

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra organické chemie



**Modifikace betulinu v poloze C-30 pomocí click
reakcí**



Department of Organic Chemistry

Palacký University Olomouc

Bakalářská práce

Autor:

Ondřej Jurčeka

Studijní program:

Chemie

Studijní obor:

Bioorganická chemie a
chemická biologie

.

Typ studia:

Prezenční

Vedoucí práce:

doc. RNDr. Milan Urban, Ph.D.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

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

V Olomouci,

.....

Podpis

Poděkování:

Tímto bych chtěl poděkovat svému vedoucímu doc. RNDr. Milanu Urbanovi, Ph.D. za cenné rady, připomínky, odborné vedení a veškerou pomoc. Dále Mgr. Soni Krajščovičové Ph.D. za měření NMR spekter, RNDr. Sandře Benické za měření HR/MS, všem členům týmu doc. RNDr. Milana Urbana Ph.D. za veškerou pomoc a rady.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora: Ondřej Jurčeka

Název práce: Modifikace betulinu v poloze C-30 pomocí click reakcí

Typ práce: Bakalářská práce

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

Školitel: doc. RNDr. Milan Urban Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2020

Abstrakt:

Cílem této práce bylo zavést propargylový substituent do polohy C-30 molekuly vybraných triterpenoidů – betulinu a betulin diacetátu. V dalším kroku provést Huisgenovu 1,3-dipolární cykloadici se zvolenými organickými azidy. Celkem bylo připraveno 28 produktů cykloadice. Nové sloučeniny jsou charakterizovány běžnými fyzikálními a spektrálními metodami (^1H a ^{13}C NMR, IČ, HR/MS) a zaslány na testování cytotoxické aktivity. Práce je členěna na tyto kapitoly – Úvod, teoretická část, cíle práce, výsledky a diskuse, závěr, experimentální část.

Klíčová slova: triterpen, betulin, betulin diacetát, propargyl, azid, Huisgenova cykloadice, 1,2,3-triazol

Počet stran: 111

Jazyk: Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname: Ondřej Jurčeka

Title: Modification of betulin at C-30 with use of click reaction.

Type of thesis: Bachelor's

Department: Department of Organic Chemistry, Faculty of Science, Palacky University
Olomouc

Advisor: doc. RNDr. Milan Urban Ph.D.

The year of presentation: 2020

Abstract:

The main focus of this thesis was to introduce propargyl substituent to C-30 position of selected triterpenoid molecules – betulin and betulin diacetate. In the next step, Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition with organic azides was used to prepare 1,2,3-triazole derivatives. This way, 28 modified triterpenoids were obtained. Structures were confirmed by basic physical and spectral methods (^1H and ^{13}C NMR, IR, HR/MS) and then samples were sent for testing of their biological activity. The chapters of this thesis consist of introduction, teoretical part, aim of the work, results and discussion, conclusion and experimental part.

Keywords: triterpene, betulin, betulin diacetate, propargyl, azide, Huisgen cycloaddition, 1,2,3-triazole.

Number of pages: 111

Language: Czech

Obsah

1	Úvod.....	8
	Teoretická část.....	9
2	Terpeny	9
2.1	Triterpeny.....	10
3	Biologická aktivita triterpenů.....	12
3.1	Cytotoxicita.....	15
3.2	Protektivita	17
4	Click reakce na triterpenech.....	20
4.1	Modifikace na C-3	21
4.2	Modifikace na C-28	22
4.3	Lupanové triterpeny modifikované na C-2, C-30, nebo jiných částech skeletu	23
4.4	Oleananové triterpeny s modifikovaným C-3	24
4.5	Oleananové triterpeny s modifikovaným C-28	25
	Cíle práce.....	26
	Výsledky a diskuse	27
5	Příprava výchozích sloučenin.....	27
5.1	Příprava propargylesterů 88 a 89.....	27
5.2	Příprava výchozích azidů.....	29
6	Huisgenova cykloadice s látkami 88, 89, 90.....	31
7	Cytotoxická aktivita připravených sloučenin.....	32
8	Závěr	35
	Seznam použitých zkratk	36
	Experimentální část.....	37
9	Příprava 30-oxolup-20(29)-en-3,28-diol diacetátu (17a).....	38

