země v 11. století. Alchymista, filosof a lékař katalánského původu Arnaud de Villanosa popisuje ve 12. století destilaci olejů z rozmarýnu a šalvěje, jejichž vonné principy jsou rovněž terpenoidní povahy. Nejstarší záznamy o použití jinanu dvoulaločného (*Ginkgo biloba*, účinné látky jsou diterpenoidní povahy) jako léčiva pochází z Číny z roku 1505.⁵ V roce 1578 popisuje Pen Tsao Ching léčbu senility stárnoucích členů císařské rodiny právě plody jinanu.⁵ Název „terpen“ byl navržen v roce 1866 pro kyslíkaté látky izolované z terpentýnového oleje. Struktura kafru (**A1**) byla správně vyřešena Bredttem v roce 1893,⁶ i když diskuze ještě nějakou dobu pokračovala.⁷ Strukturu α -pinenu (**A2**) navrhl správně Wagner v roce 1894,⁸ geranialu (**A3**) a linaloolu (**A4**) (obou komponent citralu) Tiemann v roce 1895.⁹ β -karoten (**A5**) byl poprvé izolován z mrkve v roce 1837 Wackenrodderem a jeho struktura určena ve třicátých letech minulého století s použitím ozonolýzy, UV spektroskopie a chromatografie. Zlomovým bodem byla formulace isoprenového pravidla Ruzickou v roce 1953,¹⁰ toto pravidlo bylo ovšem *de facto* používáno již od roku 1922.¹¹ V roce 1956 byl dokázán podíl mevalonové kyseliny na biosyntéze cholesterolu.¹²



Snaha o poznání struktury terpenů vedla od druhé poloviny dvacátého století syntetické organické chemiky k provedení série klasických totálních syntéz těchto přírodních látek. Mnohé z těchto velice složitých syntéz představovaly ve své době pro vědce velkou výzvu a často vyústily v objev nových syntetických metod a strategií, které zpětně obohacovaly organickou syntézu jakožto disciplínu. V roce 1971 provedl Stork¹³ totální syntézu důležitého pentacyklického triterpenu lupeolu (**A9**) (Schéma 1).

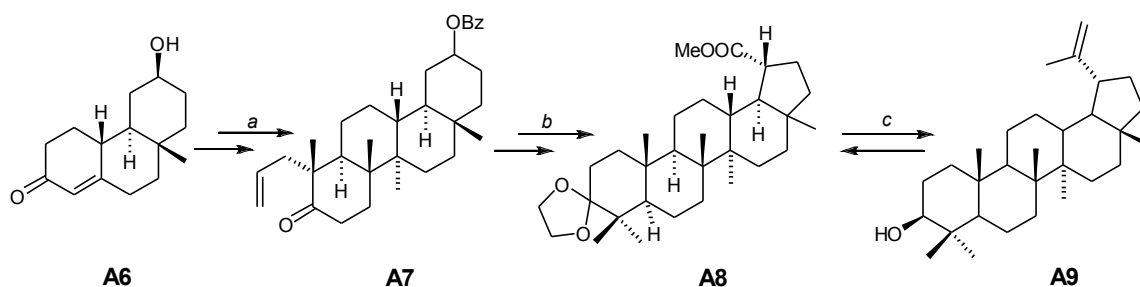


Schéma 1: Storkova totální syntéza lupeolu a: 11 kroků, b: 5 kroků, c: 2 kroky

Tento triterpenoid byl zajímavým cílem totální syntézy díky (na svou dobu) komplexnímu skeletu, obsahujícímu deset asymetrických center. Autoři využili předchozích zkušeností s totální syntézou 11-ketosteroidů,¹⁴ během níž se jim podařilo připravit tricyklický enon **A6**, představující výhodný odrazový můstek na cestě k polycyklickým isoprenoidům. Syntéza probíhala tradičním způsobem přípravy polycyklických látek, tj. kontrolovaným přikondenzováním jednotlivých kruhů krok za krokem.

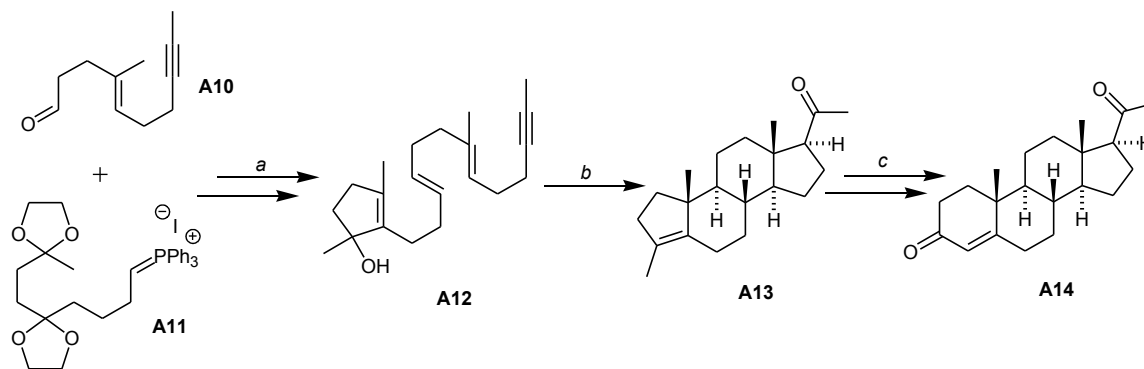


Schéma 2: Totální syntéza progesteronu a: 4 kroky, b: ethylenglykol karbonát, 1,2-dichlorethan, TFA, 0 °C, c: 2 kroky

Totální syntéza progesteronu¹⁵ (**A14**) proběhla pod taktovkou W. S. Johnsona (Schéma 2) ve stejném roce jako syntéza lupeolu (**A9**). V příkrém kontrastu k předchozí

práci využil autor biomimetického přístupu inspirovaného enzymatickou přeměnou skvalenoxidu na lanosterol.

Podle Stork¹⁶ – Eschenmoserovy¹⁷ hypotézy probíhá biosyntéza isoprenoidů stereospecificky v jediné cyklizační reakci – enzymaticky katalyzovanou asymetrickou kationickou polyenovou cyklizací lineárních polyenů jako je zmíněný skvalenoxid. Biomimetická polyenová cyklizace je pokládána za jednu z nejmocnějších metod současné organické syntézy. Kaskádovou cyklizací polynenasyceného prekurzoru, obsahujícího pouze jediné asymetrické centrum lze v jediném stereoselektivním kroku připravit komplexní polycyklický systém. W. S. Johnson dovedl biomimetickou metodu syntézy polycyklických přírodních látek od jejích počátků až k praktické použitelnosti, a rozhodujícím způsobem přispěl k přijetí Storkovy – Eschenmoserovy hypotézy širokou vědeckou komunitou. Vývoj představ o struktuře terpenů shrnul v přehledném článku Hanson,¹⁸ přehled moderních syntetických metod při syntéze triterpenoidů shrnul Maimone.¹⁹ Přehled základních totálních syntéz podal Nicolaou ve své známé knize.²⁰

Biosyntéza isoprenoidů

Klasická mevalonátová neboli HMG-CoA reduktázová cesta (Schéma 3) je důležitou buněčnou metabolickou cestou, která vede k základním stavebním kamenům isoprenoidů – dimethylallyl-difosfátu a isopentenyl-difosfátu; odehrává se v cytosolu. Kondenzací 3-isopentenyl-difosfátu se dvěma molekulami dimethylallyl-difosfátu vzniká farnesyl-difosfát (syntéza geranyl-difosfátu byla pro zjednodušení vynechána), který dimerizuje na skvalen, klíčový intermediát při biosyntéze steroidů i triterpenů (viz Schéma 4 – biosyntéza lanosterolu).

Původní představy o biosyntéze triterpenů výhradně mevalonátovou cestou, jejichž základy načrtli Rabinowitz²¹ a Bloch²² v polovině dvacátého století, jsou od devadesátých let podrobovány revizi. Možnost existence dosud neznámé metabolické cesty biosyntézy isoprenoidů, odlišné od mevalonátové cesty, naznačil Bloch na základě experimentů s biosyntézou hopanoidů v prokaryontech v roce 1988.²³ Výsledky, které jednoznačně dokládají přítomnost nejméně dvou metabolických cest syntézy isopentenyl-difosfátu v mikroorganismech však publikoval Horbach až v roce 1993.²⁴

Touto alternativní metabolickou cestou biosyntézy isoprenoidů je deoxyxylulózo-fosfátová cesta (Schéma 5), probíhající v leukoplastidech. Je přítomna zejména v rostlinách, prvocích, většině eubakterií a v zelených řasách. Některé organismy mají přítomny nezávisle oba systémy biosyntézy isoprenoidů.²⁴

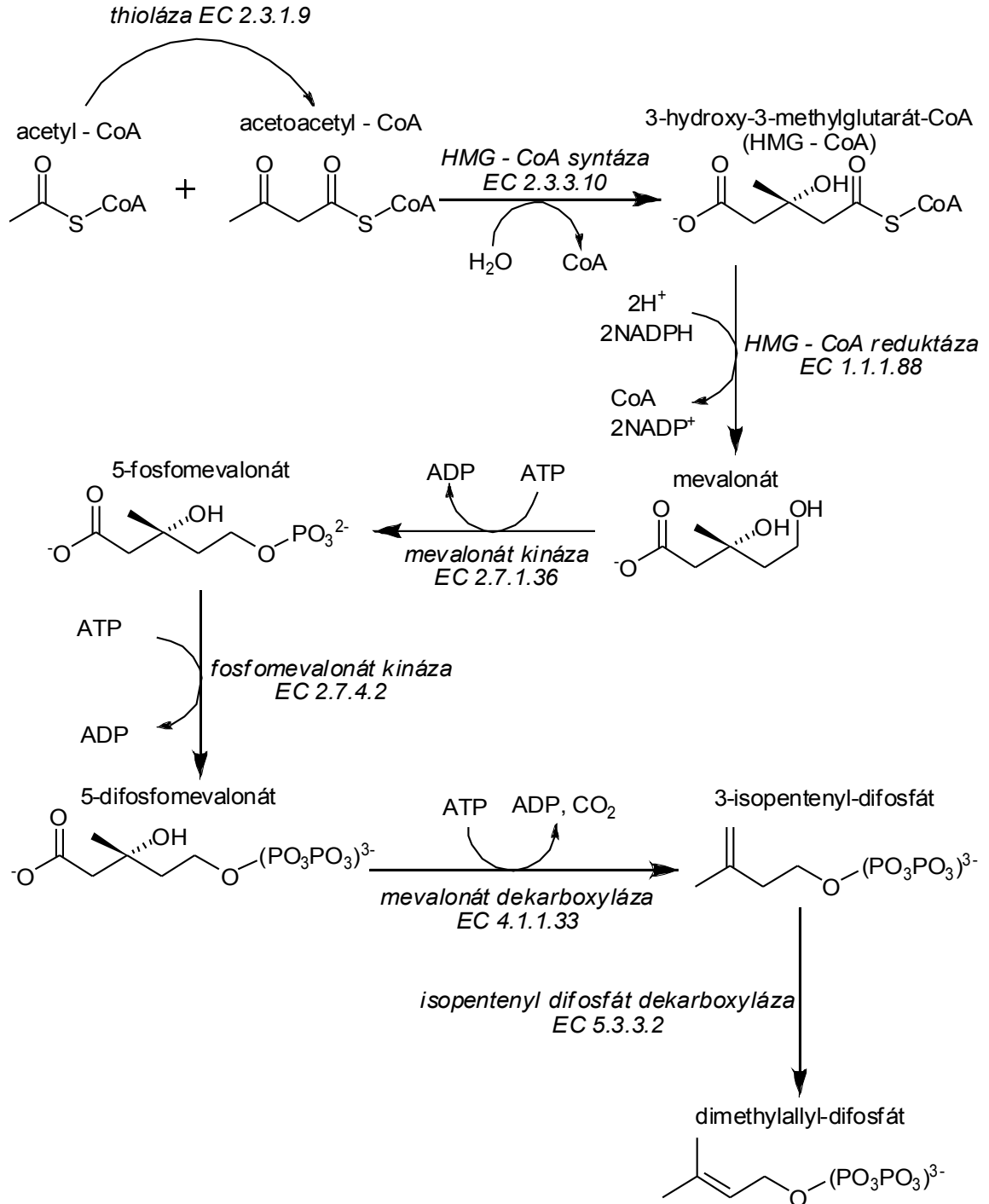


Schéma 3: Mevalonátová (HMG-CoA reduktázová) metabolická cesta.

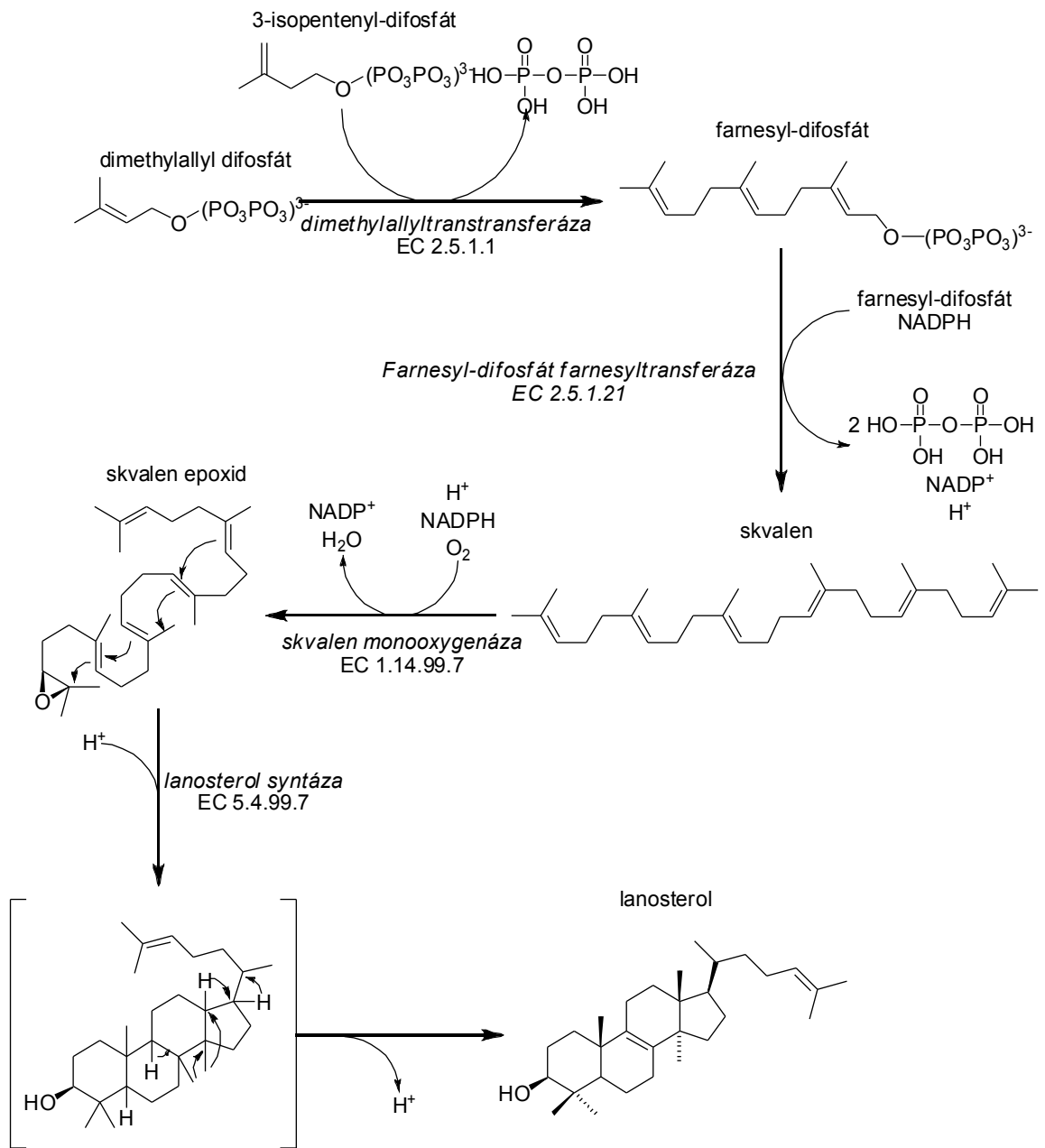


Schéma 4: Biosyntéza lanosterolu.

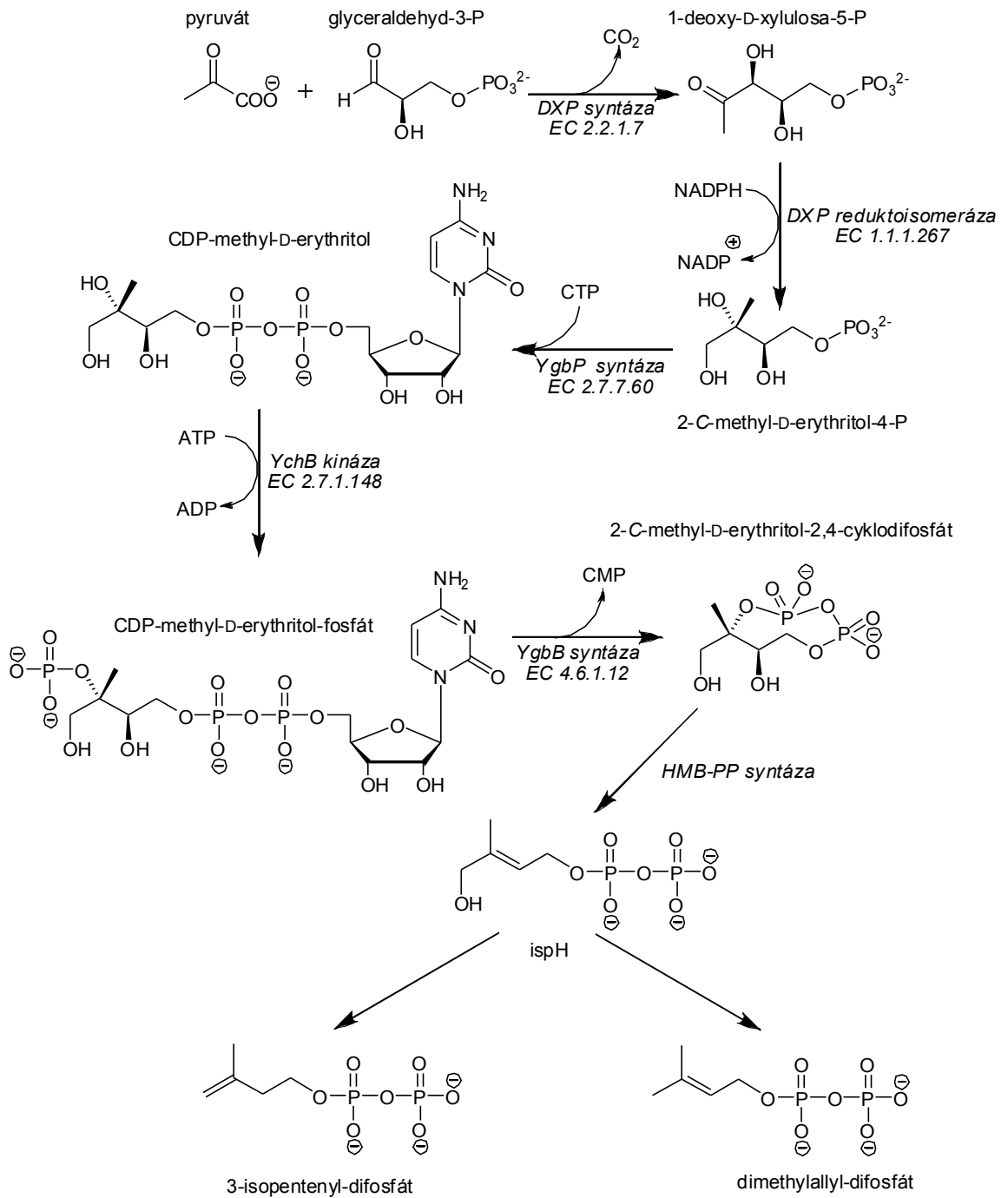
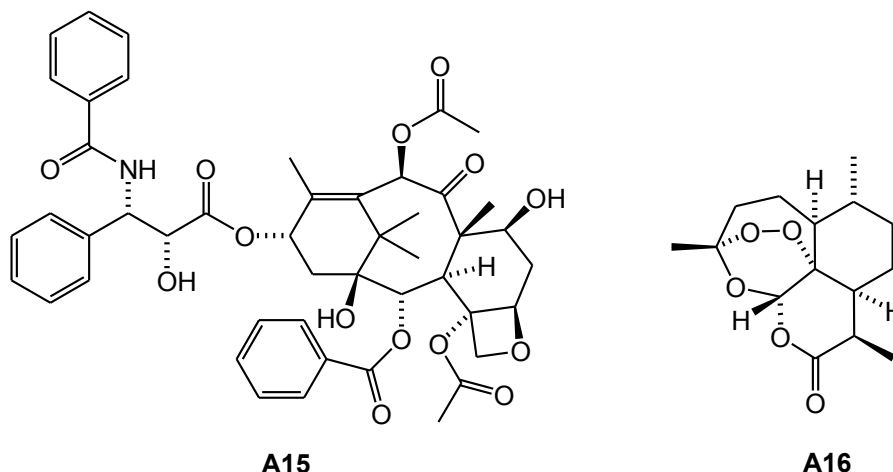


Schéma 5: Deoxyxylulózo-fosfátová metabolická cesta.

Biologické aktivity isoprenoidů

Látky obsažené v živých organismech po celou historii představovaly a až do současnosti představují hlavní zdroj terapeuticky účinných substancí. V letech 1981 až 2002 byla struktura 62 % nových léků proti zhoubnému bujení přírodního původu.²⁵ Se zhruba 50 000 známými strukturami jsou isoprenoidy nejpočetněji zastoupenou skupinou přírodních látek, a není tedy divu, že některé z nich našly uplatnění též v humánní medicíně. K nejdůležitějším lékařsky používaným terpenům se řadí zejména protinádorové léčivo Paclitaxel (**A15**) a moderní antimalarikum Artemisinin (**A16**). Následující krátký přehled je zaměřen na biologické aktivity přírodních terpenoidů, zvláště na ty sloučeniny, které jsou buď klinicky používané, anebo v některé fázi klinického testování.



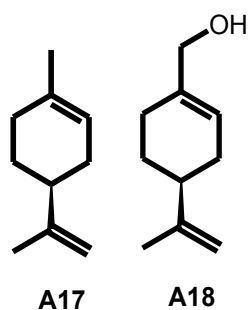
Monoterpeny

Monoterpeny jsou obsahové látky esenciálních olejů, vonné principy květinových vůní, jsou obsaženy v citrusových plodech, v bylinách i v pryskyřicích. Často se jedná o látky chuťově významné a používané jako chuťotvorné přísady do potravin, orálně podávaných léčiv a kosmetiky. Mnoho monoterpenů obsažených v potravinách prokazuje také chemopreventivní a protinádorové účinky.²⁶

(-)-Limonen (**A17**) je obsahovou látkou olejů ze slupek citrusových plodů. Chemopreventivní a protinádorové léčebné účinky tohoto monoterpenu jsou dobře známy.²⁶ Limonen (**A17**) například snižuje pravděpodobnost vzniku spontánního

rakovinného bujení na myším modelu B6C3F₁ při orálním podávání (1200 mg/kg)²⁷ a způsobuje regresi již rozvinutých nádorů. Již poměrně dávno byl proto zařazen do první fáze klinického testování.²⁸

Dalším monoterpenem s protinádorovou aktivitou je (-)-perillylalkohol (**A18**), nacházející se mimo jiné v třešních a v levanduli, je v současnosti ve druhé fázi klinického testování.^{29,30} Tato sloučenina je dle dostupné literatury velice účinná *in vivo*, zejména proti rakovině pankreatu, kde na modelu křečka byla prokázána signifikantní inhibice růstu transplantovaných nádorů, a v 16 % případů došlo dokonce ke kompletní regresi novotvaru.³¹



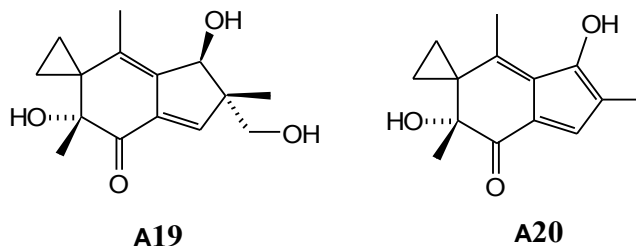
Seskviterpeny

Seskviterpeny jsou třída terpenů, složených ze tří isoprenových jednotek. Důležitou třídou seskviterpenů jsou seskviterpenické laktony, které vykazují široké spektrum biologických aktivit.³²

Jeden z těchto laktonů, Artemisinin (**A16**), je klinicky používané antimalarikum poslední generace, které efektivně účinkuje i proti odolným kmenům plasmodia (původce malárie). Artemisinin (**A16**) se získává izolací z čínského pelyňku *Artemisia annua*, a je z chemického hlediska zajímavý zejména přítomností vzácného endoperoxidového uspořádání ve své struktuře. Tento neobvyklý strukturní motiv je nezbytný pro zachování biologické aktivity Artemisininu (**A16**).³³ Přehled informací o tomto léčivu shrnuli nedávno Abdin *et al.*³⁴

Illudiny jsou seskviterpenoidní sloučeniny izolované z hub druhu *Omphalotus illudens* a druhů příbuzných.³⁵ Tato skupina látek projevuje extrémně vysokou cytotoxicitu a protinádorovou aktivitu. Illudin S (**A19**) vykazuje na šesti nádorových

liniích hodnoty IC_{50} v rozmezí 8 – 363 nmol/l. Rovněž převážná většina rezistentních nádorových linií zůstává vůči illudinům citlivá. Dlouholetý výzkum těchto látek vedl k přípravě derivátu Irofulvenu (**A20**), který disponuje výhodnějšími farmakologickými vlastnostmi, a který se nyní nachází ve druhé fázi klinických testů.³⁶



Zajímavou vlastností tohoto budoucího léčiva, kterou vykazují i látky z našeho pracoviště, je schopnost selektivního vyvolání apoptózy lidských nádorových buněk nezávisle na expresi genu p53. Léčivo se chová cytotoxicky k nádorovým buňkám, zatímco k normálním lidským buňkám pouze cytostaticky.³⁷

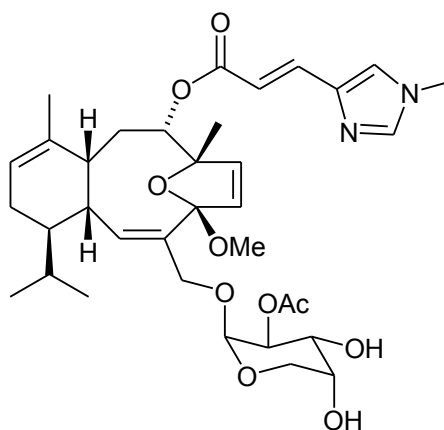
Diterpeny

Diterpeny jsou rozsáhlá třída terpenů, vyskytujících se v jak v suchozemských, tak ve vodních živočiších a rostlinách, které disponují širokou řadou biologických aktivit.^{38,39,40}

Diterpeny izolované z čeledi *Taxaceae* (tisovité) představují mimořádně důležitou skupinu sloučenin, intenzivně zkoumaných pro svou protinádorovou aktivitu již od šedesátých let.⁴¹ Jedná se zejména o paclitaxel (**A15**), který indukuje apoptózu nádorových buněk při submikromolárních koncentracích (0.005-0.05 $\mu\text{mol/l}$).⁴² Od vyřešení jeho struktury v roce 1971⁴³ nicméně uplynulo ještě dvacet jedna let, než byl schválen k použití jako léčivo a stal se jedním z důležitých klinicky používaných chemoterapeutik. V současné době je indikován zejména proti rakovině vaječníku a rakovině prsu, dále pak proti bronchogenním karcinomům, karcinomům ezofágu a karcinomům obličeje a krku.⁴⁴

Dalším cytotoxickým diterpenem je eleutherobin (**A21**), který byl izolován ze vzácných mořských živočichů rodu *Eleutherobia sp.* v mimořádně nízkých výtěžcích. Jeho struktura i mechanismus účinku jsou podobné paclitaxelu (**A15**), v některých

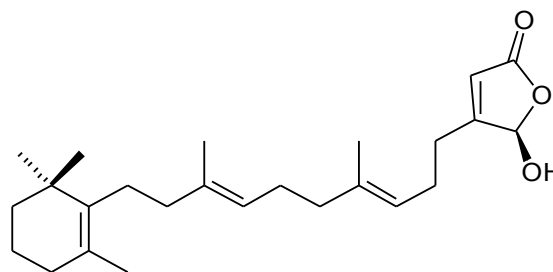
případech však vykazuje dokonce ještě vyšší cytotoxicitu než paclitaxel (A15).^{45,46} Nesnadné získávání této zajímavé látky z přírodních zdrojů a neexistence jednoduché syntézy bohužel brání v provedení testů cytotoxicity *in vivo*.⁴⁷



A21

Sesterterpeny

Sesterterpeny jsou méně početnou skupinou terpenů, nacházející se převážně v houbách a mořských organismech.⁴⁸ Manoalid (A22), izolovaný z mořské houby *Luffariela variabilis*, projevuje silnou protizánětlivou a analgetickou aktivitu.⁴⁹ Pro své výborné výsledky *in vitro* i *in vivo* byl zařazen do I. fáze klinických testů.⁵⁰



A22

Biologické aktivity triterpenoidů

Přírodní triterpenoidy (Schéma 6) poskytují důležitý výchozí bod pro vývoj nových léčiv. Triterpeny se nacházejí v mnoha rostlinách po celém světě, ale i v mikroorganismech a živočiších. Sérii výborných přehledných článků týkajících se izolace a identifikace přírodních triterpenoidů, publikují od roku 1985 pravidelně Conolly a Hill.⁵¹ V poslední dekádě se tato velká skupina přírodních látek, obsahující více jak 4000 různých sloučenin, dostala do popředí zájmu vědecké komunity, zejména

díky svým rozličným biologickým aktivitám.⁵² Mnoho triterpenoidů prokázalo nadějně cytotoxické aktivity a značná část výzkumu se zaměřila také tímto směrem. Podle databáze PubMed vyšly v roce 1987 tři články zabývající se antineoplastickou aktivitou triterpenoidů, zatímco v roce 2001 na toto téma vyšlo již 74 původních článků.⁵³ Tato kapitola literárního přehledu je zaměřena zejména na cytotoxickou aktivitu triterpenoidů rostlinného původu. Z přehledu byly pro zachování přiměřeného rozsahu vyloučeny saponiny a také triterpenoidy pocházející z živočichů a hub. Konkrétní cytotoxické aktivity jsou pro přehlednost uvedeny souhrnně v tabulce 1 (str. 34).

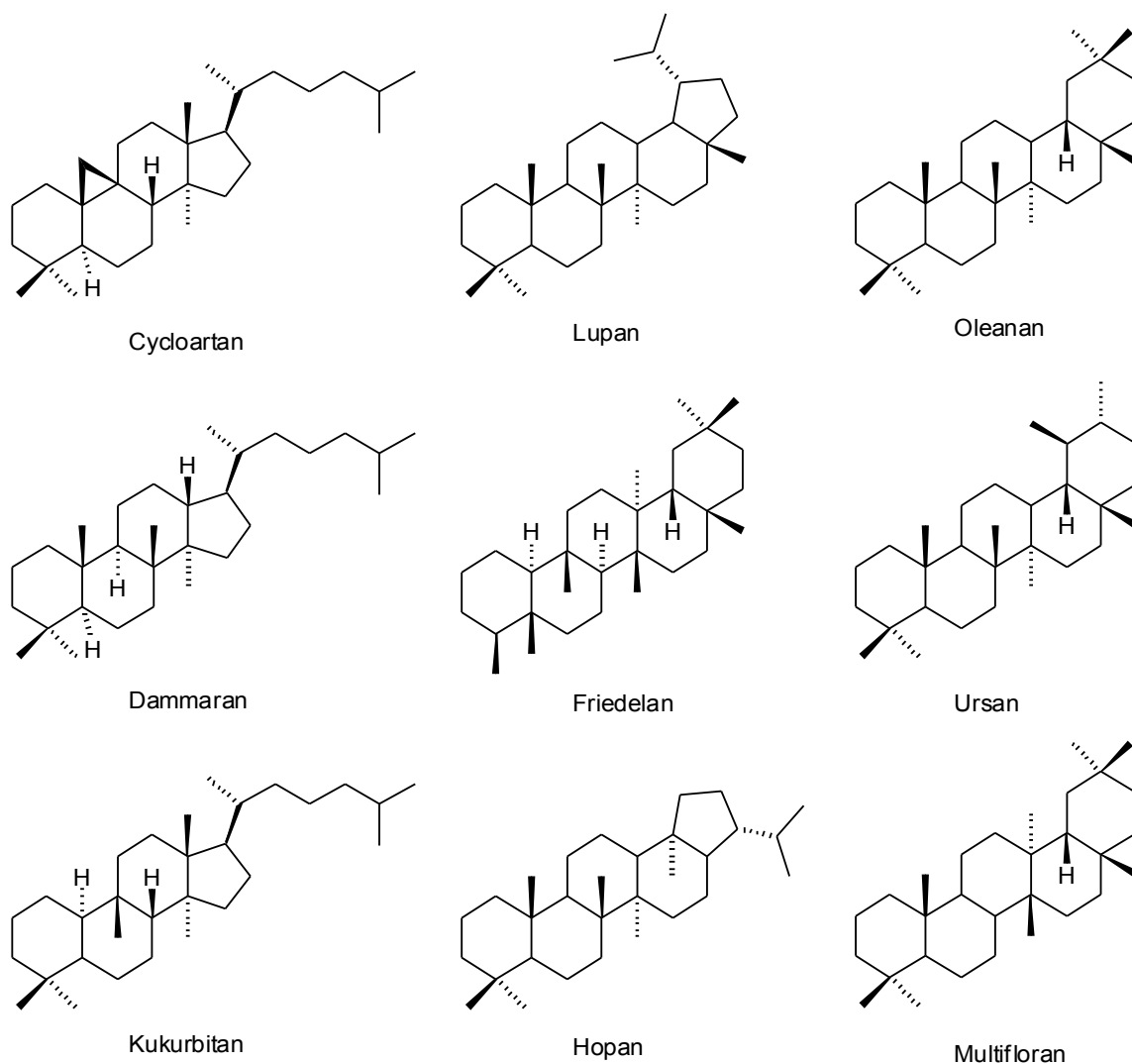
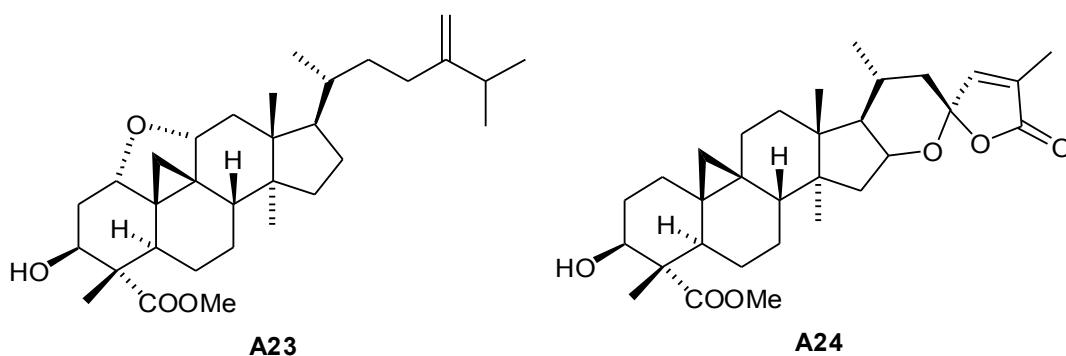


Schéma 6: Přehled vybraných triterpenických skeletů.

Cykloartanové triterpenoidy

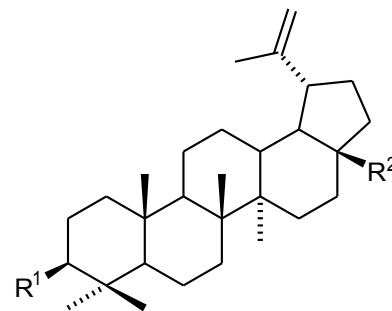
Mnoho triterpenoidů cykloartanové řady představuje podle výsledků *in vitro* testů nadějně kandidáty pro další výzkum díky své chemopreventivní aktivitě a aktivitě proti viru Epstein-Barrové.⁵⁴ Dobrou cytotoxicitu proti linii 26-L5 vykázal methyl quadrangularát D (**A23**), izolovaný z *Combretum quadrangulare*, rostliny, která je používána v asijské a africké tradiční medicíně proti hepatitidě, malárii, respiračním infekcím a rakovině.⁵⁵

Cykloartanový spirolakton pseudolarolid B (**A24**), izolovaný z kůry kořene východočínské rostliny *Pseudolarix kaempferi*, má neobyčejně silné *in vitro* cytotoxické účinky (IC_{50} se pohybuje v rozmezí 1-2 $\mu\text{mol/l}$) proti nádorovým liniím KB, A549, HTC-8 a P-388.⁵⁶ Tato rostlina je rovněž používána v tradiční medicíně jako lék proti plísňovým onemocněním a protiplísňová aktivita byla skutečně prokázána u tohoto i dalších pseudolarolidů.⁵⁶

**Lupanové triterpenoidy**

Betulin (**A26**) patří mezi první izolované přírodní látky, poprvé byl izolován Löwitzenem již v roce 1788⁵⁷ z kůry břízy (*betula sp.*). Lupeol (**A25**), společně s betulinem (**A26**) projevil *in vivo* protinádorovou aktivitu na nádorovém modelu Walker 256.⁵⁸ Lupeol (**A25**) navíc projevuje slabší *in vitro* cytotoxickou aktivitu na nádorových liniích melanomu Mel-2⁵⁹ a AsPC-1⁶⁰ a vykázal také *in vivo* chemopreventivní účinky na modelu oxidativního stresu vyvolaného u myši pomocí 7,12-dimethylbenz(a)anthracenu,⁶¹ dále protizánětlivou, protirevmatickou a imunosupresivní aktivitu.⁶² Betulin (**A26**) izolovaný z listů *Strychnos spinosa* prokázal rovněž silnou *in vitro* antitrypanosomální aktivitu ($IC_{50} = 8.9 \mu\text{mol/l}$).⁶³

Kyselina betulinová (**A27**) je jedním z nejvíce zkoumaných přírodních pentacyklických triterpenoidů. Je známa svojí vysokou *in vitro* cytotoxickou aktivitou na velkém množství nádorových buněčných linií.^{59,64,65,66,67,68} Publikované cytotoxicity se pohybují od 0.7 $\mu\text{mol/l}$ (lidský monocytální lymfom U-937) až po 100 $\mu\text{mol/l}$ (lidský maligní gliom LN-308). Seznam těchto linií a aktivit je uvedena v tabulce 1. Anti-HIV aktivita kyseliny betulinové (**A27**) je sice pouze mikromolární ($\text{IC}_{50} = 1.4 \mu\text{mol/l}$),⁶⁹ avšak soustředěný výzkum vedl k přípravě derivátu PA-457 (**A28**) známého také pod označením Bevirimat, jehož anti-HIV aktivita je mimořádně vysoká ($\text{IC}_{50} < 3.5 \times 10^{-4} \mu\text{mol/l}$), stejně jako terapeutický index ($>20\ 000$).⁷⁰ Výsledky druhé fáze klinických testů Bevirimatu (**A28**) jsou rovněž nadějně.⁷¹ Kyselina betulinová (**A27**) dále projevuje středně silnou protizánětlivou aktivitu, *in vitro* antibakteriální, atimalarickou a spasmogenní aktivitu.⁷²



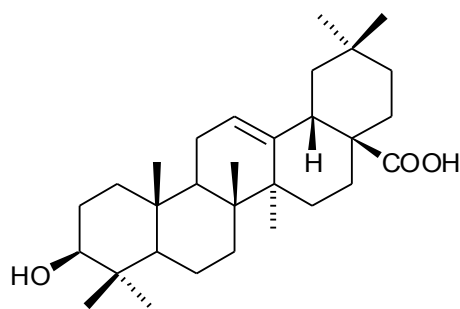
č. sl.	R ¹	R ²
A25	OH	CH ₃
A26	OH	CH ₂ OH
A27	OH	COOH
A28		

Oleananové triterpenoidy

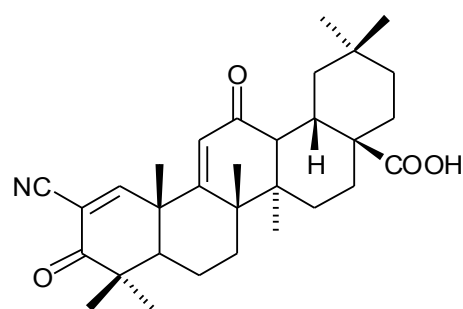
Kyselina oleanolová (**A29**) je jeden z nejběžněji se vyskytujících pentacyklických triterpenoidů, její přítomnost byla zaznamenána ve více než 120 druzích rostlin, mimo jiné i v ženšenovém kořenu.⁵² Oproti kyselině betulinové (**A27**) je cytotoxická aktivita kyseliny oleanolové (**A29**) většinou nižší a omezená na menší množství nádorových linií,^{73,74,68} její *E*-kávan však projevuje cytotoxickou aktivitu o řád vyšší.⁶⁸ Stejně jako betulin (**A26**), prokázala i kyselina oleanolová (**A29**) silnou *in vitro* antitrypanosomální aktivitu (6.4 $\mu\text{mol/l}$),⁶³ zaznamenány byly rovněž protizánětlivá⁷⁵ a anti-HIV aktivita.⁷⁶ Derivatizace kyseliny oleanolové (**A29**) vedla k přípravě 2-kyano-3,12-dioxolean-1,9-dien-28-ové kyseliny, známé pod označením CDDO (**A30**), která je *in vitro* neobyčejně

silně cytotoxicky aktivní proti množství nádorových linií,⁷⁷ s aktivitami v nanomolární oblasti a která je nyní v USA v první fázi klinických testů.⁷⁸

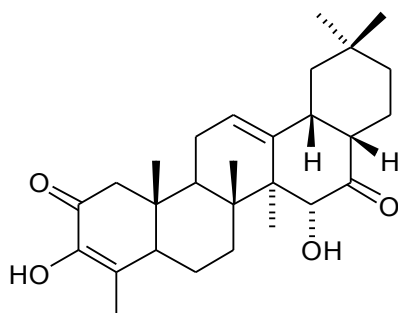
Také další sloučeniny oleananového typu vykazují zajímavé biologické aktivity. *In vitro* cytotoxicita remanglionu C (A31), izolovaného z listů *Physena madagascariensis*, proti dvěma liniím rakoviny prsu se pohybuje v jednotkách mikromolů (viz tabulka 1), zatímco proti nenádorovým savčím epiteliálním buňkám je tato látka jen slabě cytotoxická.⁷⁹



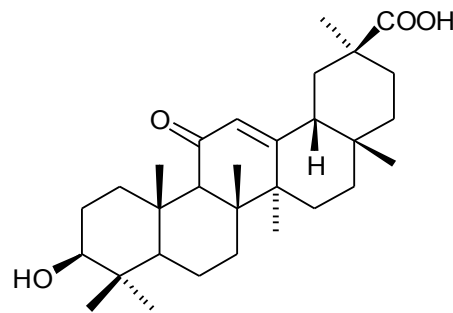
A29



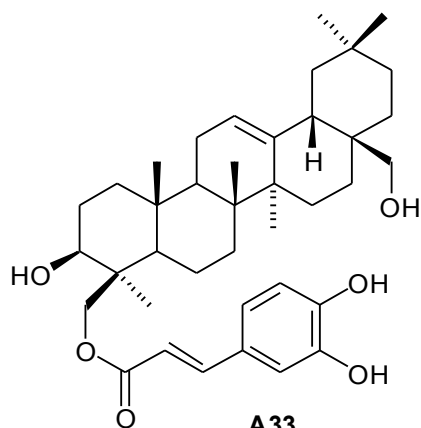
A30



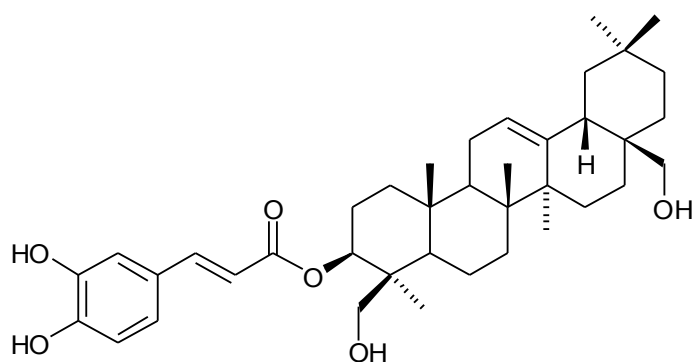
A31



A32



A33



A34

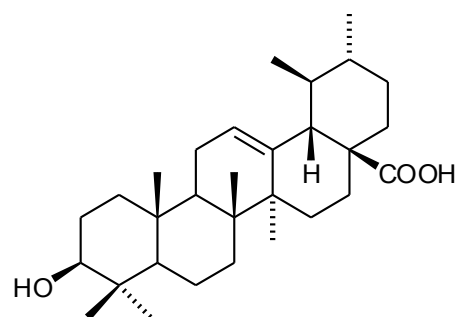
Obsahovou látkou kořene lékořice *Glycyrrhiza glabra* je glykosid glycyrrhizin. Jeho aglykon je nazýván glycyrrhetová kyselina (A32). Ta sama o sobě cytotoxická není,

ovšem její deriváty jsou středně *in vitro* cytotoxické.⁸⁰ Kávany **A33** a **A34** izolované z běžného ibišku syrského (*Hibiscus syriacus*) se rovněž vyznačují značně vysokou *in vitro* cytotoxickou aktivitou proti devíti nádorovým liniím různého histogenetického původu (IC₅₀ od 1.3 do 6.3 μmol/l).⁸¹

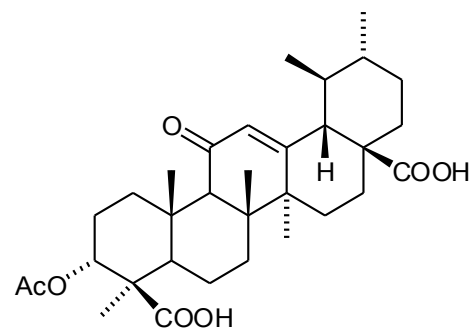
Ursanové triterpenoidy

Kyselina ursolová (**A35**) patří spolu s kyselinou oleanolovou (**A29**) mezi nejčastěji se vyskytující pentacyklické triterpeny. Nachází se v plodech, listech a květech léčivých rostlin, jako například *Rosemarinus officinalis*, *Eriobotrya japonica*, *Calluna vulgaris*, *Ocimum sanctum* a *Eugenia jumbolana*.⁸² Cytotoxické účinky kyseliny ursolové (**A35**) byly zkoumány *in vitro* proti značnému množství nádorových linií. Zjištěné cytotoxické aktivity se pohybují v relativně širokém rozmezí, od 0.85 μmol/l na leukémii HL-60 až po 30 μmol/l na linii žaludečního karcinomu NUGC-3.^{68,83,84,85,86,87,88} U kyseliny ursolové (**A35**) byla dále zaznamenána antioxidantní, protizánětlivá a hepatoprotektivní aktivita. Ve vysokých dávkách však kyselina ursolová (**A35**) působí naopak zánětlivě.⁸⁹

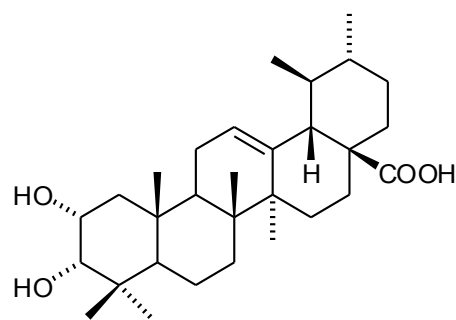
Asijská tradiční medicína odedávna používala pryskyřičnou klovatinu ze stromu *Boswellia serrata* pro její protizánětlivé, antiartritické, antiastmatické, protirakovinné, antimikrobiální, analgetické a hepatoprotektivní účinky. Aktivní látky obsažené v této pryskyřici zahrnují pentacyklické triterpenoidy,⁹⁰ souhrnně nazývané boswellové kyseliny. Jeden z těchto triterpenoidů je kyselina 3α-O-acetyl-11-oxo-β-boswellová (**A36**) která byla testována



A35



A36



A37

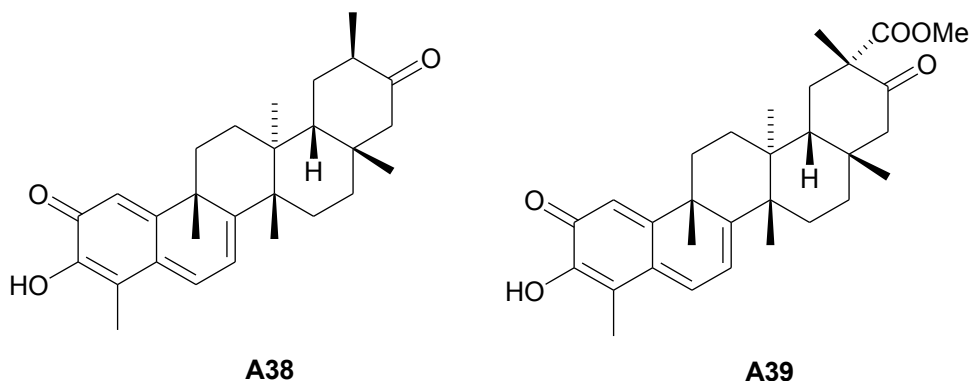
na *in vitro* cytotoxickou aktivitu proti dvěma leukemickým nádorovým liniím, avšak vykazala pouze nevýznamnou cytotoxicitu.⁹¹

V listech banabového stromu (*Lagerstroemia speciosa*) je jako hlavní sekundární metabolit obsažena corosolová kyselina (**A37**), která je strukturně i biologickou aktivitou blízce příbuzná kyselině ursolové (**A35**). Biologické aktivity této kyseliny zahrnují kromě antioxidantní, protizánětlivé a antihypertenzní aktivity⁹² zejména silnou cytotoxickou aktivitu proti řadě nádorových linií, pohybující v jednotkách $\mu\text{mol/l}$.^{68,84}

Friedelanové triterpenoidy

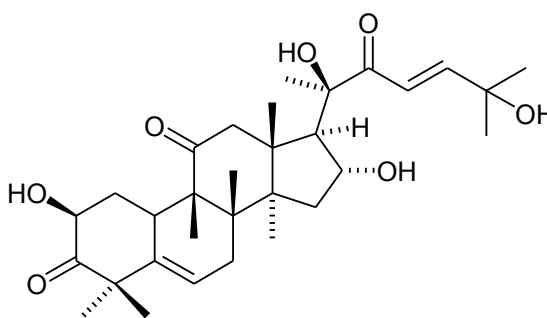
Friedelanové triterpenoidy obecně vykazují cytotoxickou aktivitu. Z nich se jako mimořádně zajímavá skupina vydělují 24-norfriedelanové terpeny chinonového typu. Jednou z neúčinnějších a nejzkoumanějších látek této skupiny je tingenon (**A38**), izolovaný z léčivých rostlin rodu *Maytenus*.^{93,94} Jeho dosud studované účinky zahrnují kromě cytotoxické aktivity ještě antiprotozoální,⁹⁵ insekticidní⁹⁶ a antifungální⁹⁷ aktivitu. Cytotoxická aktivita byla stanovena na víc než deseti nádorových liniích s výbornými hodnotami IC_{50} v rozmezí 1-2 $\mu\text{mol/l}$.^{93, 98,99,100,101,102}

Strukturně příbuznou sloučeninou, která se rovněž nachází v rostlinách *Maytenus sp.*⁹⁸ je Pristimerin (**A39**). Většina údajů o cytotoxicitě této sloučeniny však pochází z novější studie cytotoxických principů rostliny druhu *Reissantia buchananii*. Cytotoxické aktivity pristimerinu (**A39**) jsou velice vysoké,^{98,103} ještě vyšší než u tingenonu (**A38**). Přes tyto výborné cytotoxické aktivity nebyla doposud publikována žádná stať, která by se zabývala *in vivo* účinky tingenonu (**A38**) či pristimerinu (**A39**) nebo jejich farmakokinetikou.

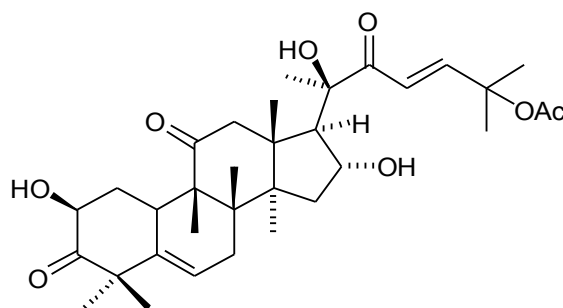
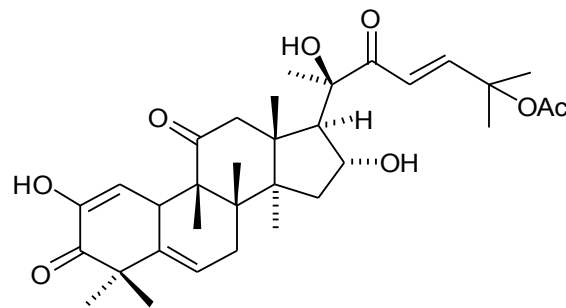


Kukurbitanové triterpenoidy

Kukurbitaciny byly identifikovány jakožto hořké principy tykvovitých rostlin (*Cucurbitaceae*),¹⁰⁴ vyskytují se však i v jiných rostlinách a houbách.¹⁰⁵ Vysoká *in vivo* i *in vitro* cytotoxicita těchto látek je známá od šedesátých let, mezi sloučeninami této skupiny se vyskytují vůbec nejvíce cytotoxicky aktivní triterpenoidy. Gitter¹⁰⁶ *et al.* určili struktury několika látek této skupiny a zpracovali podrobnou studii účinků několika kukurbitacinů, například elatericinu A (**A40**) na myším modelu Ehrlichova karcinomu, sarkomu 180 a Blackovu karcinomu. Všechny zkoumané kukurbitaciny způsobily zpomalení růstu nádoru přibližně na polovinu.

**A40**

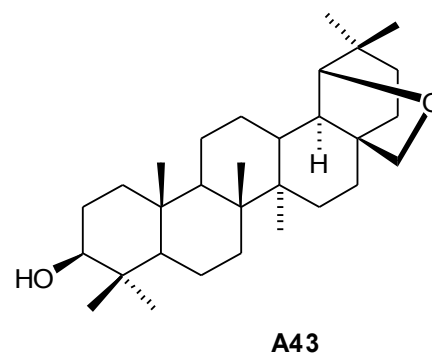
Kukurbitacin B (**A41**) má kromě silných cytotoxických účinků¹⁰⁷ také chemopreventivní¹⁰⁸ a protizánětlivou aktivitu.¹⁰⁹ Kukurbitacin E (**A42**) je svou *in vitro* protinádorovou aktivitou hluboce v nanomolární oblasti srovnatelný s nejlepšími dnešními klinicky používanými protinádorovými chemoterapeutiky.¹¹⁰ Navíc se ukazuje, že tato látka nejenže není cytotoxická proti proliferujícím nemaligním buňkám (lymfocytům), ale dokonce tyto buňky stimuluje k množení.^{111,112}

**A41****A42**

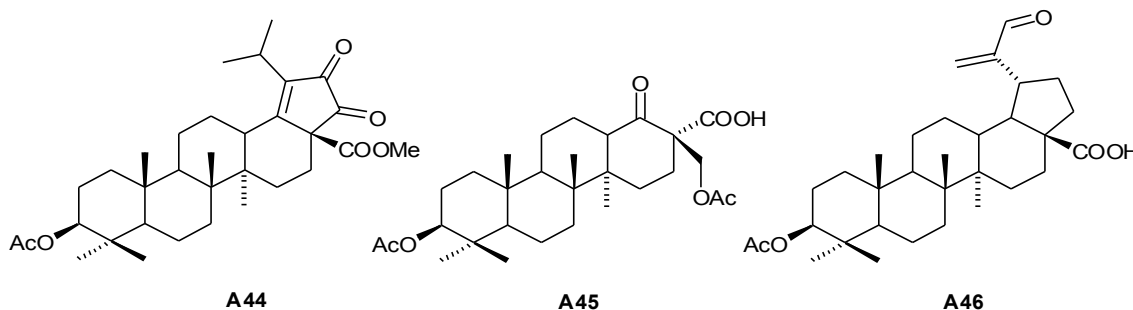
Cytotoxická aktivita sloučenin z našeho pracoviště

Naše výzkumná skupina se věnovala studiu reaktivity sloučenin lupanové a oleananové řady již téměř půl století.¹¹³ Za tu dobu se podařilo nashromáždit značné množství experimentálních dat týkajících se reakcí řady činidel s triterpenoidy, často s nestandardním průběhem a o poměrech na skeletech, které vytvářejí vhodné podmínky k zavedení či modifikaci funkčních skupin, případně k modifikaci samotného skeletu.

Jako výchozí sloučeniny pro syntézy nejčastěji sloužily triterpenoidy lupanové řady, snadno dostupné ve velkých množstvích. Jednalo se o betulin (A26) a kyselinu betulinovou (A27). Betulin (A26), hlavní sekundární metabolit nacházející se ve svrchní vrstvě kůry stromů rodu *Betula* (bříza), je výchozí látkou pro přípravu 18-lupanových a des-E-lupanových derivátů a rovněž pro přípravu allobetulinu (A43), 18 α -oleananového derivátu, který lze připravit z betulinu (A26) kyselé katalyzovaným přesmykem. Kyselina betulinová (A27), která se izoluje z kůry platanu (*Platanus*) je vysoce cytotoxicky aktivní a je proto cílem derivatizací za účelem zlepšení farmakologických vlastností.



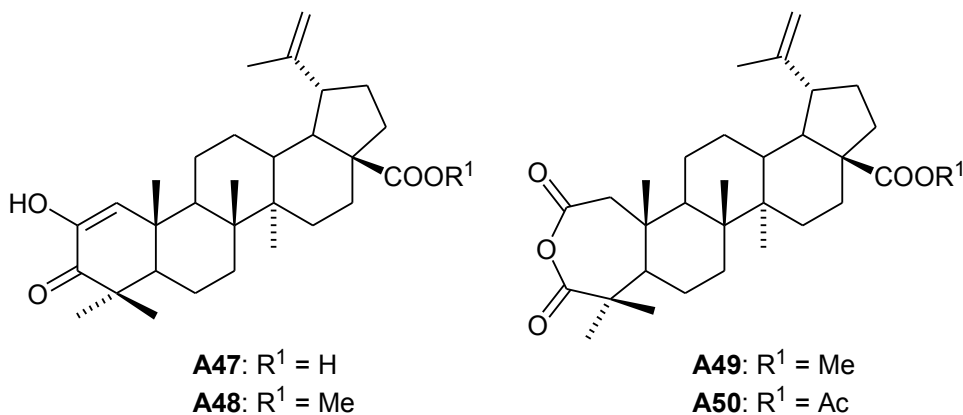
Cytotoxicitu oxidovaných a vysoce odbouraných derivátů lupanu popsali Šarek *et al.* v roce 2003.¹¹⁴ Ve své studii se autoři zabývali především oxidativními modifikacemi kruhu E a jejich vlivu na *in vitro* cytotoxicitu připravených derivátů.



Tři neaktivnější deriváty lupanu, nenasycený diketon A44, β -ketokyselina A45 a aldehyd A46, byly otestovány na panelu třiceti buněčných linií (dvacet osm nádorových a dvě nenádorové buněčné linie) různého histogenetického původu a s různými změnami fenotypu včetně linií rezistentních vůči běžně používaným

protinádorovým chemoterapeutikům. Všechny tři sloučeniny vykázaly IC_{50} v jednotkách $\mu\text{mol/l}$ proti většině zkoumaných nádorových linií, přičemž jako neaktivnější se jevila ketokyselina **A45**. Ukázalo se, že tato skupina látek dokáže překonat mechanismy zodpovědné za rezistenci nádorových buněk proti běžným cytostatikům a že cytotoxicita těchto látek proti nenádorovým buňkám je zejména v případě diketonu **A44** signifikantně nižší než vůči nádorovým buněčným liniím. Z výsledků studie dále vyplývá, že jedním z farmakoforů by mohl být β -dikarboxylový systém nebo dvojná vazba konjugovaná s karbonylem v oblasti kruhu E.

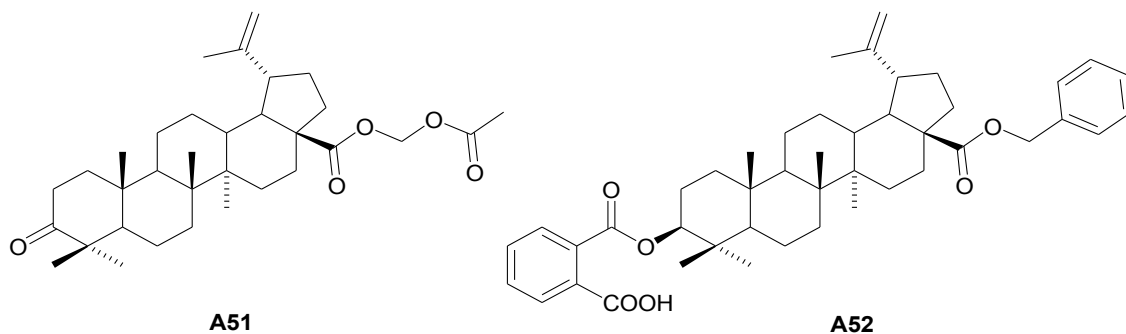
Studie publikovaná v roce 2004 Urbanem *et al.*¹¹⁵ se naopak zaměřila na oxidace derivátů kyseliny betulinové na kruhu A. Autoři publikovali přípravy diosfenolů, anhydridů a A-sekoderivátů kyseliny betulinové. Připravené deriváty byly rovněž testovány na cytotoxickou aktivitu na panelu několika nádorových linií a naměřené cytotoxické aktivity úspěšných derivátů se pohybovaly okolo $10 \mu\text{mol/l}$. Jednalo se zejména o diosfenoly **A47** a **A48** a o anhydridy **A49** a **A50**. I tato studie potvrdila, že zavedení kyslíkatých funkčních skupin, zejména α -dikarboxylového systému, vede obecně ke zvýšení cytotoxické aktivity sloučeniny.



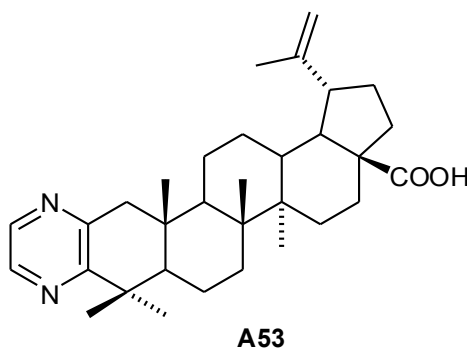
Série tří publikací z roku 2005 srovnávala cytotoxickou aktivitu volných triterpenických kyselin a alkoholů s jejich estery. Tento výzkum byl veden snahou o nalezení derivátů s lepšími farmakologickými vlastnostmi při zachování nebo zvýšení biologické aktivity. První z prací¹¹⁶ se zabývá srovnáním aktivity triterpenických acetátů a derivátů s volnou hydroxyskupinou v poloze 3 a 28. Ukázalo se, že přítomnost acetátové skupiny ovlivňuje cytotoxickou aktivitu komplikovaným způsobem a formulovat na základě získaných dat obecná pravidla nebylo možné.

Druhá publikace z této série¹¹⁷ se zabývá přípravou a cytotoxickou aktivitou různých biologicky snadno štěpitelných esterů triterpenických kyselin s cílem získat derivát, který by mohl lépe prostupovat biologickými membránami při současném zachování vysoké cytotoxické aktivity. Z několika připravených typů esterů se jako nejúčinnější jevíly acetoxymethyl-estery, například **A51**, které měly cytotoxickou aktivitu srovnatelnou s výchozími kyselinami.

Výše zmíněné práce doplnil Kvasnica *et al.*¹¹⁸ publikací zaměřenou na cytotoxické aktivity hemifitalátů derivátů betulinu a esterů kyseliny betulinové. Ačkoli autoři uvádí zvýšení cytotoxické aktivity hemifitalátů oproti výchozím látkám, dosahované cytotoxické aktivity nejsou, až na výjimky, příliš vysoké a pohybují se v desítkách $\mu\text{mol/l}$. Jedna z neaktivnějších látek, hemifitalát **A52** vykázal cytotoxickou aktivitu okolo 10 $\mu\text{mol/l}$. Připravené deriváty jsou však oproti výchozím látkám hydrofilnější a tedy lépe rozpustné ve farmaceuticky akceptovatelných rozpouštědlech založených na vodné bázi. Z uvedených prací vyplývá, že esterifikace lupanových derivátů může vést k dosažení zajímavé cytotoxické aktivity, struktura esteru však musí být zvolena velmi pečlivě.



V tomtéž roce publikovali Urban *et al.* studii,¹¹⁹ zabývající se přípravou triterpenoidních pyrazinů a benzopyrazinů. Studie se nechala inspirovat dimerními steroidními pyraziny, izolovanými z mořských živočichů *Cephalodiscus sp.*,¹²⁰ jejichž cytotoxická aktivita je velice vysoká. Z připravených derivátů projevil slibnou cytotoxickou aktivitu zejména pyrazin **A53**, jehož IC_{50} na devíti nádorových liniích se pohybuje mezi 0.4 a 19 $\mu\text{mol/l}$.



Mechanismus účinku sloučenin z našeho pracoviště

Mechanismem účinku β -ketokyseliny **A45** se zabývá připravovaná publikace Džubáka *et al.*¹²¹ V rámci této studie bylo zjištěno, že sloučenina **A45** vyvolává rychlou apoptózu nádorových buněk linie T-lymfoblastické leukémie CEM v mikromolárních koncentracích. Ranné příznaky apoptózy (přítomnost fosfatidylserinu na povrchu buňky) byly pozorovány již po deseti minutách od začátku inkubace buněk CEM s kyselinou **A45**. Podíl sub-G1 buněk vystoupal po jedné hodině z 6% na 33% a po třech hodinách až na 88%, došlo tedy k zastavení buněčného cyklu. Rovněž došlo ke zvýšení koncentrace cytochromu c v cytosolu, a po jedné hodině od začátku inkubace byla pozorována aktivace kaspáz 3 a 8. Inhibiční experimenty naznačily, že aktivace kaspáz je až sekundární jev, způsobený právě zvýšením koncentrace cytochromu c v cytosolu, což naznačuje, že kyselina **A45** působí přímo na mitochondrie. To bylo doloženo i naměřeným výrazným narušením mitochondriálního potenciálu po 30 minutách inkubace, způsobeným zřejmě permeabilizací mitochondriální membrány. Po inkubaci s kyselinou **A45** byl také pozorován nárůst koncentrace ROS (reactive oxygen species).

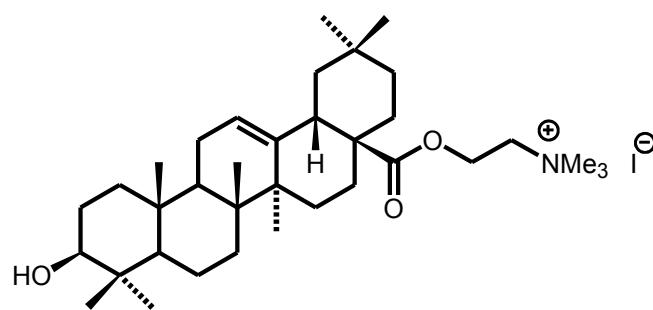
Na základě výše uvedených zjištění a na základě dalších inhibičních experimentů byl molekulární cíl kyseliny **A45** lokalizován do mitochondriálního dýchacího řetězce. Vzhledem k tomu, že cytochrom c vykazuje apoptotickou aktivitu a souvisí s produkcí ROS, byla zkoumána přímá interakce cytochromu c s kyselinou **A45**. Z Ramanových, UV-VIS a ESI spekter vyplývá, že kyselina **A45** tvoří s cytochromem c specifický nekovalentní komplex s vazebným místem pravděpodobně v okolí cytochromového hemu.

Pravděpodobný mechanismus účinku tedy zahrnuje k průnik kyseliny **A45** do mitochondrie a její vazbu na cytochrom c, což způsobí narušení jeho funkce a jeho

uvolnění do cytosolu. Přítomnost cytochromu v cytosolu společně s ROS poté aktivuje kaskádu kaspáz vedoucí až k apoptóze buňky.

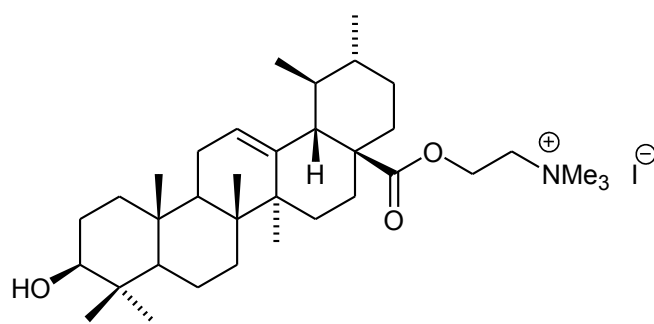
Syntetické kvarterní amoniové soli triterpenoidů

Syntéze kvarterních amoni-
ových solí triterpenoidů nebyla
zatím věnována téměř žádná
pozornost. V polovině minulého
století Hammouda *et al.* pub-
likoval¹²² syntézu cholinových
esterů oleanolové a ursolové

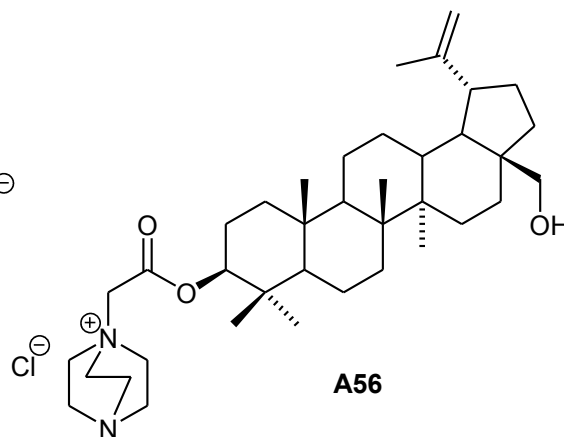


A54

kyseliny (**A54** a **A55**). V roce 2003 byla potom pokryta PCT přihláškou¹²³ široká skupina kvarterních amoniových esterů triterpenických alkoholů (např. **A56**) včetně jejich antibakteriálních, antifungálních účinků a povrchové aktivity. Žádné další práce nebyly zatím o kvarterních solích pentacyklických triterpenoidů publikovány.



A55



A56

sloučenina	nádorová linie	IC ₅₀ (μmol/l)	citace	sloučenina	nádorová linie	IC ₅₀ (μmol/l)	citace
A23	26-L5	5.42	55	A27	K562-ARA-C	>250	114
A24	KB	1.1	56	A27	K562-FLU D	>250	114
A24	A549	1.4	56	A27	CEM	>250	114
A24	HTC-8	1.6	56	A27	CEM-DNR 1/C2	>250	114
A24	P-388	1.7	56	A27	CEM-DNR bulk	>250	114
A25	MEL-2	39.4	59	A27	CEM-VCR 1/F3	19.1	114
A25	AsPc-1	35	60	A27	CEM-VCR 3/D5	24.1	114
A27	MEL-2	2.6	59	A27	CEM-VCR bulk	68.5	114
A27	MOLT-4	1.9	64	A29	HeLa	>100	73
A27	U-937	0.7	64	A29	COLO-205	>100	73
A27	DU145	9.8	64	A29	A549	35.9	68
A27	L132	3.2	64	A29	SK-OV-3	27.2	68
A27	PA-1	10	64	A29	SK-MEL-3	40.5	68
A27	HT-29	1.8	64	A29	HTC-15	26.5	68
A27	Co-115	0.82	65	A29	HONE-1	7.2	74
A27	LN-229	20	66	A29	KB	6.3	74
A27	U87MG	25	66	A29	HT29	>10	74
A27	T98G	25	66	A30	MCF-7	0.03	77
A27	LN-18	70	66	A30	MDA-MB-231	1	77
A27	LN-308	100	66	A30	21-MT-1	0.2	77
A27	Hep G2	34	67	A30	21-MT-2	0.3	77
A27	MDA-MB-231	9.61	67	A30	21-NT	1	77
A27	A549	4	68	A30	21-PT	0.3	77
A27	SK-OV-3	8.3	68	A30	THP-1	0.05	77
A27	SK-MEL-3	5.5	68	A30	U937	0.2	77
A27	XF498	8.3	68	A30	HL-60	0.1	77
A27	HTC-15	8.1	68	A30	NB4	0.04	77
A27	B16	30.5	114	A30	AML 193	0.4	77
A27	B16F	4.6	114	A30	KG-1	0.2	77
A27	SW620	>250	114	A30	ML-1	0.1	77
A27	U87MG	>228	114	A30	NT2/D1	0.1	77
A27	HepG2	3.61	114	A30	A2058	0.2	77
A27	A549	79.3	114	A30	MDA-MB-486	0.2	77
A27	MCF-7	194	114	A30	SW626	0.3	77
A27	U2OS	>250	114	A30	AsPc-1	0.1	77
A27	Saos2	>250	114	A30	CAPAN-1	0.3	77
A27	BT549	>250	114	A31	MDA-MB-435	2	79
A27	MDA-MB-2 38	195	114	A31	MDA-MB-231	1.6	79
A27	LNCaP	244	114	A31	70N	51.6	79
A27	DU145	241	114	A33	UACC62	6.3	81
A27	HT-29	>250	114	A33	MCF7	3.5	81
A27	OVCAR-3	164	114	A33	NCI-H23	4.5	81
A27	Caco-2	19.6	114	A33	ACHN	1.9	81
A27	MEL-3	2.65	114	A33	UO-31	3.2	81
A27	lymphocytes	>250	114	A33	PC-3	2.6	81
A27	NIH3T3	>250	114	A33	SW620	1.8	81
A27	K562	53.9	114	A33	HCT15	1.3	81
A27	K562-CdA	>250	114	A33	SF539	2.3	81
A27	K562-GEM	101	114	A34	UACC62	3.7	81

Tabulka 1: Cytotoxické aktivity sloučenin.

sloučenina	nádorová linie	IC ₅₀ (μmol/l)	citace	sloučenina	nádorová linie	IC ₅₀ (μmol/l)	citace
A34	HTC-8	0.32	103	A39	MCF-7	0.3	103
A34	KB	0.22	103	A39	HTC-8	0.32	103
A34	KB-VIN	0.63	103	A39	KB	0.22	103
A34	U-87-MG	0.37	103	A39	KB-VIN	0.63	103
A34	PC-3	0.5	103	A39	U-87-MG	0.37	103
A34	1A9	0.22	103	A39	PC-3	0.5	103
A34	PTX10	0.24	103	A39	1A9	0.22	103
A35	NUGC-3	30	83	A39	PTX10	0.24	103
A35	Hep G2	7	84	A41	KB	0.01	107
A35	A549	4.05	84	A42	LNCaP	0.01	110
A35	HeLa	3.3	84	A42	DU145	0.01	110
A35	K562	27.4	84	A42	PC-3	0.05	110
A35	HTC-15	7.2	85	A44	B16	35.4	114
A35	UIISO	7	85	A44	B16F	67.9	114
A35	OVCAR-5	7	85	A44	SW620	5.89	114
A35	B16	7.7	86	A44	U87MG	23.8	114
A35	HL-60	0.85	87	A44	HepG2	5.14	114
A35	HL-60	7.9	88	A44	A549	6.7	114
A35	A549	9.2	68	A44	MCF-7	12.9	114
A35	SK-OV-3	7.9	68	A44	U2OS	4.28	114
A35	SK-MEL-3	10.1	68	A44	Saos2	7.9	114
A35	XF498	9.9	68	A44	BT549	15.3	114
A35	HTC-15	9.6	68	A44	MDA-MB-2 38	3.28	114
A36	HL-60	31	91	A44	LNCaP	3.26	114
A36	CCRF-CEM	32	91	A44	DU145	1.98	114
A37	Hep G2	10.2	84	A44	HT-29	5.23	114
A37	A549	10.6	84	A44	OVCAR-3	4.65	114
A37	HeLa	2.1	84	A44	Caco-2	8.13	114
A37	K562	9.1	84	A44	MEL-3	5.86	114
A37	A549	9.3	68	A44	lymphocytes	85.3	114
A37	SK-OV-3	8.3	68	A44	NIH3T3	96.8	114
A37	SK-MEL-3	10.8	68	A44	K562	1.85	114
A37	XF498	11.6	68	A44	K562-CdA	5.17	114
A37	HTC-15	9.9	68	A44	K562-GEM	5.04	114
A38	RPMI8226	7	93	A44	K562-ARA-C	6.42	114
A38	KB	0.67	98	A44	K562-FLU D	4.85	114
A38	P-388	0.1	98	A44	CEM	4.4	114
A38	A431	1.7	99	A44	CEM-DNR 1/C2	10.3	114
A38	LNCaP	0.5	99	A44	CEM-DNR bulk	5.18	114
A38	U373	0.5	99	A44	CEM-VCR 1/F3	38.3	114
A38	L-1210	0.33	98	A44	CEM-VCR 3/D5	12.5	114
A38	HeLa	1.4	100	A44	CEM-VCR bulk	28.2	114
A38	SK-MEL-28	1.7	101	A45	B16	0.43	114
A38	Hep G2	1.91	101	A45	B16F	4.66	114
A38	MDA-MB-231	1.49	102	A45	SW620	1.22	114
A39	L-1210	0.78	98	A45	U87MG	1.85	114
A39	P-388	0.26	98	A45	HepG2	1.67	114
A39	KB	1.19	98	A45	A549	2.8	114
A39	A549	0.67	103	A45	MCF-7	2.3	114

Tabulka 1: Cytotoxické aktivity sloučenin, pokračování.

sloučenina	nádorová linie	IC ₅₀ (μ mol/l)	citace	sloučenina	nádorová linie	IC ₅₀ (μ mol/l)	citace
A45	U2OS	1.53	114	A46	CEM-DNR 1/C2	1.58	114
A45	Saos2	1.78	114	A46	CEM-DNR bulk	3.26	114
A45	Saos2	1.78	114	A46	CEM-VCR 1/F3	5.94	114
A45	BT549	2.03	114	A46	CEM-VCR 3/D5	7.82	114
A45	MDA-MB-2 38	1.35	114	A46	CEM-VCR bulk	6.95	114
A45	LNCaP	1.12	114	A47	CEM	4	115
A45	DU145	0.84	114	A47	HT 29	6	115
A45	HT-29	3.57	114	A47	K562	6	115
A45	OVCAR-3	0.9	114	A47	K562 Tax	11	115
A45	Caco-2	2.97	114	A47	PC-3	10	115
A45	MEL-3	1.28	114	A47	A549	10	115
A45	lymphocytes	12.5	114	A47	DU145	23	115
A45	NIH3T3	7.21	114	A47	MCF 7	14	115
A45	K562	0.19	114	A47	SK-Mel2	23	115
A45	K562-CdA	0.28	114	A48	CEM	23	115
A45	K562-GEM	0.94	114	A48	HT 29	6	115
A45	K562-ARA-C	0.63	114	A48	K562	8	115
A45	K562-FLU D	0.35	114	A48	K562 Tax	8	115
A45	CEM	1	114	A48	PC-3	10	115
A45	CEM-DNR 1/C2	0.61	114	A48	A549	11	115
A45	CEM-DNR bulk	1.05	114	A48	DU145	9	115
A45	CEM-VCR 1/F3	3.27	114	A48	MCF 7	6	115
A45	CEM-VCR 3/D5	2.93	114	A48	SK-Mel2	11	115
A45	CEM-VCR bulk	2.51	114	A49	CEM	7	115
A46	B16	9.32	114	A49	HT 29	12	115
A46	B16F	12.4	114	A49	K562	29	115
A46	SW620	5.86	114	A49	K562 Tax	12	115
A46	U87MG	98	114	A49	PC-3	89	115
A46	HepG2	7.12	114	A50	CEM	6	115
A46	A549	43.27	114	A51	A 549	19	115
A46	MCF-7	4.3	114	A51	DU 145	12	115
A46	U2OS	3.94	114	A51	MCF 7	24	115
A46	Saos2	4.8	114	A51	K562	15	115
A46	BT549	6.28	114	A51	K562 Tax	29	115
A46	MDA-MB-2 38	2.37	114	A52	CEM	10	118
A46	LNCaP	3.55	114	A52	K562	10.1	118
A46	DU145	2.75	114	A52	K562 Tax	6.2	118
A46	HT-29	12.31	114	A52	HT29	8.9	118
A46	OVCAR-3	2.59	114	A52	PC-3	10.9	118
A46	Caco-2	7.72	114	A52	SK-Mel2	15.3	118
A46	MEL-3	3.68	114	A53	CEM	8	119
A46	lymphocytes	24.9	114	A53	A 549	8	119
A46	NIH3T3	15.7	114	A53	HT 29	2	119
A46	K562	15.12	114	A53	K 562	0.4	119
A46	K562-CdA	2.13	114	A53	K 562 Tax	4	119
A46	K562-GEM	2.36	114	A53	PC-3	17	119
A46	K562-ARA-C	1.59	114	A53	U87MG	19	119
A46	K562-FLU D	1.27	114				
A46	CEM	4	114				

Tabulka 1: Cytotoxické aktivity sloučenin, pokračování.

CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE

Souhrn poznatků nastíněný v minulých kapitolách dokládá rozvoj poznání v oblasti výzkumu přírodních látek poslední dekády, ať už se týká jejich struktury, chemické reaktivity či biologické aktivity. Výzkumné úsilí, věnované v naší vědecké skupině během posledních několika let přípravě cytotoxicky aktivních pentacyklických triterpenoidů lupanové a 18 α -oleananové řady umožnilo předběžnou formulaci strukturních motivů zodpovědných jednak za samotnou cytotoxickou aktivitu sloučeniny a jednak za její příznivé farmakologické vlastnosti.¹²⁴ Naše skupina se rovněž podílela na objasnění molekulárního mechanismu účinku těchto biologicky aktivních sloučenin,¹²¹ což usnadnilo efektivnější návrh a přípravu nových skupin aktivních látek. Povaha získaných poznatků zapříčinila rovněž pozvolný přesun zaměření skupiny ze základního výzkumu směrem k výzkumu orientovanému na přípravu nových látek s potenciálním farmakologickým využitím. Výsledkem první fáze tohoto nového směru výzkumu je série britských a mezinárodních patentů, které chrání nalezené sloučeniny pro případné budoucí využití v protinádorové terapii.^{125,126,127,128,129,130,131} V další fázi se podařilo rovněž navázat přímou spoluprací s několika průmyslovými partnery. Spolupráce s farmaceutickým průmyslem přinesla nové požadavky na připravované látky a na postup jejich přípravy, zejména optimalizaci přísunů výchozích látek do poloprovozního měřítka a v oblasti syntézy nových látek pak použití postupů vhodných pro scale-up.

Potřeba syntézy nové skupiny aktivních sloučenin, které by disponovaly zlepšenou cytotoxickou aktivitou, a jejichž syntetický postup by vyhovoval uvedeným podmínkám, tak vychází přímo z požadavků kladených na nové deriváty ve farmaceutickém průmyslu. Z tohoto hlediska se jako jeden z vhodných kandidátů pro výzkum ukázala skupina kvarterních amoniových solí triterpenoidů, a to přesto, že jejich příprava nebyla dosud až na několik výjimek vůbec popsána. Od kvarterních solí triterpenoidů je přitom možné očekávat jak zlepšené farmakologické vlastnosti (díky zvýšené rozpustnosti v polárních rozpouštědlech), tak dobré biologické aktivity. Předkládaná dizertační práce je tedy prvním uceleným výzkumem, který se zabývá jednak přípravou kvarterních amoniových solí triterpenoidů a jednak jejich biologickými aktivitami, zejména cytotoxickou, antimikrobiální, protizánětlivou a anti-HIV aktivitou.

Tato práce byla vypracována jako součást licenčního výzkumu přípravy a studia nových biologicky aktivních triterpenoidů směřovaného k vývoji nových komerčních léčiv.

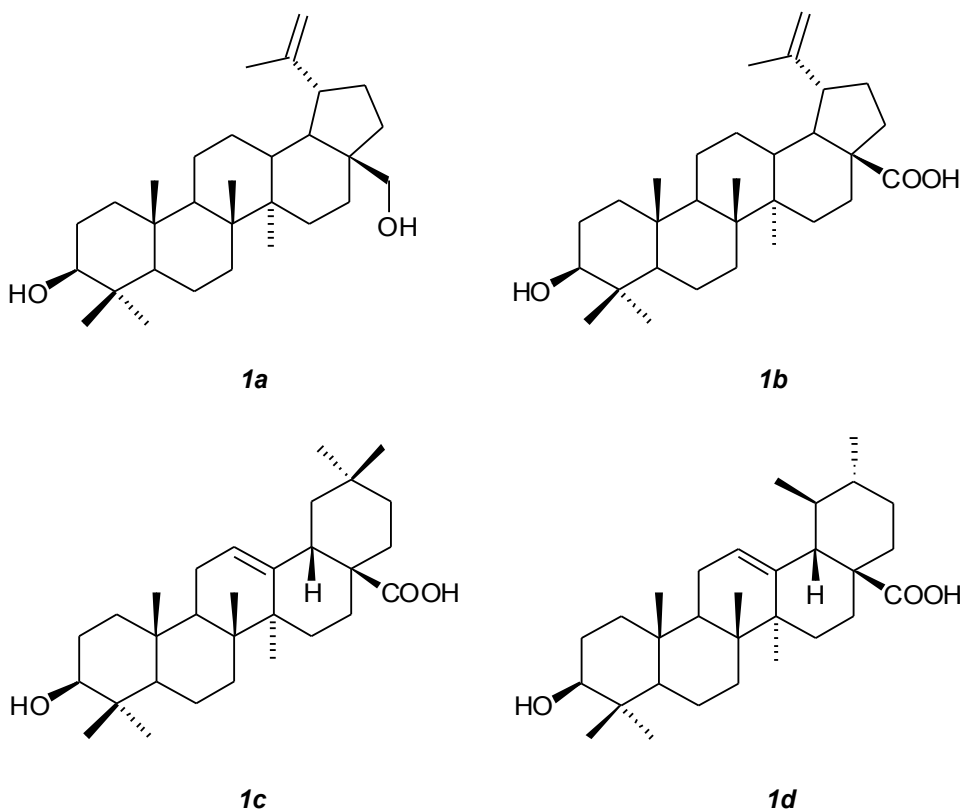
Předkládaná dizertační práce si klade následující cíle:

1. Připravit série kvarterních amoniových solí v lupanové, 21-oxolupanové, 29-norlupanové, oleananové a ursanové řadě.
2. Porovnat zjištěné biologické aktivity připravených kvartérních solí s aktivitami výchozích sloučenin a pokusit se nalézt vztah mezi cytotoxicitou daného derivátu a jeho strukturními rysy.
3. Vypracovat multigramové postupy syntézy biologicky aktivních kvarterních amoniových solí a provést optimalizaci a scale-up přípravy výchozích sloučenin potřebných pro jejich syntézu.

PŘÍPRAVA VÝCHOZÍCH LÁTEK

Stěžejními výchozími sloučeninami pro tuto práci byly přírodní pentacyklické triterpenoidy a jejich deriváty. Z přírodních pentacyklických triterpenoidů se jednalo o betulin (**1a**), kyselinu betulinovou (**1b**), ursolovou (**1c**) a oleanolovou (**1d**). Z derivátů zejména o 2'-bromethyl-estery triterpenoidních kyselin.

Kyselina ursolová (**1c**) a oleanolová (**1d**) byly získány od komerčních dodavatelů, kyselina betulinová (**1b**) byla získána extrakcí platanové kůry podle literárního postupu¹²⁴.



Betulin (**1a**)

Betulin (**1a**) je přírodní pentacyklický triterpen, který hraje důležitou úlohu jako výchozí sloučenina pro syntézu řady nových biologicky aktivních sloučenin. V přírodě se nachází zejména ve svrchních vrstvách březové kůry (*Betula sp.*). V souvislosti

s náročnými *in vivo* testy biologické aktivity prudce stoupají nároky na množství a kvalitu tohoto materiálu. Proto byla provedena pilotní studie izolace betulinu (**Ia**) v průmyslovém měřítku. Cílem této studie bylo získat potřebné provozní zkušenosti, základní data o vhodnosti navržených postupů a dostatek výchozího materiálu pro další syntézy.

Betulin (**Ia**) se tradičně získává extrakcí svrchních vrstev březové kůry vhodnými rozpouštědly (ethanol a pod.). Ačkoli je obsah betulinu (**Ia**) v březové kůře relativně vysoký,¹³² ruční sběr březové kůry neumožňuje získat dostatečné množství rostlinného materiálu pro izolaci více než jednotek kilogramů této látky. Značná množství odpadní březové kůry jsou však produkována papírenským průmyslem severských zemí.¹³³ Proto byl realizován import 25 tun březové kůry ze švédské papírny.

Skladování a příprava materiálu

Surová březová kůra obsahující značné množství hrubých nečistot, jemných prachových částic a vlhkosti byla uskladněna v hale o ploše cca 300 m², rozhrnuta do vrstvy o výšce 30 – 40 cm a sušena asi šest měsíců. Poté byl ze surové kůry ručně odstraněn podíl nejhrubších nečistot, zejména větších kusů dřeva, cizorodých těles a kůry jiných stromů. Tento podíl činil zhruba 300 kg.

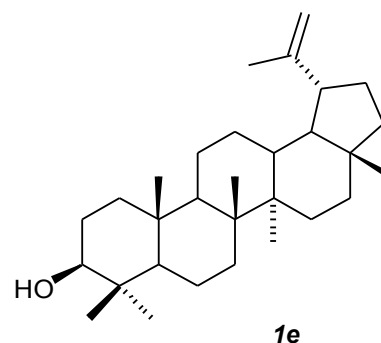
Obsah jemných částic činil asi 40 % a podle výsledků extrakčních experimentů tyto částice neobsahovaly téměř žádné extrahovatelné látky. Separace jemných částic byla prováděna mechanickým síťováním. Síťování se ukázalo jako časově velmi náročné a přesítování celého množství zabralo více než měsíc. Získaných cca 8 tun nadsítného obsahovalo 11 – 12 % extrahovatelné složky.

Pro mletí přebrané a přesítované kůry byly vyzkoušeny dva typy mlýnů. Původně použitý kladívkový šrotovník se neukázal jako příliš vhodný kvůli nízké rychlosti zpracování materiálu a kvůli nevhodné konzistenci materiálu po mletí (příliš nízká sypná hmotnost). Pro mletí větší části kůry byl použit poloprovodní nožový mlýn se šikmým stříhem a se sítem o velikosti ok 6 mm. Takto bylo semleto a napytlováno zhruba 1.5 tuny březové kůry připravené pro další zpracování.

Extrakce

Firma Flaveko Trade, Pardubice provedla laboratorní pokusy s extrakcí březové kůry superkritickým oxidem uhličitým. Za poměrně tvrdých podmínek (50 – 70 °C, 13 MPa) byl získán extrakt, který však podle analýzy obsahoval betulin (**1a**) ve směsi 1:1 s lupeolem (**1e**). Lupeol (**1e**) se vyskytuje v březové kůře společně s betulinem (**1a**) avšak jeho obsah je asi desetkrát nižší. Použitou metodou tedy nelze extrahovat betulin (**1a**) z březové kůry, teoreticky se však nabízí možnost tímto způsobem odstraňovat z březové kůry lupeol (**1e**).

Zpracovaná březová kůra byla extrahována ve firmě Exar, Jílové u Prahy 96% pitným lihem (viz Tabulka 2). Celkem 405 kg namleté březové kůry bylo ve třech šaržích dvakrát extrahováno zahorka v duplikovaných míchaných kotlích vyhřívaných přehřátou párou. Oba extrakční podíly každé šarže byly spojeny a ponechány 24 hodin odsazovat od kalu a poté zahuštěny na cirkulační odparce na obsah sušiny asi 15 %. Získaná tmavě hnědá suspenze surového betulinu (**1a**) byla dále odsávána na procesní nuči vlastní konstrukce. Konzistence vysráženého betulinu (**1a**) se ukázala pro odsávání zcela nevhodná, neboť docházelo k rychlému zanášení filtrační plachetky. Urychlení filtrace na přijatelnou míru bylo dosaženo teprve odsáváním surového betulinu (**1a**) přes pomocnou vrstvu křemeliny. Filtráty byly spojeny, znovu zahuštěny a precipitovaný betulin (**1a**) byl znovu odsát. Filtrační koláče byly vysušeny za tepla, čímž bylo získáno cca 30 kg surového betulinu (**1a**) k dalšímu zpracování.



Diskuze

Provedená pokusná izolace betulinu (**1a**) přinesla jednak dostatečné množství výchozího materiálu pro další syntézy a jednak informace a provozní zkušenosti, které lze formulovat následovně:

- Použití pitného lihu k extrakci rostlinného materiálu se neukázalo jako příliš vhodné. Jednak docházelo k extrakci většího množství nečistot, pravděpodobně

ligninové povahy, a jednak po zahuštění extraktu na cirkulační odparce docházelo k precipitaci surového betulinu (**1a**) ve formě, která není vhodná pro odsávání. Pro další pokusy se tedy navrhuje použít jiného rozpouštědla.

- Samotné použití cirkulační vakuové odparky je riskantní, neboť hrozí vysrážení surového betulinu v prostoru odparky, což komplikuje izolaci.
- Dodatečnými pokusy bylo zjištěno, že pracné síťování nesezletého materiálu by bylo možné nahradit propíráním vodou. Odstraněním podílu těžšího než voda dochází ke zvýšení obsahu extrahovatelného podílu až ke 20%.

		Šarže A	Šarže B	Šarže C
extrakce 1	březová kůra [kg]	100	150	155
	EtOH [kg]	500	600	601
	stočeno [kg]	378	503	494
	sušina %	2.2	3.0	3.1
extrakce 2	EtOH [kg]	202	330	300
	stočeno [kg]	212	326	294
	sušina %	0.8	1.1	1.1
celkem po odsazení [kg]		560	807	771
sušina spojených podílů %		2.0	2.2	2.2

Tabulka 2: Výsledky průmyslové izolace betulinu **1a**.

2'-bromethyl-estery triterpenických kyselin

2'-bromethyl-estery triterpenických kyselin jsou výhodné výchozí látky pro přípravu kvarterních amoniových solí. Dvojuhlíkatý můstek totiž kompenzuje sterický vliv rigidního triterpenického skeletu na reaktivitu halogenu.

Původní způsob přípravy 2'-bromethyl-esterů¹³⁴ spočíval v reakci příslušné kyseliny s 1,2–dibromethanem ve směsi dichlormethanu a acetonitrilu za přítomnosti DBU a následném chromatografickém oddělení bromethyl-esteru od vedlejších produktů. V této práci byl optimalizován způsob přípravy bromethyl-esteru kyseliny betulinové (**1b**) a byla zkoumána struktura vedlejších produktů. Již v literatuře¹³⁴ autorka

spekuluje, že vedlejším produktem při přípravě bromethyl-esteru **2a** může být dimerní ester **2b**. Při reprodukci experimentu (Schéma 7) byl tento vedlejší produkt **2b** skutečně izolován a jeho struktura potvrzena pomocí spektrálních dat.

Upozornění: 1,2-dibromethan je silný podezřelý karcinogen a tomu je nutné přizpůsobit režim práce s ním. Veškeré nakládání s touto látkou musí být prováděno v dobře táhnoucí digestoři za použití příslušných ochranných prostředků.

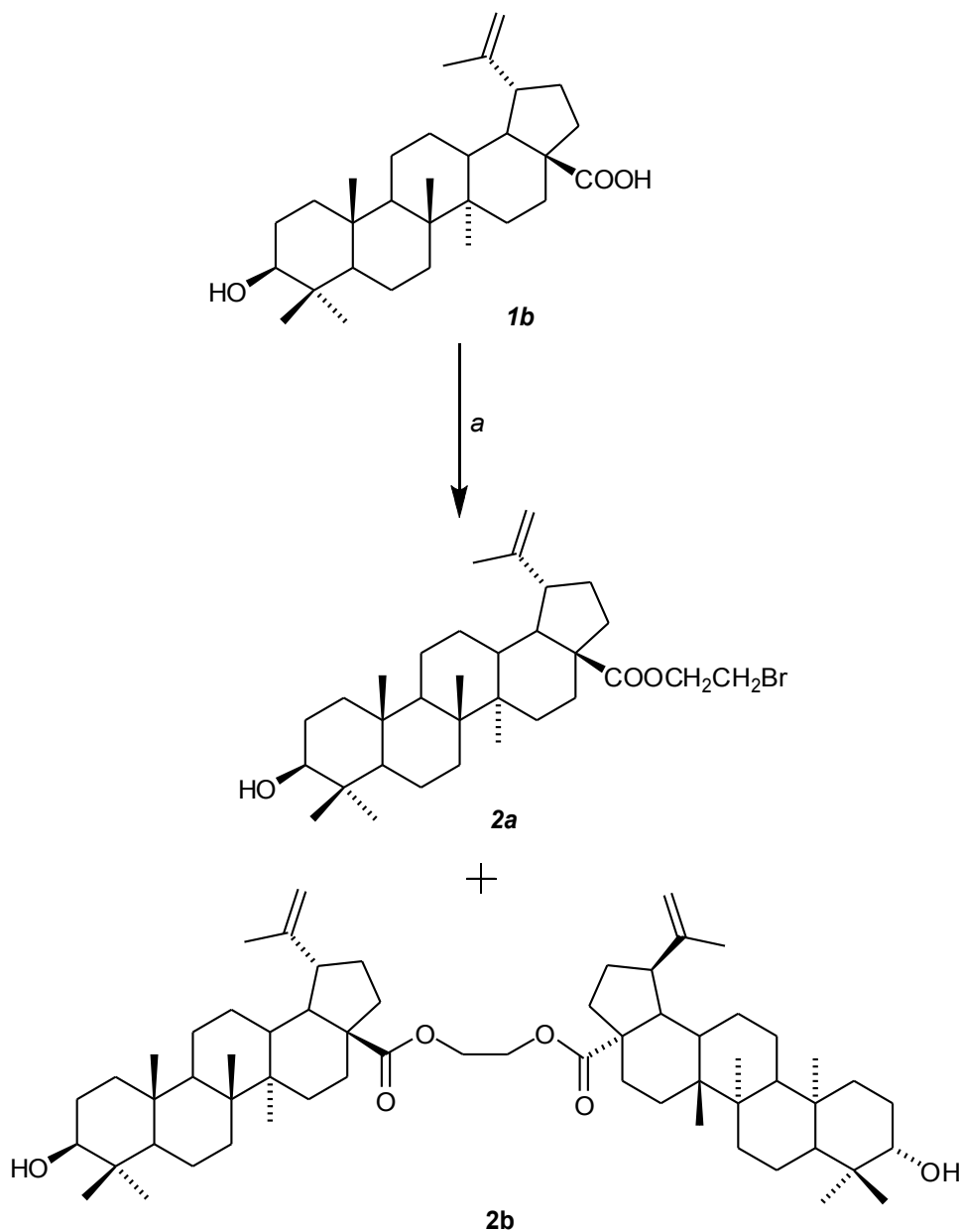


Schéma 7: a: 1,2-dibromethan, DBU, CH₂Cl₂, MeCN, RT, 4 dny.

V ^1H NMR spektru látky **2b** byla pozorována série šesti singletů skeletálních methylů mezi δ 0.76 ppm a δ 1.69 ppm, dále dvojice singletů H-29a a H-29b u δ 4.61 ppm a δ 4.73 ppm, které dokládají přítomnost dvojné vazby, a multiplet dvojuhlíkatého můstku u δ 4.29 ppm. V ^{13}C NMR spektru bylo celkem pozorováno 31 signálů, což je o jeden méně než u výchozí látky, signál můstku byl pozorován při δ 64.93 ppm. Dimerní povahu látky také dokládá MS (ESI), kde byl nalezen iont $[\text{M}+\text{Na}+\text{H}]^+$ při 962 m/z.

Optimalizace způsobu přípravy bromethyl-esteru **2a** spočívala v záměně dichlormethanu za DMF, záměně drahé báze DBU za uhličitan draselný, dále v provádění reakce za zvýšené teploty (50 °C), což vedlo ke zkrácení reakční doby na 2–3 hodiny (monitoring pomocí TLC), a v optimalizaci molárního nadbytku 1,2-dibromethanu na 5 molárních ekvivalentů, při kterém dimer **2b** vzniká pouze ve stopách. Tím zanikla i potřeba chromatografie a k získání čistého produktu stačilo produkt rekrystalizovat z *i*-PrOH. Tímto postupem pak byly získány všechny 2'-bromethyl-estery použité v této práci.

PŘÍPRAVA KVARTERNÍCH SOLÍ VYCHÁZEJÍCÍCH Z BETULINU (*1a*)

2'-halogenethyl-estery kyseliny *3e*

21-oxokyselina *3e* byla připravena podle literárních postupů,^{135,136,137} které byly částečně modifikovány tak, aby umožnily přípravu řádově stovek gramů látky.¹³⁸ Přestože oxokyselinu *3e* je třeba přisunovat pětistupňovým postupem (Schéma 8), je tato látka ve velkých množstvích dostupnější než přírodní triterpenické kyseliny. Jedná se o často používaný výchozí materiál pro nejrůznější derivatizace, které vyžadují karboxylovou funkční skupinu v poloze 28.

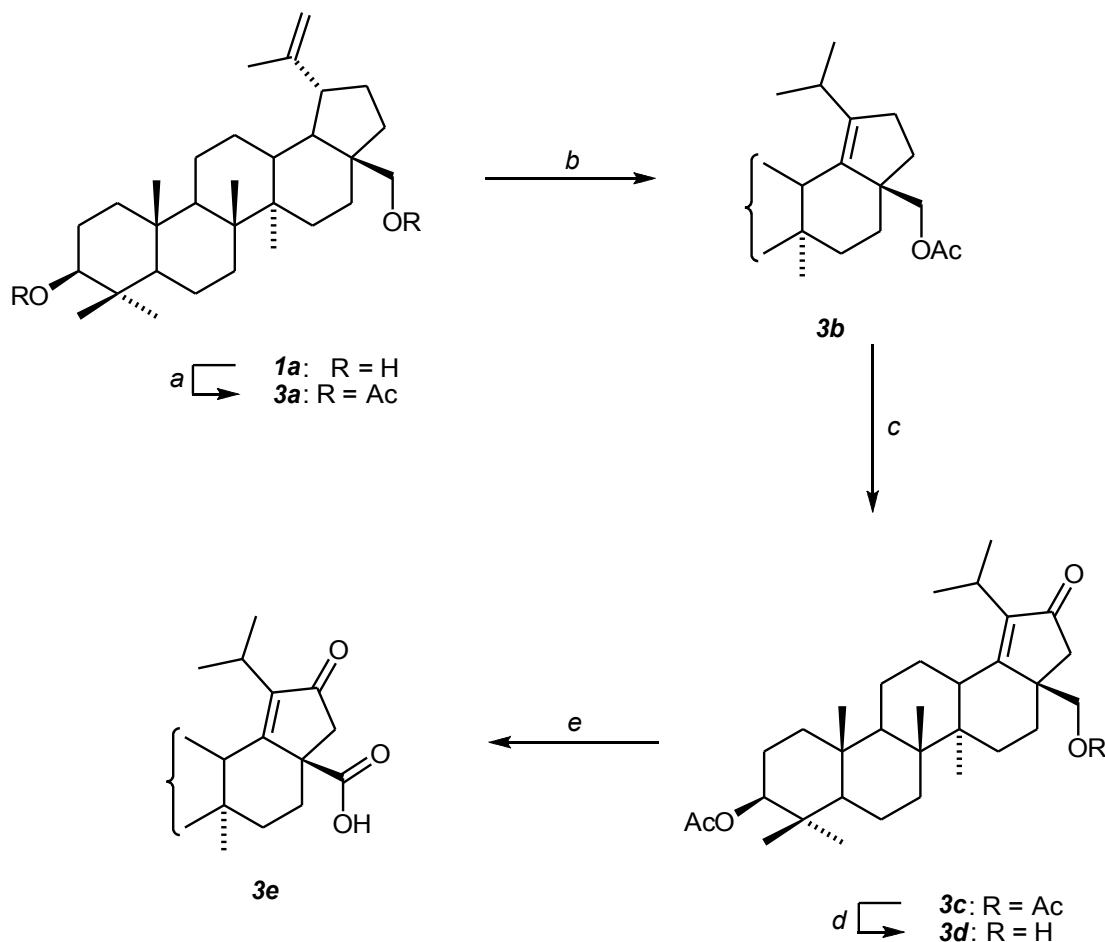


Schéma 8: a: Ac₂O, pyridin; b: HBr, CH₃COOH, toluen, Ac₂O; c: Na₂Cr₂O₇, CH₃COONa, toluen, CH₃COOH, Ac₂O; d: KOH, toluen, EtOH; e: RuO₂, NaIO₄, EtOAc, H₂O, H₂SO₄

Betulin (*1a*) byl nejprve acetylován acetanhydridem v pyridinu, poté byl proveden přesmyk dvojné vazby z polohy 20(29) do polohy 18 působením bromovodíku

v kyselině octové, následovala allylová oxidace dichromanem sodným do polohy 21 a parciální hydrolýza acetátu v poloze 28. Závěrečná oxidace oxidem rutheničelým připraveným *in situ* oxidací oxidu rutheničitého pomocí jodistanu sodného ve dvoufázovém systému voda – ethylacetát poskytla oxokyselinu **3e**.

Takto připravená oxokyselina **3e** byla dále použita k přípravě několika halogenovaných esterů (Schéma 9). Výše popsanou reakcí s 1,2-dibrommethanem byl získán již známý¹³⁴ bromethyl-ester **3f** a bromethyl-ester **3i** s volnou hydroxyskupinou v poloze 3. Analogickou reakcí oxokyseliny **3e** s 1-brom-2-chlorethanem byl také připraven 2'-chlorethyl-ester **3g**. Hydrolýza kyseliny **3e** byla provedena podle literárního postupu.¹¹⁶

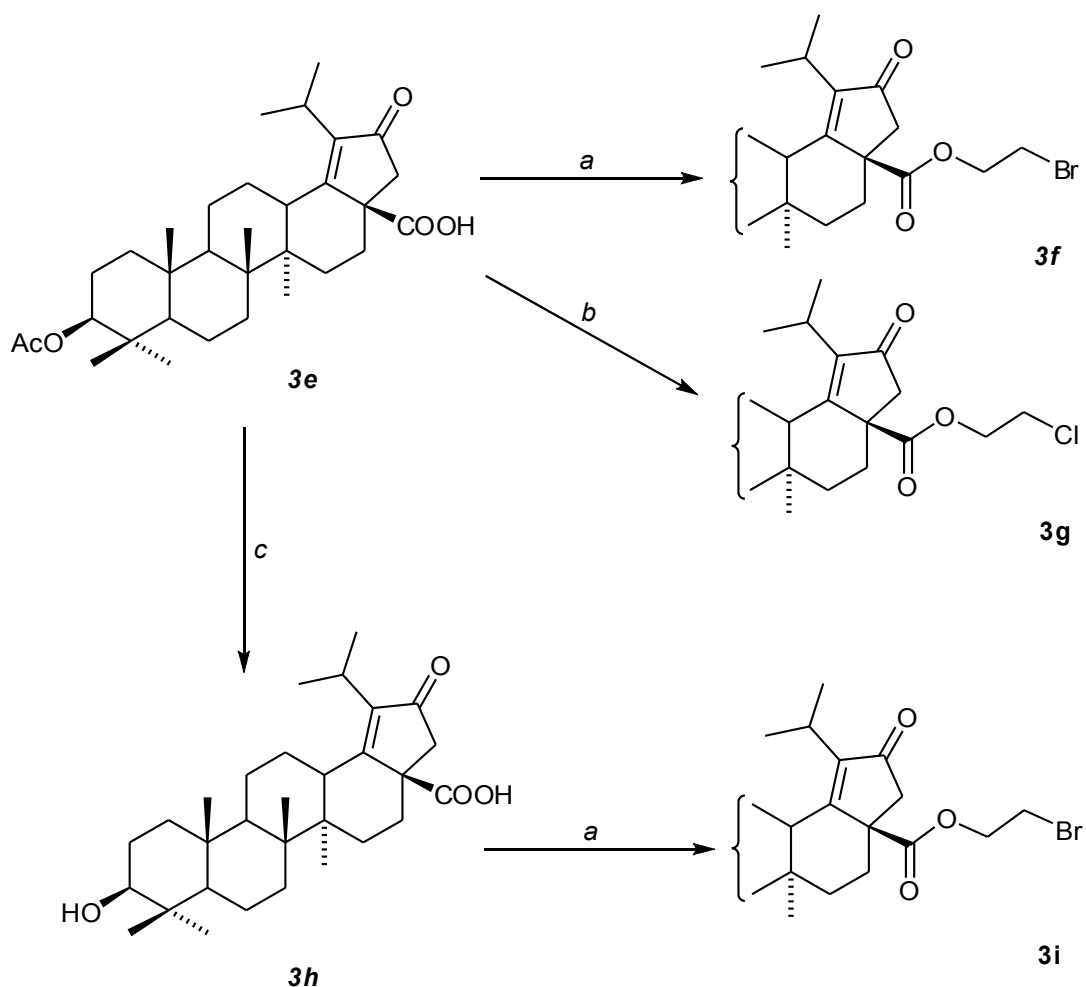


Schéma 9: a: $\text{BrCH}_2\text{CH}_2\text{Br}$, K_2CO_3 , MeCN, DMF, 50°C ; b: $\text{BrCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$, K_2CO_3 , MeCN, DMF, 50°C ; c: KOH, EtOH, toluen.

Připravené halogenethyl-estery byly identifikovány na základě spektrálních dat. V ^1H NMR spektru látky **3g** byl nalezen jeden signál acetátového methyly při δ 2.05 ppm, dále septet jednoho vodíku při δ 3.2 ppm charakteristický pro isopropylový systém. Přítomnost vodíků H-1' a H-2' dokládají dva multiplety při δ 3.7 ppm a δ 4.5 ppm, každý o intenzitě dvou vodíkových atomů. V ^{13}C NMR spektru byly pozorovány signály dvojné vazby uhlíků C-18 a C-19 při δ 145.84 ppm a δ 170.95 ppm, dále signál acetátového kvarterního uhlíku při δ 171.45 ppm, signál uhlíku C-28 karboxylové funkce při δ 174.03 ppm a signál ketonu C-21 při δ 206.93 ppm. V MS spektru (ESI) byl pozorován iont $[\text{M}]^+$ při 574 m/z. V ^1H NMR a ^{13}C NMR spektru látky **3i** byly nalezeny analogické signály jako v již popsaném esteru **3f**,¹³⁴ kromě signálu acetátu. V souladu se strukturou byl v MS (ESI) nalezen bromový dublet $[\text{M}+\text{H}]^+$ při 578 m/z.

Kvarterní sole esterů 3f, 3g a 3i

Estery **3f**, **3g** a **3i** posloužily jako výchozí látky při prvních pokusech o přípravu kvarterních amoniových solí. Uspořádání experimentu a experimentální procedury byly voleny tak, aby případné převedení syntetického postupu do poloprovozního, nebo provozního měřítka bylo co nejjednodušší. Konkrétní způsob přípravy spočíval v reakci příslušného 2'-halogenethyl-esteru s terciárním aminem v dipolárním aprotickém rozpouštědle (DMF). Zvolená knihovna terciárních aminů obsahovala alifatické aminy (trimethylamin, triethylamin), aromatické aminy (pyridin, pyrazin) a funkcionalizované aminy (triethanolamin).

Během prvních experimentů se ukázalo, že jedním z problémů při přípravě kvarterních amoniových solí bude značná neochota terciárních aminů reagovat s halogenovanými estery. Reakce s TMA sice probíhá přijatelnou rychlostí, reakce s ostatními aminy (TEA, pyridin, triethanolamin) však za laboratorní teploty v podstatě vůbec neprobíhá. Například typická reakce bromethyl-esteru **3f** s TEA za laboratorní teploty vykazala, dle TLC, pouze 30% konverzi výchozího materiálu po sedmi dnech reakčního času. Při zvýšení teploty až na 100 °C proběhne sice reakce během 24 hodin, avšak dochází jednak k rozkladu výchozí látky v bazickém prostředí aminu a jednak k rozkladu samotného terciárního aminu na barevné polární nečistoty, jejichž separace

od dalších produktů reakce je velmi obtížná. Jako akceptovatelné se ukázalo zahřátí na 50 – 70 °C, kdy rozklad látek participujících v reakci probíhá jen velmi pomalu a reakční doba se pohybuje v řádu dnů (tabulka 3) v závislosti na struktuře aminu. Samotné zahřívání probíhalo ve skleněných vialkách firmy Supelco se šroubovacím uzávěrem, které byly dále v případě nízkovroucích aminů uzavřeny do plastové nádoby naplněné sorbentem. Reakce s pyrazinem neprobíhá ani za zvýšené reakční teploty a vede pouze k pozvolnému rozkladu reaktantů. Všechny reakce je nezbytné provádět pod atmosférou inertního plynu (argon).

činidlo	reakční doba (50 – 70 °C) [h]
TMA	2 – 3
TEA	48 – 72
pyridin	60 – 96
triethanolamin	< 168
pyrazin	reakce neprobíhá

Tabulka 3: Typické reakční doby reakce aminů s bromethyl-estery.

Dalším podstatným problémem se ukázalo zpracování reakční směsi a purifikace produktu. Zpracovat reakční směs obvyklým způsobem, to jest zředěním reakční směsi vodou a extrakcí produktů do organického rozpouštědla, je složité, neboť kvarterní amoniové sole jsou v organických rozpouštědlech nemísitelných s vodou pouze omezeně rozpustné. Naopak, rozpustnost v methanolu či ethanolu je vynikající. Dostatečně koncentrovanou reakční směs je možné zředit vodou a vysrážené produkty potom odsát, výtěžky jsou ale sniženy částečnou rozpustností produktu. Navíc žádný z výše uvedených postupů není využitelný v průmyslu, neboť tam je vyžadována co nejúplnější regenerace rozpouštědel.

Purifikace surového produktu také není triviální záležitost, neboť vznikající kvarterní soli jsou vysoce polární sloučeniny. Chromatografickou separaci je možno provést následujícím postupem: produkt rozpuštěný ve směsi alkoholu (MeOH) a chlorovaného rozpouštědla se nanese na kolonu naplněnou silikagelem. Promytí kolony nejprve chlorovaným rozpouštědlem vede k eluci nepolárních nečistot, poté se kolona postupně promývá gradientem methanolu až do 20 % (obj.), čímž ve většině případů dojde k oddělení produktu od barevných rozkladných zplodin. Toto oddělení

od barevných zplodin ale nikdy není úplné a navíc dochází ke ztrátám materiálu při chromatografii. Krystalizace z běžných rozpouštědel také nepřináší dobré výsledky, neboť místo krystalů vznikají často amorfni objemné sraženiny, které nelze odsát.

Výše uvedené nevýhody konvenčních způsobů zpracování byly důvodem pro vývoj alternativního postupu, který by je eliminoval. Při experimentech se snižováním objemu použitého rozpouštědla bylo pozorováno, že výchozí látky ochotně tvoří v použitém rozpouštědle přesycené roztoky, které jsou stabilní řádově týden. Pokud byla reakce s terciárním aminem provedena s předem připraveným přesyceným roztokem halogenderivátu, vznikající kvarterní amoniová sůl často vykristalizovala jako chromatograficky jednotná látka, kterou stačilo pouze odsát a vysušit. Takto je možno v některých případech získat přímo vysoce čistou kvarterní sůl bez nutnosti chromatografie a krystalizace. Tato metoda je velmi vhodná pro přípravu velkých množství kvarterních solí. Byly provedeny scale-up pokusy až do desítek gramů výchozích látek.

Další úspěšně vyzkoušenou metodou zpracování reakční směsi, je její přímé odpaření za sníženého tlaku a teploty 80 °C. Odpařování probíhá velmi pomalu a zbytky reakčního rozpouštědla (DMF) zůstávají v odparku velmi dlouho. Získaný surový produkt je potom obvykle nutné chromatograficky přechistit podle výše uvedeného postupu. Tato metoda byla použita v případech, kdy nedošlo ke krystalizaci produktu z reakční směsi.

Reakcí bromethyl-esteru **3f** s TMA, TEA a pyridinem byly připraveny soli **4a** – **4c** (Schéma 10). Reakce chlorethyl-esteru **3g** s terciárními aminy (TMA, TEA, pyridin, triethanolamin) probíhaly velice neochotně – zatímco s alifatickými aminy reakce vůbec neprobíhala, při reakci s triethanolaminem došlo ke vzniku směsi polárních produktů kde žádná látka nepřevažovala a která nebyla dále zkoumána. Kýžený produkt, chlorid **4d** tak vznikl pouze při reakci s pyridinem.

Připravené sloučeniny byly identifikovány na základě spektrálních dat. Pro všechny sloučeniny 21-oxolup-18-enového typu jsou typické následující spektrální charakteristiky: V ¹H NMR spektru jsou vodíkové atomy isopropylových methylů v pozicích 29 a 30 reprezentovány dvěma dublety tří vodíků v oblasti $\delta \sim 1.19$ ppm a zbylý vodíkový atom isopropylového systému septetem při $\delta \sim 3.2$ ppm. Interakční konstanta v tomto systému činí přibližně $J \sim 6.9$ Hz. Atomy vodíků H-22a a H-22b se navzájem štěpí interakční konstantou přibližně $J \sim 18.8$ Hz na ostré dublety

s chemickým posunem $\delta \sim 2 - 3$ ppm. Signál vodíkového atomu H-3 α se ve spektru objevuje jako multiplet charakteristického tvaru o intenzitě jednoho vodíku přibližně při $\delta \sim 3.5$ ppm pro sloučeniny s volnou 3 β hydroxyskupinou a přibližně při $\delta \sim 4.5$ ppm pro sloučeniny s esterifikovanou (např. acetylovanou) hydroxyskupinou. ^{13}C NMR spektrum látek tohoto typu obsahuje signály uhlíků dvojné vazby C-18 a C-19 v oblasti $\delta \sim 145$ ppm a $\delta \sim 170 - 175$ ppm. Ve stejné oblasti se nachází i signál karboxylového uhlíku C-28 a signál karbonylového uhlíku C-21 bývá pozorován u $\delta \sim 205 - 210$ ppm.

V ^1H NMR spektru soli **4a** byl kromě výše zmíněných signálů nalezen singlet tří vodíkových atomů H-32 acetátu při δ 2.03 ppm s intenzitou tří vodíků. Při δ 3.74 ppm a $\delta \sim 4.61$ ppm byly pozorovány signály vodíkových atomů H-1' a H-2' jako ostrý triplet a multiplet. Intenzivní singlet tří methylů navázaných na kvarterní dusík byl pozorován při δ 3.19 ppm. V ^{13}C NMR spektru byly v souladu se strukturou nalezeny signály typické pro 21-oxolup-18-enový skelet. Intenzivní signál tří methylů vázaných na dusík se nachází při δ 57.12 ppm. V MS (ESI) se nachází pík $[\text{M}-\text{Br}]^+$ při 599 m/z. V ^1H NMR spektru soli **4b** se nachází kromě obvyklých signálů jeden signál acetátu při δ 2.03 ppm, signály vodíkových atomů ethylenového můstku H-1' a H-2' se nachází při δ 3.74 ppm jako triplet a při $\delta \sim 4.50$ ppm jako multiplet. Signály tří ethylových skupin vázaných na kvarterní dusík byly pozorovány jako triplet s intenzitou devíti vodíků při δ 1.31 ppm s interakční konstantou $J \sim 7.2$ Hz a jako kvartet při δ 3.39 ppm s interakční konstantou $J \sim 7.4$ Hz. V ^{13}C NMR spektru byly nalezeny kromě signálů obvyklých pro danou skupinu derivátů intenzivní signály tří ethylových skupin vázaných na dusík při δ 7.93 ppm (CH_3) a při δ 54.76 ppm (CH_2) a signál uhlíkového atomu acetátu C-31 při δ 172.81 ppm. V MS (ESI) se nachází iont $[\text{M}-\text{Br}]^+$ při 641 m/z a signál odpovídající ztrátě 29 hmotnostních jednotek (ethylový radikál). V ^1H NMR spektru soli **4c** byl kromě obvyklých signálů pozorován signál tří vodíkových atomů H-32 acetátu jako singlet při δ 2.03 ppm. Signály vodíkových atomů v pozicích 1' a 2' ethylenového můstku byly pozorovány jako triplet při δ 5.00 ppm s intenzitou dvou vodíků a dva dublety tripletů s intenzitou jednoho vodíku a interakčními konstantami $J \sim 9.6$ Hz a $J \sim 4.8$ Hz při δ 4.58 ppm a δ 4.64 ppm. Signály pyridinové části molekuly byly nalezeny jako dublet dubletu dvou vodíků při δ 8.15 ppm, dále jako rozšířený triplet jednoho vodíku při δ 8.67 ppm a dublet dvou vodíků při δ 8.97 ppm.

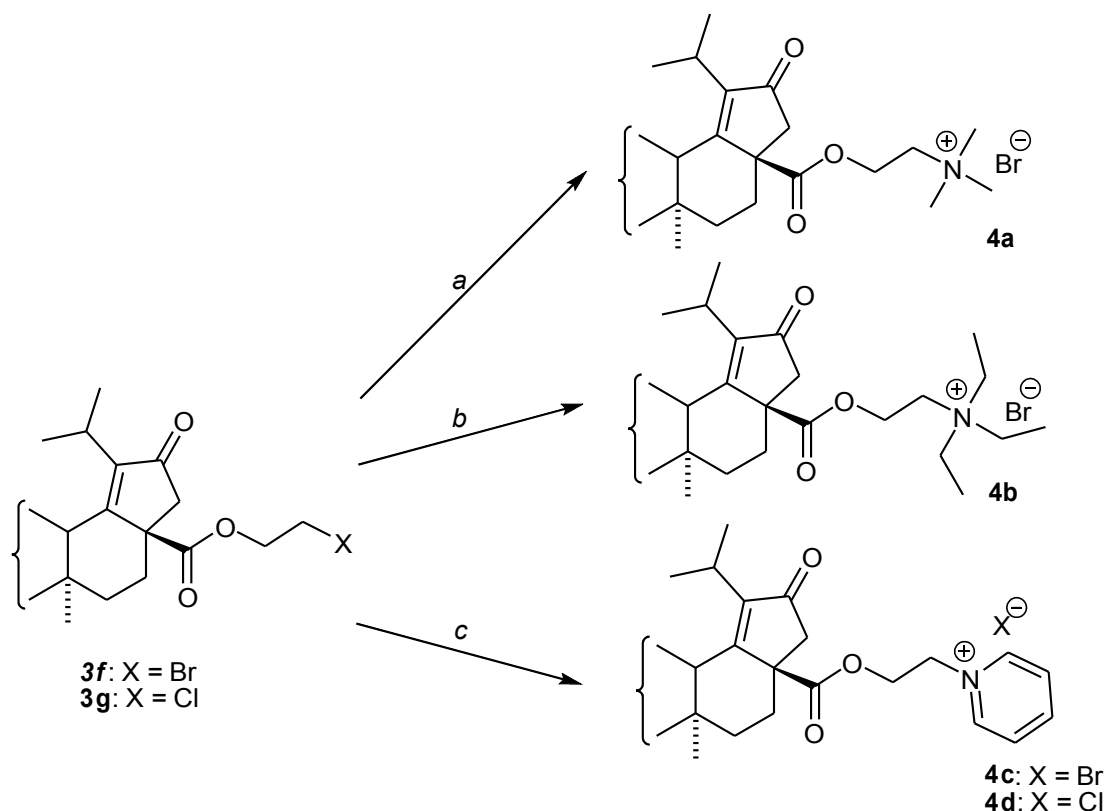


Schéma 10: a: TMA, DMF, 50 – 70 °C; b: TEA, DMF, 50 – 70 °C; c: pyridin, DMF, 50 – 70 °C.

V ^{13}C NMR spektru byl kromě signálů typických pro danou skupinu sloučenin nalezen signál uhlíkového atomu C-31 při δ 172.73 ppm a signály terciárních uhlíků pyridiniové skupiny při δ 146.12 ppm, δ 146.98 ppm a při δ 147.57 ppm. V MS (EI) byl nalezen molekulární iont $[\text{M}-\text{Br}]^{++}$ při 618 m/z dále iont odpovídající ztrátě 106 hmotnostních jednotek ($\text{C}_7\text{H}_9\text{N}$), iont odpovídající ztrátě molekuly acetaldehydu, iont odpovídající ztrátě molekuly kyseliny octové a ionty odpovídající kombinacím těchto ztrát. V ^1H NMR spektru chloridu **4d** byly nalezeny analogické signály jako v případě bromidu **4c**, signály pyridiniové skupiny se nacházely při δ 8.08 ppm (intenzita dvou vodíků), δ 8.48 ppm (intenzita jednoho vodíku) a δ 9.18 (intenzita dvou vodíků). V ^{13}C NMR spektru byly rovněž zaznamenány analogické signály jako v předchozím případě s trojicí signálů pyridiniové skupiny při δ 128.36 ppm, δ 145.46 ppm a δ 172.78 ppm. V MS (ESI) byl pozorován molekulární iont $[\text{M}-\text{Br}]^+$ při 618 m/z.

Při reakci bromethyl-esteru **3f** s triethanolaminem (Schéma 11) byl jako jediný produkt izolován terciární amin **4e**, který se tvoří pravděpodobně reakcí vznikající soli s nadbytkem triethanolaminu. Jako vedlejší produkt pak vzniká tetraethanolamonium bromid, který také byl z reakce izolován. Při pokusu o zabránění této následné reakci

snížením nadbytku triethanolaminu až na jeden ekvivalent došlo prakticky k zastavení reakce. Při všech pokusech o přípravu triethanolaminové kvarterní soli došlo tedy k výše popsané reakci a byly získány pouze terciární aminy typu **4e**. V ^1H NMR spektru aminu **4e** byl pozorován kromě obvyklých signálů signál vodíkových atomů H-32 acetátu při δ 2.03 ppm, signály H-1' a H-2' ethylenového můstku byly pozorovány jednak jako triplet s intenzitou dvou vodíků při δ 2.85 ppm a jednak jako multiplet dvou vodíků při $\delta \sim 4.22$ ppm. Počet hydroxyetylových skupin navázaných na dusík byl určen pomocí integrálních intenzit. U δ 2.70 ppm byl zaznamenán triplet s intenzitou čtyř vodíků a interakční konstantou $J \sim 5.8$ Hz a při δ 3.58 ppm triplet čtyř vodíků se stejnou interakční konstantou.

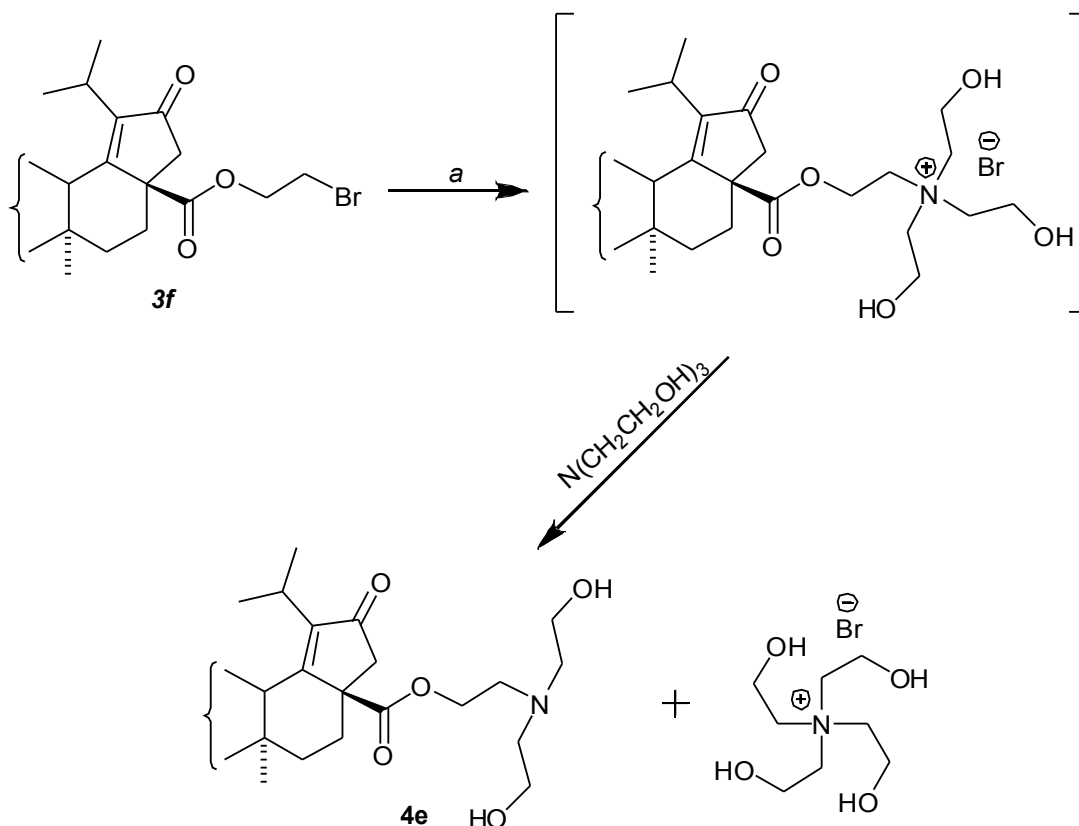


Schéma 11: *a*: triethanolamin, DMF, 50 – 70 °C.

V ^{13}C NMR spektru byly v souladu s předchozími daty nalezeny signály obvyklé pro tuto skupinu sloučenin. Kromě těchto signálů se ve spektru nacházel pík uhlíku acetátu C-31 při δ 172.82 ppm a dva intenzivní signály hydroxyetylových sekundárních uhlíků při δ 57.90 ppm a δ 60.84 ppm. V MS (ESI) byl nalezen iont $[\text{M}+\text{H}]^+$ při 644 m/z a dále iont

odpovídající ztrátě kyseliny octové. Přítomnost volných hydroxylových skupiny dokládá široký pík v IR (DRIFT) spektru s maximem při 3437 cm^{-1} .

Hydrochloridy a soli heterocyklických esterů

Během předchozího výzkumu¹³⁴ bylo zjištěno, že heterocyklické estery typu **5b**, **5c** a **5d** projevují zajímavou cytotoxickou aktivitu. Proto byly tyto látky použity pro přípravu kvarterních solí s cílem prověřit vliv kvarternizace dusíku na biologickou aktivitu těchto sloučenin (Schéma 12). Na žádost partnerů z průmyslové i farmaceutické sféry byly tyto látky a také pyridinylmethyl ester **5a** použity i k přípravě hydrochloridů, které mívají často lepší farmaceutický profil, než výchozí aminy. Převedení aminu na jeho hydrochlorid je obvyklý způsob jak zvýšit jeho rozpustnost ve vodě.

4-pyridinylmethyl ester **5a** byl připraven v rámci licenční spolupráce s kanadskou firmou Virochem pro testování anti-HIV aktivity.¹³⁹ Hydrochlorid **6a**, stejně jako hydrochloridy **6b**, **6d** a **6f** byl připraven reakcí výchozího materiálu – esterů **5a – 5d** s chlorovodíkem rozpuštěným v diethyletheru. Reakce probíhala velmi rychle a jednotně s minimem vedlejších produktů.

Struktura získaných hydrochloridů byla potvrzena pomocí spektrálních dat. V IR (DRIFT) spektru hydrochloridů **6a**, **6b**, **6d** a **6f** se, na rozdíl od IR spekter výchozích látek **5a – 5d** nachází široký a intenzivní pás s vrcholem mezi 2200 cm^{-1} a 2600 cm^{-1} , který je charakteristický právě pro hydrochloridy. V ^1H NMR spektru hydrochloridu **6a** byl pozorován kromě signálů obvyklých pro 21-oxolup-18-enový skelet rovněž široký singlet dvou vodíků uhlíku C-1' při δ 5.38 ppm. Je zajímavé, že ve výchozím materiálu se signál uhlíku C-1' dělí na dva dublety s interakční konstantou $J \sim 14.4$ Hz při δ 5.17 ppm a při δ 5.31 ppm. Signály pyridiniových protonů byly nalezeny jako dva široké singlety dvou vodíků při δ 7.83 ppm a δ 8.87 ppm. V ^{13}C NMR spektru byly nalezeny signály obvyklé pro tento typ sloučenin. Kromě nich se ve spektru nacházely signály esterové části molekuly. Signál C-1' se nachází při δ 63.76 ppm, při δ 124.29 ppm, δ 141.24 ppm a δ 156.00 ppm se nacházely tři signály pyridiniové skupiny. V MS (ESI) byl nalezen $[\text{M}-\text{Cl}]^+$ při 562 m/z a $[\text{M}-\text{Cl}+\text{Na}]^+$.

Příprava kvarterních solí vycházejících z betulinu

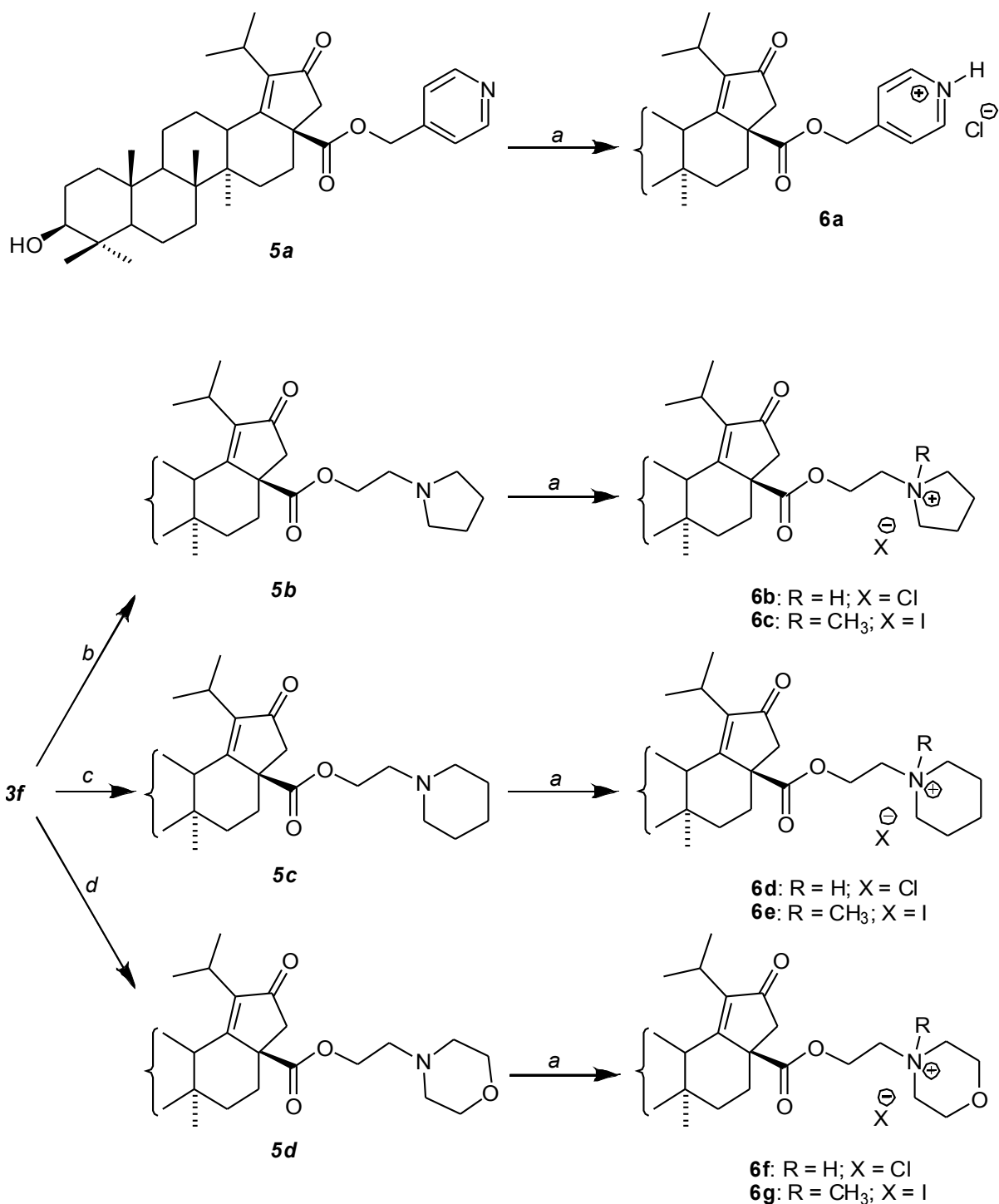


Schéma 12: a: **6a**, **6b**, **6d**, **6f**: HCl, Et₂O; **6c**, **6e**, **6g**: MeI, DMF, 100 °C; b: pyrrolidin, CHCl₃, 50 °C; c: piperidin, CHCl₃, 50 °C; d: morfolin, CHCl₃, 50 °C.

V ¹H NMR spektru hydrochloridu **6b** byl nalezen kromě obvyklých signálů dokládajících neporušený základní skelet jeden singlet acetátového methylu (H-32) při δ 2.05 ppm. Signály ethylenového můstku byly pozorovány jako dva široké multiplety

dvou vodíků při δ 4.71 ppm (H-1') a δ 3.74 ppm (H-2'). Signály patřící pyrrolidinové skupině nebyly, díky překrytí ostatními signály skeletálních vodíkových atomů, jednoznačně identifikovány. Široký singlet o intenzitě jednoho vodíku při δ 12.93 ppm byl přiřazen vodíkovému atomu hydrochloridu. V ^{13}C NMR spektru byly nalezeny signály obvyklé pro tento typ sloučenin a jeden signál acetátového uhlíku C-31 při δ 171.00 ppm. V MS (ESI) spektru byl zaznamenán $[\text{M}-\text{Cl}]^+$ při 611 m/z a $[\text{M}-\text{Cl}+\text{Na}]^+$. V ^1H NMR spektru hydrochloridu **6d** byly pozorovány kromě signálů obvyklých pro tuto skupinu sloučenin signál tří vodíkových atomů acetátu H-32 při δ 2.05 ppm. Signál dvou vodíkových atomů H-1' byl pozorován jako multiplet při δ 4.75 ppm a signál vodíku N-H hydrochloridu byl nalezen při δ 12.56 ppm. V ^{13}C NMR spektru byl kromě obvyklých signálů nalezen ještě signál C-31 acetátu při $\delta \sim 171$ ppm. V MS (ESI) spektru byl zaznamenán $[\text{M}-\text{Cl}]^+$ při 611 m/z a $[\text{M}-\text{Cl}+\text{Na}]^+$. V ^1H NMR spektru hydrochloridu **6f** se nachází obvyklé signály, v oblasti δ 2.7 – 4.8 ppm se nachází komplikovaný systém navzájem se překrývajících multipletů, jejichž přiřazení je velmi složité. V ^{13}C NMR spektru byl kromě obvyklých signálů nalezen signál C-31 acetátu při δ 171.05 ppm. V MS (ESI) spektru byl zaznamenán $[\text{M}-\text{Cl}]^+$ při 584 m/z.

Totožné výchozí sloučeniny – estery **5b** – **5d** byly využity i k přípravě *N*-methyl derivátů **6c**, **6e** a **6g**. Estery **5b** – **5d** reagovaly za zvýšené teploty s nadbytkem methyljodidu. Dle TLC byl po třech hodinách spotřebován veškerý výchozí materiál. Kvarterní sole této skupiny se vyznačují vlastnostmi poněkud odlišnými od ostatních připravených solí, jsou například rozpustné v chlorovaných rozpouštědlech a obecně méně polární než jiné připravené kvarterní amoniové sole. Ačkoli tedy při reakci s methyljodidem vznikalo značné množství polárních barevných vedlejších produktů, vznikající kvarterní sole typu **6c** bylo možno přecistit chromatografií na silikagelu a následnou krystalizací.

Struktura připravených *N*-methylovaných kvarterních jodidů byla potvrzena spektrálními daty. V ^1H NMR spektru jodidu **6c** byl kromě signálů obvyklých pro 21-oxolup-18-enový systém nalezen signál tří vodíkových atomů H-32 acetátu při δ 2.06 ppm. Signály dvou vodíkových atomů ethylenového můstku H-2' byly pozorovány jako triplet při δ 4.00 ppm s interakční konstantou $J \sim 4.8$ Hz, zatímco signály vodíkových atomů H-1'a a H-1'b byly pozorovány odděleně, jako dva dublety tripletů při δ 4.57 ppm a δ 4.66 ppm s interakčními konstantami $J \sim 14.7$ Hz a $J \sim 4.8$ Hz.

Signály pyrrolidinového systému byly nalezeny jako dvojice širokých multipletů, každý s integrální intenzitou odpovídající čtyřem vodíkovým atomům při $\delta \sim 2.28$ ppm a při $\delta \sim 3.71$ ppm, singlet tří vodíkových atomů *N*-methylu byl pozorován při $\delta 3.17$ ppm. V ^{13}C NMR spektru byl nalezen signál C-31 acetátu při $\delta 171.39$ ppm. V MS (ESI) spektru byl zaznamenán $[\text{M-I}]^+$ při 624 m/z. V ^1H NMR spektru jodidu **6e** se kromě obvyklých signálů nachází signál tří vodíkových atomů acetátu při $\delta 2.05$ ppm, signál H-2' byl pozorován jako velmi široký multiplet ($\Sigma J \sim 51$ Hz) při $\delta 4.14$ ppm a signály H-1'a H-1'b byly pozorovány jako multiplety při $\delta 4.60$ ppm a $\delta 4.74$ ppm. Signál dvou CH_2 skupin piperidinu vázaných na dusík byl nalezen jako multiplet s integrální intenzitou odpovídající čtyřem vodíkovým atomům při $\delta 3.68$ ppm a signál *N*-methylu jako singlet při $\delta 3.35$ ppm. V ^{13}C NMR spektru byl nalezen signál C-31 acetátu při $\delta \sim 171$ ppm. V MS (ESI) byl pozorován $[\text{M-I}]^+$ při 639 m/z. V ^1H NMR spektru jodidu **6g** se nachází signály obvyklé pro tuto skupinu sloučenin, kromě nich se ve spektru nachází i signál acetátu při $\delta 2.06$ ppm, signály H-1'a a H-1'b byly pozorovány jako dva multiplety při $\delta 4.63$ ppm a $\delta 4.75$ ppm, široký multiplet dvou vodíkových atomů H-2' byl nalezen při $\delta 4.14$ ppm. Signály morfolinových vodíkových atomů byly nalezeny jako dvojice multipletů, každý s integrální intenzitou odpovídající čtyřem vodíkovým atomům při $\delta 3.60$ ppm a $\delta 4.04$ ppm a singlet *N*-methylu se nachází při $\delta 3.30$ ppm. V ^{13}C NMR spektru byly nalezeny obvyklé signály a dále signál acetátu při $\delta \sim 171$ ppm. V MS (ESI) byl zaznamenán $[\text{M-I}]^+$ při 641 m/z.

Pokus o přípravu hemisukcinátů kvarterních solí

V rámci prvních orientačních studií, zaměřených na přípravu látek pro testování anti-HIV aktivity byl proveden i pokus o přípravu kvarterní sole, která by byla v poloze 3 esterifikována sukcinylanhydridem (Schéma 13). Hydroxybrom-ester **3i** byl za působení triethylaminu v DMF převeden na sůl **7a**. Ukázalo se však, že za tvrdých podmínek, které vyžaduje reakce s sukcinylanhydridem dochází k rozkladu výchozího materiálu na komplikovanou směs sloučenin, kterou se nepodařilo rozdělit. Po tomto neúspěchu a po zjištění, že kvarterní soli připravené v této práci jsou příliš cytotoxické a tedy nejsou perspektivní jako nová anti-HIV léčiva, byl výzkum tímto směrem ukončen.

Spektrální charakteristiky sole **7a** jsou analogické k soli **4b**. V ^1H NMR spektru ani ve ^{13}C NMR spektru sole **7a** nebyl pozorován žádný signál acetátu. V IR (DRIFT) spektru byl v souladu se strukturou pozorován široký signál OH skupiny při 3341 cm^{-1} . V MS (ESI) spektru byl nalezen $[\text{M}-\text{Br}]^{+}$ při 599 m/z .

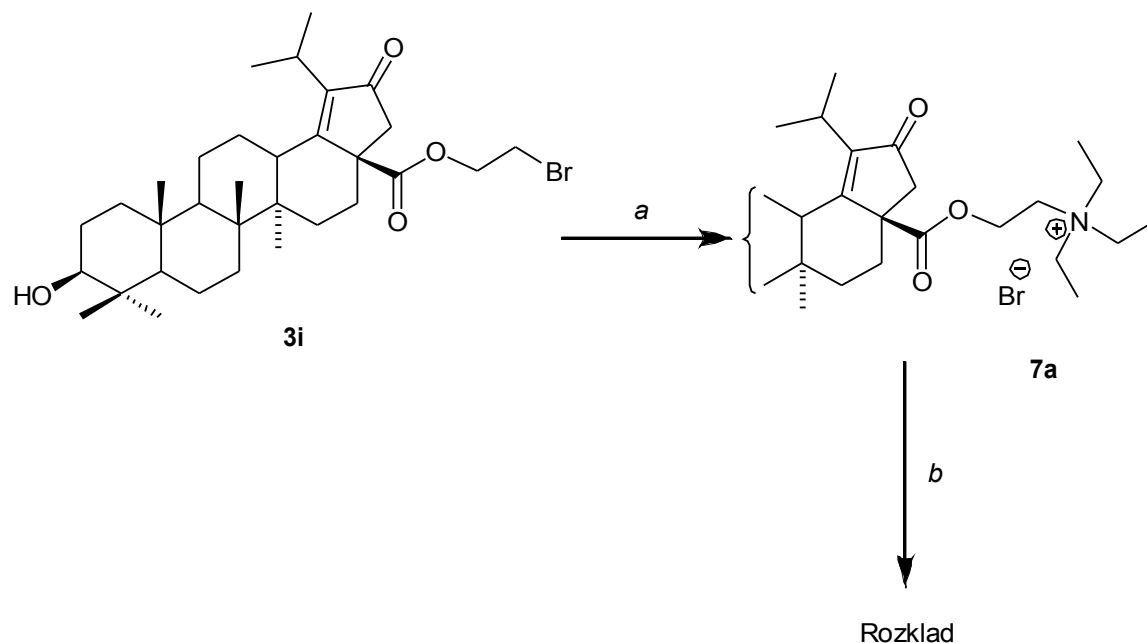


Schéma 13: *a*: TEA, DMF, $50 - 70\text{ }^\circ\text{C}$; *b*: sukcinylanhydrid, DMAP, kolidin, refl.

Pokus o přípravu kvarterních solí v poloze 30

Možnost zavedení halogenidů do reaktivní allylové polohy 30 na lup-20(29)-enovém skeletu je známa již dlouhou dobu. Již popsány¹⁴⁰ 30-bromderivát **8a** byl připraven reakcí betulin-diacetátu (**3a**) s NBS v tetrachlormethanu. Bromderivát **8a** potom reagoval s TMA, TEA, triethanolaminem a s pyridinem v DMF. Ukázalo se však, že reakce s TMA a TEA vede ke vzniku směsi přinejmenším tří produktů, které se nepodařilo rozdělit, zatímco reakce s triethanolaminem vede pouze k pozvolnému rozkladu reaktantů. Naproti tomu reakcí bromderivátu **8a** s pyridinem vznikl kýžený produkt, který přímo vykrytalizoval z reakční směsi jako čistá látka – pyridiniová sůl **8b** (Schéma 14).

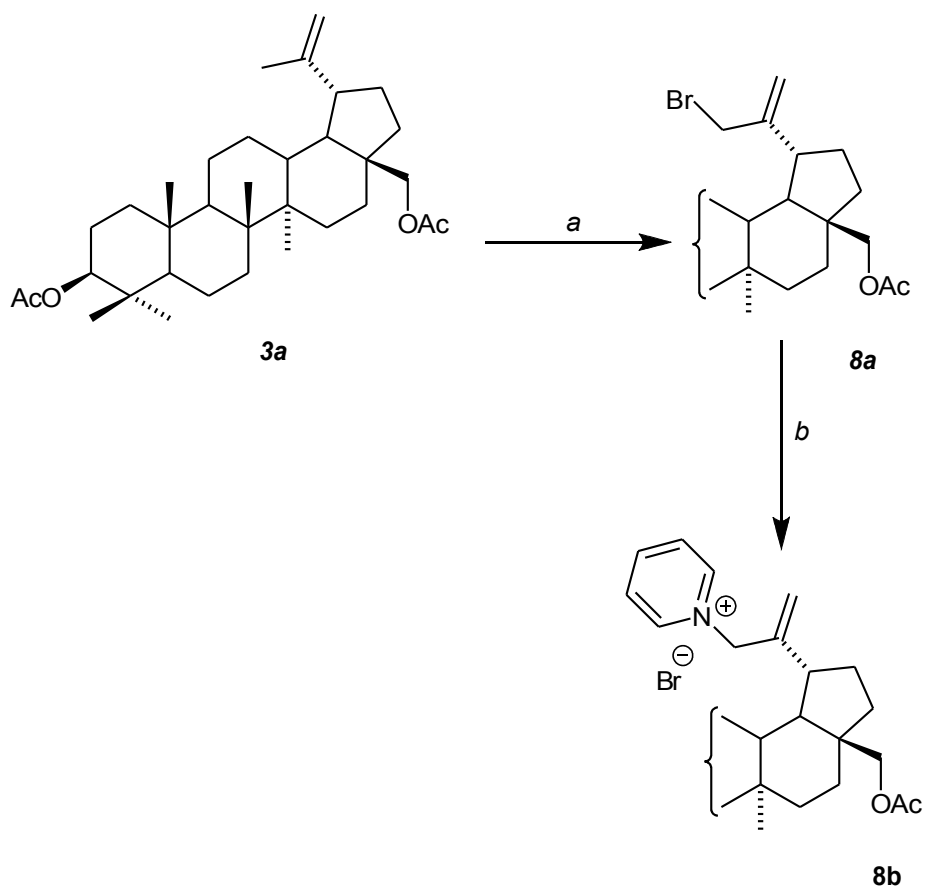


Schéma 14: a: NBS, CCl_4 , refl.; b: pyridin, DMF, 50 – 70 °C.

V 1H NMR spektru pyridinové soli **8b** byly nalezeny dva signály acetátu při δ 2.03 ppm a při δ 2.05 ppm. Další signály rovněž potvrzují navrženou strukturu – při δ 3.81 ppm byl pozorován dublet H-29a s interakční konstantou $J \sim 11.1$ Hz, analogický dublet H-29b, rovněž s interakční konstantou $J \sim 11.1$ Hz byl nalezen při δ 4.37 ppm. Dublet dvou vodíkových atomů H-30 byl nalezen při δ 5.32 ppm a charakteristický multiplet H-3 α byl nalezen při δ 4.44 ppm. Signály pyridiniové skupiny byly nalezeny jako triplet s intenzitou odpovídající dvěma vodíkovým atomům při δ 8.19 ppm s interakční konstantou $J \sim 6.7$ Hz, jako triplet jednoho vodíku při δ 8.67 ppm s interakční konstantou $J \sim 7.8$ Hz, a jako dublet dvou vodíků při δ 9.02 ppm s interakční konstantou $J \sim 6.6$ Hz. V ^{13}C NMR spektru byl nalezen signál dvou acetátových kvarterních uhlíků při δ 172.89 ppm a při δ 173.19 ppm, signál C-29 při δ 113.93 ppm a signál C-20 při δ 151.01 ppm. Signály pyridiniové skupiny byly pozorovány při δ 129.69 ppm, δ 146.72 ppm a při δ 147.59 ppm. V MS (ESI) byl pozorován iont $[M-Br]^+$ při 605 m/z.

Příprava soli aminu 9c

Dvojná vazba v poloze 20(29) betulin diacetátu (**3a**) byla ozonolyzována za vzniku norderivátu **9a**.¹⁴¹ Poté, co selhal pokus o reduktivní aminaci byl tento norderivát **9a** působením hydroxylamin hydrochloridu v pyridinu převeden na oximy **9b**¹⁴² které byly redukovány tetrahydridboritanem sodným za varu na 29-noramin **9c**, pro který byla podle analogie s *N*-acetátem¹⁴³ navržena konfigurace R na C-20. Noramin **9c** se v roztoku během několika hodin rozkládá, v krystalickém stavu je pak relativně stálý. Reakce noraminu **9c** s methyljodidem za zvýšené teploty tedy vedla k rychlému rozkladu výchozí látky a bylo nutno najít jiný způsob kvarternizace tohoto aminu. Jako methylační činidlo se nakonec osvědčil methyl-triflát, který je schopen převádět aminy až na kvarterní soli za mírných podmínek. Působením methyl-triflátu na amin **9c** byla získána směs látek, ze které se podařilo v nízkém výtěžku izolovat kvarterní sůl **9d**.

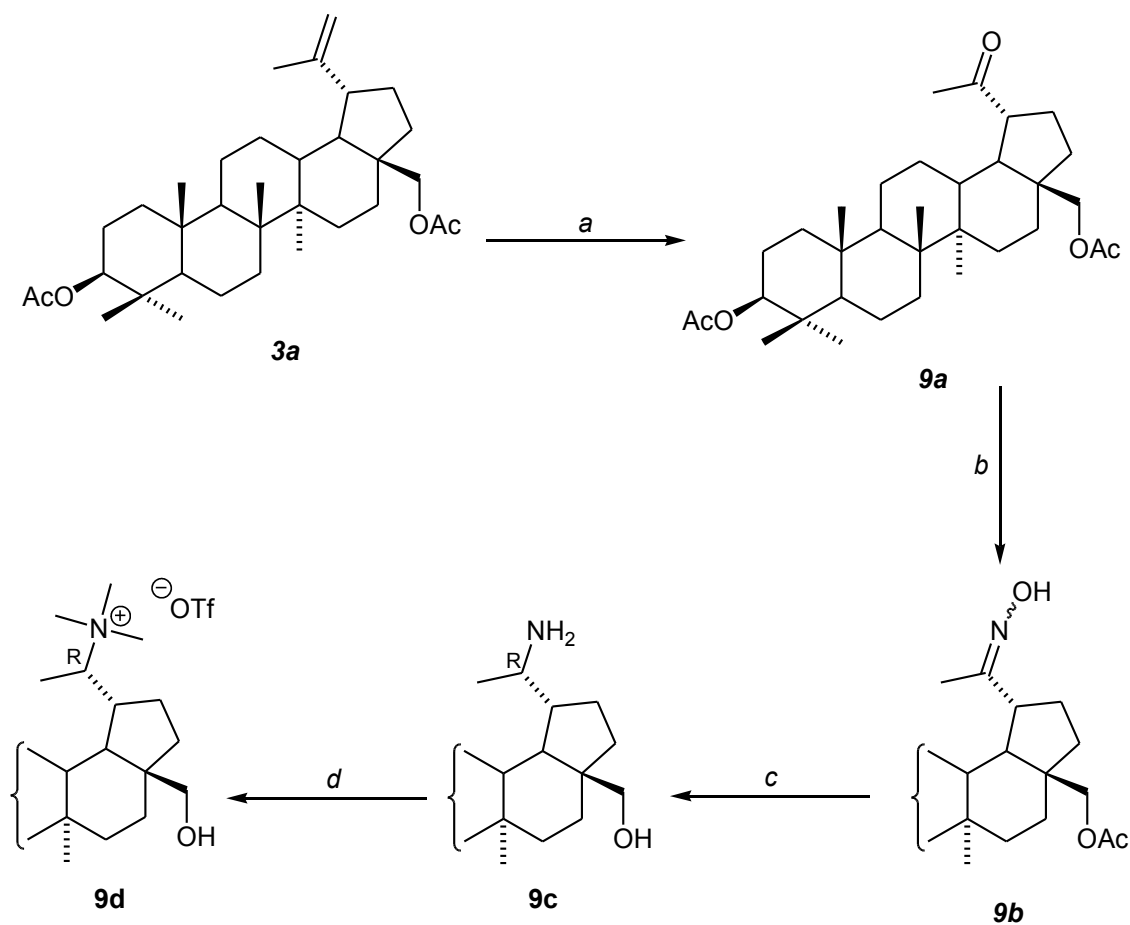


Schéma 15: a: 1: O_3 , CH_2Cl_2 , $-50\text{ }^\circ C$; 2: Me_2S ; b: $NH_2OH.HCl$, pyridin, refl.; c: $Na[BH_4]$, $MeOH$, refl.; d: $MeOTf$, CH_2Cl_2 , K_2CO_3 , 1 minuta.

Struktura noraminu **9c** a soli **9d** byla potvrzena spektrálními údaji. V ^1H NMR spektru noraminu **9c** byl nalezen jediný signál acetátu při δ 2.04 ppm, dále byl nalezen signál H-20 při δ 2.56 ppm. Signály H-28a a H-28b se nachází při δ 3.30 ppm a δ 3.79 ppm jako dublety s interakční konstantou $J \sim 10.8$ Hz. Signál H-3 α se nachází při δ 4.47 ppm. V ^{13}C NMR spektru byl nalezen jediný signál C-31 acetátu při δ 171.05 ppm. V MS (EI) byl pozorován iont $[\text{M}-2\text{H}]^{+}$ při 485 m/z a ionty odpovídající ztrátě methyly, trimethylaminu a kombinace těchto ztrát. V ^1H NMR spektru soli **9d** byly nalezeny analogické signály jako u aminu **9c**, signál tří *N*-methylů byl pozorován při δ 3.61 ppm. V ^{13}C NMR spektru byly nalezeny signály analogické výchozí sloučenině. V MS (ESI) byl nalezen $[\text{M}-\text{OTf}]^{+}$ při 531 m/z.

Reakce 2 ξ -brom-19 β ,28-epoxy-18 α -olean-3-onu (10d) s terciárními aminy

Epimerní 2 ξ -bromallobetulon **10d** byl připraven třístupňovou procedurou (schéma 16). Betulin (**1a**) byl nejprve izomerován na allobetulin (**10b**) varem v CHCl_3 s kyselou zeminou – montmorilonitem K10¹⁴⁴ a potom oxidován PCC na alumině postupem, který optimalizoval Urban.¹²⁴ Brom do polohy 2 byl zaveden přímou bromací pomocí bromu v kyselině octové podle literatury.¹⁴⁵ Získaná epimerní směs 2 α a 2 β epimerů bromketonů **10d** nebyla dále dělena a byla použita do reakcí s TMA, TEA, triethanolaminem a s pyridinem v DMF. V případě TMA a TEA došlo v bazickém prostředí k eliminaci bromového atomu a vznikl pouze již známý¹⁴⁶ nenasycený keton **10e**, zatímco s triethanolaminem výchozí bromketon vůbec nereagoval. Kýžený produkt – kvarterní amoniová sůl **10f** tak opět vznikla pouze při reakci s pyridinem. Analýzou spektrálních dat však bylo zjištěno, že místo očekávané směsi epimerů byl izolován pouze jediný epimer, pravděpodobně termodynamicky stabilnější produkt. Srovnáním výsledků NMR studií, zabývajících se stereochemií 2-bromketonů steroidů a triterpenoidů,¹⁴⁷ s naměřenými NMR daty byla podle analogie pro bromid **10f** navržena konfigurace 2 β . V ^1H NMR spektru bromidu **10f** byly nalezeny signály typické pro 19 β ,28-epoxy-18 α -oleananový skelet. Jedná se zejména o dva dublety H-28a a H-28b při δ 3.50 ppm a při δ 3.81 ppm které navzájem interagují s konstantou $J \sim 7.8$ Hz. Singlet vodíkového atomu H-19 α byl pozorován při δ 3.55 ppm.

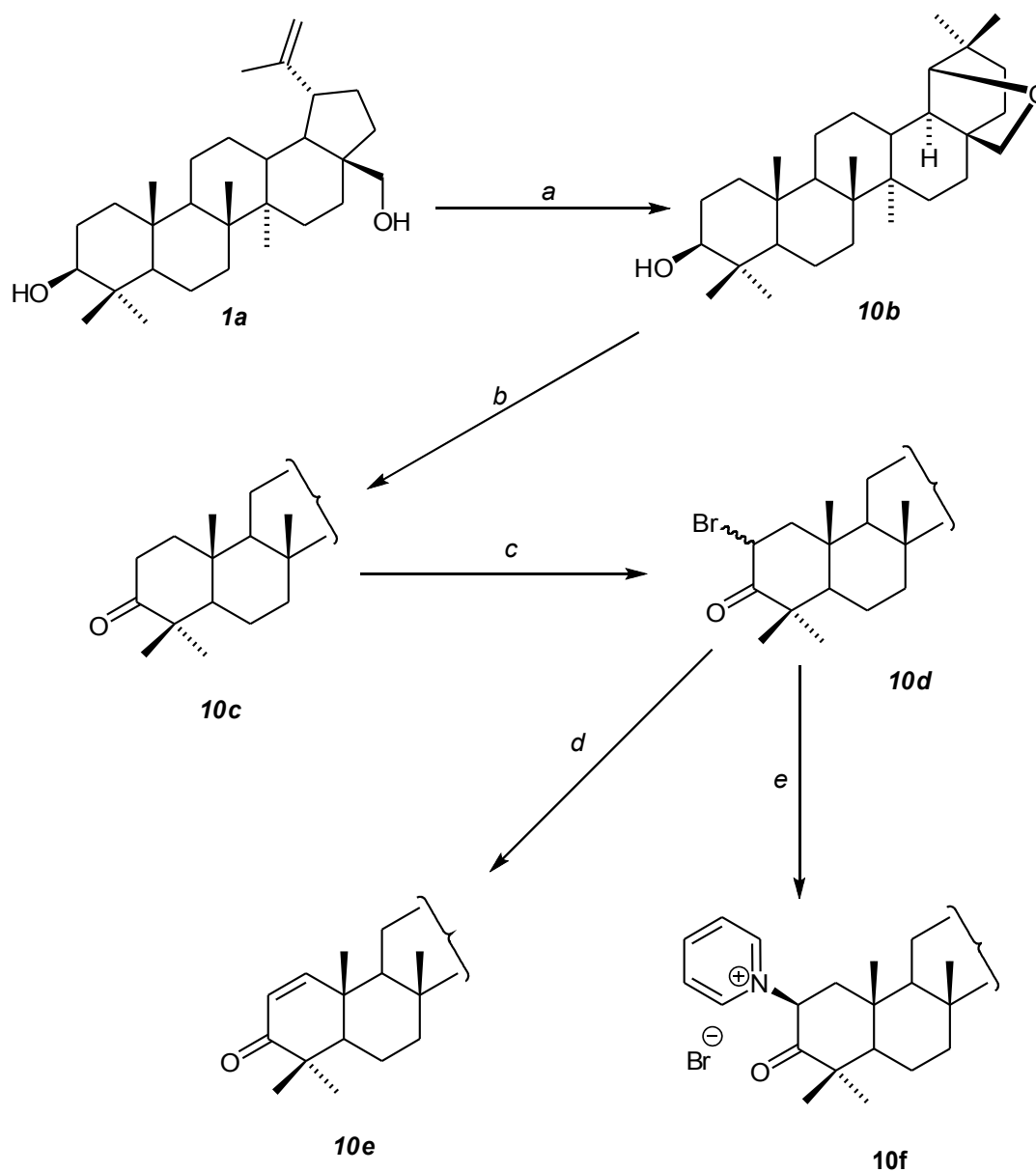


Schéma 16: *a*: montmorillonit K10, CHCl_3 , refl.; *b*: PCC, Al_2O_3 , CH_2Cl_2 ; *c*: Br_2 , AcOH, NaOAc, CHCl_3 ; *d*: TMA, DMF, 50 – 70 °C nebo TEA, DMF, 50 – 70 °C; *e*: pyridin, DMF, 50 – 70 °C.

V oblasti δ 6.45 ppm byl pozorován dublet dubletu H-2 α . Signály pyridinové skupiny byly nalezeny jako triplet při δ 8.17 ppm odpovídající dvěma vodíkovým atomům, jako triplet při δ 8.67 ppm odpovídající jednomu vodíkovému atomu a jako dublet při δ 8.91 ppm odpovídající dvěma vodíkovým atomům. V ^{13}C NMR spektru byl pozorován signál karbonylu při δ 176.29 ppm a signály pyridiniové skupiny při δ 129.56 ppm, δ 146.38 ppm a při δ 147.55 ppm. V MS (ESI) byl pozorován iont $[\text{M}-\text{Br}]^+$ při 518 m/z a iont odpovídající ztrátě pyridinu.

PŘÍPRAVA SOLÍ VYCHÁZEJÍCÍCH Z KYSELINY BETULINOVÉ (*1b*)

Kvarterní soli esterů kyseliny betulinové (1b) dihydrobetulinové (12a) a platanové (11a)

Jak bylo uvedeno výše, kyselina betulinová (*1b*) byla získána extrakcí přírodního materiálu (kůry platanu). Kyselina platanová (*11a*) je však z přírodního materiálu špatně dostupná a proto byla připravena z kyseliny betulinové (*1b*) ozonolýzou.¹⁴⁸ Obě kyseliny potom reagovaly s 1,2-dibromethanem za vzniku bromethyl-esterů¹³⁴ **2a** a **11b**. Při reakci bromethyl-esterů **2a** a **11b** s TEA, TMA a pyridinem vznikly příslušné kvarterní sole **11c** – **11h** a dva terciální aminy **11j** a **11k** (Schéma 17).

V ¹H NMR spektru kvarterních solí a terciálních aminů tohoto typu byly pozorovány signály obvyklé pro 20(29)-lupenový, respektive 20-oxo-29-norlupanový skelet. Jedná se zejména o charakteristický dublet dubletu H-3 α v regionu $\delta \sim 3.1 - 3.4$ ppm, dále signály terminálních vodíkových atomů dvojně vazby H-29a a H-9b které bývají pozorovány jako dva ostré dublety v oblasti $\delta \sim 4.5 - 4.8$ ppm, a které se navzájem štěpí interakční konstantou $J \sim 2$ Hz. U derivátů kyseliny platanové (*11a*) je navíc pozorován singlet methylu v poloze 30 při $\delta \sim 2.15 - 2.20$ ppm a signál H-19 β okolo $\delta \sim 3.30$ ppm. V ¹³C NMR spektru esterů kyseliny betulinové (*1b*) se nacházejí tyto charakteristické signály: signál C-3 v oblasti $\delta \sim 80$ ppm, signál C-28 v regionu $\delta \sim 180$ ppm a signály dvojně vazby C-29 při $\delta \sim 110$ ppm a C-20 při $\delta \sim 150$ ppm. Ve spektru esterů kyseliny platanové (*11a*) se místo signálů dvojně vazby v poloze 20(29) vyskytuje signál karbonylu C-20 při $\delta \sim 215$ ppm.

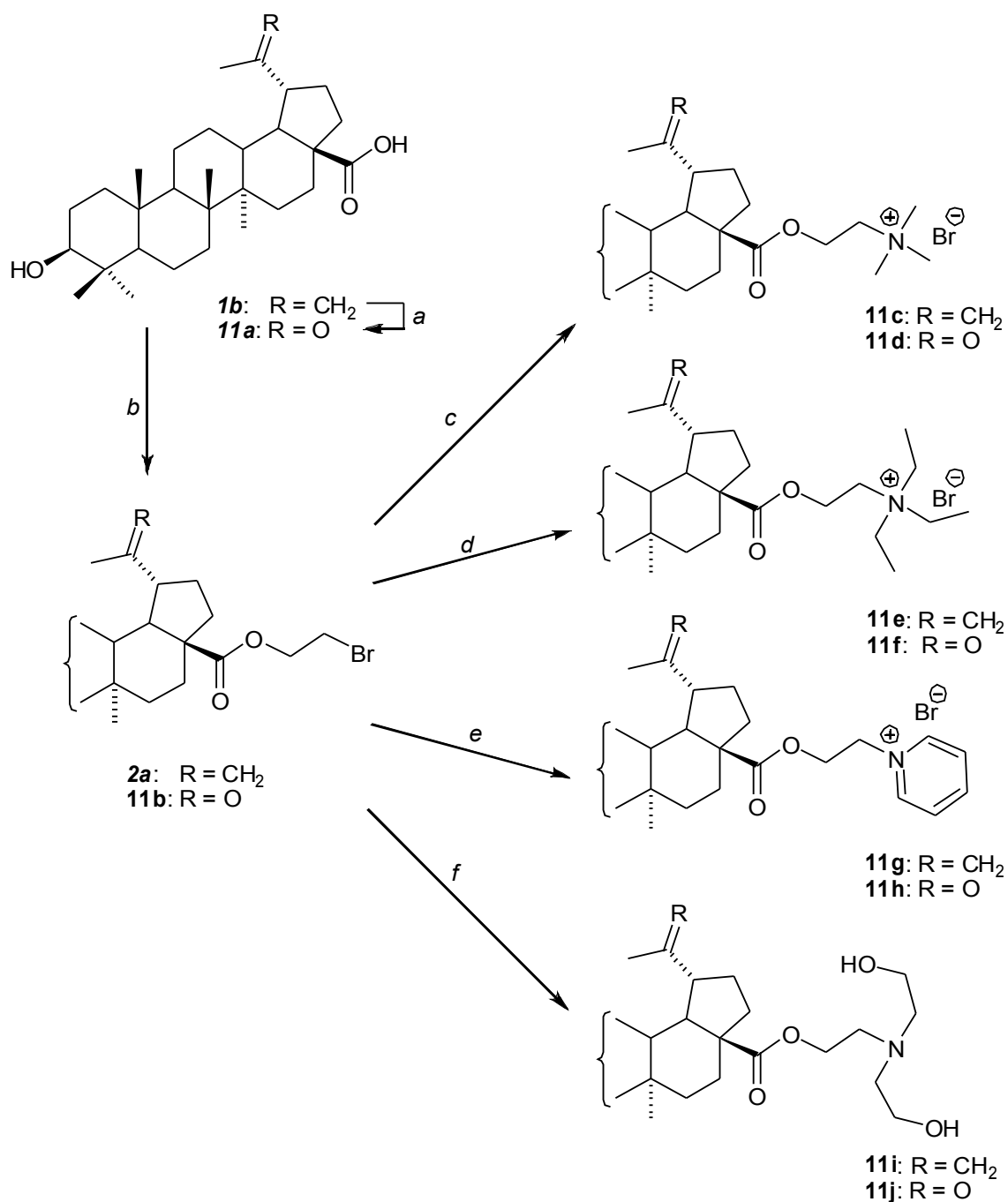


Schéma 17: a: 1. O₃ / CH₂Cl₂ 2. Me₂S; b: BrCH₂CH₂Br, K₂CO₃, MeCN, DMF, 50 °C; c: TMA, DMF, 50 – 70 °C; d: TEA, DMF, 50 – 70 °C; e: pyridin, DMF, 50 – 70 °C; f: triethanolamin, DMF, 50 – 70 °C.

V ¹H NMR spektru bromethyl-esteru **11b** byly pozorovány signály obvyklé pro 20-oxo-29-norlupanový skelet. Kromě nich byl ve spektru nalezen signál dvou vodíkových atomů H-1' při δ 4.41 ppm a signál dvou vodíkových atomů H-2' při δ 3.55 ppm. V ¹³C NMR spektru byly pozorovány obvyklé signály. V MS (EI)

byl pozorován bromový dublet $[M]^{++}$ při 564 m/z a dále ionty odpovídají ztrátě molekuly vody, ethylenu, hydroxylového radikálu a kombinacím těchto ztrát.

V ^1H NMR spektru cholinového esteru **11c** byly nalezeny signály obvyklé pro 20(29)-lupenový skelet. Dále byl pozorován signál dvou vodíkových atomů H-1' jako široký komplikovaný multiplot při δ 4.56 ppm a signál H-2' jako triplet dvou vodíkových atomů při δ 3.76 ppm. Velmi intenzivní singlet devíti vodíkových atomů tří *N*-methylů byl nalezen při δ 3.25 ppm. V ^{13}C NMR spektru byl kromě obvyklých signálů pozorován intenzivní signál tří *N*-methylů při δ 54.41 ppm. V MS (ESI) byl pozorován iont $[M-\text{Br}]^+$ při 542 m/z a dále iont odpovídající ztrátě trimethylaminu. V ^1H NMR spektru esteru **11e** byl kromě obvyklých signálů nalezen signál dvou vodíkových atomů H-1' jako široký multiplot při δ 4.49 ppm a signál H-2' jako multiplot dvou vodíkových atomů při δ 3.62 ppm. Signály *N*-ethylů byly nalezeny jako triplet s intenzitou devíti vodíkových atomů při δ 1.35 ppm a jako kvartet šesti vodíkových atomů při δ 3.43 ppm. V ^{13}C NMR spektru byly pozorovány obvyklé signály. V MS (ESI) byl pozorován iont $[M-\text{Br}]^+$ při 585 m/z. V ^1H NMR spektru esteru **11g** byly pozorovány kromě signálů obvyklých pro 20(29)-lupenový skelet signály esterových CH_2 skupin, signál H-1' byl pozorován jako triplet při δ 5.04 ppm a signál H-2' jako triplet při δ 4.60 ppm. Signály pyridiniové skupiny byly pozorovány jako triplet dvou vodíkových atomů při δ 8.23 ppm, jako triplet tripletů jednoho vodíkového atomu při δ 8.70 ppm a jako dublet dvou vodíkových atomů při δ 9.19 ppm. V ^{13}C NMR spektru se kromě obvyklých signálů nachází ještě signály pyridiniové skupiny při δ 129.67 ppm, δ 146.56 ppm a při δ 147.72 ppm. V MS (ESI) se nachází iont $[M-\text{Br}]^+$ a iont odpovídající ztrátě molekuly pyridinu. V ^1H NMR spektru aminu **11i** byly kromě běžných signálů této skupiny sloučenin nalezeny triplety čtyř ethylenových vodíků H-1' při δ 4.17 ppm a H-2' při δ 2.85 ppm které se navzájem štěpí s interakční konstantou $J \sim 6.1$ Hz. Dále byly nalezeny signály vodíků $\text{N}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-OH})_2$ skupin jako dvojice tripletů čtyř vodíků při δ 2.73 ppm a při δ 3.61 ppm které se štěpí interakční konstantou $J \sim 5.7$ Hz. V ^{13}C NMR spektru byly nalezeny signály obvyklé pro tuto skupinu látek. V MS (ESI) byl pozorován iont $[M-\text{Br}]^+$ při 588 m/z a ionty zvýšené o hmotnost jednoho až čtyř atomů sodíku.

V ^1H NMR spektru cholinového esteru **11d** byly nalezeny kromě obvyklých signálů 20-oxo-29-norlupanového skeletu signály dvou vodíkových atomů H-1' při δ 4.57 ppm a H-2' při δ 3.77 ppm a dále intenzivní singlet devíti vodíkových atomů

cholinových methylů při δ 3.25 ppm. V ^{13}C NMR spektru byly pozorovány obvyklé signály. V MS (ESI) byl nalezen iont $[\text{M-Br}]^+$ při 545 m/z. V ^1H NMR spektru soli **11f** byly pozorovány obvyklé signály. Kromě nich byly ve spektru nalezeny signály ethylenového můstku, multiplet dvou vodíkových atomů H-1' byl nalezen při δ 4.57 ppm a multiplet dvou vodíkových atomů H-2' při δ 3.56 ppm. Signály *N*-ethylových skupin se nacházejí jako triplet devíti vodíkových atomů při δ 1.36 ppm s interakční konstantou $J \sim 7.2$ Hz a jako kvartet šesti vodíkových atomů při δ 3.44 ppm. V ^{13}C NMR spektru byly pozorovány obvyklé signály. V MS (ESI) byl nalezen iont $[\text{M-Br}]^+$ při 587 m/z. V ^1H NMR spektru soli **11h** byly kromě obvyklých signálů nalezeny triplety dvou vodíkových atomů H-1' při δ 4.62 ppm a H-2' při δ 5.05 ppm s interakční konstantou $J \sim 5.0$ Hz. Signály pyridinia se nachází při δ 8.22 ppm jako triplet dvou vodíků, δ 8.71 ppm jako triplet jednoho vodíku a při δ 9.14 ppm jako dublet dvou vodíků. V ^{13}C NMR spektru se nachází signály obvyklé pro tuto skupinu sloučenin. Kromě nich se ve spektru nachází signály pyridinia při δ 129.72 ppm, δ 146.58 ppm, a při δ 147.78 ppm. V MS (ESI) byl nalezen iont $[\text{M-Br}]^+$ při 565 m/z. V ^1H NMR spektru terciárního aminu **11j** byly v souladu se strukturou pozorovány obvyklé signály. Dále byly nalezeny signály H-1' jako triplet dvou vodíkových atomů při δ 4.18 ppm a signál H-2' jako triplet dvou vodíkových atomů při δ 2.86 ppm které se vzájemně štěpí interakční konstantou $J \sim 6.0$ Hz. Signály $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-OH})_2$ se nachází jako dva triplety čtyř vodíkových atomů s interakční konstantou $J \sim 5.8$ Hz při δ 2.73 ppm a při δ 3.61 ppm. V ^{13}C NMR spektru byly nalezeny pouze obvyklé signály. V MS (ESI) byl nalezen iont $[\text{M}]^+$ při 589 m/z.

Kyselina dihydrobetulinová (**12a**) byla připravena hydrogenací kyseliny betulinové (**1b**) vodíkem na Raneyově niklu. Její již známý¹³⁴ bromethyl-ester **12b** byl připraven analogicky jako v předchozím případě, stejně jako kvarterní sole **12c** – **12e** a terciární amin **12f** (Schéma 18). Pro ^1H NMR spektrum látek odvozených od kyseliny dihydrobetulinové (**12a**) jsou společné následující výrazné signály: Přítomnost isopropylové skupiny dokládají intenzivní signály vodíkových atomů methylů H-29 a H-30 štěpené na dublet vodíkem H-20 s interakční konstantou asi $J \sim 7.0$ Hz při $\delta \sim 0.7 - 0.9$ ppm. Signál H-20 naopak nebývá na rozdíl od sloučenin s dvojnou vazbou v poloze 18 pozorován, neboť je překryt ostatními signály skeletálních vodíků. Signál H-3 α je obvykle pozorován jako charakteristický multiplet při $\delta \sim 3.1 - 3.5$ ppm. Pro

^{13}C NMR spektrum je charakteristický signál karboxylového uhlíku C-28 při $\delta \sim 175$ ppm.

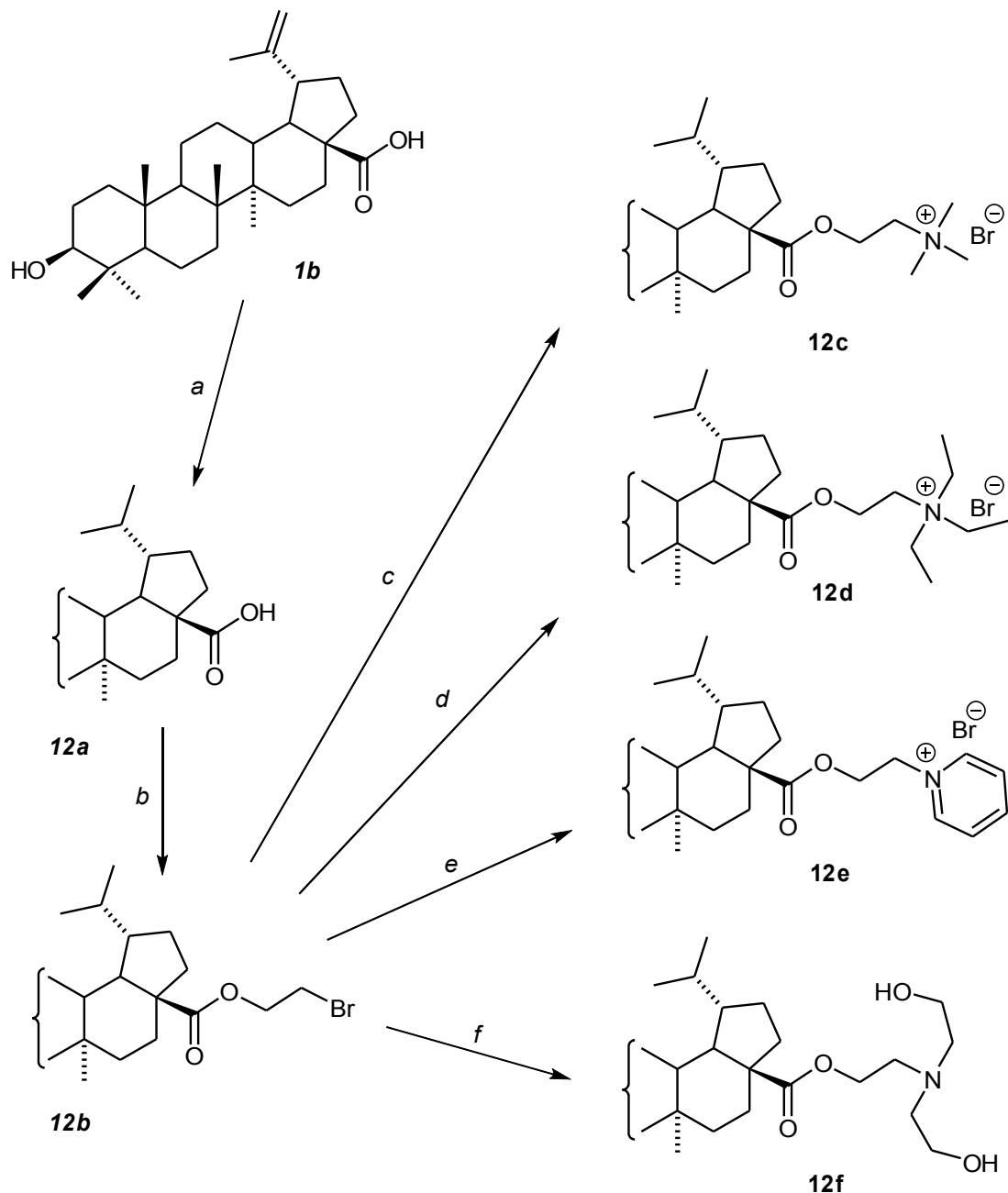


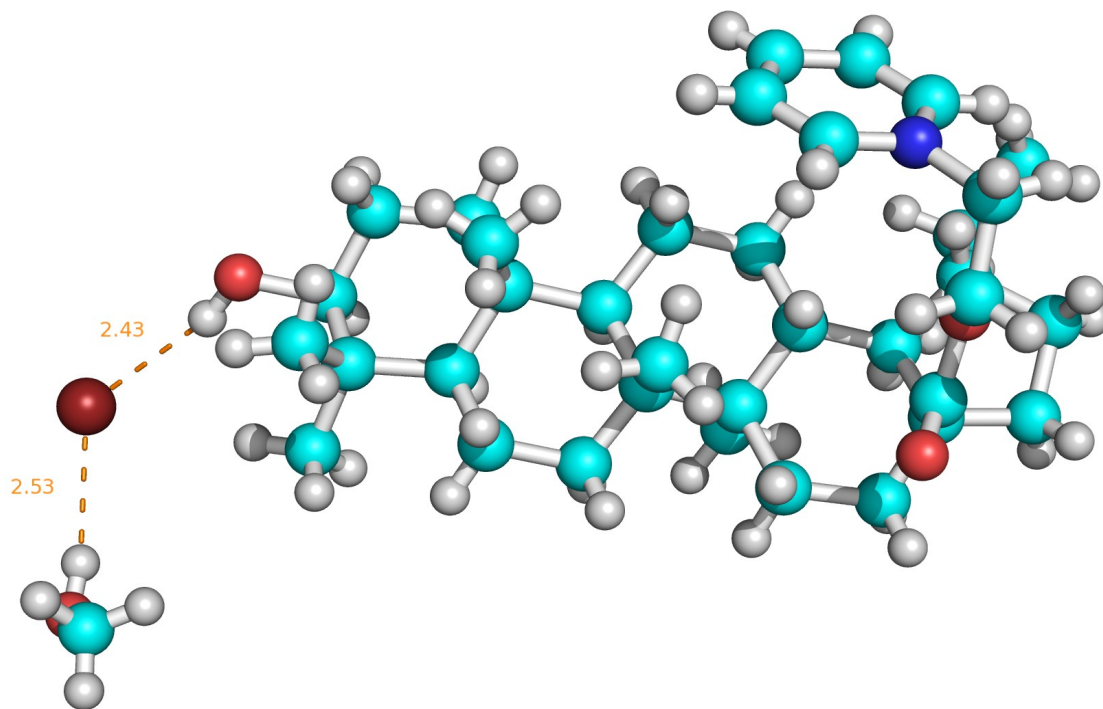
Schéma 18: a: H_2 , RaNi , methoxyethanol; b: $\text{BrCH}_2\text{CH}_2\text{Br}$, K_2CO_3 , MeCN, DMF, 50°C ; c: TMA, DMF, $50 - 70^\circ\text{C}$; d: TEA, DMF, $50 - 70^\circ\text{C}$; e: pyridin, DMF, $50 - 70^\circ\text{C}$; f: triethanolamin, DMF, $50 - 70^\circ\text{C}$.

V ^1H NMR spektru cholinového esteru dihydrobetulinové kyseliny **12c** byl pozorován kromě obvyklých signálů také signál dvou vodíkových atomů H-1' jako komplikovaný multiplet při δ 4.54 ppm, signál H-2' byl pozorován jako triplet při

δ 3.75 ppm. Intenzivní signál devíti vodíkových atomů *N*-methylů byl nalezen při δ 3.25 ppm. V ^{13}C NMR spektru byly pozorovány obvyklé signály. V MS (ESI) byl nalezen iont $[\text{M-Br}]^+$ při 545 m/z. V ^1H NMR spektru kvarterní soli **12d** byly pozorovány obvyklé signály. Kromě nich byly ve spektru nalezeny multiplety dvou vodíkových atomů H-1' při δ 4.47 ppm a H-2' při δ 3.62 ppm. Signály tří *N*-ethylových skupin byly pozorovány jako triplet při δ 1.35 ppm a kvartet při δ 3.42 ppm s interakční konstantou $J \sim 7.2$ Hz. V ^{13}C NMR spektru byly pozorovány obvyklé signály. V MS (ESI) byl nalezen iont $[\text{M-Br}]^+$ při 587 m/z. V ^1H NMR spektru soli **12e** byly pozorovány obvyklé signály a dále signál H-1' při δ 5.02 ppm a signál H-2' při δ 4.59 ppm. Signály pyridiniové skupiny byly pozorovány jako triplet dvou vodíkových atomů při δ 8.19 ppm, triplet jednoho vodíkového atomu při δ 8.68 ppm a dublet dvou vodíkových atomů při δ 9.10 ppm. V ^{13}C NMR spektru byly kromě obvyklých signálů nalezeny signály aromatických uhlíkových atomů při δ 129.64 ppm, δ 146.46 ppm a při δ 147.66 ppm. V MS (ESI) byl nalezen iont $[\text{M-Br}]^+$ při 564 m/z.

Struktura soli **12e** byla dále potvrzena pomocí rentgenostrukturní analýzy. Kvarterní sole triterpenoidů obecně snadno vytvářejí krystaly, jejich velikost a forma je ovšem pro rentgenostrukturní analýzu málokdy vhodná. Sůl **12e** tak byla jediná od které se podařilo vypěstovat krystaly dostatečné kvality. Z rentgenostrukturní analýzy vyplývá, že sůl **12e** krystalizuje s jednou molekulou methanolu, hydroxylová skupina methanolu a 3β -hydroxylová skupina soli **12e** jsou ve slabé vodíkové interakci s bromovým aniontem (Obrázek 1).

V ^1H NMR spektru terciárního aminu **12f** byly pozorovány signály obvyklé pro tuto skupinu látek, dále byly nalezeny signály dvou vodíkových atomů H-1' jako široký multiplet při δ 4.18 ppm a dvou vodíkových atomů H-2' jako triplet při δ 2.85 ppm. Signály dvou *N*-hydroxyethylových skupin byly nalezeny jako dva triplety čtyř vodíkových atomů při δ 2.75 ppm a při δ 3.64 ppm které se vzájemně štěpí interakční konstantou $J \sim 5.3$ Hz. V ^{13}C NMR spektru byly nalezeny pouze obvyklé signály. V MS (ESI) byl nalezen iont $[\text{M}]^+$ při 591 m/z, ionty odpovídající $[\text{M}+\text{Na}]^+$ a $[\text{M}+3\text{Na}]^+$, a dále iont odpovídající ztrátě kyseliny octové.



Obrázek 1: Rentgenová struktura soli **12e**.

ORTEP struktura soli **12e** se nalézá v příloze (str. 120).

PŘÍPRAVA SOLÍ VYCHÁZEJÍCÍ Z KYSELINY OLEANOLOVÉ (1c)

Pokusy o přípravu kvarterní soli v poloze 11 a 12 kyseliny oleanolové (1c)

Oleanolová kyselina představuje kvůli své nižší dostupnosti méně častý cíl syntetických modifikací. Přítomnost dvojné vazby v poloze 12 však umožňuje provádět selektivní derivatizace kruhu C. V této práci byly provedeny pokusy o přípravu kvarterní soli v poloze 11 a 12 kyseliny oleanolové (1c), šlo jednak o pokus o halogenaci do allylové polohy a jednak o přípravu oxidovaných derivátů a následný pokus o jejich převedení na aminy (Schéma 19). Jako první byl proveden pokus o radikálovou bromaci methyl-esteru **13b** do polohy 11 pomocí NBS.

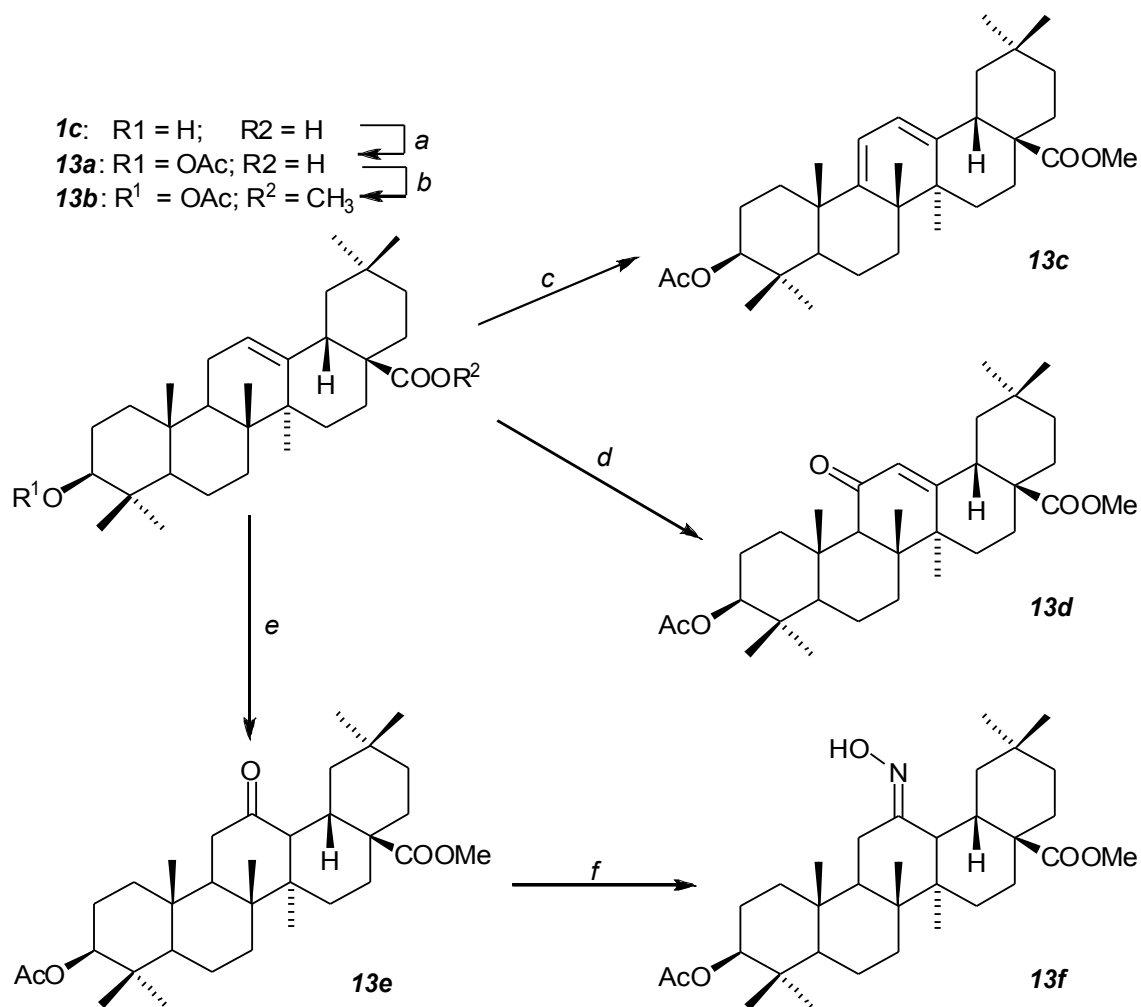


Schéma 19: a: Ac₂O, pyridin; b: MeBr, DMF, K₂CO₃; c: NBS, CCl₄; d: tert-butyl chromát, CCl₄; e: O₃, CH₂Cl₂; f: NH₂OH.HCl, pyridin, refl.

Z reakční směsi však byl bez ohledu na zvolené reakční podmínky vždy izolován ve vysokém výtěžku již známý¹⁴⁹ dien **13c**. Z methyl-esteru **13b** byl dále reakcí s *tert*-butyl chromátem podle literárního postupu¹⁵⁰ připraven allylový keton **13d**. Pokus o jeho reduktivní aminaci pomocí octanu amonného a NaBH₃CN však selhal a k žádné reakci nedošlo. Pokus o přípravu allylového oximu a jeho následnou redukci vhodným činidlem také selhal již v prvním stupni, opět nedošlo k žádné reakci. Již známý¹⁵⁰ keton **13e** byl připraven oxidací methyl-esteru **13b** za podmínek ozonolýzy. U skeletálních dvojných vazeb triterpenoidů často nedochází působením ozonu ke vzniku ozonidu a štěpení dvojných vazby, nýbrž pouze k epoxidaci. V tomto případě dochází navíc k okamžitému přesmyku vzniklého epoxidu na keton **13e**.

Poté, co selhal pokus o reduktivní aminaci i tohoto ketonu **13e** byl z něj připraven působením hydroxylamin hydrochloridu v pyridinu oxim **13f**,¹⁵¹ který však nereagoval se zinkem v kyselině octové. Po těchto neúspěšných pokusech o přípravu kvarterních amoniových solí v derivátů kyseliny oleanolové (**1c**) byl další výzkum v této oblasti ukončen.

Příprava kvarterních solí bromethyl-esteru 14a

Bromethyl-ester **14a**, který byl připraven z kyseliny **1c** reakcí s dibromethanem je již známý.¹⁵² Reakcí bromethyl-esteru **14a** s TMA, TEA, pyridinem a triethanolaminem vznikly očekávané produkty – sole **14b** – **14d** a terciární amin **14e**, jejichž struktura byla potvrzena spektrálními daty. Struktura cholinového esteru **14b** je již známa,¹²² její úplné spektrální charakteristiky však dosud nebyly publikovány (Schéma 20).

Všechny sloučeniny odvozené od kyseliny oleanolové (**1c**) mají společné následující důležité signály: v ¹H NMR spektru se jedná zejména o signál H-3 α , což bývá dublet dubletů či multiplet v regionu $\delta \sim 3.2 - 3.5$ ppm a dále o charakteristický triplet H-12 okolo $\delta \sim 5.2 - 5.4$ ppm. V ¹³C NMR spektru jsou pozorovány signály uhlíků C-12 a C-13 dvojných vazby okolo $\delta \sim 120$ ppm a okolo $\delta \sim 145$ ppm a signál karboxylového C-28 v oblasti $\delta \sim 175$ ppm.

V ^1H NMR spektru bromethyl-esteru **14a** byly nalezeny všechny výše uvedené signály a dále dva multiplety vodíkových atomů H-1' při δ 3.49 ppm a H-2' při δ 4.33 ppm. V ^{13}C NMR spektru byly nalezeny obvyklé signály. V MS (EI) byl pozorován bromový dublet $[\text{M}]^{+\bullet}$ při 562 m/z a dále ionty odpovídající ztrátě molekuly vody.

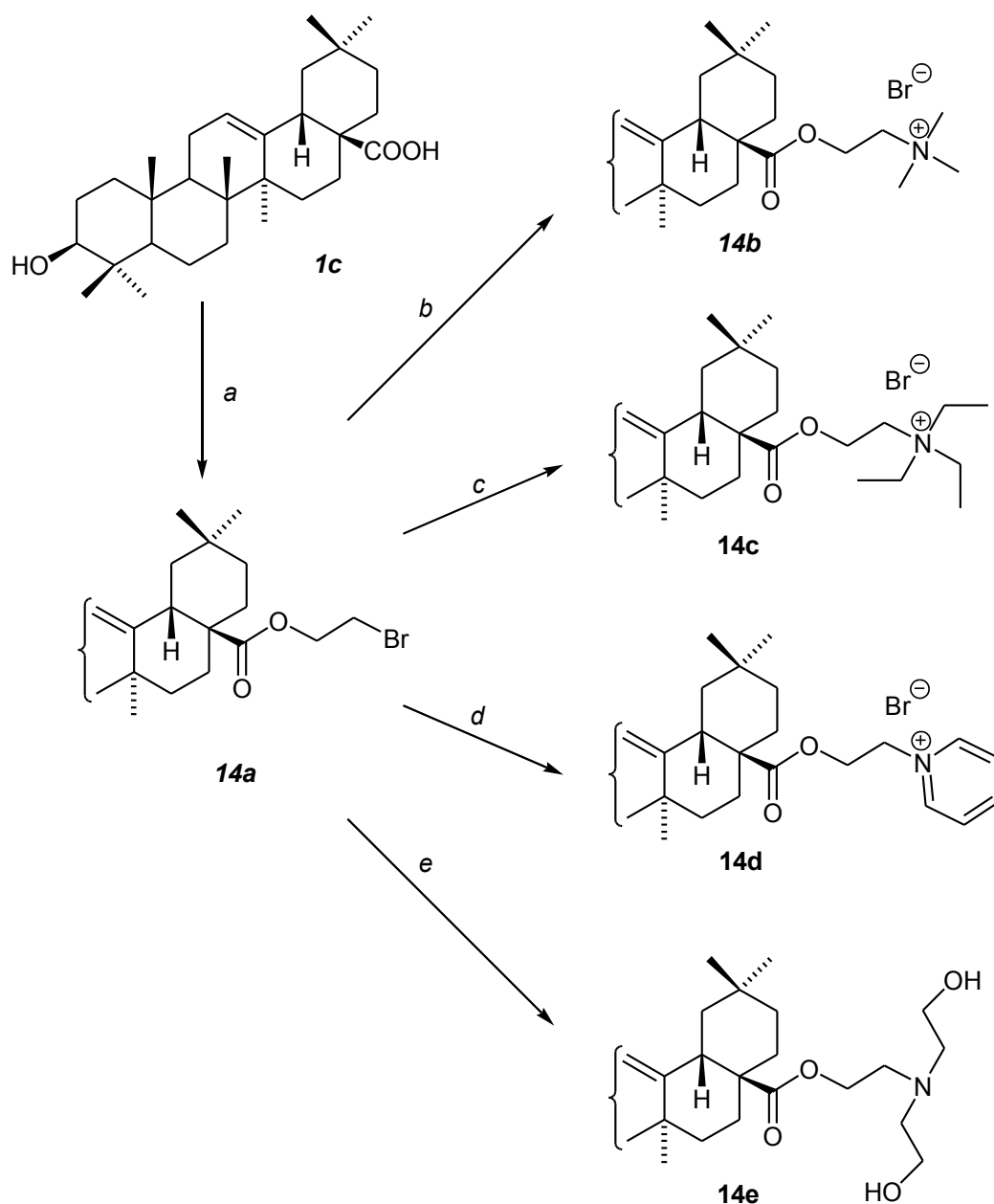


Schéma 20: a: $\text{BrCH}_2\text{CH}_2\text{Br}$, K_2CO_3 , MeCN, DMF, 50 °C; b: TMA, DMF, 50 – 70 °C; c: TEA, DMF, 50 – 70 °C; d: pyridin, DMF, 50 – 70 °C; e: triethanolamin, DMF, 50 – 70 °C.

V ^1H NMR spektru cholinového esteru **14b** byl kromě obvyklých signálů pozorován široký multiplet dvou vodíkových atomů H-1' při δ 3.73 ppm, podobný

multiplet dvou vodíkových atomů H-2' byl nalezen při δ 4.51 ppm. Signál tří *N*-methylů byl pozorován při δ 3.24 ppm. V ^{13}C NMR spektru byly nalezeny obvyklé signály. V MS (ESI) byl pozorován iont $[\text{M-Br}]^+$ při 585 m/z a iont odpovídající ztrátě molekuly ethylenu. V ^1H NMR spektru sole **14c** byly nalezeny obvyklé signály. Kromě nich byl ve spektru pozorován triplet H-1' při δ 4.42 ppm a komplikovaný multiplet H-2' při δ 3.61 ppm. Signály *N*-ethylů byly nalezeny jako triplet devíti vodíkových atomů při δ 0.95 ppm a kvartet šesti vodíkových atomů při δ 3.22 ppm které se vzájemně štěpí s konstantou $J \sim 7.2$ Hz. V ^{13}C NMR spektru byly nalezeny obvyklé signály. V MS (ESI) byl pozorován iont $[\text{M-Br}]^+$ při 585 m/z a iont odpovídající ztrátě ethylenu. V ^1H NMR spektru sole **14d** byly nalezeny obvyklé signály. Kromě nich byly ve spektru nalezeny multiplety H-1' při δ 4.51 ppm a H-2' při δ 5.00 ppm. Signály pyridiniové skupiny byly nalezeny jako triplet dvou vodíkových atomů při δ 8.21 ppm, triplet jednoho vodíkového atomu při δ 8.70 ppm a dublet dvou atomů vodíku při δ 9.10 ppm. V ^{13}C NMR spektru byly kromě obvyklých signálů nalezeny signály pyridiniové skupiny při δ 144.72 ppm, při δ 146.59 ppm a při δ 147.73 ppm. V MS (ESI) byl pozorován iont $[\text{M-Br}]^+$ při 563 m/z. V ^1H NMR spektru terciárního aminu **14e** byly pozorovány signály H-1' při δ 4.12 ppm, signál H-2' při δ 2.85 ppm byl částečně překryt pravděpodobně signálem H-18. Signály *N*-hydroxyethylových skupin se nachází jako dva triplety dvou vodíků při δ 2.73 ppm a δ 3.60 ppm které se vzájemně štěpí interakční konstantou $J \sim 6.0$ Hz. Dále byly pozorovány obvyklé signály. V ^{13}C NMR spektru byly rovněž nalezeny obvyklé signály. V MS (ESI) byl pozorován iont $[\text{M}]^+$ při 588 m/z.

PŘÍPRAVA SOLÍ VYCHÁZEJÍCÍ Z KYSELINY URSOLOVÉ (*1d*)

Příprava kvarterních solí bromethyl-esteru 15a

Série kvarterních amoniových esterů byla doplněna kvarterními amoniovými solemi esterů kyseliny ursolové (*1d*). Kyselina ursolová (*1d*) reagovala s 1,2-dibromethanem za vzniku bromethyl-esteru **15a**. Tento bromethyl-ester poté reagoval s TEA, TMA, pyridinem a triethanolaminem za vzniku již známého cholinového esteru **15b**, který byl připraven jiným způsobem¹²² a jehož spektrální charakteristiky nebyly dosud publikovány (Schéma 21), a rovněž za vzniku solí **15c** a **15d** a aminu **15e**.

Struktura připravených sloučenin byla potvrzena pomocí spektrálních dat. V ¹H NMR spektru všech derivátů kyseliny ursolové (*1d*) byly pozorovány některé důležité signály. Jedná se zejména o signály methylů v poloze 29 a 30 které jsou štěpeny na dublety s $J \sim 6.0 - 9.0$ Hz a jejichž chemický posun odpovídá přibližně $\delta \sim 0.9$ ppm – 1.0 ppm. Signál H-12 se podobně jako v případě kyseliny oleanolové (*1c*) nachází při $\delta \sim 5.2 - 5.4$ ppm a signál H-3 α v oblasti $\delta \sim 3.2 - 3.5$ ppm. V ¹³C NMR spektru všech látek této skupiny se nachází signály uhlíkových atomů C-12 a C-13 dvojné vazby okolo $\delta \sim 125$ ppm a $\delta \sim 140$ ppm. Signál karboxylového C-28 se nachází v regionu $\delta \sim 175$ ppm.

V ¹H NMR spektru bromethyl-esteru **15a** se kromě obvyklých signálů nachází ještě dva triplety H-1' při δ 3.49 ppm a H-2' při δ 4.32 ppm, které mají společnou interakční konstantu $J \sim 6.0$ Hz. V ¹³C NMR spektru byly nalezeny výše zmíněné obvyklé signály. V MS (EI) byl pozorován bromový dublet $[M]^{+}$ při 562 m/z a dále iont odpovídající ztrátě molekuly vody. V ¹H NMR spektru cholinového esteru **15b** byl pozorován kromě obvyklých signálů široký singlet H-1' při δ 4.48 ppm a multiplet H-2' při δ 3.75 ppm. Signál tří *N*-methylů byl pozorován při δ 3.25 ppm. V ¹³C NMR spektru byly nalezeny obvyklé signály. V MS (ESI) byl pozorován iont $[M-Br]^{+}$ při 543 m/z. V ¹H NMR spektru soli **15c** byly kromě obvyklých signálů pozorovány multiplety H-1' při δ 4.41 ppm a H-2' při δ 3.62 ppm. Signály tří *N*-ethylů byly nalezeny jako triplet devíti vodíkových atomů při δ 1.35 ppm a kvartet šesti vodíkových atomů při δ 3.42 ppm, interakční konstanta těchto signálů odpovídá $J \sim 7.2$ Hz. V ¹³C NMR spektru

byly nalezeny obvyklé signály. V MS (ESI) byl pozorován iont $[M-Br]^+$ při 585 m/z. V 1H NMR spektru soli **15d** byly nalezeny kromě obvyklých signálů multiplety dvou vodíkových atomů H-1' při δ 5.02 ppm a H-2' při δ 4.52 ppm. Signály aromatických vodíkových atomů byly pozorovány jako triplet při δ 8.23 ppm, jako triplet při δ 8.71 ppm a jako dublet při δ 9.13. V ^{13}C NMR spektru byly pozorovány obvyklé signály a dále signály aromatických uhlíkových atomů při δ 139.3 ppm, při δ 146.66 ppm a při δ 147.70 ppm. V MS (ESI) byl pozorován iont $[M-Br]^+$ při 562 m/z.

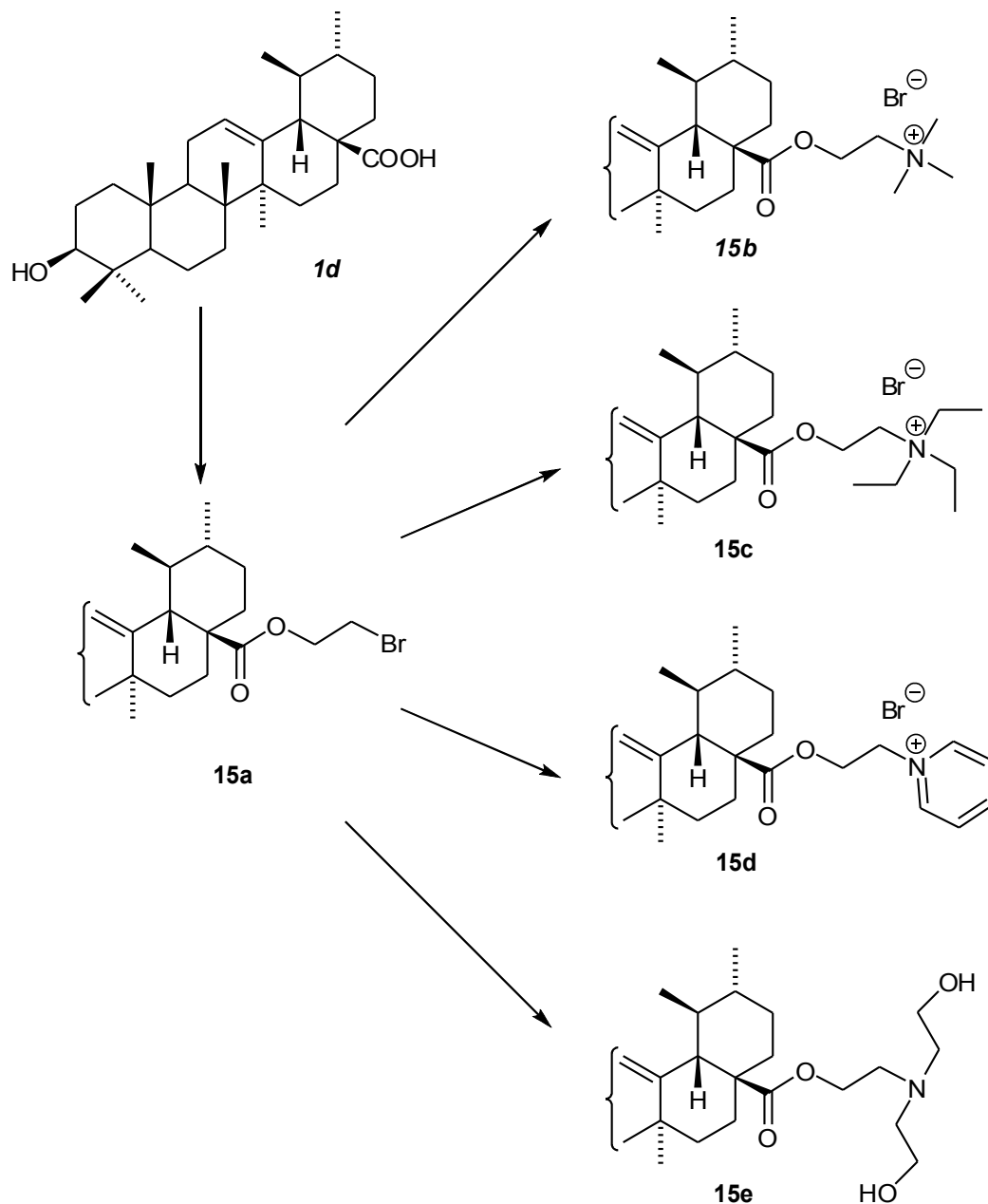


Schéma 21: a: $BrCH_2CH_2Br$, K_2CO_3 , MeCN, DMF, 50 °C; b: TMA, DMF, 50 – 70 °C; c: TEA, DMF, 50 – 70 °C; d: pyridin, DMF, 50 – 70 °C; e: triethanolamin, DMF, 50 – 70 °C.

V ^1H NMR spektru aminu **15e** byly nalezeny obvyklé signály a dále triplety dvou vodíkových atomů H-1' při δ 4.22 ppm a H-2' při δ 2.89 ppm. Signály $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_2$ byly nalezeny při δ 2.82 ppm a δ 3.68 ppm jako triplety čtyř vodíků. V ^{13}C NMR spektru byly pozorovány obvyklé signály. V MS (ESI) byl pozorován iont $[\text{M}]^+$ při 559 m/z.

BIOLOGICKÁ AKTIVITA PŘIPRAVENÝCH SLOUČENIN

Anti-HIV aktivita připravených sloučenin

Sloučeniny **4c**, **6a**, **10f**, **11c**, **11e**, **11g** a **11i** byly firmou Virochem v rámci licenční spolupráce testovány na anti-HIV aktivitu. Žádná z těchto sloučenin však schopnost potlačovat množení viru HIV neprokázala. Poté, co byla zjištěna vysoká cytotoxická aktivita většiny sloučenin připravených v této práci, byly další sloučeniny považovány za neperspektivní jako potenciální léčiva proti viru HIV (díky nízké předpokládané hodnotě terapeutického indexu) a další testování antivirové aktivity připravených sloučenin bylo zastaveno.

Protizánětlivá aktivita připravených sloučenin

Vybrané připravené sloučeniny byly testovány na protizánětlivou aktivitu pracovištěm doc. MUDr. Mariána Hajdúcha v LEM Dětské kliniky FN Olomouc.¹⁵³

Standardním testem pro zjištění předpokladů látky pro protizánětlivou aktivitu je test inhibice tvorby NO v myších makrofázích. Oxid dusnatý je (spolu s interleukinem 8, interferonem γ a dalšími látkami) jedním z důležitých buněčných mediátorů zánětlivé odpovědi. Inhibici tvorby NO lze stanovit následujícím *in vitro* testem. Ke kultuře myších makrofágů kmene B10R je přidán lipopolysacharid, který indukuje tvorbu NO; ten je následně oxidován na nitrit, který se uvolňuje do kultivačního média. Koncentrace nitritu se stanovuje spektrofotometricky pomocí Griessova činidla. Inhibiční koncentrace IC_{50} se potom určí z křivek závislosti koncentrace nitritu na koncentraci zkoumané látky.

Vzhledem k tomu, že inhibice tvorby NO může být způsobena rovněž prostou toxicitou látky, stanovuje se vedle protizánětlivé aktivity také cytotoxická aktivita zkoumané látky pomocí MTT testu (viz níže). Poměr mezi IC_{50} těchto dvou testů (terapeutický index) potom udává, nakolik je snížení tvorby NO způsobeno toxicitou zkoumané látky.

Výše popsaným způsobem byly testovány sloučeniny **4a**, **4b**, **4c**, **4e**, **6b**, **6c**, **6d**, **6e**, **6f**, **6g**, **14c** a **14d**. Výsledky testů jsou shrnuty v tabulce 4. Asi polovina připravených

látek má nevýznamný účinek a na produkci NO působí převážně cytotoxicitou. V případě látek **4a**, **4b**, **6c** a **6e** dochází k mírné inhibici tvorby NO samotnou látkou, sloučeniny jsou však stále významně cytotoxické.

Závěrem lze tedy konstatovat, že ačkoli některé kvarterní sole triterpenoidů potlačují tvorbu NO v myších makrofázích, jejich aktivita není významná a další výzkum této aktivity není perspektivní.

látka	Produkce nitritů		MTT		terapeutický index
	IC ₅₀ [μmol/l]	SD	IC ₅₀ [μmol/l]	SD	
4a	133.0	18.0	248.0	3.7	1.87
4b	138.0	18.0	248.0	5.9	1.79
4c	30.5	4.8	32.0	1.1	1.05
4e	44.9	5.9	36.6	5.7	0.82
6b	118.5	30.9	91.8	3.9	0.77
6c	31.3	5.7	59.2	4.1	1.89
6d	35.6	3.6	50.5	3.1	1.42
6e	54.8	14.4	129.4	12.2	2.36
6f	45.9	4.5	50.1	2.9	1.09
6g	159.8	11.4	177.3	18.5	1.11
14c	29.2	5.0	31.4	2.4	1.07
14d	29.7	2.0	33.9	2.7	1.14

Tabulka 4: Protizánětlivé aktivity připravených sloučenin.

Antimikrobiální aktivita připravených sloučenin

Některé sloučeniny připravené v této práci (**4a**, **6b**, **6c**, **6f**, **10e**, **11b**, **11e**, **11j**, **12d**, **13c**, **14b**, **14c**, **14e**, **14d** a **14e**) byly testovány na antimikrobiální aktivitu pracovištěm doc. RNDr. Jana Hlaváče, CSc. na UP Olomouc. Z testovaných látek prokázaly čtyři sloučeniny zajímavé antibakteriální aktivity proti gram-positivním bakteriím, druhů *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* (MRSA) a *Staphylococcus haemolyticus*. Žádná ze sloučenin neprokázala antimikrobiální aktivitu proti gram-negativním bakteriím *Escherichia coli* či *Pseudomonas aeruginosa*. Naměřené aktivity se udávají jako minimální inhibiční koncentrace (MIC [mg/l]), což je taková koncentrace zkoumané látky, která způsobí opticky kontrolované zastavení růstu populace bakterií daného kmene. Výsledky testování shrnuje tabulka 5.

látka	MIC [mg/l]			
	<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 4224	<i>Staphylococcus aureus</i> CCM 3953	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
4a	16	8	8	128
14b	128	4	8	128
14c	128	32	64	128
14d	4	2	2	128

Tabulka 5: Antimikrobiální aktivita připravených sloučenin.

Antimikrobiální aktivitu proti gram-pozitivním bakteriím prokázaly všechny tři připravené sole kyseliny oleanolové **14b** – **14d**. Naopak terciární amin **14e** žádnou aktivitu proti mikroorganismům neprokázal. Nejvyšší antimikrobiální aktivita byla zaznamenána u 21-oxolupanového methylovaného derivátu **4a** a zejména pak u pyridiniového esteru kyseliny oleanolové **14d**.

Lze tedy uzavřít, že některé z připravených kvarterních solí jeví vysokou antimikrobiální aktivitu, která je předurčuje k dalšímu výzkumu. Jako nejzajímavější se však jeví fakt, že antimikrobiální aktivita připravených látek zůstává zachována i proti multidrug-rezistentnímu kmenu zlatého stafylokoka MRSA. V současné době se hledáním vhodného léku proti tomuto kmenu zabývá značné množství vědeckých pracovišť po celém světě.

Cytotoxická aktivita připravených sloučenin

Všechny nově připravené a některé již známé sloučeniny byly otestovány MTT testem proti linii T-lymfoblastické leukémie CEM. MTT test využívá schopnosti živých buněk redukovat MTT v mitochondriích na tmavě fialový formazan (Schéma 22).

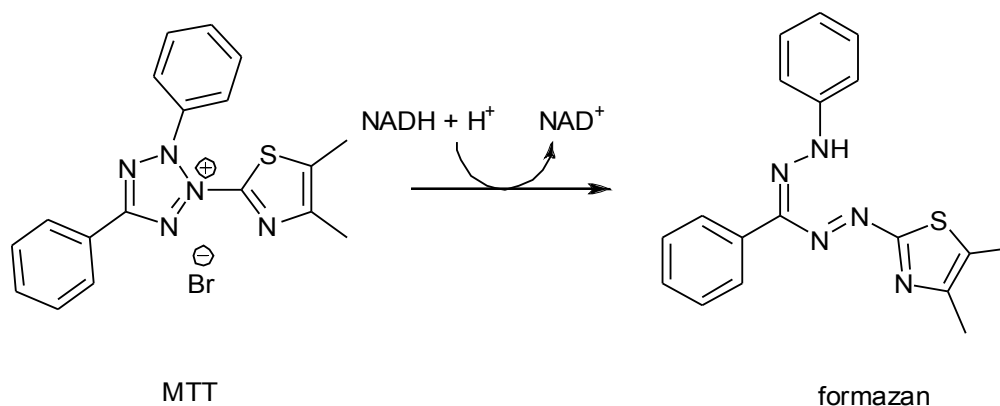


Schéma 22: Redukce MTT na formazan.

Intenzita zbarvení kultivačního média je přímo úměrná procentu přeživších buněk a lze ji stanovit spektrofotometricky. Cytotoxická účinnost látky se udává jako hodnota IC_{50} , což je taková koncentrace zkoumané látky, která inhibuje právě 50% buněk. Hodnotu IC_{50} lze vypočítat z křivek závislosti účinku látky na dávce. Výsledky testování udává tabulka 6.

látka	CEM		látka	CEM	
	IC_{50} [$\mu\text{mol/l}$]	SD		IC_{50} [$\mu\text{mol/l}$]	SD
2b	>250	-	11e	7.8	1.7
3f	58.2	10.9	11f	24.2	2.8
3g	20.7	4.4	11g	9.6	2.1
3i	8.5	1.0	11h	89.0	5.6
4a	134.8	6.8	11i	11.5	0.8
4b	10.1	1.4	11j	12.2	1.2
4c	19.0	4.6	12c	44.7	17.6
4d	19.2	3.5	12d	1.5	0.9
4e	14.1	3.4	12e	9.2	1.8
6a	161.0	34.8	12f	7.9	1.9
6b	182.0	15.8	13c	>250	-
6c	34.2	2.0	13d	>250	-
6d	>250	-	13e	28.5	1.4
6e	24.0	10.4	13f	26.4	1.5
6f	12.8	2.4	14a	131.9	9.2
6g	30.6	4.3	14b	119.4	16.9
7a	16.2	2.8	14c	29.4	8.3
8a	>250	-	14d	10.7	1.3
8b	9.1	0.6	14e	37.9	9.5
9c	32.6	1.2	15a	28.9	2.9
9d	31.1	4.2	15b	16.7	2.3
10f	8.8	3.2	15c	4.1	1.7
11b	141.0	15.6	15d	22.6	3.7
11c	10.7	1.5	15e	13.4	2.2
11d	75.0	13.7			

Tabulka 6: Cytotoxická aktivita připravených sloučenin proti linii CEM.

Z výsledků testování vyplývá, že všechny připravené kvarterní sole mají vyšší cytotoxickou aktivitu než výchozí bromethyl-estery. Jako nejučinnější se jeví jednak deriváty kyseliny ursolové, kde nejlepší cytotoxicitu projevila sůl **15c** (4.1 $\mu\text{mol/l}$), a jednak *N,N,N*-triethylethanaminiové deriváty, mezi kterými se nachází i nejučinnější připravená sloučenina **12d** s $IC_{50} = 1.5 \mu\text{mol/l}$. Celkem se podařilo připravit devět sloučenin s IC_{50} menší než 10 $\mu\text{mol/l}$.

Vybrané sloučeniny byly dále testovány MTT testem proti panelu deseti dalších nádorových linií různého histogenetického původu a s různými změnami fenotypu, včetně rezistentních. Výsledky shrnuje tabulka 7.

buněčná linie		látka							
		4e	10f	11e	11i	12d	12f	14c	14d
A 549	IC ₅₀ [μmol/l]	14.1	28.9	5.3	62.5	8.1	8.8	21.9	23.9
	SD	3.0	7.2	2.1	6.5	4.4	2.2	9.9	7.0
MCF-7	IC ₅₀ [μmol/l]	33.2	40.5	7.6	56.2	39.0	10.5	52.7	36.1
	SD	16.1	2.6	5.1	8.4	5.8	2.3	2.7	4.7
CEM-DNR-BULK	IC ₅₀ [μmol/l]	63.5	39.1	14.1	44.6	45.3	9.3	46.4	41.1
	SD	13.1	3.1	3.2	4.9	8.1	1.6	7.39	8.0
K562	IC ₅₀ [μmol/l]	4.3	9.6	2.3	34.6	2.9	3.5	11.0	13.5
	SD	2.9	1.4	1.3	4.8	0.3	0.41	2.9	3.5
K562-tax	IC ₅₀ [μmol/l]	13.9	12.0	9.7	36.5	38	8.2	46.8	19.8
	SD	2.7	2.6	3.5	1.3	6.6	1.5	6.0	0.7
HT-29	IC ₅₀ [μmol/l]	25.1	14.0	10.9	36.0	41.3	8.2	56.4	25.4
	SD	10.4	3.6	2.4	4.0	6.4	2.0	4.4	6.5
PC-3	IC ₅₀ [μmol/l]	111.7	32.2	9.7	135.7	15.6	10.1	29.8	20.5
	SD	31.8	1.7	4.7	6.1	9.0	2.4	7.9	3.8
U87Mg	IC ₅₀ [μmol/l]	246.1	47.4	26.6	67.7	43.9	10.6	48.6	30.9
	SD	8.7	3.1	13.4	27.3	6.8	0.9	6.9	9.3
HTC116p53mut	IC ₅₀ [μmol/l]	28.4	32.2	9.1	46	14.5	8.3	16.8	22.6
	SD	4.5	5.0	1.8	8.0	1.0	1.1	2.3	7.0
HTC116p53wt	IC ₅₀ [μmol/l]	12.6	36.8	7.4	42.3	12.9	8.8	27.7	26.9
	SD	2.0	2.6	1.5	3.81	1.0	1.0	4.9	6.7

Tabulka 7: Cytotoxické aktivity připravených sloučenin proti panelu deseti nádorových linií.

Ukázalo se, že kvarterní amoniové sole a látky příbuzné projevují vysokou cytotoxickou aktivitu proti široké skupině nádorových linií rozličného histogenetického původu. Vysoká cytotoxická aktivita zůstává zachována nebo je pouze mírně snížena i proti rezistentním nádorovým liniím. Lze tedy konstatovat, že připravené látky jsou schopny překonat mechanismy zodpovědné za rezistenci vůči běžně používaným cytostatikům. Celkem bylo připraveno devět nových sloučenin (**3i**, **8b**, **10f**, **10g**, **11e**, **12d**, **12e**, **12f** a **15c**) s IC₅₀ menší než 10 μmol/l, které mají potenciál k dalšímu výzkumu. Struktury a aktivita vybraných sloučenin byla ochráněna patentovou přihláškou.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

OBEČNÉ POZNÁMKY K EXPERIMENTÁLNÍ ČÁSTI

Teploty tání byly stanoveny na bodotávku Büchi B-545, nejsou korigovány a byly zaokrouhleny na celé stupně celsia.

Specifické optické otáčivosti byly měřeny na polarimetru Autopol III (Rudolph research, Flanders, New Jersey) v roztoku methanolu (pokud není u experimentu uvedeno jinak) a jsou uváděny v jednotkách [10^{-1} deg cm² g⁻¹], koncentrace c [g/100 ml] jsou udávány u každé hodnoty specifické optické otáčivosti.

IČ spektra byla měřena na spektrometru Nicolet Avatar 370 FTIR technikou DRIFT. Vlnočty jsou uvedeny v cm⁻¹.

NMR spektra byla měřena na přístroji Varian ^{UNITY}INOVA 400 a na přístroji Varian ^{UNITY}INOVA 300 v roztoku CDCl₃, CD₃OD, případně v jejich směsi (uvedeno u každého experimentu). Pracovní frekvence spektrometru je uvedena u každého experimentu. Pro ¹H NMR spektra měřená v CDCl₃ byl jako vnitřní standard použit tetramethylsilan $\delta(\text{TMS}) = 0.000$ ppm, pokud bylo měření prováděno v CD₃OD bylo spektrum referencováno na signál tohoto rozpouštědla $\delta(\text{CD}_3\text{OD}) = 3.310$ ppm. Chemické posuny ¹³C NMR spekter byly referencovány vůči $\delta(\text{CDCl}_3) = 77.00$ ppm anebo vůči $\delta(\text{CD}_3\text{OD}) = 49.00$ ppm. 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 BRUKKER Esquire 3000; zavedení vzorku bylo provedeno v methanolickém roztoku pokud není u experimentu uvedeno jinak.

Hmotnostní spektra EI byla měřena na přístroji INCOS 50 (Finnigan MAT), teplota iontového zdroje byla 150 °C, zavedení vzorku bylo provedeno přímým vstupem na rheniovém drátku vyhřívaném elektrickým proudem (proud narůstal od 0 mA do 380 mA rychlostí 10 mA/s), energie ionizujících elektronů byla 75 eV. Relativní intenzity jsou vztaženy na nejintenzivnější iont v oblasti $m/z > 180$.

Elementární analýzy byly měřeny na servisním pracovišti Ústavu Organické Chemie a Biochemie AVČR v. v. i.

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.

Pro sloupcovou chromatografii byl použit silikagel Kieselgel 60 (Merck 7734, 70 – 230 mesh). K odpařování rozpouštědel byla použita RVO (Büchi Rotovapor R-200). Pro reakce za snížené teploty byl používán kryostat Huber TC 100E.

Reakce a zpracování reakcí ve velkém měřítku byly provedeny ve skleněném duplikovaném reaktoru o objemu 12 l opatřeném hřídelovým míchadlem kluzně uloženým ve vodou chlazeném plášti. Pohon míchadla zajišťoval motor Lenze D-32699 s variátorem (57 – 345 ot./min; 1600 – 840 Ncm). Reaktor byl zahříván vodní párou.

Analytické vzorky byly sušeny za sníženého tlaku. 1,2-dibromethan, DBU, acetanhydrid, methyljodid, piperidin, pyrrolidin, morfolin, DMAP, NBS, hydroxylamin hydrochlorid, tetrahydridoboritan sodný, methyl-triflát, montmorillonit K10, oxid rutheničitý a Raneyův nikl byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich, s.r.o., jodistan sodný byl zakoupen od firmy Merck, s.r.o. Použité aminy (TEA, TMA, pyridin, triethanolamin) byly získány z laboratorních zásob.

Eluční soustavy pro vyvíjení TLC fólií a pro chromatografie:

Soustava A: chloroform

Soustava B: chloroform / methanol 10:1 (obj.)

Soustava C: toluen / diethylether 5:1 (obj.)

Obvyklá zpracování reakčních směsí

Postup A

Reakční směs byla v dobře táhnoucí digestoři odsáta na fritě a promyta dichlormethanem. Získaná sraženina byla vysušena za sníženého tlaku.

Postup B

Reakční směs byla odpařena na RVO při 80 °C s odtahem plynů do digestoře. K vlhkému odparku byla třikrát přidána voda (1 ml na 100 mg výchozí látky) a roztok byl znovu odpařen. Poté byl k odparku přidán methanol (1 ml na 100 mg výchozí látky) a roztok, případně obsahující suspenzi byl odpařen do sucha. Suchý odparek byl znovu rozpuštěn v methanolu, přefiltrován přes krátký sloupec silikagelu (chloroform / methanol = 8 / 2) a znovu odpařen do sucha. Poté byl odparek nanesen v minimálním množství methanolu na silikagel a chromatografován v chloroformu s gradientem methanolu (0 – 20 % obj.).

Postup C

Celé zpracování bylo provedeno v digestoři, nebo na RVO s odtahem plynů do digestoře. Reakční směs byla zředěna desetinásobným objemem vody a dvakrát extrahována chloroformem (vždy dvojnásobný objem reakční směsi). Spojené organické podíly byly jednou extrahovány vodou a odpařeny na RVO. K vlhkému odparku byla dvakrát přidána voda (vždy 10 ml) a suspenze byla znovu odpařena. Suchý odparek byl rozpuštěn v minimálním množství toluenu a přefiltrován v toluenu přes krátký sloupec silikagelu. Spojené frakce byly znovu odpařeny a rekrystalizovány z *i*-PrOH.

Postup D

Celé zpracování bylo provedeno v digestoři, nebo na RVO s odtahem plynů do digestoře. Reakční směs byla nalita do desetinásobného množství vody. Po 30 minutách byla směs odsáta na fritě, filtrační koláč byl promyt vodou a vysušen za sníženého tlaku.

Obecné postupy

Příprava 2'-bromethyl-esterů

Do roztoku výchozí triterpenické karboxylové kyseliny v DMF (10 ml na gram výchozího materiálu) byl suspendován K_2CO_3 (1 mol. ekvivalent). K této směsi byl přidán MeCN (1 ml na gram výchozího materiálu). 1,2-dibromethan (5 mol. ekvivalentů) byl přidán jako poslední a směs byla za míchání zahřívána na 50 °C po dobu 3 hodin, nebo do úplné konverze výchozího materiálu (kontrola TLC soustava C) a reakční směs byla zpracována postupem C.

Příprava kvarterních solí halogenidů

Výchozí halogenid (bromid, chlorid) byl rozpuštěn za zvýšené teploty (70 – 90 °C) v DMF (na 100 mg výchozího materiálu 1 ml DMF), byl přidán příslušný amin (3 mol. ekvivalenty) a reakční směs byla umístěna pod argonem do uzavřené skleněné nádoby. Reakční nádoba byla poté zahřívána na teplotu 50 – 70 °C až do úplné konverze výchozího materiálu, nebo do zastavení reakce (kontrola TLC soustava A).

Příprava hydrochloridů

Do roztoku výchozí látky v diethyletheru (2 ml na 100 mg výchozího materiálu) byl přidán nadbytek nasyceného roztoku HCl v diethyletheru a směs byla míchána po dobu deseti minut. Poté byla reakční směs odpařena na RVO za sníženého tlaku.

Methylace terciárních aminů

Do roztoku výchozího terciárního aminu v DMF (na 100 mg výchozího materiálu 2 ml rozpouštědla) byl přidán methyljodid (2 mol. ekvivalenty) a směs byla za míchání pod argonem zahřívána na 100 °C po dobu 3 hodin (kontrola TLC soustava B). Zpracování proběhlo postupem D.

EXPERIMENTÁLNÍ POSTUPY

2'-bromethyl-ester kyseliny betulinové (**2a**)

Metoda 1: Z kyseliny betulinové (**1b**) (500 mg, 1.1 mmol) byl získán modifikovaným literárním postupem¹³⁴ (1.5 mol. ekvivalentu 1,2-dibromethanu) bromethyl-ester **2a** (395 mg, 64%) jako bílé krystalky a dimerní ester **2b** (52 mg, 5%) rovněž jako bílé krystalky.

Metoda 2: Z kyseliny betulinové (**1b**) (10.0 g, 22 mmol) byl obecným postupem přípravy 2'-bromethyl-esterů připraven bromethyl-ester **2a** (7.3 g, 59%) jako bílé krystaly.

Data pro **2a**: T.t. 185 °C (*i*-PrOH), $[\alpha]_D +6$ (c 0.22, CHCl₃). Literatura¹³⁴ uvádí pro (**2a**) t.t. 182 – 184 °C (methanol), $[\alpha]_D +7$ (c 0.38). ¹H NMR spektrum je identické se spektrem autentického preparátu.¹³⁴

Data pro **2b**: T.t. 275 °C (*i*-PrOH), $[\alpha]_D 0$ (c 0.15, CHCl₃). IR spektrum: 1632 (C=C), 1726 (C=O), 3397 (O-H). ¹H NMR (299.91 MHz; CDCl₃): 0.75 s, 0.82 s, 0.92 s, 0.96 s, 0.97 s, 1.69 s, 6 x 6H (12 x CH₃); 1.90 m, 4H ($\Sigma J = 32.4$); 2.19 dd, 2H ($J = 12.2$, $J' = 2.9$); 2.26 dd, 2H ($J = 9.3$, $J' = 2.4$); 3.00 td, 2H ($J = 10.8$, $J' = 4.2$); 3.17 m, 2H (H – 3 α , $\Sigma J = 16.2$); 4.28 m, 4H ($\Sigma J = 28.5$), 4.06 s, 2H (H – 29a); 4.73 s, 2H (H – 29b). ¹³C NMR (75.42 MHz; CDCl₃): 14.55, 15.19, 15.80, 15.95, 18.16, 19.20, 20.76, 25.39, 26.92, 27.75, 29.61, 30.47, 31.95, 34.18, 36.83, 37.04, 38.16, 38.68, 40.58, 42.27, 46.83, 49.27, 50.41, 55.23, 56.48, 61.93, 78.69, 109.49, 150.23, 175.96. MS – ESI (m/z pro C₆₂H₉₈O₆): 962 (100, M⁺ + Na). Elementární analýza: vypočteno C 79.27%, H 10.51%; nalezeno C 79.16%, H 10.47%.

Betulin-diacetát (**3a**)

Surový betulin (**1a**) (2 kg) reagoval s acetanhydridem v pyridinu podle literární procedury¹⁵⁶ za vzniku betulin diacetátu (**3a**) (0.98 kg) o t.t. 222 °C (butanon), $[\alpha]_D = +22$ (c 0.40, CHCl₃). Literatura¹⁵⁶ uvádí t.t. 222 – 224 °C (chloroform / methanol),

$[\alpha]_D +21$ (c 0.43, CHCl_3). ^1H NMR spektrum je identické se spektrem autentického preparátu.¹⁵⁶

Lup-18-en-3 β ,28-diyl diacetát (3b)

Lupen **3b** byl připraven z betulin diacetátu (**3a**) (0.75 kg, 1.45 mol) reakcí s bromovodíkem v kyselině octové podle literárního postupu.¹⁵⁶ Byl získán lupen **3b** (0.56 kg, 75%) o t.t. 219 °C (butanon), $[\alpha]_D +15$ (c 0.4, CHCl_3). Literatura¹⁵⁶ uvádí t.t. 215 – 217 °C, $[\alpha]_D +12$ (c 0.25). ^1H NMR spektrum¹⁵⁴ je identické se spektrem autentického preparátu.

21-oxolup-18-en-3 β ,28-diyl diacetát (3c)

Keton **3c** byl připraven z lupenu **3b** (0.45 kg, 0.83 mol) oxidací $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ podle literárního postupu.¹⁵⁵ Byl získán keton **3c** (0.41 kg, 91%) o t.t. 201 °C (butanon), $[\alpha]_D = -35$ (c 0.49, CHCl_3). Literatura¹⁵⁵ uvádí t.t. 198 – 201 °C (chloroform / methanol), $[\alpha]_D -34$. ^1H NMR spektrum je identické se spektrem autentického preparátu.¹⁵⁵

28-hydroxy-21-oxolup-18-en-3 β -yl acetát (3d)

Hydroxyketon **3d** byl připraven z ketonu **3c** (12 g, 22.2 mmol) hydrolyzou podle literárního postupu.¹¹⁴ Byl získán hydroxyketon **3d** (9.3 g, 84%) o t.t. 312 °C (EtOAc), $[\alpha]_D -59$ (c 0.17, CHCl_3). Literatura¹¹⁴ uvádí t.t. 310 – 313 °C (EtOAc), $[\alpha]_D -67$ (c 0.48, CHCl_3). ^1H NMR spektrum je identické se spektrem autentického preparátu.¹¹⁴

3 β -acetoxy-21-oxolup-18-en-28-ová kyselina (3e)

21-oxokyselina **3e** byla připravena z hydroxyketonu **3d** (5.0 g, 10.0 mmol) oxidací pomocí RuO_4 podle literárního postupu.¹¹⁴ Byla získána kyselina **3e** (3.24 g, 54%) o t.t. 218 °C (butanon), $[\alpha]_D -41$ (c 0.23, dioxan). Literatura¹¹⁴ uvádí t.t. 222 – 239 °C (butanon), $[\alpha]_D -40$ (c 0.42, dioxan). ^1H NMR spektrum je identické se spektrem autentického preparátu.¹¹⁴

2'-bromethyl-3 β -acetoxy-21-oxolup-18-en-28-oát (3f)

Bromethyl-ester **3f** byl připraven z 21-oxokyseliny **3e** (5 g, 9.77 mmol) obecným postupem přípravy 2'-bromethyl-esterů. Byl získán bromethyl-ester **3f** (2.84 g, 47%) o t.t. 212 °C (*i*-PrOH), $[\alpha]_D$ -7 (c 0.21, CHCl₃). Literatura¹³⁴ uvádí t.t. 208-210 °C (methanol), $[\alpha]_D$ -14.6 (c 0.44). ¹H NMR spektrum je identické se spektrem autentického preparátu.¹³⁴

2'-chlorethyl-3 β -acetoxy-21-oxolup-18-en-28-oát (3g)

Chlorethyl-ester **3g** byl připraven z 21-oxokyseliny **3e** (1.67 g, 3.26 mmol) modifikovaným obecným postupem přípravy 2'-bromethyl-esterů. Modifikace spočívala v záměně 1,2-dibromethanu za 1-brom-2-chlorethan. Byl získán chlorethyl-ester **3g** (698 mg, 37%) o t.t. 198 °C (*i*-PrOH), $[\alpha]_D$ -16 (c 0.26, CHCl₃). IR spektrum: 1614 (C=C), 1726 (C=O), 1738 (C=O). ¹H NMR (299.91 MHz; CDCl₃): 0.84 s, 0.85 s, 0.91 s, 0.94 s, 1.04 s, 1.21 d, (J = 1.8), 1.23 d (J = 1.8), 7 \times 3H (7 \times CH₃); 2.05 s, 3H (OAc); 2.47 m, 1H (ΣJ = 5.7); 2.52 m, 1H (ΣJ = 6.3); 2.73 dd, 1H (J = 12.6, J = 3.3); 3.21 sept., 1H (J = 7.2, H – 20); 3.68 m, 2H (ΣJ = 27.6); 4.24 m, 1H (ΣJ = 22.2, H – 3 α); 4.48 m, 2H (ΣJ = 23.1). ¹³C NMR (75.42 MHz; CDCl₃): 15.87, 16.48, 16.65, 16.79, 18.08, 19.83, 20.17, 21.15, 21.26, 23.58, 25.10, 27.59, 27.89, 29.02, 30.89, 33.38, 34.79, 37.10, 37.75, 38.55, 41.31, 41.79, 45.06, 45.06, 45.33, 47.48, 51.03, 53.02, 55.38, 64.40, 80.70, 145.84, 170.95, 171.45, 174.03, 206.93. MS – ESI (m/z, CHCl₃ pro C₃₄H₅₁ClO₅): 574 (100, M⁺). Elementární analýza: vypočteno C 70.99%, H 8.94%, Cl 6.16%; nalezeno C 71.06%, H 8.86%; Cl nebyl stanoven.

3 β -hydroxy-21-oxolup-18-en-28-ová kyselina (3h)

21-oxokyselina **3e** (600 mg, 1.18 mmol) reagovala s KOH ve směsi EtOH a toluenu za varu pod zpětným chladičem podle literatury.¹¹⁶ Byly získány bílé krystaly hydroxykyseliny **3h** (482 mg, 87%) o t.t. 192 °C (toluen, rozkl.), $[\alpha]_D$ -62 (c 0.19, CHCl₃). Literatura¹⁵⁶ uvádí t.t. 196 – 204 °C (toluen, rozkl.), $[\alpha]_D$ -50 (c 0.38, dioxan). ¹H NMR spektrum je identické se spektrem autentického preparátu.¹⁵⁶

2'-bromethyl-3 β -hydroxy-21-oxolup-18-en-28-oát (3i)

Podle obecného postupu přípravy 2'-bromethyl-esterů byl z hydroxykyseliny **3h** (2.5 g, 5.33 mmol) získán bromethyl-ester **3i** (1.54 g, 50%) o t.t. 238 °C (*i*-PrOH), $[\alpha]_D^{25}$ -43 (c 0.28, CHCl₃). IR spektrum: 1628 (C=C), 1714 (C=O), 3461 (O-H). ¹H NMR (299.91 MHz; CDCl₃): 0.77 s, 0.88 s, 0.95 s, 0.98 s, 1.04 s, 1.20 d, (J = 2.1), 1.23 d (J = 1.8), 7 × 3H (7 × CH₃); 2.04 m, 1H (Σ J = 15.6); 2.15 d, 1H (J = 18.6, H-28a); 2.50 d, 1H (J = 18.6, H-28b); 2.76 dd, 1H (J = 12.6, J' = 3.3); 3.20 m, 2H (Σ J = 19.8); 3.51 m, 2H (Σ J = 13.2, COOCH₂CH₂Br); 4.30 m, 1H (Σ J = 22.8, COOCH₂CH₂Br); 4.50 m, 1H (Σ J = 24.0, COOCH₂CH₂Br). ¹³C NMR (75.42 MHz; CDCl₃): 15.37, 15.94, 16.74, 18.20, 19.84, 20.19, 21.14, 25.12, 27.29, 27.65, 27.93, 28.97, 29.04, 33.38, 34.88, 37.19, 38.82, 38.88, 41.32, 45.09, 45.44, 47.52, 51.12, 53.02, 55.32, 64.26, 78.83, 145.85, 171.56, 173.93, 206.99. MS – ESI (m/z, CHCl₃ pro C₃₂H₄₉BrO₄): 579 (95), 577 (100, M⁺). Elementární analýza: vypočteno C 66.54%, H 8.55%, Br 13.83%; nalezeno C 66.14%, H 9.01%, Br 13.56%.

***N,N,N*-trimethyl-2'-ethanaminium-3 β -acetoxy-21-oxolup-18-en-28-oát bromid (4a)**

Bromethyl-ester **3f** (117 mg, 0.19 mmol) reagoval s TMA podle obecného postupu přípravy kvarterních solí halogenidů. Po zpracování reakční směsi postupem B byl získán bromid **4a** (78 mg, 61%) jako jemný bílý prášek o t.t. 90 °C (CHCl₃/MeOH, rozklad), $[\alpha]_D^{25}$ +10 (c 0.19). IR spektrum: 1628 (C=C), 1732 (C=O). ¹H NMR (399.95 MHz; CD₃OD): 0.87 s, 0.88 s, 0.88 s, 0.97 s, 1.11 s, 1.18 d (J = 6.8); 1.20 d (J = 6.4), 7 × 3H (7 × CH₃); 2.03 s, 3H (OAc); 2.21 d, 1H (J = 18.8); 2.65 d, 1H (J = 18.8); 3.19 s, 9H (N(CH₃)₃); 3.29 sept. (J = 7.0); 3.74 t, 2H (J = 4.9, COOCH₂CH₂N); 4.47 m, 1H (H – 3 α , Σ J = 16.5); 4.61 m, 2H (Σ J = 45.2, COOCH₂CH₂N). ¹³C NMR (100.57 MHz; CD₃OD): 16.47, 17.00, 17.35, 17.39, 19.21, 20.26, 20.73, 21.15, 22.35, 24.64, 26.40, 28.41, 28.89, 30.08, 34.45, 35.99, 38.34, 38.86, 39.65, 42.60, 46.58, 46.88, 48.29, 52.34, 54.34, 54.51, 56.71, 59.81, 82.29, 147.24, 172.82, 173.64, 174.25, 209.33. MS – ESI (m/z, pro C₃₇H₆₀BrNO₅): 599 (100, M⁺ - Br). Elementární analýza: vypočteno C 65.47%, H 8.91%, Br 11.77%, N 2.06%; nalezeno C 65.22%, H 9.01%, Br nebyl stanoven, N 2.14%.

***N,N,N*-triethyl-2'-ethanaminium-3 β -acetoxy-21-oxolup-18-en-28-oát bromid (4b)**

Bromethyl-ester **3f** (285 mg, 0.46 mmol) reagoval s TEA podle obecného postupu přípravy kvarterních solí halogenidů. Po zpracování reakční směsi postupem B byl získán bromid **4a** (78 mg, 24%) jako jemný bílý prášek o t.t. 205 °C (CHCl₃/MeOH, rozklad), $[\alpha]_D^{20}$ +76 (c 0.18). IR spektrum: 1634 (C=C), 1722 (C=O). ¹H NMR (399.95 MHz; CD₃OD): 0.87 s, 0.88 s, 0.97 s, 1.02 s, 1.10 s, 1.19 s, 1.22 s, 5 x 3H (5 x CH₃); 1.31 t, 9H (J = 7.2, N(CH₂CH₃)₃); 2.20 d, 1H (J = 18.9); 2.47 d, 1H (J = 12.0); 2.64 d, (J = 18.9); 2.73 dd, 1H (J = 8.0, J = 8.0); 3.30 sept., 1H (J = 6.9, H – 20); 3.39 q, 6H (J = 7.4, N(CH₂CH₃)₃); 3.65 t, 2H (J = 5.1, COOCH₂CH₂N); 4.50 m, 2H (Σ J = 32.4, COOCH₂CH₂N). ¹³C NMR (100.58 MHz; CD₃OD): 7.93, 16.47, 17.00, 17.36, 19.20, 20.35, 20.71, 21.15, 22.35, 24.62, 26.40, 28.41, 28.83, 30.05, 34.85, 35.97, 38.32, 38.84, 39.63, 42.61, 46.71, 46.80, 52.32, 54.42, 54.76, 56.24, 56.69, 59.39, 82.27, 174.01, 172.81, 173.87, 174.43, 209.29. MS – ESI (m/z, pro C₄₀H₆₆BrNO₅): 641 (100, M⁺ - Br), 613 (53). Elementární analýza: vypočteno C 66.65%, H 9.23%, Br 11.08%, N 1.94%; nalezeno 66.41%, H 9.38%, Br 13.78%, N 2.09%.

2'-pyridiniumethyl-3 β -acetoxy-21-oxolup-18-en-28-oát bromid (4c)

Bromethyl-ester **3f** (308 mg, 0.50 mmol) reagoval s pyridinem podle obecného postupu přípravy kvarterních solí halogenidů. Po zpracování reakční směsi postupem A byl získán bromid **4a** (78 mg, 61%) jako bílé krystaly o t.t. 249 °C (DMF, rozklad), $[\alpha]_D^{20}$ -16 (c 0.27). IR spektrum: 1636 (C=C), 1733 (C=O). ¹H NMR (399.95 MHz; CD₃OD): 0.86 s, 0.86 s, 0.93 s, 0.96 s, 0.98 s, 1.18 d (J = 6.8), 1.19 d (J = 6.8), 7 x 3H (7 x CH₃); 2.03 s, 3H (OAc); 2.11 d, 1H (J = 18.8); 2.30 d, 1H (J = 18.8); 2.39 dd, 1H (J = 9.7, J' = 2.7); 2.54 m, 1H (Σ J = 16.2); 3.23 sept. (J = 7.0, H-20); 4.45 m, 1H (Σ J = 16.5, H-3 α); 4.58 dt, 1H (J = 9.6, J' = 4.8); 4.64 dt, 1H (J = 9.6, J' = 4.8); 5.00 t, 2H (J = 5.1); 8.15 dd, 2H (J = 7.6, J' = 6.4); 8.67 t, 1H (J = 7.8); 8.97 d, 2H (J = 4.0). ¹³C NMR (100.58 MHz; CD₃OD): 16.45, 16.95, 17.24, 17.32, 19.00, 20.18, 20.76, 21.25, 22.10, 24.44, 26.11, 28.36, 28.62, 29.81, 34.25, 35.74, 38.11, 38.66, 39.45, 42.30, 46.31, 46.49, 52.02, 54.14, 56.46, 61.07, 64.28, 82.13, 129.53, 146.12, 146.98, 147.56, 149.03, 172.73, 173.28, 174.14, 208.99. MS – EI (m/z, pro C₃₉H₅₆BrNO₅): 618 (2, M⁺ - Br), 558 (2), 512 (3), 468 (34), 426 (6), 409 (15), 393 (11), 365 (13), 249 (31), 205 (100), 189 (75).

Elementární analýza: vypočteno C 67.03%, H 8.08%, Br 11.43%, N 2.00%; nalezeno C 67.02%, H 8.11%, Br nebyl stanoven, N 2.20%.

2'-pyridiniumethyl-3 β -acetoxy-21-oxolup-18-en-28-oát chlorid (4d)

Chlorethyl-ester **3g** (322 mg, 0.56 mmol) reagoval s pyridinem podle obecného postupu přípravy kvarterních solí halogenidů. Po zpracování reakční směsi postupem B byl získán bromid **4a** (186 mg, 51%) jako bílé krystaly o t.t. 212 °C (MeOH, rozklad), $[\alpha]_D$ -16 (c 0.27). IR spektrum: 1644 (C=C), 1712 (C=O), 1756 (C=O). ¹H NMR (299.91 MHz; CD₃OD): 0.85 s, 0.85 s, 0.99 s, 0.99 s, 1.15 s, 1.17 d (J = 5.4), 1.19 d (J = 6.9), 7 × 3H (7 × CH₃); 2.05 s, 3H (OAc); 3.21 sept. (J = 6.9, H – 20); 4.65 m, 2H (Σ J = 59.1); 5.24 m, 2H (Σ J = 61.5); 8.08 s, 2H; 8.48 t, 1H (J = 6.9); 9.18 s, 2H. ¹³C NMR (75.42 MHz; CD₃OD): 15.89, 16.44, 16.70, 16.76, 18.01, 19.71, 20.46, 20.99, 21.23, 23.53, 25.02, 27.63, 27.84, 28.70, 31.07, 33.22, 34.70, 37.06, 37.71, 38.49, 41.25, 45.19, 45.38, 47.86, 50.92, 52.81, 55.37, 63.73, 80.73, 128.36, 145.46, 146.05, 171.12, 171.54, 172.78, 207.31. MS – ESI (m/z, pro C₃₉H₅₆ClNO₅): 618 (100, M⁺ - Cl⁻). Elementární analýza: vypočteno C 71.59%, H 8.63%, Cl 5.42%, N 2.14%; nalezeno C 71.68%, H 8.61%, Cl nebyl stanoven, N 2.02%.

Bis(2-hydroxyethyl)amino-2'-ethyl-3 β -acetoxy-21-oxolup-18-en-28-oát (4e)

Bromethyl-ester **3f** (250 mg, 0.40 mmol) reagoval s pyridinem podle obecného postupu přípravy kvarterních solí halogenidů. Po zpracování reakční směsi postupem B byl získán amin **4e** (126 mg, 48%) jako bílé krystaly o t.t. 174 °C (CHCl₃/MeOH, rozklad), $[\alpha]_D$ -20 (c 0.20). IR spektrum: 1688 (C=C), 1731 (C=O), 3437 (O-H). ¹H NMR (399.95 MHz; CD₃OD): 0.87 s, 0.88 s, 0.96 s, 1.01 s, 1.09 s, 5 × 3H (5 × CH₃); 1.19 d, 3H (J = 1.2); 1.21 d, 3H (J = 1.6); 2.03 s, 3H (OAc); 2.15 d, 1H (J = 18.9, H-22a); 2.51 d, 1H (J = 18.8, H-22b); 2.70 t, 4H (J = 5.8, NCH₂CH₂OH); 2.85 t, 2H (J = 5.7, COOCH₂CH₂N); 3.27 sept., 1H (J = 6.9, H-20); 3.58 t, 4H (J = 5.8, NCH₂CH₂OH); 4.22 m, 2H (Σ J = 16.2, COOCH₂CH₂N); 4.47 m, 1H (Σ J = 16.5, H-3 α). ¹³C NMR (100.58 MHz; CD₃OD): 16.49, 17.01, 17.33, 17.36, 19.21, 20.31, 20.60, 21.15, 22.36, 24.64, 26.37, 28.41, 28.82, 30.18, 34.54, 35.97, 38.33, 38.85, 39.64, 42.57, 45.98, 46.51, 46.76, 52.32, 54.32, 54.52, 56.71, 57.89, 60.84, 64.66, 79.48, 146.84, 172.82, 174.40, 175.50,

209.72. MS – ESI (m/z, pro $C_{38}H_{61}NO_7$): 644 (100, $M^+ + H$), 584 (27). Elementární analýza: vypočteno C 70.88%, H 9.55%, N 2.18%; nalezeno C 71.02%, H 9.41%, N 2.29%.

2'-pyrrolidinoethyl-3 β -acetoxy-21-oxolup-18-en-28-oát (5b)

Bromethyl-ester **3f** (2.0 g, 3.32 mmol) reagoval s pyrrolidinem podle literární procedury¹³⁴ za vzniku pyrrolidinyethyl-esteru **5b** (1.62 g, 81%) o t.t. 166 °C (MeOH), $[\alpha]_D$ -18 (c 0.22, $CHCl_3$). Literatura¹³⁴ uvádí t.t. 162 – 164 °C (aceton), $[\alpha]_D$ -14.5 (c 0.48). ¹H NMR spektrum je identické se spektrem autentického preparátu.¹³⁴

2'-piperidinoethyl-3 β -acetoxy-21-oxolup-18-en-28-oát (5c)

Bromethyl-ester **3f** (1.0 g, 1.66 mmol) reagoval s piperidinem podle literární procedury¹³⁴ za vzniku piperidinyethyl-esteru **5c** (876 mg, 84%) o t.t. 174 °C (MeOH), $[\alpha]_D$ +4 (c 0.24, $CHCl_3$). Literatura¹³⁴ uvádí t.t. 173 – 175 °C (aceton), $[\alpha]_D$ 0 (c 0.47). ¹H NMR spektrum je identické se spektrem autentického preparátu.¹³⁴

2'-morfolinoethyl-3 β -acetoxy-21-oxolup-18-en-28-oát (5d)

Do roztoku bromethyl-esteru **3f** (1.0 g, 1.66 mmol) v chloroformu (4 ml) byl přidán morfolin (450 μ L, 5.17 mmol) a reakční směs byla zahřívána na teplotu 50 °C po dobu 2 dnů. Poté byla reakční směs zpracována postupem C. Byl získán morfolinoethyl-ester **5d** o t.t. 155 °C (*i*-PrOH), $[\alpha]_D$ -21 (c 0.18). Literatura¹³⁴ uvádí t.t. 150-151 °C (methanol), $[\alpha]_D$ -16 (c 0.34). ¹H NMR spektrum je identické se spektrem autentického preparátu.¹⁵⁷

4''-methylpyridino-3 β -hydroxy-21-oxolup-18-en-28-oát hydrochlorid (6a)

Methylpyridino-ester **5a**¹³⁹ (50 mg, 0.09 mmol) reagoval s chlorovodíkem podle obecného postupu přípravy hydrochloridů. Byl získán hydrochlorid **6a** (34 mg, 62%) jako bílý prášek o t.t. 204 °C (diethylether, rozklad), $[\alpha]_D$ 0 (c 0.20, $CHCl_3$). IR spektrum: 1640 (C=C), 1701 (C=O), 2585 (N-H), 3363 (O-H). ¹H NMR (299.91 MHz; $CDCl_3$): 0.77 s, 0.87 s, 0.97 s, 0.97 s, 0.97 s, 1.23 d (J = 6.9), 1.23 d (J = 6.9), 7 \times 3H (7 \times CH_3);

2.56 m, 3H ($\Sigma J = 38.3$); 3.21 m, 2H ($\Sigma J = 17.1$, H-3 α); 5.39 s, 2H (COOCH₂-); 7.83 s, 2H; 8.87 s, 2H. ¹³C NMR (75.42 MHz; CDCl₃): 15.37, 15.92, 16.70, 16.75, 18.14, 19.78, 20.39, 21.14, 25.18, 27.18, 27.75, 27.91, 28.98, 33.31, 34.81, 37.15, 38.79, 41.27, 45.19, 45.60, 47.59, 50.98, 53.04, 55.28, 63.76, 78.71, 124.29, 141.24, 146.60, 173.25, 206.27. MS – ESI (m/z, pro C₃₆H₅₂ClNO₄): 584 (100), 562 (76, M⁺ - Cl), 381 (62), 353 (31). Elementární analýza: vypočteno C 72.27%, H 8.76%, Cl 5.93%, N 2.34%; nalezeno C 72.05%, H 8.93%, Cl nebyl stanoven, N 2.16%.

2'-pyrrolidinoethyl-3 β -acetoxy-21-oxolup-18-en-28-oát hydrochlorid (6b)

Pyrrolidinoethyl-ester **5b** (350 mg, 0.57 mmol) reagoval s chlorovodíkem v diethyletheru podle obecného postupu přípravy hydrochloridů a získaný surový produkt byl krystalizován z methanolu. Byl získán hydrochlorid **6b** (261 mg, 71%) o t.t. 196 °C (methanol), $[\alpha]_D$ -23 (c 0.19, CHCl₃). IR spektrum: 1611 (C=C), 1697 (C=O), 1729 (C=O), 2596 (N-H). ¹H NMR (299.91 MHz; CDCl₃): 0.85 s, 0.86 s, 0.93 s, 0.95 s, 1.05 s, 1.17 d (J = 7.2), 1.21 d (J = 7.2), 7 \times 3H (7 \times CH₃); 2.05 s (OAc); 2.46 m, 2H ($\Sigma J = 18.6$); 2.59 m, 1H ($\Sigma J = 15.0$); 3.22 m, 2H ($\Sigma J = 20.7$); 4.48 dd, 1H (J = 9.8, J' = 6.7, H - 3 α); 4.69 m, 2H ($\Sigma J = 60.7$); 12.93 bs, 1H. ¹³C NMR (75.42 MHz; CDCl₃): 15.92, 16.47, 16.78, 18.06, 19.89, 20.32, 21.07, 21.27, 21.96, 23.33, 23.57, 25.10, 27.79, 27.88, 28.85, 33.47, 34.76, 37.11, 37.74, 38.55, 41.34, 45.30, 45.52, 47.74, 51.04, 52.81, 53.53, 54.59, 55.42, 60.17, 80.70, 146.06, 171.00, 171.38, 173.11, 206.72. MS – ESI (m/z, pro C₃₈H₆₀ClNO₅): 610 (100, M⁺ - Cl). Elementární analýza: vypočteno C 70.61%, H 9.36%, Cl 5.49%, N 2.17%; nalezeno C 70.57%, H 9.28%, Cl nebyl stanoven, N 2.04%.

2'-N-methylpyrrolidiniumethyl-3 β -acetoxy-21-oxolup-18-en-28-oát jodid (6c)

Pyrrolidinoethyl-ester **5b** (496 mg, 0.81 mmol) reagoval s MeI v DMF podle obecného postupu methylace terciárních aminů. Surový produkt byl chromatografován na silikagelu (gradient mobilní fáze z CHCl₃ k CHCl₃ / EtOH = 10 / 1) a krystalizován z methanolu. Byly získány bílé jehlice jodidu **6c** (333 mg, 54%) o t.t. 244 °C (methanol, rozklad), $[\alpha]_D$ -11 (c 0.25). IR spektrum: 1688 (C=C), 1712 (C=O), 1736 (C=O). ¹H NMR (299.91 MHz; CDCl₃): 0.86 s, 0.86 s, 0.93 s, 0.96 s, 1.06 s, 1.17 d (J = 7.2), 1.20 d (J = 7.5), 7 \times 3H (7 \times CH₃); 2.06 s, 3H (OAc); 2.19 d, 1H (J = 18.9); 2.28 m, 3H ($\Sigma J =$

30.8); 2.49 d, 1H ($J = 12.9$); 2.56 d, 1H ($J = 18.6$); 2.61 dd, 1H ($J = 12.6, J' = 3.3$); 3.17 s, 3H; 3.25 sept., 1H ($J = 6.9$); 3.71 m, 4H ($\Sigma J = 45.1$); 4.00 t, 2H ($J = 4.8$, COOCH₂CH₂N); 4.47 m, 1H ($J = 16.2, H - 3\alpha$); 4.57 dt, 1H ($J = 14.7, J' = 4.8$); 4.66 dt, 1H ($J = 14.7, J' = 4.8$). ¹³C NMR (75.42 MHz; CDCl₃): 15.75, 16.25, 16.62, 17.88, 19.60, 20.19, 21.04, 21.23, 21.29, 23.37, 24.92, 27.55, 27.67, 28.68, 33.30, 34.59, 36.95, 37.56, 38.35, 41.19, 45.22, 45.44, 47.44, 50.93, 52.74, 55.23, 59.09, 62.44, 65.50, 80.86, 146.06, 171.39, 171.89, 172.76, 207.47. MS – ESI (m/z , pro C₃₉H₆₂INO₅): 625 (100, M⁺-I), 585 (2). Elementární analýza: vypočteno C 62.30%, H 8.31%, I 16.88%, N 1.86%; nalezeno C 62.17%, H 8.37%, I nebyl stanoven, N 1.81%.

2'-piperidinoethyl-3β-acetoxy-21-oxolup-18-en-28-oát hydrochlorid (6d)

Piperidinoethyl-ester **5c** (413 mg, 0.66 mmol) reagoval s chlorovodíkem v diethyletheru podle obecného postupu přípravy hydrochloridů a získaný surový produkt byl krystalizován z methanolu. Byl získán hydrochlorid **6d** (330 mg, 76%) o t.t. 223 °C (methanol), $[\alpha]_D -13$ (c 0.23). IR spektrum: 1693 (C=C), 1716 (C=O), 1738 (C=O), 2207 (N-H). ¹H NMR (299.91 MHz; CDCl₃): 0.85 s, 0.86 s, 0.92 s, 0.94 s, 1.04 s, 1.18 d ($J = 6.9$); 1.20 d ($J = 6.9$); 7 × 3H (7 × CH₃); 2.05 s, 3H (OAc); 2.17 d, 1H ($J = 18.3$); 2.25 m, 2H ($\Sigma J = 43.2$); 2.44 d, 1H ($J = 18.6$); 2.47 m, 2H ($\Sigma J = 26.3$); 2.62 m, 2H ($\Sigma J = 64.9$); 3.17 m, 2H ($\Sigma J = 90.1$); 3.22 sept., 1H ($J = 7.2$); 4.48 m, 1H ($\Sigma J = 16.2, H - 3\alpha$); 4.75 m, 2H ($\Sigma J = 62.7, \text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 12.56 bs, 1H. ¹³C NMR (75.42 MHz; CDCl₃): 15.92, 16.46, 16.76, 16.82, 18.05, 19.82, 20.35, 21.05, 21.26, 21.67, 22.57, 23.56, 25.09, 27.75, 27.87, 28.84, 33.31, 34.75, 37.09, 37.74, 38.53, 41.32, 45.26, 45.53, 47.72, 50.99, 52.77, 53.70, 54.28, 55.41, 56.18, 59.40, 80.67, 146.16, 170.99, 171.13, 173.05, 206.63. MS – ESI (m/z , pro C₃₉H₆₂ClNO₅): 646 (26), 624 (100, M⁺ - Cl), 381 (1), 353 (1). Elementární analýza: vypočteno C 70.93%, H 9.46%, Cl 5.37%, N 2.12%; nalezeno C 70.99%, H 9.35%, Cl nebyl stanoven, N 2.21%.

2'-N-methylpiperidiniummethyl-3β-acetoxy-21-oxolup-18-en-28-oát jodid (6e)

Piperidinoethyl-ester **5c** (300 mg, 0.48 mmol) reagoval s MeI v DMF podle obecného postupu methylace terciárních aminů a byl krystalizován z EtOH. Byl získán jodid **6e** (228 mg, 62%) o t.t. 226 °C (ethanol, rozklad), $[\alpha]_D -13$ (c 0.26). IR spektrum:

1690 (C=C), 1712 (C=O), 1739 (C=O). ^1H NMR (299.91 MHz; CDCl_3): 0.85 s, 0.85 s, 0.93 s, 0.94 s, 1.06 s, 1.17 d ($J = 6.9$), 1.19 d ($J = 6.9$), $7 \times 3\text{H}$ ($7 \times \text{CH}_3$); 2.05 s, 3H (OAc); 2.17 d, 1H ($J = 18.9$); 2.47 d, 1H ($J = 12.6$); 2.58 dd, 1H ($J = 11.2$, $J = 3.4$); 2.60 d, 1H ($J = 18.9$); 3.23 sept. ($J = 6.9$); 3.35 s, 3H; 3.68 m, 4H ($\Sigma J = 38.4$); 4.14 m, 2H ($\Sigma J = 51.2$); 4.48 m, 1H ($\Sigma J = 16.2$, H – 3α); 4.60 m, 1H ($\Sigma J = 25.2$); 4.74 m, 1H ($\Sigma J = 18.3$). ^{13}C NMR (75.42 MHz; CDCl_3): 15.89, 16.45, 16.84, 16.93, 18.04, 18.35, 19.81, 20.11, 20.51, 21.14, 21.25, 23.54, 25.07, 27.73, 27.85, 28.82, 33.44, 34.74, 37.09, 37.72, 38.51, 41.34, 45.27, 45.46, 47.79, 48.78, 50.98, 52.78, 55.38, 58.41, 62.27, 62.46, 63.63, 80.70, 146.133, 171.03, 171.31, 172.90, 206.92. MS – ESI (m/z , pro $\text{C}_{40}\text{H}_{64}\text{INO}_5$): 639 (100, $\text{M}^+ - \text{Cl}$). Elementární analýza: vypočteno C 62.73%, H 8.42%, I 16.57%, N 1.83%; nalezeno C 62.75%, H 8.38%, I nebyl stanoven, N 1.88%.

2'-morfolinoethyl-3 β -acetoxy-21-oxolup-18-en-28-oát hydrochlorid (6f)

Morfolinoethyl-ester **5d** (350 mg, 0.56 mmol) reagoval s chlorovodíkem v diethyletheru podle obecného postupu přípravy hydrochloridů a získaný surový produkt byl krystalizován z methanolu. Byl získán hydrochlorid **6f** (231 mg, 63%) o t.t 183 °C (methanol), $[\alpha]_{\text{D}} -28$ (c 0.23). IR spektrum: 1672 (C=C), 1756 (C=O), 2433 (N-H). ^1H NMR (299.91 MHz; CDCl_3): 0.82 s, 0.83 s, 0.90 s, 0.92 s, 1.02 s, 1.15 d ($J = 8.1$), 1.18 d, ($J = 7.2$); $7 \times 3\text{H}$ ($7 \times \text{CH}_3$); 2.03 s, 3H (OAc); 2.48 m, 6H ($\Sigma J = 29.1$); 2.89 m, 2H ($\Sigma J = 102.1$); 3.20 sept., 1H ($J = 6.6$); 3.35 m, 4H ($\Sigma J = 91.2$); 4.06 m, 4H ($\Sigma J = 132.4$); 4.47 m, 1H ($\Sigma J = 16.2$); 4.82 m, 2H ($\Sigma J = 84.6$), 12.95 bs, 1H. ^{13}C NMR (75.42 MHz; CDCl_3): 15.92, 16.45, 16.74, 18.03, 19.79, 20.40, 21.03, 21.25, 23.54, 25.08, 27.85, 28.80, 33.27, 34.73, 37.08, 37.72, 38.51, 41.31, 45.24, 45.54, 47.72, 50.97, 52.76, 55.38, 56.45, 59.37, 63.51, 63.70, 80.69, 146.21, 171.05, 172.93, 206.88. MS – ESI (m/z , pro $\text{C}_{38}\text{H}_{60}\text{ClNO}_6$): 627 (100, $\text{M}^+ - \text{Cl}$). Elementární analýza: vypočteno C 68.91%, H 9.13%, Cl 5.35%, N 2.11%; C 68.87%, H 9.06%, Cl nebyl stanoven, N 2.25%.

2'-N-methylmorfoliniumethyl-3 β -acetoxy-21-oxolup-18-en-28-oát jodid (6g)

Morfolinoethyl-ester **5d** (328 mg, 0.52 mmol) reagoval s MeI v DMF podle obecného postupu methylace terciárních aminů a byl krystalizován z MeOH. Byl získán jodid **6g** (203 mg, 51%) o t.t. 202 °C (methanol, rozklad), $[\alpha]_{\text{D}} -10$ (c 0.20). IR

spektrum: 1604 (C=C), 1735 (C=O). ^1H NMR (299.91 MHz; CDCl_3): 0.85 s, 0.85 s, 0.93 s, 0.95 s, 1.07 s, 1.18 d ($J = 6.9$), 1.19 d ($J = 6.9$), $7 \times 3\text{H}$ ($7 \times \text{CH}_3$); 2.06 s, 3H (OAc); 2.18 d, 1H ($J = 18.6$); 2.48 d, 1H ($J = 12.9$); 2.63 m, 2H ($J = 18.3$); 3.25 sept., 1H ($J = 6.8$, H – 20); 3.30 s, 3H; 3.61 m, 4H ($\Sigma J = 25.5$); 4.04 m, 4H ($\Sigma J = 19.2$); 4.14 m, 2H ($\Sigma J = 39.9$); 4.47 dd, 1H ($J = 8.1$, $J = 8.1$, H – 3 α); 4.63 m, 1H ($\Sigma J = 18.3$); 4.75 m, 1H ($\Sigma J = 18.9$). ^{13}C NMR (75.42 MHz; CDCl_3): 15.77, 16.28, 16.66, 17.90, 19.60, 20.28, 20.96, 21.06, 23.39, 24.93, 27.57, 27.69, 28.67, 33.26, 34.60, 36.95, 37.59, 38.37, 41.21, 45.21, 45.40, 47.55, 47.96, 50.84, 52.71, 55.24, 58.00, 60.32, 60.67, 63.86, 80.85, 146.09, 171.36, 171.94, 172.66, 207.69. MS – ESI (m/z, pro $\text{C}_{39}\text{H}_{62}\text{INO}_6$): 640 (100, $\text{M}^+ - \text{I}$). Elementární analýza: vypočteno C 61.01%, H 8.14%, I 16.53%, N 1.82%; nalezeno C 60.87%, H 8.09%, I nebyl stanoven, N 1.94%.

***N,N,N*-triethyl-2'-ethanaminium-3 β -acetoxy-21-oxolup-18-en-28-oát bromid (7a)**

Bromethyl-ester **3i** (700 mg, 1.21 mmol) reagoval s TEA podle obecného postupu přípravy kvarterních solí halogenidů. Po zpracování reakční směsi postupem B byl získán bromid **7a** (279 mg, 34%) jako jemný bílý prášek o t.t. 236 °C ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, rozklad), $[\alpha]_D -29$ (c 0.26). IR spektrum: 1616 (C=C), 1731 (C=O), 3341 (O-H). ^1H NMR (399.95 MHz; CD_3OD): 0.77 s, 0.93 s, 0.97 s, 1.01 s, 1.10 s, 1.19 d, ($J = 2.0$), 1.21 d, ($J = 2.0$), $7 \times 3\text{H}$ ($7 \times \text{CH}_3$); 1.31 t, 9H, ($J = 7.2$, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$); 1.78 d, ($J = 13.1$); 1.98 m, 2H ($\Sigma J = 15.9$); 2.20 d, 1H ($J = 19.1$); 2.47 d, 1H ($J = 13.4$); 2.72 t, 1H ($J = 8.1$); 3.16 m, 1H ($\Sigma J = 15.3$, H – 3 α); 3.28 sept. ($J = 7.0$, H – 20); 3.38 q, 6H ($J = 7.2$, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$); 3.64 t, 2H ($J = 5.0$, $\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 4.49 dt, 2H ($J = 13.8$, $J' = 4.5$); 4.60 dt, 2H ($J = 13.8$, $J' = 4.5$). ^{13}C NMR (100.6 MHz; CD_3OD): 7.91, 16.16, 16.43, 17.37, 19.34, 20.32, 20.70, 22.34, 26.42, 28.00, 28.56, 28.90, 30.07, 34.87, 36.12, 38.37, 39.95, 40.13, 42.61, 46.72, 46.87, 52.47, 54.46, 54.77, 54.77, 56.23, 56.73, 59.39, 79.48, 147.02. MS – ESI (m/z, pro $\text{C}_{38}\text{H}_{64}\text{BrNO}_4$): 598 (100, $\text{M}^+ - \text{Br}$). Elementární analýza: vypočteno C 67.23%, H 9.50%, Br 11.77%, N 2.06%; nalezeno C 67.17%, H 9.58%, Br 12.37%, N 1.96%.

30-brom-3 β ,28-diacetoxylup-20(29)-en (8a)

Betulin-diacetát (**3a**) (1g, 1.90 mmol) reagoval s NBS v CCl₄ podle literárního postupu¹⁴⁰ za vzniku bromderivátu **8a** (820 mg, 71%) o t.t. 188 °C (methanol), [α]_D +6 (c 0.22, chloroform). Literatura¹⁴⁰ uvádí t.t. 190 – 196 °C, literatura¹⁵⁸ uvádí [α]_D +7.4 (c 0.49, chloroform). ¹H NMR spektrum¹⁴⁰ je identické se spektrem autentického preparátu.

30-pyridinium-3 β ,28-diacetoxylup-20(29)-en bromid (8b)

Bromderivát **8a** (182 mg, 0.30 mmol) reagoval s pyridinem podle obecného postupu přípravy kvarterních solí halogenidů (zpracování postup A) za vzniku pyridiniumbromidu **8b** (112 mg, 59%) o t.t. 276 °C (DMF), [α]_D +3 (c 0.17). IR spektrum: 1631 (C=C), 1731 (C=O). ¹H NMR (399.95 MHz; CD₃OD): 0.87 s, 0.87 s, 0.91 s, 1.06 s, 1.09 s, 5 × 3H (5 × CH₃); 2.03 s, 3H (OAc); 2.05 s, 3H (OAc); 2.45 td, 1H (J = 11.3, J' = 5.4); 3.52 m, 1H (J = 26.8); 3.81 d, 1H (J = 11.1); 4.37 d, 1H (J = 11.1); 4.44 dd, 1H (J = 11.1, J' = 5.3, H – 3 α); 4.69 s, 1H; 5.27 s, 1H; 5.32 d, 2H (J = 4.6); 8.19 t, 2H (J = 6.7); 8.67 t, 1H (J = 7.8); 9.02 d, 2H (J = 6.6). ¹³C NMR (100.58 MHz; CD₃OD): 16.52, 16.68, 16.94, 19.24, 20.81, 21.14, 22.06, 24.64, 25.32, 26.68, 28.10, 28.44, 30.66, 32.49, 35.19, 35.28, 36.29, 38.25, 38.77, 38.83, 39.56, 42.13, 43.85, 47.71, 51.52, 56.76, 63.26, 64.28, 82.44, 113.93, 129.69, 146.72, 147.59, 151.01, 172.89, 173.19. MS – ESI (m/z, pro C₃₉H₅₈BrNO₄): 605 (100, M⁺ - Br). Elementární analýza: vypočteno C 68.40%, H 8.54%, Br 11.67%, N 2.05%; nalezeno C 68.52%, H 8.56%, Br 12.22%, N 2.18%

20-oxo-3 β ,28-diacetoxy-29-norlupan (9a)

Roztok betulin diacetátu (**3a**, 10 g, 19.01 mmol) v dichlormethanu (200 ml) byl při -78 °C probubláván po dobu 1 hodiny vzduchem obsahujícím 5% ozonu. Poté byl k modré reakční směsi přidán dimethylsulfid (50 ml) a směs byla ohřáta na laboratorní teplotu. Směs byla dále přefiltrována přes krátký sloupec oxidu hlinitého a odpařena na RVO. Získaný nažloutlý odparek byl krystalizován z MeOH. Byl získán norderivát **9a** (7.6 g, 76%) o t.t. 181 °C (methanol), [α]_D -7 (c 0.28, chloroform). Literatura¹⁴¹ uvádí t.t.

186 – 188 °C, $[\alpha]_D$ -13.1. ^1H NMR spektrum je identické se spektrem autentického preparátu.¹⁴¹

3 β ,28-diacetoxy-29-norlupan-20-oxim (9b)

Z norderivátu **9a** (2.5 g, 4.37 mmol) byl literárním postupem¹⁴² připraven oxim **9b** (2.1 g, 88%) o t.t. 202 °C (chloroform), $[\alpha]_D$ +11 (c 0.32, chloroform). Literatura¹⁴² uvádí t.t. 197 – 198 °C (diethylether / hexan), $[\alpha]_D$ +16 (chloroform). ^1H NMR spektrum je identické se spektrem autentického preparátu.¹⁴²

20-amino-3 β -acetoxy-28-hydroxy-29-norlupan (9c)

Do roztoku oximu **9b** (700 mg, 1.29 mmol) v methanolu (20 ml) byl za varu pod zpětným chladičem během 2 hodin přidán $\text{Na}[\text{BH}]_4$ a poté co byla spotřebována veškerá výchozí látka (dle TLC soustava C) byla reakční směs ochlazená na r.t., nalita do vody (500 ml) a opatrně neutralizována 10% HCl až na pH 7 – 8. Poté byla reakční směs dvakrát extrahována ethylacetátem (200 ml) a spojené organické podíly byly promyty vodou (150 ml) a odpařeny na RVO. Získaný světlý odparek byl chromatografován na silikagelu (mobilní fáze toluen / diethylether 10 / 1) a lyofilizován z *t*-BuOH čímž byl získán amin **9c** (528 mg, 84%) o t.t. 153 °C (*t*-BuOH), $[\alpha]_D$ -76 (c 0.19, chloroform). IR spektrum: 1715 (C=O), 3215 (N-H). ^1H NMR (399.95 MHz; CDCl_3): 0.83 s, 0.85 s, 0.85 s, 0.95 s, 1.01 s, 1.14 d, (J = 10.0) 6 \times 3H (6 \times CH₃); 2.04 s, 3H (OAc); 2.56 dd, 1H (J = 16.9, J' = 10.1, H – 20); 3.30 d, 1H (J = 10.8, H – 28a); 3.79 d, (J = 10.8, H – 28b); 4.47 m, 1H (H – 3 α , Σ J = 16.0). ^{13}C NMR (100.58 MHz; CDCl_3): 10.57, 14.56, 15.90, 16.10, 16.47, 18.15, 20.70, 21.31, 23.66, 25.24, 26.88, 27.35, 27.91, 29.04, 33.96, 34.09, 36.63, 37.04, 37.77, 38.36, 40.86, 42.59, 45.28, 47.54, 49.11, 50.13, 55.34, 58.20, 50.36, 80.89, 171.05. MS – EI (m/z, pro $\text{C}_{31}\text{H}_{53}\text{NO}_3$): 485 (M^+ - 2H, 2), 470 (1), 459 (1), 443 (29), 428 (13), 412 (100), 400 (7), 369 (7), 207 (29), 189 (27). Elementární analýza: vypočteno C 76.34%, H 10.95%, N 2.87%; nalezeno C 76.42%, H 11.11%, N 2.78%.

20-*N,N,N*-trimethylaminium-3 β -acetoxy-28-hydroxy-29-norlupan triflát (9d)

Celá reakce a zpracování bylo provedeno v dobře tahnoucí digestoři nebo na odparce s odtahem plynů do digestoře. Při zacházení s methyl triflátem je nutné používat příslušné ochranné prostředky. Reakce byla provedena v argonové atmosféře. V roztoku aminu **9c** (224 mg, 0.46 mmol) v dichlormethanu (10 ml) byl suspendován NaHCO₃ a do této směsi byl přidán methyl triflát (400 μ L, 1.68 mmol). Reakční směs byla míchána za r.t. po dobu 1 minuty a poté byla přímo přefiltrována přes krátký sloupec silikagelu (v dichlormethanu) a odpařena na RVO. Získaný na vzduchu tmavnoucí odparek byl ihned chromatografován na silikagelu (soustava B). Byla získána sůl **9d** (27 mg, 9%) o t.t. 156 °C (MeOH, rozklad), $[\alpha]_D$ -43 (c 0.16). IR spektrum: 1702 (C=O), 3435 (O-H). ¹H NMR (399.95 MHz; CD₃OD+CDCl₃): 0.76 s, 0.86 s, 0.95 s, 0.99 s, 1.07 s, 1.14 d (J = 10.0), 6 \times 3H (6 \times CH₃); 1.78 s, 3H (OAc); 2.57 m, 1H (Σ J = 27.2); 3.13 m, 1H (Σ J = 21.2); 3.45 m, 1H (Σ J = 14.0); 3.61 s, 9H, 3.91 m, 1H (Σ J = 14.0). ¹³C NMR (100.6 MHz; CD₃OD+CDCl₃): 10.81, 15.08, 16.10, 16.46, 16.64, 19.38, 21.80, 26.46, 27.93, 28.20, 28.59, 30.14, 34.96, 35.34, 38.00, 38.19, 39.87, 39.96, 42.01, 43.67, 46.42, 49.41, 50.25, 51.29, 56.71, 60.30, 64.12, 79.55, 163.74. ¹⁹F NMR (376.29 MHz; CD₃OD+CDCl₃): 79.95. MS – ESI (m/z, pro C₃₅H₆₀F₃NO₆S): 531 (100, M⁺ - OTf). Elementární analýza: nebyla stanovena.

Allobetulin (10b)

Betulin (**1a**) (10 g, 22.62 mmol) byl izomerizován na allobetulin (**10b**) reakcí s Montmorillonitem K10 podle literárního postupu.¹⁴⁴ Byl získán allobetulin (**10b**) (5.6 g, 56%) o t.t. 271 °C (butanon), $[\alpha]_D$ +41 (c 0.36, chloroform). Literatura¹⁴⁴ uvádí t.t. 264 – 266 °C (butanon), $[\alpha]_D$ +40. ¹H NMR spektrum je identické se spektrem autentického preparátu.¹⁴⁴

Allobetulon (10c)

Allobetulin (**10b**) (5.6 g, 12.52 mmol) byl oxidován PCC na alumině podle literárního postupu.¹²⁴ Byl získán allobetulon (**10c**) (2.35 g, 42%) o t.t. 226 °C (toluen / methanol), $[\alpha]_D$ +79 (c 0.31, chloroform). Literatura¹²⁴ uvádí t.t. 264 – 266 °C

(toluen / methanol), $[\alpha]_D +83$ (c 0.35). ^1H NMR spektrum je identické se spektrem autentického preparátu.¹²⁴

Epimerní směs: 2-brom-19 β ,28-epoxy-18 α -oleanan-3-on (**10d**)

Allobetulon (**10c**) (4.2 g, 9.54 mmol) reagoval s bromem v kyselině octové podle literatury¹²⁴ za vzniku epimerního bromallobetulonů (**10d**) (3.1 g, 63%) o t.t. 223 °C (chloroform / methanol), $[\alpha]_D +76$ (c 0.29, chloroform). Literatura¹²⁴ uvádí t.t. 226 – 228 °C (chloroform / methanol), $[\alpha]_D +68$ (c 0.55). ^1H NMR spektrum je identické se spektrem autentického preparátu.¹²⁴

19 β ,28-epoxy-18 α -oleanan-1-en-3-on (**10e**)

Epimerní bromid **10d** (133 mg, 0.26 mmol) reagoval s TMA či TEA podle obecného postupu přípravy kvarterních solí halogenidů a byl zpracován postupem D za vzniku již známého olefinu **10e** (82 mg, 72%) o t.t. 243 °C (methanol), $[\alpha]_D +92$ (c 0.29, chloroform). Literatura¹⁵⁹ uvádí t.t. 251.5 – 252.5 °C (chloroform / methanol), $[\alpha]_D +86$ (c 1.5, chloroform). ^1H NMR spektrum je identické se spektrem autentického preparátu.¹⁴⁶

2 β -pyridinium-19 β ,28-epoxy-18 α -oleanan-3-on bromid (**10d**)

Epimerní bromid **10d** (303 mg, 0.58 mmol) reagoval s pyridinem podle obecného postupu přípravy kvarterních solí halogenidů. Po dosažení konverze byla reakční směs nalita do vody (150 ml) a extrahována ethylacetátem (3 × 200 ml). Spojené organické podíly byly extrahovány vodou (250 ml), odpařeny na RVO a získaný nažloutlý odparek byl přefiltrován přes krátký sloupec silikagelu (Soustava B) a krystalizován z butanonu. Byl získán pyridiniový derivát **10f** (81 mg, 28%) o t.t. 299 °C (butanon, rozklad), $[\alpha]_D +60^\circ$ (c 0.15). IR spektrum: 1632 (C=C), 1723 (C=O). ^1H NMR (399.95 MHz; CD₃OD): 0.82 s, 0.91 s, 1.04 s, 1.06 s, 1.08 s, 1.20 s, 1.31 s, 7×3H (7×CH₃); 1.85 dd, 1H (J = 11.2, J' = 4.2); 2.10 m, 2H ($\Sigma J = 21.2$); 2.81 t, 1H (J = 12.2); 3.50 d, 1H (J = 7.8, H-28a); 3.55 s, 1H (H-19 α); 3.81 d, 1H (J = 7.8, H-28b); 6.45 dd, 1H (J = 11.6, J' = 8.7, H-2 α); 8.17 t, 2H (J = 7.0); 8.67 t, 1H (J = 7.2); 8.91 d, 2H (J =

5.8). ^{13}C NMR (100.58 MHz; CD_3OD): 14.95, 15.01, 16.64, 16.64, 19.25, 21.89, 23.34, 23.45, 27.83, 27.92, 28.55, 30.65, 30.75, 30.79, 32.55, 35.45, 37.90, 38.10, 39.20, 39.79, 39.87, 41.65, 43.43, 45.25, 56.53, 58.21, 59.42, 61.40, 63.39, 129.56, 146.38, 147.55, 176.29. MS – ESI (m/z, pro $\text{C}_{35}\text{H}_{52}\text{BrNO}_2$): 519 (100, M^+ - Br). Elementární analýza: vypočteno C 71.89%, H 9.31%, Br 13.67%, N 2.40%; nalezeno C 71.82%, H 9.34%, Br nebyl stanoven, N 2.48%.

Platanová kyselina (**IIa**)

Kyselina betulinová (**Ib**) (12.5 g, 27.23 mmol) reagovala s ozonem podle literární procedury.¹⁴⁸ Byla získána kyselina platanová (**IIa**) (9.76 g, 78%) o t.t. 287 °C (methanol), $[\alpha]_{\text{D}}$ -37 (c 0.29, CHCl_3). Literatura¹⁶⁰ uvádí t.t. 280 – 282 °C (ethanol), $[\alpha]_{\text{D}}$ -29.4 (c 0.14, CHCl_3). ^1H NMR spektrum¹⁶¹ je identické se spektrem autentického preparátu.

2'-bromethyl-3 β -hydroxy-20-oxo-29-norlup-28-oát (**IIb**)

Podle modifikovaného obecného postupu přípravy 2'-bromethyl-esterů byl z kyseliny platanové (**IIa**) (1.0 g, 2.15 mmol) získán bromethyl-ester **IIb** (468 mg, 38%). Modifikace spočívala v krystalizaci z hexanu. Bromethyl-ester **IIb** má t.t. 226 °C (hexan), $[\alpha]_{\text{D}}$ -63 (c 0.22, CHCl_3). IR spektrum: 1702 (C=O), 1723 (C=O), 3535 (O-H). ^1H NMR (399.95 MHz; CD_3OD): 0.75 s, 0.81 s, 0.90 s, 0.96 s, 1.00 s, 2.19 s, 5 \times 3H (5 \times CH_3); 2.31 m, 1H ($\Sigma J = 14.7$); 3.18 dd, 1H ($J = 11.1$, $J' = 5.1$, H – 3 α); 3.27 td, 1H ($J = 11.1$, $J' = 4.4$); 3.55 t, 2H ($J = 5.8$, $\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 4.41 td, 2H ($J = 5.6$, $J' = 1.1$, $\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{N}$). ^{13}C NMR (100.58 MHz; CD_3OD): 14.64, 15.29, 15.85, 16.03, 18.18, 20.81, 29.14, 27.18, 27.88, 28.24, 29.08, 29.62, 30.07, 31.31, 31.51, 34.13, 36.59, 37.10, 37.35, 38.61, 38.75, 40.57, 42.14, 49.32, 50.33, 51.12, 55.22, 56.49, 63.44, 78.70, 175.60, 212.54. MS – EI (m/z, pro $\text{C}_{31}\text{H}_{49}\text{BrO}_4$): 566 (10), 564 (10, M^+), 548 (22), 546 (22), 533 (4), 531 (4), 412 (4), 369 (5), 329 (8), 207 (50), 189 (100). Elementární analýza: vypočteno C 65.83%, H 8.73%, Br 14.13%; nalezeno C 65.81%, H 8.69%, Br nebyl stanoven.

***N,N,N*-trimethyl-2'-ethanaminium-3 β -hydroxylup-20(29)-en-28-oát bromid (11c)**

Bromethyl-betulinát **2a** (200 mg, 0.36 mmol) reagoval podle obecného postupu přípravy kvarterních solí halogenidů s TMA a reakční směs byla zpracována postupem A. Byly získány sněhobílé krystaly soli **11c** (162 mg, 73%) o t.t. = 279 °C (DMF, rozklad), $[\alpha]_D$ 0 (c 0.28). IR spektrum: 1641 (C=C), 1729 (C=O), 3353 (O-H). ¹H NMR (399.95 MHz; CD₃OD): 0.75 s, 0.86 s, 0.95 s, 0.95 s, 1.01 s, 1.69 s, 6 \times 3H (6 \times CH₃); 1.91 m, 2H (Σ J = 41.5); 2.22 dt, 1H (J = 3.1, J' = 13.0); 2.29 td, 1H (J = 3.3, J' = 11.8); 2.63 m, 1H (Σ J = 14.5); 3.13 m, 1H (Σ J = 16.2, H-3 α); 3.25 s, 9H (N(CH₃)₃); 3.76 t, 2H (J = 5.0, COOCH₂CH₂N); 4.56 m, 3H (Σ J = 39.5); 4.72 d, 1H (J = 2.0, H-20b). ¹³C NMR (100.58 MHz; CD₃OD): 15.13, 16.07, 16.64, 16.76, 19.30, 19.50, 21.93, 26.61, 27.88, 28.56, 30.75, 31.30, 32.74, 35.42, 37.47, 38.19, 39.30, 39.82, 39.95, 41.80, 43.42, 50.50, 51.79, 54.45, 56.66, 57.65, 58.41, 65.99, 78.74, 79.07, 79.39, 79.47, 110.50, 128.08, 137.31, 151.25, 176.12. MS – ESI (m/z, pro C₃₅H₆₀BrNO₃): 543 (100, M⁺ - Br), 484 (4). Elementární analýza: vypočteno C 67.50%, H 9.71%, Br 12.83%, N 2.25%; nalezeno C 67.64%, H 9.68%, Br nebyl stanoven, N 2.31%.

***N,N,N*-trimethyl-2'-ethanaminium-3 β -hydroxy-29-norlup-20-oxo-28-oát bromid (11d)**

Bromethyl platanát **11b** (316 mg, 0.56 mmol) reagoval podle obecného postupu přípravy kvarterních solí halogenidů s TMA a reakční směs byla zpracována postupem B. Byla získána sůl **11d** (151 mg, 43%) o t.t. 264 °C (methanol, rozklad), $[\alpha]_D$ -20 (c 0.16). IR spektrum: 1726 (C=O), 3345 (O-H). ¹H NMR (299.91 MHz; CD₃OD): 0.75 s, 0.86 s, 0.95 s, 0.95 s, 1.02 s, 2.19 s, 6 \times 3H (6 \times CH₃); 2.27 d, 1H (J = 12.9); 3.13 dd, 1H (J = 10.5, J' = 5.4, H – 3 α); 3.25 s, 9H (N(CH₃)₃); 3.77 t, 2H (J = 4.9, COOCH₂CH₂N); 4.57 m, 2H (Σ J = 48.3, COOCH₂CH₂N). ¹³C NMR (75.42 MHz; CD₃OD): 14.70, 15.08, 16.17, 16.64, 16.78, 19.42, 20.30, 22.12, 24.07, 28.04, 28.39, 28.64, 29.11, 29.87, 30.92, 32.28, 35.46, 37.37, 38.34, 38.55, 39.95, 40.06, 41.87, 43.35, 50.73, 51.89, 52.41, 54.51, 56.81, 57.64, 58.76, 64.23, 66.08, 79.51, 176.01, 214.63. MS – ESI (m/z, pro C₃₄H₅₈BrNO₄): 544 (100, M⁺ - Br), 413 (41). Elementární analýza: vypočteno C 65.37%, H 9.36%, Br 12.79%, N 2.24%; nalezeno C 65.21%, H 9.24%, Br nebyl stanoven, N 2.31%.

***N,N,N*-triethyl-2'-ethanaminium-3β-hydroxylup-20(29)-en-28-oát bromid (11e)**

Bromethyl-betulinát **2a** (1.00 g, 1.78 mmol) reagoval podle obecného postupu přípravy kvarterních solí halogenidů s TEA, reakční směs byla zpracována postupem B a odparek byl krystalizován z ethanolu. Byla získána sůl **11e** (462 mg, 39%) o t.t. = 250 °C (ethanol, rozklad), $[\alpha]_D$ 0 (c 0.16). IR spektrum: 1637 (C=C), 1732 (C=O), 3311 (O-H). ¹H NMR (399.95 MHz; CD₃OD): 0.75 s, 0.86 s, 0.95 s, 0.96 s, 1.02 s, 5 x 3H (5 x CH₃); 1.35 t, 9H (J = 7.2); 1.70 s, 3H; 2.21 d, 1H (J = 13.0); 2.30 td, 1H (J = 12.5, J' = 3.1); 3.00 td, 1H (J = 7.6, J' = 5.5); 3.13 m, 1H (H – 3α, ΣJ = 16.2); 3.43 q, 6H (J = 7.2); 3.63 m, 2H (ΣJ = 20.0); 4.49 m, 2H (ΣJ = 54.5); 4.61 s, 1H; 4.72 s, 1H. ¹³C NMR (100.58 MHz; CD₃OD): 7.89, 15.10, 16.12, 16.70, 16.75, 19.41, 19.47, 22.05, 26.75, 28.01, 28.60, 30.93, 31.42, 32.80, 35.54, 37.55, 38.30, 39.45, 39.93, 40.04, 41.93, 43.54, 50.66, 51.93, 54.74, 56.12, 56.80, 57.85, 57.96, 79.48, 110.51, 151.49, 176.38. MS – ESI (m/z, pro C₃₈H₆₆BrNO₃): 585 (100, M⁺ - Br). Elementární analýza: vypočteno C 68.65%, H 10.01%, Br 12.02%, N 2.11%; nalezeno C 68.79%, H 10.12%, Br 12.76%, N 2.16%.

***N,N,N*-triethyl-2'-ethanaminium-3β-hydroxy-29-norlup-20-oxo-28-oát bromid (11f)**

Bromethyl-platanát **11b** (250 mg, 0.44 mmol) reagoval podle obecného postupu přípravy kvarterních solí halogenidů s TEA, reakční směs byla zpracována postupem A a krystalizována z ethanolu. Byla získána sůl **11f** (132 mg, 45%) o t.t. 248 °C (methanol, rozklad), $[\alpha]_D$ -19 (c 0.18). IR spektrum: 1729 (C=O), 3359 (O-H). ¹H NMR (399.95 MHz; CD₃OD): 0.75 s, 0.86 s, 0.86 s, 0.95 s, 1.02 s, 5 x 3H (5 x CH₃); 1.36 t, 9H (J = 7.2, N(CH₂CH₃)₃); 2.19 s, 3H (H-30); 2.24 dt, 1H (J = 13.1, J' = 4.4); 3.13 dd, 1H (J = 10.8, J' = 5.2, H – 3α); 3.26 m, 1H (ΣJ = 22.3); 3.44 q, 6H (J = 7.2, N(CH₂CH₃)₃); 3.56 m, 2H (ΣJ = 13.6, COOCH₂CH₂N); 4.50 m, 2H (ΣJ = 55.5, COOCH₂CH₂N). ¹³C NMR (100.58 MHz; CD₃OD): 7.91, 15.05, 16.12, 16.63, 16.74, 19.40, 22.10, 28.01, 28.37, 28.60, 29.08, 29.80, 30.96, 32.23, 35.45, 37.36, 38.33, 38.55, 39.93, 40.04, 41.86, 43.34, 50.77, 51.87, 52.41, 54.77, 56.79, 57.70, 58.17, 79.52, 176.15, 214.67. MS – ESI (m/z, pro C₃₇H₆₄BrNO₄): 587 (100, M⁺ - Br). Elementární analýza: vypočteno C 66.41%, H 9.85%, Br 11.98%, N 1.94%; nalezeno C 66.64%, H 9.67%, Br nebyl stanoven, N 2.10%.

2'-pyridiniummethyl-3 β -hydroxylup-20(29)-en-28-oát bromid (11g)

Bromethyl-betulinát **2a** (285 mg, 0.51 mmol) reagoval podle obecného postupu přípravy kvarterních solí halogenidů s pyridinem a reakční směs byla zpracována postupem A. Byla získána sůl **11g** (257 mg, 76%) o t.t. 257 °C (DMF, rozklad), $[\alpha]_D$ 0 (c 0.18). IR spektrum: 1635 (C=C), 1725 (C=O), 1731 (C=O), 3398 (O-H). ^1H NMR (399.95 MHz; CD_3OD): 0.75 s, 0.75 s, 0.83 s, 0.94 s, 0.95 s, 5 x 3H (5 x CH_3); 2.07 m, 2H ($\Sigma J = 42.0$); 2.86 dt, 1H ($J = 10.9$, $J' = 4.9$); 3.11 m, 1H ($\Sigma J = 16.3$); 4.60 m, 2H ($\Sigma J = 18.9$); 4.68 bs, 1H; 5.04 t, 2H ($J = 5.1$); 8.23 t, 2H ($J = 7.2$); 8.70 tt, 1H ($J = 7.9$, $J' = 1.2$); 9.19 dd, 2H ($J = 6.6$, $J' = 1.1$). ^{13}C NMR (100.58 MHz; CD_3OD): 15.05, 16.12, 16.67, 16.70, 19.37, 19.43, 21.95, 26.62, 27.98, 28.59, 30.81, 31.37, 32.72, 35.50, 37.54, 38.25, 39.50, 39.91, 39.98, 41.79, 50.57, 51.80, 56.74, 57.90, 61.54, 63.56, 79.48, 110.50, 129.67, 146.56, 147.72, 151.28, 176.30. MS – EI (m/z, pro $\text{C}_{37}\text{H}_{56}\text{BrNO}_3$): 564 (3, $\text{M}^+ - \text{Br}$), 546 (1), 456 (22), 438 (9), 410 (11), 356 (9), 248 (34), 207 (55), 189 (100). Elementární analýza: vypočteno C 69.14%, H 8.78%, Br 12.43%, N 2.18%; nalezeno C 69.21%, H 8.62%, Br 11.57%, N 2.19%.

2'-pyridiniummethyl-3 β -hydroxy-29-norlup-20-oxo-28-oát bromid (11h)

Bromethyl-platanát **11b** (300 mg, 0.53 mmol) reagoval podle obecného postupu přípravy kvarterních solí halogenidů s pyridinem, reakční směs byla zpracována postupem B a krystalována z ethanolu. Byla získána sůl **11h** (177 mg, 52%) o t.t. 239 °C (ethanol, rozklad), $[\alpha]_D$ -14 (c 0.18). IR spektrum: 1713 (C=O), 3388 (O-H). ^1H NMR (299.91 MHz; CD_3OD): 0.73 s, 0.75 s, 0.83 s, 0.95 s, 0.96 s, 2.16 s, 6 x 3H (6 x CH_3); 3.09 m, 2H ($\Sigma J = 26.7$); 4.62 t, 2H ($J = 4.9$, $\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 5.05 t, 2H ($J = 5.0$, $\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 8.22 t, 2H ($J = 7.1$); 8.71 1H, ($J = 7.8$); 9.14 d, 2H ($J = 6.0$). ^{13}C NMR (75.42 MHz; CD_3OD): 15.00, 16.11, 16.61, 16.67, 19.36, 22.00, 27.99, 28.20, 28.59, 29.03, 29.74, 30.84, 32.16, 35.42, 37.36, 38.28, 38.62, 39.92, 41.73, 43.22, 50.67, 51.75, 52.47, 56.74, 57.76, 61.48, 63.81, 64.31, 79.52, 129.72, 146.58, 147.78, 176.10, 214.59. MS – ESI (m/z, pro $\text{C}_{36}\text{H}_{54}\text{BrNO}_4$): 565 (100, $\text{M}^+ - \text{Br}$). Elementární analýza: vypočteno C 67.07%, H 8.44%, Br 12.39%, N 2.17%; nalezeno C 67.16%, H 8.36%, Br nebyl stanoven, N 2.25%.

Bis(2-hydroxyethyl)amino-2'-ethyl-3 β -hydroxylup-20(29)-en-28-oát (11i)

Bromethyl-betulinát **2a** (291 mg, 0.52 mmol) reagoval podle obecného postupu přípravy kvarterních solí halogenidů s triethanolaminem a reakční směs byla zpracována postupem D. Byl získán amin **11i** (134 mg, 44%) o t.t. 146 °C (DMF, rozklad), $[\alpha]_D^{+6}$ (c 0.18). IR spektrum: 1640 (C=C), 1723 (C=O), 3068 (O-H), 3331 (O-H). ¹H NMR (399.95 MHz; CD₃OD): 0.74 s, 0.85 s, 0.94 s, 0.94 s, 0.99 s, 1.69 s, 6×3H (6×CH₃); 1.89 m, 2H ($\Sigma J = 34.6$); 2.25 m, 2H ($\Sigma J = 24.1$); 2.73 t, 4H (J = 5.8, NCH₂CH₂OH); 2.85 t, 2H (J = 6.1, COOCH₂CH₂N); 3.01 m, 1H ($\Sigma J = 22.0$); 3.12 m, 1H ($\Sigma J = 16.0$, H-3 α); 3.61 t, 4H (J = 5.7, NCH₂CH₂OH); 4.17 t, 2H (J = 6.1, COOCH₂CH₂N); 4.59 s, 1H; 4.71 s, 1H. ¹³C NMR (100.58 MHz; CD₃OD): 15.18, 16.07, 16.66, 16.72, 19.29, 19.60, 21.92, 26.63, 27.85, 28.55, 30.72, 31.48, 32.96, 35.38, 37.79, 38.16, 39.39, 39.82, 39.93, 41.77, 43.39, 50.45, 51.75, 54.31, 56.63, 57.66, 57.85, 58.03, 60.49, 60.69, 60.99, 63.02, 79.46, 110.33, 151.47, 177.40. MS – ESI (m/z, pro C₃₆H₆₁NO₅): 632 (33), 610 (100), 588 (33, M⁺), 528 (16). Elementární analýza: vypočteno C 73.55%, H 10.46%, N 2.38%; nalezeno C 73.72%, H 10.41%, N 2.51%.

Bis(2-hydroxyethyl)amino-3 β -hydroxy-29-norlup-20-oxo-28-oát bromid (11j)

Bromethyl-platanát **11b** (336 mg, 0.60 mmol) reagoval podle obecného postupu přípravy kvarterních solí halogenidů s triethanolaminem a reakční směs byla zpracována postupem D. Byl získán amin **11j** (146 mg, 41%) o t.t. 172 °C (DMF, rozklad), $[\alpha]_D^{+11}$ (c 0.22). IR spektrum: 1648 (C=C), 1735 (C=O), 3297 (O-H). ¹H NMR (299.91 MHz; CD₃OD): 0.75 s, 0.86 s, 0.94 s, 0.95 s, 1.01 s, 2.18 s, 6 × 3H (6 × CH₃); 2.73 t, 4H (J = 5.9, N(CH₂CH₂OH)₂); 2.86 t, 2H (J = 6.0, COOCH₂CH₂N); 3.13 dd, 1H (J = 10.8; J' = 5.4, H – 3 α); 3.61 t, 4H (J = 5.8, N(CH₂CH₂OH)₂); 4.18 t, 2H (J = 6.0, COOCH₂CH₂N). ¹³C NMR (75.42 MHz; CD₃OD): 15.08, 16.12, 16.64, 16.72, 19.41, 22.11, 25.21, 28.01, 28.39, 28.61, 29.30, 29.82, 30.87, 32.51, 35.46, 37.67, 38.33, 38.71, 39.94, 40.05, 41.88, 43.33, 50.71, 51.89, 52.69, 54.63, 56.82, 57.69, 58.06, 60.93, 79.58, 177.25, 215.11. MS – ESI (m/z, pro C₃₅H₅₉NO₆): 589 (100, M⁺). Elementární analýza: vypočteno C 71.27%, H 10.08%, N 2.37%; nalezeno C 71.32%, H 10.16%, N 2.29%.

Dihydrobetulinová kyselina (12a)

Kyselina betulinová (**1b**) (7 g, 15.35 mmol) reagovala v ocelovém autoklávu s vodíkem na Raneyově niklu v methoxyethanolu podle literatury¹²⁴ za vzniku dihydrobetulinové kyseliny (**12a**) (11.65 g, 76%) o t.t. 313 °C (methanol), $[\alpha]_D +22$ (c 0.23, chloroform). Literatura¹⁶² uvádí t.t. 312 – 314 °C, literatura¹²⁴ uvádí $[\alpha]_D +17$ (c 0.35). ¹H NMR spektrum¹⁶² je identické se spektrem autentického preparátu.

2'-bromethyl-3 β -hydroxy-lup-28-oát (12b)

Dihydrobetulinová kyselina (**1b**) (2.5 g, 5.45 mmol) reagovala s 1,2-dibromethanem podle obecného způsobu přípravy 2'-bromethyl-esterů. Byl získán bromethyl-ester **12b** (1.34 g, 44%) o t.t. 188 °C (methanol), $[\alpha]_D -17$ (c 0.17, chloroform). Literatura¹³⁴ uvádí t.t. 186 °C (methanol), $[\alpha]_D -14.3$ (c 0.42). ¹H NMR spektrum je identické se spektrem autentického preparátu.¹³⁴

N,N,N-trimethyl-2'-ethanaminium-3 β -hydroxylup-28-oát bromid (12c)

Bromethyl-ester **12b** (203 mg, 0.36 mmol) reagoval s TMA podle obecného postupu přípravy kvarterních solí halogenidů a reakční směs byla zpracována postupem A. Byla získána sůl **12c** (156 mg, 70%) o t.t. 265 °C (DMF, rozklad), $[\alpha]_D -16$ (c 0.16). IR spektrum: 1728 (C=O), 3329 (O-H). ¹H NMR (399.95 MHz; CD₃OD): 0.76 s, 0.79 d (J = 6.8), 0.88 s, 0.88 d (J = 6.8), 0.96 s, 0.96 s, 1.00 s, 7 \times 3H (7 \times CH₃); 2.24 m, 1H (Σ J = 15.7); 2.31 td, 1H (J = 11.8, J' = 3.1); 3.14 m, 1H (Σ J = 16.3, H-3 α); 3.25 s, 9H (N(CH₃)₃); 3.75 t, 2H (J = 5.0, COOCH₂CH₂N); 4.54 m, 2H (Σ J = 58.4, COOCH₂CH₂N). ¹³C NMR (100.58 MHz; CD₃OD): 14.99, 15.04, 16.15, 16.74, 19.44, 22.16, 23.37, 23.61, 28.04, 28.24, 28.63, 30.89, 31.00, 32.77, 35.64, 38.00, 38.31, 39.32, 39.94, 40.09, 41.96, 43.71, 45.42, 50.22, 51.72, 54.50, 56.79, 58.27, 58.50, 66.14, 79.58, 176.37. MS – ESI (m/z, pro C₃₅H₆₂BrNO₃): 545 (100, M⁺). Elementární analýza: vypočteno C 67.28%, H 10.00%, Br 12.79%, N 2.24%; nalezeno C 67.12%, H 9.92%, Br nebyl stanoven, N 2.11%.

***N,N,N*-trimethyl-2'-ethanaminium-3 β -hydroxylup-28-oát bromid (12d)**

Bromethyl-ester **12b** (305 mg, 0.54 mmol) reagoval s TEA podle obecného postupu přípravy kvarterních solí halogenidů a reakční směs byla zpracována postupem A. Byla získána sůl **12d** (159 mg, 44%) o t.t. 248 °C (DMF, rozklad), $[\alpha]_D$ -20 (c 0.23). IR spektrum: 1735 (C=O), 3295 (O-H). ¹H NMR (399.95 MHz; CD₃OD): 0.76 d, 3H (J = 6.4); 0.76 s, 0.88 s, 0.91 d, 3H (J = 6.4); 0.96 s, 0.96 s, 1.00 s, 7 × 3H (7 × CH₃); 1.35 t, 9H (J = 7.2); 2.21 m, 1H (Σ J = 15.9); 2.31 dt, 1H (J = 12.4, J' = 3.5); 3.14 m, 1H (Σ J = 16.2); 3.42 q, 6H (J = 7.3); 3.62 m, 2H (Σ J = 33.7); 4.47 m, 2H (Σ J = 55.7). ¹³C NMR (100.58 MHz; CD₃OD): 7.87, 14.95, 14.99, 16.13, 16.72, 19.43, 22.14, 23.35, 23.61, 28.02, 28.23, 28.60, 30.94, 31.01, 32.72, 35.64, 38.01, 38.30, 39.34, 39.94, 40.05, 41.96, 43.71, 45.42, 50.28, 51.70, 54.69, 56.77, 57.89, 58.35, 59.63, 79.57, 176.51. MS – ESI (m/z, C₃₈H₆₈BrNO₃): 587 (100, M⁺ - Br). Elementární analýza: vypočteno C 68.44%, H 10.28%, Br 11.98%, N 2.10%; nalezeno C 68.11%, H 10.22%, Br 12.48%, N 2.03%.

2'-pyridiniumethyl-3 β -hydroxylup-28-oát bromid (12e)

Bromethyl-ester **12b** (277 mg, 0.49 mmol) reagoval s pyridinem podle obecného postupu přípravy kvarterních solí halogenidů a reakční směs byla zpracována postupem A. Byla získána sůl **12e** (240 mg, 76%) o t.t. 272 °C (DMF, rozklad), $[\alpha]_D$ -16 (c 0.30). IR spektrum: 1634 (C=C), 1735 (C=O), 3289 (O-H). ¹H NMR (399.95 MHz; CD₃OD): 0.74 d, 3H (J = 6.5); 0.75 s, 6H; 0.83 s, 6H; 0.94 d, 3H (J = 6.5); 0.94 s, 3H; 1.77 sept., 1H (J = 6.5, H-20); 2.07 m, 2H (Σ J = 23.5); 3.12 m, 1H (Σ J = 16.0, H-3 α); 4.59 dt, 2H (J = 9.2, J' = 5.0); 5.02 d, 2H (J = 4.7); 8.19 t, 2H (J = 7.0); 8.68 t, 1H (J = 7.6); 9.10 s, 2H. ¹³C NMR (100.58 MHz; CD₃OD): 14.97, 15.03, 16.14, 16.68, 16.70, 19.33, 22.00, 23.37, 23.53, 27.94, 28.01, 28.61, 30.74, 30.86, 32.64, 35.55, 37.97, 38.19, 39.32, 39.86, 39.97, 41.75, 43.52, 45.38, 51.50, 56.65, 58.31, 61.48, 63.51, 79.49, 129.64, 146.46, 147.66, 176.41. MS – ESI (m/z, pro C₃₇H₅₈BrNO₃): 564 (100, M⁺ - Br). Elementární analýza: vypočteno C 68.92%, H 9.07%, Br 12.39%, N 2.17%; nalezeno C 68.97%, H 8.91%, Br nebyl stanoven, N 2.09%.

Bis(2-hydroxyethyl)amino-2'-ethyl-3 β -hydroxylup-28-oát (12f)

Bromethyl-ester **12b** (258 mg, 0.46 mmol) reagoval s triethanolaminem podle obecného postupu přípravy kvarterních solí halogenidů a reakční směs byla zpracována postupem B. Byl získán amin **12f** (201 mg, 74%) o t.t. 182 °C (chloroform / methanol, rozklad), $[\alpha]_D$ -17 (c 0.42). IR spektrum: 1724 (C=O), 3358 (O-H). ¹H NMR (399.95 MHz; CDCl₃): 0.74 d, 3H (J = 6.8); 0.76 s, 3H; 0.82 s, 3H; 0.85 d, 3H (J = 6.4); 0.91 s, 3H; 0.94 s, 3H; 0.97 s, 3H; 1.79 m, 4H (ΣJ = 16.2); 2.75 t, 4H (J = 5.3, NCH₂CH₂OH); 2.85 t, 2H (J = 5.8, COOCH₂CH₂N); 3.19 m, 1H (ΣJ = 16.2, H-3 α); 3.64 t, 4H (J = 5.3, NCH₂CH₂OH); 4.18 m, 2H (ΣJ = 51.6, COOCH₂CH₂N). ¹³C NMR (100.58 MHz; CDCl₃): 14.56, 14.64, 15.35, 15.99, 16.07, 18.24, 20.85, 22.72, 22.96, 26.86, 27.32, 27.94, 29.63, 29.69, 31.95, 34.33, 37.10, 37.25, 37.99, 38.65, 38.81, 40.65, 42.49, 44.08, 48.87, 50.23, 53.32, 55.23, 56.40, 56.95, 59.71, 61.46, 77.21, 78.93, 176.31. MS – ESI (m/z, pro C₃₆H₆₃NO₅): 612 (100), 588 (41, M⁺ - Br), 530 (34). Elementární analýza: vypočteno C 73.30%, H 10.76%, N 2.37%; nalezeno C 73.43%, H 10.92%, N 2.32%.

3 β -acetoxy-18 β -oleanolová kyselina (13a)

Do roztoku kyseliny oleanolové (**1c**) (7.6 g, 16.66 mmol) v pyridinu (130 ml) byl přidán nadbytek acetanhydridu (cca 50 ml) a reakční směs byla ponechána za r.t. přes noc. Poté, co veškerá výchozí kyselina zreagovala (TLC soustava C), byla reakční směs zpracována postupem D a surový produkt krystalizován z methanolu. Byl získán acetát **13a** (7.2 g, 88%) o t.t. 258 °C (methanol), $[\alpha]_D$ +59 (c 0.19, chloroform). Literatura¹⁶³ uvádí t.t. 248 – 250 °C, literatura¹⁶⁴ uvádí $[\alpha]_D$ +77.6. ¹H NMR spektrum je identické se spektrem autentického preparátu.¹⁶³

Methyl-3 β -acetoxy-18 β -olean-12-en-28-oát (13b)

Acetát **13a** (7.2 g, 14.45 mmol) reagoval podle modifikovaného postupu přípravy 2'-bromethyl-esterů. Modifikace spočívala v záměně 1,2-dibromethanu za methylbromid. Byl získán methyl-ester **13b** (6.9, 93%) o t.t. 216 °C (*i*-PrOH), $[\alpha]_D$ +48 (c 0.21, chloroform). Literatura¹⁶⁵ uvádí t.t. 226 °C, $[\alpha]_D$ +68.4. ¹H NMR spektrum je identické se spektrem autentického preparátu.¹⁶⁵

Methyl-3 β -acetoxy-18 β -olean-10,12-dien-28-oát (13c)

K roztoku methyl-esteru **13b** (467 mg, 0.91 mmol) v tetrachlormethanu (15 ml) byl přidán *N*-bromsukcinimid (285 mg, 1.60 mmol) a směs byla přivedena k varu pod zpětným chladičem po dobu dvou hodin v dobře táhnoucí digestoři. Reakční směs byla poté zředěna toluenem (100 ml), přefiltrována přes krátký sloupec silikagelu a krystalizována z methanolu. Byl získán dien **13c** (234 mg, 51%) o t.t. 221 °C (methanol), $[\alpha]_D^{20} +238$ (c 0.20, chloroform). Literatura¹⁶⁶ uvádí t.t. 120 – 121 °C. ¹H NMR spektrum je identické se spektrem autentického preparátu.¹⁶⁶

Methyl-3 β -acetoxy-11-oxo-18 β -olean-12-en-28-oát (13d)

Roztok tert-buthylchromátu byl připraven podle literární procedury (na 100ml *t*-BuOH bylo použito 35 g oxidu chromového).¹⁶⁷

Do roztoku methyl-esteru **13b** (1.75 g, 3.33 mmol) v tetrachlormethanu (15 ml) byl přidán roztok tert-buthylchromátu (30 ml) a směs byla míchána po dobu 2 dnů při 50 °C. Reakční směs byla poté zředěna dichlormethanem (250 ml), extrahována vodou (3 × 400 ml) a spojené organické podíly byly přefiltrovány přes krátký sloupec silikagelu (v dichlormethanu). Krystalizace z methanolu poskytla keton **13d** o t.t. 246 °C (methanol), $[\alpha]_D^{20} +62$ (c 0.22, chloroform). Literatura¹⁶⁸ uvádí t.t. 250 - 252 °C (ethanol), $[\alpha]_D^{20} +53.58$. ¹H NMR spektrum je identické se spektrem autentického preparátu.¹⁶⁸

Methyl-3 β -acetoxy-12-oxo-18 β -olean-28-oát (13e)

Roztok methyl-esteru **13b** (3.6 g, 7.03 mmol) v chloroformu (50 ml) byl při -50 °C probublávan vzduchem obsahujícím cca 5% ozonu po dobu 20 minut. Poté byl k modré reakční směsi přidán dimethylsulfid (10 ml) a směs byla za laboratorní teploty míchána přes noc. Poté byla reakční směs přefiltrována přes krátký sloupec silikagelu, odpařena na RVO a krystalizována z methanolu. Byl získán keton **13e** (3.4 g, 92%) o t.t. 201 °C (methanol), $[\alpha]_D^{20} -2$ (c 0.17, chloroform). Literatura¹⁶⁸ uvádí t.t. 195 - 198 °C (methanol), $[\alpha]_D^{20} -6.54$. ¹H NMR spektrum je identické se spektrem autentického preparátu.¹⁶⁸

Methyl-3 β -acetoxy-18 β -olean-28-oát-12-oxim (13f)

Do roztoku ketonu **13e** (200 mg, 0.38 mmol) v pyridinu (5 ml) byl přidán hydroxylamin hydrochlorid (200 mg, 2.81 mmol) a směs byla přivedena k varu zpětným chladičem po dobu 4 hodin. Poté byla reakční směs zpracována postupem C. Byl získán oxim **13f** (151 mg, 73%) o t.t. 202 °C (*i*-PrOH), $[\alpha]_D$ 0 (c 0.22, chloroform). IR spektrum: 1728 (C=O), 3342 (O-H). ¹H NMR (299.91 MHz; CDCl₃): 0.83 s, 0.86 s, 0.86 s, 0.88 s, 0.90 s, 0.93 s, 0.93 s, 7 × 3H (7 × CH₃); 2.05 s, 3H (OAc); 2.55 d, 1H (J = 3.6); 2.87 d, 1H (J = 13.8); 3.07 dd, 1H (J = 17.6, J' = 5.2); 3.68 s, 3H (COOCH₃); 4.47 dd, 1H (J = 10.7, J' = 5.6, H – 3 α). ¹³C NMR (75.42 MHz; CDCl₃): 15.45, 16.02, 16.71, 18.36, 20.08, 20.80, 21.54, 22.92, 23.27, 23.71, 27.56, 28.15, 31.04, 31.98, 32.83, 33.47, 33.77, 34.88, 36.18, 37.22, 37.99, 40.52, 41.31, 43.57, 47.63, 48.33, 52.05, 55.43, 80.88, 160.30, 170.98, 178.67. MS – EI (m/z, pro C₃₃H₅₃NO₅): 543 (M⁺, 15), 528 (49), 512 (100), 484 (3), 468 (28), 452 (35), 277 (36), 218 (16), 189 (5). Elementární analýza: vypočteno C 72.89%, H 9.82%, N 2.58%; nalezeno C 72.82%, H 9.74%, N 2.72%.

2'-bromethyl-3 β -hydroxy-18 β -olean-12-en-28-oát (14a)

Podle obecného postupu přípravy 2'-bromethyl-esterů byl z kyseliny oleanolové **1c** (5.0 g, 10.94 mmol) získán bromethyl-ester **14a** (3.2 g, 52%) o t.t. 195 °C (*i*-PrOH), $[\alpha]_D$ +14 (c 0.18, CHCl₃). IR spektrum: 1645 (C=C), 1725 (C=O), 3432 (O-H). ¹H NMR (399.95 MHz; CD₃OD): 0.74 s, 0.78 s, 0.91 s, 0.91 s, 0.93 s, 1.00 s, 1.14 s, 7 × 3H (7 × CH₃); 2.88 dd, 1H (J = 13.8, J' = 4.5); 3.21 m, 1H (Σ J = 16.0, H – 3 α); 3.49 m, 2H (Σ J = 12.1); 4.33 d sext., 2H (J = 23.8, J' = 6.0); 5.31 t, 1 H (H – 12, J = 3.6). ¹³C NMR (100.58 MHz; CD₃OD): 15.30, 15.55, 17.02, 18.31, 22.92, 23.40, 23.57, 25.83, 27.17, 27.67, 28.01, 29.04, 30.67, 32.42, 32.72, 33.06, 33.82, 37.01, 38.44, 38.73, 39.36, 41.26, 41.68, 45.79, 46.85, 47.58, 55.19, 63.60, 78.99, 122.62, 143.46, 177.30. MS – EI (m/z, pro C₃₂H₅₁BrNO₃): 564 (3), 562 (M⁺, 3), 356 (24), 354 (24), 203 (100), 189 (20). Elementární analýza: vypočteno C 68.19%, H 9.12%, Br 14.18%; nalezeno C 68.07%, H 9.24%, Br nebyl stanoven.

***N,N,N*-trimethyl-2'-ethanaminium-3 β -hydroxy-18 β -olean-12-en-28-oát bromid (14b)**

Bromethyl-oleanát **14a** (225 mg, 0.40 mmol) reagoval podle obecného postupu přípravy kvarterních solí halogenidů s TMA a reakční směs byla zpracována postupem A. Byla získána sůl **14b** (192 mg, 77%) o t.t. 277 °C (DMF, rozklad), $[\alpha]_D^{20}$ +46 (c 0.21). IR spektrum: 1631 (C=C), 1725 (C=O), 3433 (O-H). ^1H NMR (399.95 MHz; CD_3OD): 0.78 s, 0.78 s, 0.92 s, 0.95 s, 0.95 s, 0.98 s, 1.18 s, $7 \times 3\text{H}$ ($7 \times \text{CH}_3$); 1.92 dd, 2H ($J = 8.8$, $J' = 3.5$); 2.10 td, 1H ($J = 4.0$); 2.86 dd, 1H ($J = 13.0$, $J' = 5.1$); 3.15 dd, 1H ($J = 11.1$, $J' = 4.9$, H – 3 α); 3.24 s, 9H ($\text{N}(\text{CH}_3)_3$); 3.73 m, 2H ($\Sigma J = 50.1$, $\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 4.51 m, 2H ($\Sigma J = 45.3$, $\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 5.28 t, 1H ($J = 3.4$, H – 12). ^{13}C NMR (100.58 MHz; CD_3OD): 15.89, 16.32, 17.90, 19.46, 23.94, 24.10, 24.49, 26.40, 27.83, 28.73, 31.55, 33.41, 33.89, 34.69, 38.15, 39.82, 40.61, 42.74, 42.88, 46.99, 48.03, 54.52, 56.67, 59.00, 59.60, 79.61, 124.19, 144.79, 178.13. MS – ESI (m/z, pro $\text{C}_{35}\text{H}_{60}\text{BrNO}_3$): 543 (100, $\text{M}^+ - \text{Br}$). Elementární analýza: vypočteno C 67.50%, H 9.71%, Br 12.83%, N 2.25%; nalezeno C 67.52%, H 9.68%, Br nebyl stanoven, N 2.39%.

***N,N,N*-triethyl-2'-ethanaminium-3 β -hydroxy-18 β -olean-12-en-28-oát bromid (14c)**

Bromethyl-oleanát **14a** (295 mg, 0.52 mmol) reagoval podle obecného postupu přípravy kvarterních solí halogenidů s TEA a reakční směs byla zpracována postupem A. Byla získána sůl **14c** (116 mg, 34%) o t.t. 230 °C (DMF, rozklad), $[\alpha]_D^{20}$ +43 (c 0.19). IR spektrum: 1661 (C=C), 1719 (C=O), 3301 (O-H). ^1H NMR (399.95 MHz; CD_3OD): 0.78 s, 0.78 s, 0.93 s, 0.95 s, 0.95 s, 0.98 s, 1.18 s, $7 \times 3\text{H}$ ($7 \times \text{CH}_3$); 1.35 t, 9H ($J = 7.2$, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$); 2.84 m, 1H ($\Sigma J = 16.2$); 3.15 dd, 1H ($J = 11.2$, $J' = 4.7$, H – 3 α); 3.22 q, 1H ($J = 7.3$); 3.42 q, 6H ($J = 7.2$); 3.61 m, 3H ($\Sigma J = 37.1$); 4.42 t, 2H ($J = 5.2$, $\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 5.28 bs, 1H (H – 12). ^{13}C NMR (100.58 MHz; CD_3OD): 7.90, 15.88, 16.32, 17.95, 19.47, 23.98, 24.11, 24.49, 26.46, 27.83, 28.73, 31.56, 33.40, 33.49, 33.86, 34.64, 38.16, 39.76, 39.82, 42.70, 42.89, 47.01, 54.77, 56.00, 56.67, 58.56, 59.62, 79.60, 124.17, 144.87, 178.28. MS – ESI (m/z, pro $\text{C}_{38}\text{H}_{66}\text{BrNO}_3$): 585 (100, $\text{M}^+ - \text{Br}$), 556 (3). Elementární analýza: vypočteno C 68.65%, H 10.01%, Br 12.02%, N 2.11%; nalezeno C 68.71%, H 9.89%, Br nebyl stanoven, N 1.98%.

2'-pyridiniumethyl-3 β -hydroxy-18 β -olean-12-en-28-oát bromid (14d)

Bromethyl-oleanát **14a** (272 mg, 0.48 mmol) reagoval podle obecného postupu přípravy kvarterních solí halogenidů s pyridinem a reakční směs byla zpracována postupem A. Byla získána sůl **14d** (270 mg, 88%) o t.t. 260 °C (DMF, rozklad), $[\alpha]_D = +39$ (c 0.18). IR spektrum: 1633 (C=C), 1716 (C=O), 3361 (O-H). ^1H NMR (399.95 MHz; CD_3OD): 0.46 s, 0.75 s, 0.88 s, 0.88 s, 0.89 s, 0.94 s, 1.08 s, $7 \times 3\text{H}$ ($7 \times \text{CH}_3$); 1.99 m, 1H ($\Sigma J = 35.6$); 2.70 dd, 1H ($J = 13.7$, $J' = 3.8$); 3.11 dd, 1H ($J = 11.1$, $J' = 4.8$, H – 3 α); 4.51 m, 2H ($\Sigma J = 14.5$); 5.00 m, 2H ($\Sigma J = 12.8$); 5.09 t, 1H ($J = 3.4$, H – 20); 8.21 t, 2H ($J = 7.2$); 8.70 t, 1H ($J = 7.8$); 9.10 d, 2H ($J = 5.8$). ^{13}C NMR (100.58 MHz; CD_3OD): 15.88, 16.31, 17.65, 19.37, 23.88, 24.01, 24.34, 26.39, 27.80, 28.72, 31.51, 33.40, 33.60, 33.75, 34.60, 38.10, 39.69, 39.79, 40.40, 42.57, 42.68, 46.86, 56.61, 61.46, 64.12, 79.47, 79.57, 123.91, 129.70, 144.72, 146.59, 147.72, 178.21. MS – ESI (m/z, pro $\text{C}_{37}\text{H}_{56}\text{BrNO}_3$): 562 (100, $\text{M}^+ - \text{Br}$), 483 (2), 432 (3). Elementární analýza: vypočteno C 69.14%, H 8.78%, Br 12.43%, N 2.18%; nalezeno C 69.02%, H 8.89%, Br nebyl stanoven, N 2.31%.

Bis(2-hydroxyethyl)amino-2'-ethyl-3 β -hydroxy-18 β -olean-12-en-28-oát bromid (14e)

Bromethyl-oleanát **14a** (193 mg, 0.34 mmol) reagoval podle obecného postupu přípravy kvarterních solí halogenidů s triethanolaminem a reakční směs byla zpracována postupem B. Byl získán amin **14e** (109 mg, 57%) o t.t. 230 °C (chloroform / methanol, rozklad), $[\alpha]_D = +22$ (c 0.15). IR spektrum: 1618 (C=C), 1732 (C=O), 3363 (O-H). ^1H NMR (399.95 MHz; CD_3OD): 0.77 s, 0.78 s, 0.91 s, 0.94 s, 0.95 s, 0.98 s, 1.16 s, $7 \times 3\text{H}$ ($7 \times \text{CH}_3$); 1.91 dd, 1H ($J = 7.6$, $J' = 3.5$); 2.04 dd, 1H ($J = 15.3$, $J' = 11.3$); 2.73 t, 4H ($J = 5.8$, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_2$); 2.85 t, 2H ($J = 6.1$, $\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 2.88 dd, 1H ($J = 15.3$, $J' = 5.0$); 3.15 dd, 1H ($J = 11.2$, $J' = 4.8$, H – 3 α); 3.60 t, 4H ($J = 6.0$, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_2$); 4.12 m, 2H ($\Sigma J = 51.4$); 5.27 t, 1H ($J = 3.5$, H – 20). ^{13}C NMR (100.58 MHz; CD_3OD): 15.90, 16.32, 17.85, 19.48, 24.00, 24.05, 24.51, 26.43, 27.85, 28.74, 31.59, 33.52, 33.65, 34.81, 38.16, 39.83, 40.66, 42.73, 42.84, 45.92, 47.12, 48.03, 54.25, 56.73, 58.01, 60.88, 63.82, 79.46, 79.68, 123.90, 145.00, 179.45. MS – ESI (m/z, pro $\text{C}_{36}\text{H}_{61}\text{NO}_5$): 610 (100), 588

(46, M^+ - Br), 550 (3), 528 (41). Elementární analýza: vypočteno C 73.55%, H 10.46%, N 2.38%; nalezeno C 73.58%, H 10.32%, N 2.26%.

2'-bromethyl-3 β -hydroxyurs-12-en-28-oát (15a)

Podle obecného postupu přípravy 2'-bromethyl-esterů byl z kyseliny ursolové (**1d**) (2.5 g, 5.48 mmol) získán bromethyl-ester **15a** (1.27 g, 41%) o t.t. 201 °C (*i*-PrOH), $[\alpha]_D^{20} = +8$ (c 0.32, CHCl₃). IR spektrum: 1618 (C=C), 1727 (C=O), 3360 (O-H). ¹H NMR (399.95 MHz; CD₃OD): 0.77 s, 0.79 s, 0.87 d (J = 6.8), 0.92 d (J = 6.0), 0.96 s, 1.00 s, 1.09 s, 7 × 3H (7 × CH₃); 1.80 td, 1H (J = 13.7, J' = 4.6); 1.92 dd, 2H (J = 9.0, J' = 3.7); 2.02 td, 1H (J = 13.0, J' = 4.5); 2.25 d, 1H (J = 10.4); 3.22 dd, 1H (J = 10.8, J' = 4.9, H – 3 α); 3.49 t, 2H (J = 6.0, COOCH₂CH₂Br); 4.32 t, 2H (J = 6.0, COOCH₂CH₂Br); 5.28 t, 1H (J = 3.7). ¹³C NMR (100.58 MHz; CD₃OD): 15.46, 15.61, 16.97, 17.13, 18.30, 21.14, 23.30, 23.51, 24.13, 27.22, 28.00, 28.13, 29.01, 30.63, 33.03, 36.62, 36.96, 38.62, 38.73, 38.83, 39.04, 39.58, 42.04, 47.54, 48.24, 52.80, 55.20, 63.63, 79.00, 125.84, 137.87, 177.09. MS – ESI (m/z, pro C₃₂H₅₁BrNO₃): 564 (100), 562 (M^+ , 93). Elementární analýza: vypočteno C 69.19%, H 9.12%, Br 14.18%; nalezeno C 69.05%, H 8.98%, Br 15.32%.

N,N,N-trimethyl-2'-ethanaminium-3 β -hydroxyurs-12-en-28-oát bromid (15b)

Bromethyl-ursolát **15a** (200 mg, 0.36 mmol) reagoval podle obecného postupu přípravy kvarterních solí halogenidů s TMA a reakční směs byla zpracována postupem A. Byla získána sůl **15b** (211 mg, 94%) o t.t. 208 °C (DMF, rozklad), $[\alpha]_D^{20} +44$ (c 0.26). IR spektrum: 1642 (C=C), 1731 (C=O), 3363 (O-H). ¹H NMR (299.91 MHz; CD₃OD): 0.78 s, 0.80 s, 0.90 d (J = 8.8), 0.96 d (J = 7.2), 0.98 s, 0.98 s, 7 × 3H (7 × CH₃); 2.13 td (J = 5.1); 0.74 d, 1H (J = 11.4); 3.16 dd, 1H (J = 10.8, J' = 5.1, H – 3 α); 3.25 s, 3H (N(CH₃)₃); 3.75 m, 2H ($\Sigma J = 42.0$, COOCH₂CH₂N); 4.48 bs, 2H (COOCH₂CH₂N); 5.27 t, 1H (J = 3.6, H – 12). ¹³C NMR (75.42 MHz; CD₃OD): 16.03, 16.40, 17.59, 17.98, 19.44, 21.49, 24.15, 24.33, 25.33, 27.87, 28.79, 29.08, 31.56, 34.19, 37.69, 38.09, 39.82, 39.94, 40.25, 40.32, 40.83, 43.22, 54.34, 54.56, 56.65, 58.98, 66.06, 79.59, 127.35, 139.41, 177.90. MS – ESI (m/z, pro C₃₅H₆₀BrNO₃): 543 (100, M^+ - Br). Elementární analýza: vypočteno C 67.50%, H 9.71%, Br 12.83%, N 2.25%; nalezeno C 67.63%, H 9.78%, Br nebyl stanoven, N 2.12%.

***N,N,N*-triethyl-2'-ethanaminium-3 β -hydroxyurs-12-en-28-oát bromid (15c)**

Bromethyl-ursolát **15a** (300 mg, 0.53 mmol) reagoval podle obecného postupu přípravy kvarterních solí halogenidů s TEA a reakční směs byla zpracována postupem A. Byla získána sůl **15c** (270 mg, 77%) o t.t. 212 °C (DMF, rozklad), $[\alpha]_D +38$ (c 0.28). IR spektrum: 1634 (C=C), 1724 (C=O), 3322 (O-H). ¹H NMR (399.95 MHz; CD₃OD): 0.78 s, 0.78 s, 0.79 d (J = 8.0), 0.98 d (J = 6.8), 0.98 s, 0.98 s, 1.14 s, 7 × 3H (7 × CH₃); 1.35 t, 9H (J = 7.2, N(CH₂CH₃)₃); 1.82 td, 1H, (J = 4.5, J' = 13.6); 1.94 m, 2H (ΣJ = 25.9); 2.13 td, 1H (J = 13.6, J' = 4.4); 2.21 d, 1H (J = 11.1); 3.16 dd, 1H (J = 11.6, J' = 4.3, H - 3α); 3.42 q, 2H (J = 7.3, N(CH₂CH₃)₃); 3.62 m, 2H (ΣJ = 18.5, COOCH₂CH₂N); 4.41 m, 2H (ΣJ = 28.2, COOCH₂CH₂N); 5.27 t, 1H (J = 3.7, H - 12). ¹³C NMR (100.58 MHz; CD₃OD): 7.95, 9.38, 16.01, 16.39, 17.61, 18.03, 19.44, 21.46, 24.13, 24.35, 25.32, 27.86, 28.77, 29.07, 31.53, 34.16, 37.77, 38.08, 39.82, 39.92, 40.31, 40.36, 40.82, 42.87, 43.23, 47.87, 54.36, 54.80, 56.03, 56.65, 58.43, 59.61, 79.59, 127.33, 139.46, 177.99. MS – ESI (m/z, pro C₃₈H₆₆BrNO₃): 585 (100, M⁺ - Br). Elementární analýza: vypočteno C 68.65%, H 10.01%, Br 12.02%, N 2.11%; nalezeno C 68.66%, H 10.24%, Br nebyl stanoven, N 2.26%.

2'-pyridiniumethyl-3 β -hydroxyurs-12-en-28-oát bromid (15d)

Bromethyl-ursolát **15a** (272 mg, 0.48 mmol) reagoval podle obecného postupu přípravy kvarterních solí halogenidů s pyridinem a reakční směs byla zpracována postupem A. Byla získána sůl **15d** (270 mg, 88%) o t.t. 231 °C (DMF, rozklad), $[\alpha]_D +22$ (c 0.19). IR spektrum: 1628 (C=C), 1731 (C=O), 3405 (O-H). ¹H NMR (399.95 MHz; CD₃OD): 0.77 s, 0.85 d (J = 6.4), 0.90 s, 0.90 d (J = 8.0), 0.96 s, 0.96 s, 1.05 s, 7 × 3H (7 × CH₃); 2.72 dd, 1H (J = 13.7, J' = 4.0); 3.14 dd, 1H (J = 11.1, J' = 4.9); 4.52 m, 2H (ΣJ = 25.6, COOCH₂CH₂N); 5.02 m, 2H (ΣJ = 13.1, COOCH₂CH₂N); 5.10 t, 1H (J = 3.5, H - 12); 8.23 t, 2H (J = 6.7); 8.71 t, 1H (J = 7.8); 9.13 d, 2H (J = 6.6). ¹³C NMR (100.58 MHz; CD₃OD): 15.98, 16.38, 17.54, 17.68, 19.32, 21.46, 24.00, 24.08, 24.17, 25.07, 27.80, 28.73, 29.02, 31.48, 33.58, 34.01, 37.88, 38.00, 38.08, 39.78, 40.18, 40.38, 40.59, 43.01, 48.16, 49.52, 54.13, 56.56, 61.48, 64.17, 64.24, 79.48, 127.00, 129.70, 139.30, 146.66, 147.70, 177.99. MS – ESI (m/z, pro C₃₇H₅₆BrNO₃): 562 (100, M⁺ - Br).

Elementární analýza: vypočteno C 69.14%, H 8.78%, Br 12.43%, N 2.18%; nalezeno C 68.99%, H 8.76%, Br nebyl stanoven, N 2.14%.

Bis(2-hydroxyethyl)amino-2'-ethyl-3 β -hydroxyurs-12-en-28-oát bromid (15e)

Bromethyl-ester kyseliny ursolové **15a** (200 mg, 0.36 mmol) reagoval podle obecného postupu přípravy kvarterních solí halogenidů s triethanolaminem a reakční směs byla zpracována postupem B. Byl získán amin **15e** (142 mg, 67%) o t.t. 242 °C (chloroform / methanol, rozklad), $[\alpha]_D = +28$ (c 0.21). IR spektrum: 1627 (C=C), 1738 (C=O), 3312 (O-H). ^1H NMR (299.91 MHz; CD_3OD): 0.76 s, 0.81 s, 0.85 d (J = 6.2), 0.92 d (J = 6.2), 0.94 s, 1.02 s, 1.09 s, 7 \times 3H (7 \times CH_3); 2.12 m, 1H ($\Sigma J = 18.2$); 2.32 d, 1H (J = 11.2); 2.82 t, 4H (J = 6.9, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_2$); 2.89 t, 2H (J = 6.0, $\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 3.22 m, 1H ($\Sigma J = 16.4$, H – 3 α); 3.68 t, 4H (J = 5.9, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_2$); 4.22 t, 2H (J = 6.0, $\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 5.46 t, 1H (J = 2.2). ^{13}C NMR (75.42 MHz; CD_3OD): 14.45, 15.20, 16.95, 17.00, 19.16, 22.12, 23.11, 29.96, 24.13, 27.22, 28.23, 28.87, 29.12, 32.62, 33.86, 36.65, 36.99, 38.62, 38.72, 38.83, 39.05, 39.46, 40.07, 44.52, 47.02, 48.46, 54.64, 54.74, 58.77, 61.28, 81.01, 125.94, 137.65, 177.01. MS – ESI (m/z, pro $\text{C}_{36}\text{H}_{61}\text{NO}_5$): 559 (100, M^+). Elementární analýza: vypočteno C 73.55%, H 10.46%, N 2.38%; nalezeno C 73.21%, H 10.37%, N 2.31%.

ZÁVĚRY

Tato práce se zabývala přípravou kvarterních amoniových solí triterpenoidů lupanové, oleananové a ursanové řady pro *in vitro* testování biologických aktivit: anti-HIV, antimikrobiální, protizánětlivé a cytotoxické aktivity. Dosažené výsledky shrnují následující body:

1. Autor se podílel na pilotním projektu izolace betulinu (**1a**) z cca 400 kg březové kůry. Dále byl dokončen výzkum vedlejších produktů a optimalizace přípravy bromethyl-esterů triterpenických kyselin.
2. Byly v dostatečném množství syntetizovány prekurzory pro přípravu kvarterních amoniových esterů – bromethyl-estery **2a**, **3f**, **3i**, **11b**, **12b**, **14a**, **15a** a chlorethyl-ester **3g**.
3. Bylo připraveno celkem šest sérií čítajících tři kvarterní soli a jeden terciární amin a to od kyseliny betulinové (**1b**), oleanolové (**1c**), ursolové (**1c**), oxokyseliny **3e**, platanové kyseliny (**11a**) a dihydrobetulinové kyseliny (**12a**). Postupy přípravy jsou vhodné pro syntézy ve větším měřítku. Dále byly připraveny další kvarterní sole derivátů triterpenoidů.
4. Byla připravena série derivátů oxokyseliny **3e** – heterocyklické hydrochloridy **6a**, **6b**, **6d**, **6f** a heterocyklické kvarterní soli **6c**, **6e**, **6g**.
5. Všechny nově připravené sloučeniny byly testovány na *in vitro* cytotoxickou aktivitu proti linii T-lymfoblastické leukemie CEM pracovištěm MUDr. Mariána Hajdúch v LEM Dětské Kliniky FN Olomouc. Bylo nalezeno 9 účinných sloučenin s $IC_{50} < 10 \mu\text{mol/l}$ (**3i**, **8b**, **10f**, **11e**, **11g**, **12d**, **12e**, **12f**, **15c**). Jako perspektivní se jeví zejména deriváty kyseliny ursolové (**1c**). 8 vybraných sloučenin (**4e**, **10f**, **11e**, **11i**, **12d**, **12f**, **14c**, **14d**) bylo dále otestováno na *in vitro* cytotoxickou aktivitu v panelu 10 nádorových linií. Bylo zjištěno, že cytotoxická aktivita zůstává zachována proti všem liniím včetně rezistentních a se změnou fenotypu.

6. Z vybraných sloučenin, testovaných na antimikrobiální aktivitu pracovištěm Jana Hlaváče, CSc. na UP Olomouc projevily 4 látky **4a**, **14b**, **14c**, **14d** zajímavou aktivitu proti gram-pozitivním bakteriím včetně rezistentních kmenů.
7. Během této práce bylo připraveno a plně charakterizováno těchto 40 dosud nepopsaných sloučenin: **2b**, **3g**, **3i**, **3a**, **3b**, **3c**, **3d**, **3e**, **6a**, **6b**, **6c**, **6d**, **6e**, **6f**, **6g**, **7a**, **8b**, **9c**, **9d**, **10f**, **11b**, **11c**, **11d**, **11e**, **11f**, **11g**, **11h**, **11i**, **11j**, **12c**, **12d**, **12e**, **12f**, **14c**, **14d**, **14e**, **15a**, **15c**, **15d**, **15e**.
8. Získané výsledky byly ochráněny přihláškou českého patentu a mohou tak být dále licencovány průmyslovým partnerům.

VÝSTUPY

Seznam publikací a patentů:

- **Biedermann D.**, Šarek J., Klinot J., Hajdúch M., Džubák P.: Fluorination of Betulinines and Other Triterpenoids with DAST, *Synthesis* **2005**, 1157.
- Dzubak P., Hajduch M., Vydra D., Hustova A., Kvasnica M., **Biedermann D.**, Markova L., Urban M., Sarek J.: Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications, *Nat. Prod. Rep.* **2006**, 23, 394.
- Urban M., Klinot J., Tislerova I., **Biedermann D.**, Hajduch M., Cisarova I., Sarek J.: Reactions of activated lupane oxo-compounds with Diazomethane: an approach to new derivatives of cytotoxic triterpenes, *Synthesis* 2006, 3979.
- Sarek J., Hajduch M., Svoboda M., Novakova K., Spacilova P., Kubelka T., **Biedermann D.**: Method of preparation of a soluble formulation of water-insoluble pentacyclic and tetracyclic terpenoids, a soluble formulation of a pentacyclic or tetracyclic terpenoid and a pharmaceutical composition containing this soluble formulation. PCT/CZ2007/000088, 25.9.2007.
- Šarek J., **Biedermann D.**, Hajdúch M.: Deriváty triterpenoidů pro léčbu nádorových onemocnění a jejich příprava. PV-2008/528, 1.9.2008.

Prezentace na českých konferencích „Pokroky v organické, bioorganické a farmaceutické chemii“.

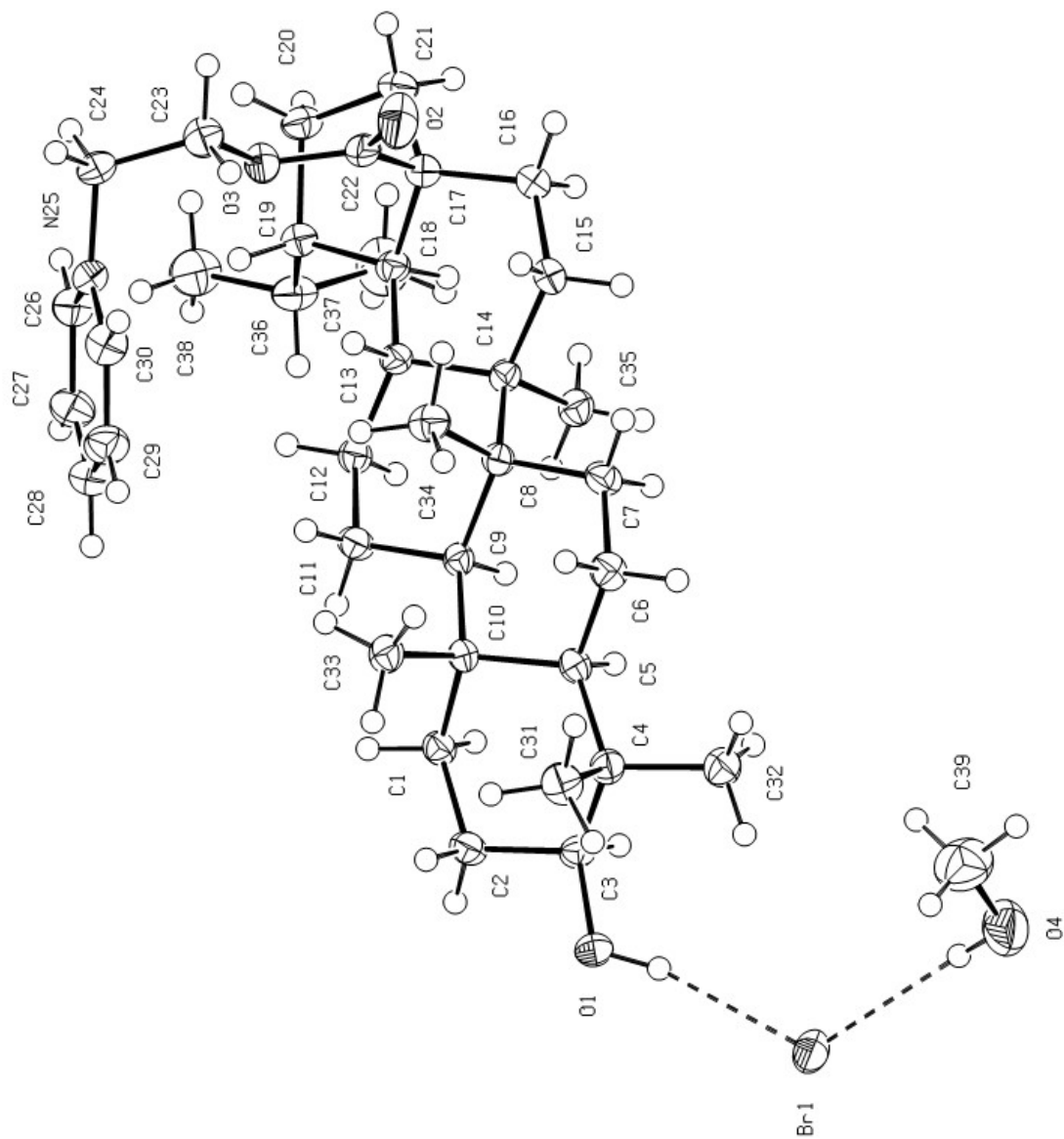
- *36. konference, Nymburk 2001:*
Biedermann D., Kvasnica M., Šarek J., Klinot J., Tišlerová I.: Derivatizace hydroxyskupiny lupanových triterpenoidů. Abstrakt v *Chem. Listy* **2001**, 95, 743.

- *37. konference, Nymburk 2002:*
Kvasnica M., **Biedermann D.**, Urban M., Šarek J. a Klinot J.: Příprava substituovaných allobetulinových a α -apoallobetulinových derivátů s cytotoxickou aktivitou. Abstrakt v Chem. Listy **2002**, 96, 930.
- *38. konference, Nymburk 2003:*
Šarek J., Urban M., Kvasnica M., **Biedermann D.**, Hajdúch M.: Betulininy s protinádorovou aktivitou se širokým spektrem účinnosti. Abstrakt v Chem. Listy **2003**, 97, 1124.
Biedermann D., Šarek J., Klinot J., Kvasnica M., Urban M.: Fluorace triterpenoidů DASTem. Abstrakt v Chem. Listy **2003**, 97, 1097.
- *40. konference, Nymburk 2005:*
Vranková K., **Biedermann D.**, Šarek J., Malkov I., Kočovský P.: Příprava chirálních redoxních činidel s pyridinovým motivem. Abstrakt v Chem. Listy **2005**, 99, 874.
- *41. konference, Nymburk 2006:*
Biedermann D., Šarek J., Hajdúch M., Svobodová X., Kvartérní amoniové soli lupanových triterpenoidů. Abstrakt v Chem. Listy 2006. Abstrakt v Chem. Listy **2006**, 100, 958.

PODPORA

Tato práce byla podpořena granty Grantové agentury České Republiky (203/03/D152 a 203/05/P025) a grantem Ministerstva Půmyslu a Obchodu (FT-TA/027).

PŘÍLOHA

Rentgenová ORTEP struktura látky 12e

POUŽITÁ LITERATURA

1. Kollner T. G., Schnee C., Gershenzon J., Degenhardt J.: *The Plant cell*, **2004**, 16(5), 1115.
2. Gershenzon J., Dudareva N.: *Nat. Chem. Biol.*, **2007**, 3, 408.
3. Christianson D. W.: *Science*, **2007**, 316, 60.
4. Maimone J. T., Baran S. P.: *Nat. Chem. Biol.*, **2007**, 3, 396.
5. Strømgaard K., Nakanishi K.: *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**, 43, 1640.
6. Bredt J.: *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **1893**, 26, 3047.
7. Bredt J.: *Justus Liebigs Ann. der Chem.*, **1895**, 289, 15.
8. Wagner G.: *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **1894**, 27, 1636.
9. Tiemann F., Semmler F. W.: *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **1895**, 28, 2126.
10. Ruzicka L.: *Experimentia*, **1953**, 9, 357.
11. Ruzicka L., Stoll M.: *Helv. Chim. Acta*, **1922**, 5, 923.
12. Tavormina P. A., Gibbs M. H., Huff J. W.: *J. Am. Chem. Soc.*, **1956**, 78, 4498.
13. Stork G., Uyeo S., Wakamatsu T., Grieco P., Labovitz J.: *J. Am. Chem. Soc.*, **1971**, 93, 4946.
14. Stork G., Loewenthal H. J. E., Mukharji P. C.: *J. Am. Chem. Soc.*, **1956**, 78, 501.
15. Johnson W. S., Gravestock M. B., McCarry B. E.: *J. Am. Chem. Soc.*, **1971**, 93(17), 4332.
16. Stork G., Burgstahler A. W.: *J. Am. Chem. Soc.*, **1955**, 77, 5068.
17. Eschenmoser A., Ruzicka L., Jeger O., Arigoni D.: *Helv. Chim. Acta*, **1955**, 38, 1890.
18. Hanson R. J.: *Nat. Prod. Rep.*, **2001**, 18, 607.
19. Maimone T. J., Baran P. S.: *Nat. Chem. Biol.*, **2007**, 3(7), 396.
20. Nicolaou K. C., Sorensen E. J.: *Classics in total synthesis*, VCH publishers Inc. New York, **1996**.
21. Rabinowitz J. L., Gurin S.: *J. Biol. Chem.*, **1954**, 208, 307.
22. Bloch K., Clark L. C., Harary I.: *J. Biol. Chem.*, **1954**, 211, 687.
23. Flesch G., Rohmer M.: *Eur. J. Biochem.*, **1988**, 175, 405.
24. Horbach S., Sahm H., Welle R.: *FEMS Microbiol. Lett.*, **1993**, 111, 135.
25. Newman D. J., Cragg G. M., Snader K. M.: *J. Nat. Prod.*, **2003**, 66, 1022.

26. Crowell P. L.: *J. Nutr.*, **1999**, *129*, 775S.
27. Jameson C. W.: *NTP TECHNICAL REPORT*, **1990**, NIH Publication No. 90-2802.
28. McNamee D.: *Lancet*, **1993**, *342*, 801.
29. Morgan-Meadows S., Dubey S., Gould M., Tutsch K., Marnocha R., Arzoomanin R., Alberti D., Binger K., Feierabend C., Volkman J., Ellinge S., Black S., Pomplun M., Wilding G., Bailey H.: *Cancer Chemoter. Pharmacol.*, **2003**, *52*, 361.
30. Liu G., Oettel K., Bailey H., Ummersen L., Tutsch K., Staab M. J., Horvath D., Alberti D., Arzoomanian R., Rezazadeh H., McGovern J., Robinson E., DeMets D., Wilding G.: *Investigation. New Drugs*, **2003**, *21*, 367.
31. Stark M. J., Burke Y. D., McKinzie H. J., Ayoubi A. S., Crowell P. L.: *Cancer Lett.*, **1995**, *96*, 15.
32. Fraga B. M.: *Nat. Prod. Rep.*, **2006**, *23*, 943.
33. Brossi A., Venugopalan B., Gerpe L. D., Yeh H. J. C., Flippen-Anderson J. L., Buchs P., Luo X. D., Milhous W., Peters W.: *J. Med. Chem.*, **1988**, *31*, 645.
34. Abdin M. Z., Israr M., Rehman R. U., Jain S. K.: *Planta med.*, **2003**, *69*, 289.
35. Anchel M., Hervey A., Robbins W. J.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **1950**, *36*, 30.
36. Senzer N. S., Arsenau J., Richards D., Berman B., MacDonald J. R., Smith S.: *Am. J. Clin. Oncol.*, **2005**, *28*, 36.
37. Woynarowska B. A., Woynarowski J. M., Herzig M. C. S., Roberts K., Higdon A. L., MacDonald J. R.: *Biochem. Pharmacol.*, **2000**, *59*, 1217.
38. Macías A. F., López A., Varela R. M., Torres A., Molinillo J. M. G.: *J. Chem. Ecol.*, **2008**, *65*.
39. Weifang W., Michio N.: *Heterocycles*, **2007**, *74*, 53.
40. Tu W., Wang S., Chien S., Lin F., Chen L., Chiu C., Hsiao P.: *Planta Medica*, **2007**, *73*, 1407.
41. Wang G., Tang W., Bidigare R. R.: *Nat. Prod.*, **2005**, 197.
42. Zahr A. S., Pishko M. V.: *Biomacromolecules*, **2007**, *8*, 2004.
43. Wani M. C., Taylor H. L., Wall M. E., Coggon P., McPhail A. T.: *J. Am. Chem. Soc.*, **1971**, *93*, 2325.
44. Klener P.: *Protinádorová chemoterapie*, **1996**, Galén, Praha

45. Höfle G., Bedorf N., Steinmetz H., Schomburg D., Gerth K., Reichenbach H.: *Angew. Chem*, **1996**, 13-14, 1567.
46. Fenical W. H., Jensen P. R., Lindel T.: US Patent #5473057, **1995**.
47. Britton R., de Silva E. D., Bigg C. M., McHardy L. M., Roberge M., Andersen R. J.: *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, 42, 2953.
48. Dewick P. M.: *Nat. Prod. Rep.*, **2002**, 19, 181.
49. Grange E., Rabin O., Bell J., Chang M. C. J.: *Neurochem. Res.*, **1998**, 23, 1251.
50. Haefner B.: *Drug Discovery Today*, **2003**, 8, 536.
51. Connolly J. D., Hill J. A.: *Nat. Prod. Rep.*, **2007**, 24, 465.
52. Dzubak P., Hajdich M., Vydra D., Hustova A., Kvasnica M., Biedermann D., Markova L., Urban M., Sarek J.: *J. Nat. Prod.*, **2006**, 23, 394.
53. Setzer W. N., Setzer M. C.: *Mini reviews in medicinal chemistry*, **2003**, 3, 540.
54. Kikuchi T., Akihisa T., Tokuda H., Ukiya M., Watanabe K., Nishino H.: *J. Nat. Prod.*, **2007**, 70, 918.
55. Banskota A. H., Tezuka Y., Phung L. K., Tran K. Q., Saiki I., Miwa Y., Taga T., Kadota S.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.*: **1998**, 8, 3519.
56. Chen G., Li Z., Pan D., Tang C., He X., Xu G.: *J. Nat. Prod.*, **1993**, 56, 1114.
57. Löwitz: *Crell's annalen*, **1788**, 1, 312.
58. Sheth K., Bianchi E., Wiedhopf R., Cole J. R.: *J. Pharm. Sci.*, **1973**, 62, 139.
59. Kim D. S., Pezzutot J. M., Pisha E.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1998**, 8, 1707.
60. Saleem M., Kaur S., Kweon M., Adhami V. M., Afaq F., Mukhtar H.: *Carcinogen.*, **2005**, 26, 1956.
61. Prasad S., Kalra N., Shukla Y.: *Mol. Nutr. Food. Res.*, **2007**, 51(3), 352.
62. Bani S., Kaul A., Khan B., Ahmad S., Fayaz S. K. A., Gupta B. D., Satti N. K., Qazi, G. N.: *Phytother. Res.*, **2006**, 20(4), 279.
63. Hoet S., Pieters L., Muccioli G. G., Habib-Jiwan J., Opperdoes F. R., Quetin-Leclercq J.: *J. Nat. Prod.*, **2007**, 70, 1360.
64. Rajendran P., Jaggi M., Singh M. K., Mukherjee R., Burman A. C.: *Invest. New Drugs*, **2008**, 26, 25.
65. Tomas-Barberan F.A., Hostettmann K.: *Planta Med.*, **1988**, 54, 266.

66. Wick W., Grimmel C., Wagenknecht B., Dichgans J., Weller M. J.: *Pharmacol. Exp. Ther.*, **1999**, 289, 1306.
67. Setzer W. N., Setzer M. C., Bates R. B., Jackes B. R.: *Planta Med.*, **2000**, 66, 485.
68. Kim Y. K., Yoon S. K., Ryu S. Y.: *Planta Med.*, **2000**, 66, 485.
69. 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.*, **1994**, 57, 243.
70. Kashiwada Y., Hashimoto F., Cosentino L. M., Chen C. H., Garrett P. E., Lee K. H.: *J. Med. Chem.*, **1996**, 39, 1016.
71. Smith P. F., Ogundele A., Forrest A., Wilton J., Salzwedel K., Doto J., Allaway G. P., Martin E. D.: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2007**, 51, 3574.
72. Cichewicz R. H., Kouzi S. A.: *Med. Res. Rev.*, **2004**, 24, 90.
73. Tu J., Sun H.-X., Ye Y.-P.: *Chemistry & Biodiversity*, **2006**, 3, 69.
74. Chiang Y.-M., Chang J.-Y., Kuo C.-C., Chang C.-Y., Kuo Y.-H.: *Phytochemistry*, **2005**, 66, 495.
75. Giner-Larza E. M, Máñez S., Recio M. C., Giner R. M., Prieto J. M., Cerdá-Nicolás M., Ríos J. L.: *Eur. J. Pharmacol.*, **2001**, 428, 137.
76. Kashiwada Y., Wang H. K., Nagao T., Kitanaka S., Yasuda I., Fujioka T., Yamagishi T., Cosentino L. M., Kozuka M., Okabe H., Ikeshiro Y., Hu C. Q., Yeh E., Lee K. H.: *J. Nat. Prod.*, **1998**, 61, 1090.
77. Suh N., Wang Y., Honda T., Gribble G. W., Dmitrovsky E., Hickey W. F., Maue R. A., Place A. E., Porter D. M., Spinella M. J., Williams C. R., Wu G., Dannenberg A. J., Flanders K. C., Letterio J. J., Mangelsdorf D. J., Nathan C. F., Nguyen L., Porter W. W., Ren R. F., Roberts A. B., Roche N. S., Subbaramaiah K., Sporn M. B.: *Cancer Res.*, **1999**, 59, 336.
78. Sporn M. B., Liby K., Yore M. M., Suh N., Albini A., Honda T., Sundararajan C., Gribble G. W.: *Drug Dev. Res.*, **2007**, 68, 174.
79. Deng Y., Jiang T.-Y., Sheng S., Tianasoa-Ramamonjy M., Snyder J. K.: *J. Nat. Prod.*, **1999**, 62(3), 471.
80. Shintyapina A. B., Shults E. E., Petrenko N. I., Uzenkova N. V., Tolstikov G. A., Pronkina N. V., Kozhevnikov V. S., Pokrovsky A. G.: *Russian Journal of*

- Bioorganic Chemistry*, **2007**, *33*, 579.
81. Yun B.-S., Ryoo I.-J., Lee I.-K., Park K.-H., Choung D.-H., Han K.-H., Yoo I.-D.: *J. Nat. Prod.*, **1999**, *62*, 764.
 82. Shishodia S., Majumdar S., Banerjee S., Aggarwal B. B.: *Cancer Res.*, **2003**, *63*, 4375.
 83. Mizushima Y., Iida A., Ohta K., Sugawara F., Sakaguchi K.: *Biochem. J.*, **2000**, *350*, 757.
 84. Ahn K., Hahm M. S., Park E., Lee H., Kim I.: *Planta Med.*, **1998**, *64*, 468.
 85. Rios M. Y., Gonzalez-Morales A., Villarreal M. L.: *Planta Med.*, **2001**, *67*, 683.
 86. Es-saady D., Simon A., Ollier M., Maurizis J. C., Chulia A. J., Delage C.: *Cancer Lett.*, **1996**, *106*, 193.
 87. Simon A., Najid A., Chulia A. J., Delage C., Rigaud M.: *Biochim. Biophys. Acta*, **1992**, *1125*, 68.
 88. Baek J. H., Lee Y. S., Kang C. M., Kim J., Kwon K. S., Son H. C., Kim K.: *Int. J. Cancer*, **1997**, *73*, 725.
 89. Ikeda Y., Murakami A., Ohigashi H.: *Mol. Nut. Food Res.*, **2008**, *52*, 26.
 90. Sharma A., Mann A. S., Gajbhiye V., Kharya M. D.: *Pharmacog. Rev.*, **2007**, *1*, 137.
 91. Hoernlein R. F., Kunda N. P., Orlikowsky T., Zehrer C., Niethammer D., Sailer E. R., Simmet T., Dannecker G. E., Ammon H. P.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1999**, *288*, 613.
 92. Yamaguchi Y., Yamada K., Yoshikawa N., Nakamura K., Haginaka J., Kunitomo M.: *Life Sci.*, **2006**, *79*, 2474.
 93. Morita H., Hirasawa Y., Muto A., Yoshida T., Sekita S., Shirota O.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2008**, *18(3)*, 1050.
 94. Alvarenga N. L., Velazquez C. A., Gomez R., Canela N. J., Bazzocchi I. L., Ferro E. A.: *J. Nat. Prod.*, **1999**, *62*, 750.
 95. Mena-Rejon G. J., Perez-Espadas A. R., Moo-Puc R. E., Cedillo-Rivera R., Bazzocchi I. L., Jimenez-Diaz I. A., Quijano L.: *J. Nat. Prod.*, **2007**, *70*, 863.
 96. Avilla J., Teixido A., Velazquez C., Alvarenga N., Ferro E., Canela R.: *J. Agric. Food. Chem.*, **2000**, *48*, 88.

97. Luo D.-Q., Wang H., Tian X., Shao H.-J., Liu J.-K.: *Pest. Manag. Sci.*, **2005**, *61*, 85.
98. Shirota O., Morita H., Takeya K., Itokawa H., Iitaka Y.: *J. Nat. Prod.*, **1994**, *57*, 1675.
99. Ngassapa O., Soejarto D. D., Pezzuto J. M., Farnsworth N. R.: *J. Nat. Prod.*, **1994**, *57*, 1.
100. Gonzalez A. G., Darias V., Boada J., Alonso G.: *Planta med.*, **1977**, *32*, 282.
101. Setzer W. N., Setzer M. C., Hopper A. L., Moriarty D. M., Lehrman G. K., Niekamp K. L., Morcomb S. M., Bates R. B., McClure K. J., Stessman C. C., Haber W. A.: *Planta Med.*, **1998**, *64*, 583.
102. Setzer W. N., Holland M. T., Bozeman C. A., Rozmus G. F., Setzer M. C., Moriarty D. M., Reeb S., Vogler B., Bates R. B., Haber W. A.: *Planta Med.*, **2001**, *67*, 65.
103. Chang F.-R., Hayashi K.-I., Chen I.-H., Liaw C.-C., Bastow K. F., Nakanishi Y., Nozaki H., Cragg G. M., Wu Y.-C., Lee K.-H.: *J. Nat. Prod.*, **2003**, *66*, 1416.
104. Rehm S., Wessels J. H.: *J. Sci. Food Agric.*, **1957**, *8*, 679.
105. Chen J. C., Chiu M. H., Nie R. L., Cordell G. A., Qiu S. X.: *Nat. Prod. Rep.*, **2005**, *22*, 386.
106. Gitter S., Gallily R., Shohat B., Lavie D.: *Cancer res.*, **1961**, *21*, 516.
107. Oberlies N. H., Burgess J. P., Navarro H. A., Pinos R. E., Soejarto D. D., Farnsworth N. R., Kinghorn A. D., Wani M. C., Wall M. E.: *J. Nat. Prod.*, **2001**, *64*, 497.
108. Ahmad A., Manuel M., Jose J., Jose A., Dolores-Caracuel M., Garcia-Granados A., Concepcion Navarro M.: *Planta. Med.* **1999**, *65*, 673.
109. Yesilada E., Tanaka S., Tabata M.: *J. Nat. Prod.*, **1988**, *28*, 1268.
110. Duncan K. L., Duncan M. D., Alley M. C., Sausville E. A.: *Biochem. Pharmacol.*, **1996**, *52*, 1553.
111. Attard E., Cuschieri A., Scicluna-Spiteri A., Brincat M. P.: *Pharm. Biol.*, **2004**, *42*, 170.
112. Attard E., Brincat M. P., Cuschieri A.: *Fitoterapia*, **2005**, *76*, 439.
113. Vystreil A., Klinot J.: *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **1959**, *24*, 3273.

114. Sarek J., Klinot J., Dzubak P., Klinotova E., Noskova V., Krecek V., Korinkova G., Thomson J. O., Janostakova A., Wang S., Parsons S., Fischer P. M., Zhelev N. Z., Hajduch M.: *J. Med. Chem.*, **2003**, *46*, 5402.
115. Urban M., Sarek J., Klinot J., Korinkova G., Hajduch M.: *J. Nat. Prod.*, **2004**, *67*, 1100.
116. Sarek J., Kvasnica M., Urban M., Klinot J., Hajduch M.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2005**, *15*, 4196.
117. Urban M., Sarek J., Tislerova I., Dzubak P., Hajduch M.: *Bioorg. Med. Chem.*, **2005**, *13*, 5527.
118. Kvasnica M., Sarek J., Klinotova E., Dzubak P., Hajduch M.: *Bioorg. Med. Chem.*, **2005**, *13*, 3447.
119. Urban M., Sarek J., Kvasnica M., Tislerova I., Hajduch M.: *J. Nat. Prod.*, **2005**, *70*, 526.
120. Pettit G. R., Inoue M., Kamano Y., Herald D. L., Arm C.: *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, *110*, 2006.
121. Dzubak P., Sarek J., Anzenbacher P., Masek V., Novak P., Havlicek V., Otyepka M., Vydra D., Hajduch M.: *Cancer Res.*, submitted.
122. Hammouda Y., Pourrat H.: *Proceedings of the Pharmaceutical Society of Egypt*, **1957**, *39*, 69.
123. Krasutsky P. A., Avilov D. V.: PCT Int. Appl., WO 2003062260, **2003**.
124. Urban M.: Dizertační práce, Univerzita Karlova v Praze, **2005**.
125. Hajduch M., Sarek J.: Betulinines I. British patent, GB 0012526.0, **2000**.
126. Hajduch M., Sarek J.: Betulinines II. British patent, GB 0012528.6, **2000**.
127. Hajduch M., Sarek J.: Betulinines III. British patent, GB 0012532.8, **2000**.
128. Hajduch M.; Sarek J.: Triterpenoid derivatives. PCT Int. Patent Appl. WO 0190136, **2001**.
129. Hajduch M.; Sarek J.: Triterpenoid derivatives. PCT Int. Patent Appl. WO 0190046, **2001**.
130. Hajduch M.; Sarek J.: Triterpenoid derivatives. PCT Int. Patent Appl. WO 0190096, **2001**.

131. Fischer P. M., Sarek J., Blaney P. M., Collier P., Fergusson J. R.: Medicament. PCT Int. Patent Appl. WO03/045971 A2, **2003**.
132. Zhao G., Yan W., Cao D.: *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2007**, 43, 959.
133. Jääskeläinen P.: *Paperi- ja Puutavaralehti*, **1981**, 10, 599.
134. Martinová B.: Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, **2006**.
135. Sejbál J., Klinot J., Vystrčil A.: *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **1987**, 52, 487.
136. Klinotová E., Cermáková J., Rejzek M., Krecek V., Sejbál J., Olsovský P., Klinot J.: *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **1999**, 64, 329.
137. Sarek J., Klinot J., Dzubak P., Klinotová E., Nosková V., Krecek V., Korinková G., Thomson J. O., Janostáková A., Wang S., Parsons S., Fischer P. M., Zhelev N. Z., Hajduch M.: *J. Med. Chem.*, **2003**, 46, 5402.
138. Hajduch M., Sarek J.: PCT Int. Patent Appl. WO 2001090046, **2001**.
139. Tichý M.: Nepublikované výsledky.
140. Uzenkova N. V., Petrenko N. I., Shakirov M. M., Shul'ts E. E., Tolstikov G. A.: *Chem. Nat. Comp.*, **2005**, 41, 692.
141. Vystrčil A., Buděšínský M.: *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **1970**, 36, 312.
142. Vystrčil A., Krecek V., Budesínský M., Protiva J.: *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **1986**, 51, 581.
143. Krecek V., Budesínský M., Vystrčil A.: *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **1992**, 57, 556.
144. Biedermann D.: Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, **2003**.
145. Klinot J., Vystrčil A.: *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **1987**, 31, 1079.
146. Sejbál J., Klinot J., Hrnčířová D., Vystrčil A.: *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **1985**, 50, 2753.
147. Bose A. K., Manhas M. S., Malinowski E. R.: *J. Am. Chem. Soc.*, **1963**, 85, 2795.
148. Štěpánek O.: Bakalářská práce, Univerzita Karlova v Praze, **2006**.
149. Begum S., Sultana I., Siddiqui B. S., Shaheen F., Gilani A. H.: *J. Nat. Prod.*, **2002**, 65, 1939.
150. Honda T., Finlay H. J., Gribble G. W., Suh N., Sporn M. B.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1997, 7, 1623.

151. Zaprutko L., Partyka D., Bednarczyk-Cwynar B.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2004**, *14*, 4723.
152. Chen J., Liu J., Zhang L., Wu G., Hua W., Wu X., Sun H.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2006**, *16*, 2915.
153. Spáčilová P.: Bakalářská práce, Univerzita Karlova v Praze, **2007**.
154. Suokas E., Hase T.: *Acta. Chem. Scand., Ser. B.*, **1975**, *29*, 139.
155. Sejbal J., Klinot J., Budesinsky M., Protiva J.: *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **1991**, *56*, 2936.
156. Šarek J.: Dizertační práce, Univerzita Karlova v Praze, **2007**.
157. Klinotová E., Křeček V., Klinot J., Endová M., Eisenreichová J., Buděšínský M., Štícha M.: *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 1997, *62*, 1776.
158. Sun I-C., Wang H.-K., Kashiwada Y., Shen J.-K., Cosentino L. M., Chen C.-H., Yang L.-M., Lee K.-H.: *J. Med. Chem.*, **1998**, *41*, 4648.
159. Klinot J.; Vystreil A.: *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **1997**, *62*, 1776.
160. Denisenko M. V., Odinokova L. E., Denisenko V. A., Uvarova N. I.: *Chem. Nat. Comp.*, **1966**, *31*, 1079.
161. Samoshina N. F., Denisenko M. V., Denisenko V. A., Uvarova N. I.: *Chem. Nat. Comp.*, **2003**, *39*, 575.
162. Otsuka H., Fujioka S., Goto M., Hirmatsu Y., Fujimora H.: *Chem. Pharm. Bull.*, **1981**, *29*, 3099.
163. Silva M., Balocchi M., Sammes P. G.: *Phytochem.*, **1968**, *7*, 333.
164. Kumar N., Ravindranath B., Seshadri T. R.: *Phytochem.*, **1974**, *13*, 633.
165. Reddy G. C. S., Ayengar K. N. N., Rangaswami S.: *Phytochem.*, **1975**, *14*, 307.
166. Begum S., Sultana I., Siddiqui B. S., Shaheen F., Gilani A. H.: *J. Nat. Prod.*, **2002**, *65*, 1939.
167. Šarek J.: Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, **2002**.
168. Okamoto I., Takeya T., Kagawa Y., Kotani E.: *Chem. Pharm. Bull.*, **2000**, *48*, 120.

PODĚKOVÁNÍ

Je mojí milou povinností na tomto místě poděkovat všem, bez kterých by tato práce nemohla vzniknout.

Na prvním místě mé upřímné poděkování patří mému školiteli, RNDr. JANU ŠARKOVI PhD, za jeho neutuchající podporu v samostatné práci, za čas který mi věnoval i přes všechny své další povinnosti, za poučení a za životní zkušenosti, které jsem pod jeho vedením nasbíral.

Zvláště děkuji všem, kteří si vznikající práci přečetli a svými korekturami a radami přispěli k její vyšší kvalitě. Jedná se kromě mého školitele o RNDr. MIROSLAVA KVASNICU PhD, RNDr. MILANA URBANA PhD a RNDr. LADU BIEDERMANNNOVOU PhD.

Vřelý dík také patří všem, kteří se se podíleli na získávání fyzikálních, spektrálních a biologických údajů zde připravených sloučenin. Děkuji pracovníkům LEM FN Olomouc, UP Olomouc a zejména pak Mgr. PAVLE SPÁČILOVÉ za měření biologických aktivit. RNDr. STANISLAVU HILGARDOVI CSc., RNDr. MIROSLAVU KVASNICOVI PhD, MARTINU VLKOVI, RNDr. MARTINU ŠTÍCHOVI, Mgr. SIMONĚ HYBLBAUEROVÉ, RNDr. IVĚ RUDOVSKÉ, PhD a Mgr. BOHUNĚ ŠPERLICHOVÉ děkuji za pomoc a za měření IČ, NMR, MS, optických otáčivostí a teplot tání.

Děkuji také všem svým kolegům v laboratoři za výborné pracovní prostředí a za cenné rady.

Na závěr můj ze srdce jdoucí dík patří mým rodičům a mé manželce RNDr. LADĚ BIEDERMANNNOVÉ PhD za poskytnutí zázemí, bez kterého by tato práce nemohla vzniknout.