10	Příprava 30-oxolup-20(29)-en-3,28- diolu (6a).....	39
11	Příprava kyseliny 3,28-diacetoxylup-20(29)-en-30-ové (17b).....	40
12	Příprava kyseliny 3,28-dihydroxylup-20(29)-en-30-ové (6b).....	41
13	Příprava kyseliny 3-hydroxy-28-acetoxylup -20(29)-en-30-ové (17c).....	41
14	Příprava propargylesteru kyseliny 3,28-diacetoxylup-20(29)-en-30-ové (89).	42
15	Příprava propargylesteru kyseliny 3,28-dihydroxylup-20(29)-en-30-ové (88)	43
16	Příprava propargylesteru kyseliny 3-hydroxy-28-acetoxylup -20(29)-en-30-ové (90)	44
17	Obecný postup pro přípravu triazolových derivátů 91-118 Huisgenovou cykloadicí.....	45

1 Úvod

V současné době se zvyšuje počet lidí trpících různými nemocemi. Velká řada těchto nemocí je však jen omezeně léčitelná a některé jsou neléčitelné úplně. Přes velké úspěchy s již dostupnými léčivy a značný potenciál tzv. biologické léčby, je stále potřeba hledat nová terapeutika s vyšší selektivitou, účinností a alternativním mechanismem účinku. Potřeba objevovat biologicky aktivní látky s vhodnými vlastnostmi a použitelností jako léčiva je stále aktuální. Velmi slibnou a stále se rozvíjející oblastí chemie v oblasti terapeutik je chemie triterpenoidních sloučenin. Ty prokázaly rozličnou biologickou aktivitu jako například nefroprotektivní, hepatoprotektivní, cytotoxickou a nově neuroprotektivní. Kromě jejich vysoké variability hraje také v jejich prospěch vysoký terapeutický index (poměr účinné koncentrace vůči koncentraci, kdy je sloučenina již toxická). Většímu využití triterpenoidů naopak brání nepříliš vhodné farmakologické vlastnosti. Tedy velká lipofilita a nižší rozpustnost ve vodných médiích. Tato práce si klade za cíl připravit sloučeniny s vhodnými vlastnostmi potenciálně využitelnými v terapii neurodegenerativních onemocnění.

Teoretická část

2 Terpeny

Terpeny jsou širokou skupinou organických sloučenin. Lze je nalézt v květech, stoncích, listech, kořenech a jiných částech mnoha rostlinných druhů a v jisté míře u dalších živých organismů jako sekundární metabolity. Jsou složeny z různého počtu izoprenoidních jednotek (n) a lze je tedy zapsat obecným vzorcem $(C_5H_8)_n$. Podle počtu isoprenoidních jednotek lze terpeny rozdělit na hemiterpeny, monoterpeny, sesterterpeny, diterpeny, triterpeny, tetraterpeny a polyterpeny¹.

U savců jsou izopreneony jednou ze složek stabilizující buněčné membrány. Také se účastní některých metabolických drah. Konkrétně je to například syntéza cholesterolu a jeho dalších derivátů, pro kterou je potřeba prekurzor skvalen. Mohou také sloužit jako regulátory enzymatických reakcí. U bylin a vyšších rostlin jsou terpeny zdrojem aroma, nebo specifické chuti.

V současné době je známo více jak 55 000 terpenických sloučenin². To z nich dělá jednu z největších skupin přírodních látek. Díky jejich obrovské variabilitě jim v relativně nedávné době začalo být věnováno více pozornosti. Ukázalo se, že by mohly sloužit jako léčiva pro léčbu některých onemocnění jako rakovina a HIV. Ale také jako přírodní insekticidy, nebo antimikrobiální sloučeniny³.

Většina terpenů jsou poměrně lipofilní látky. Naproti tomu některé monoterpenické struktury jako iridoidy, triterpenické saponiny tímto problémem tolik netrpí. Je to dáno jejich vazbou s polárními cukry⁴.

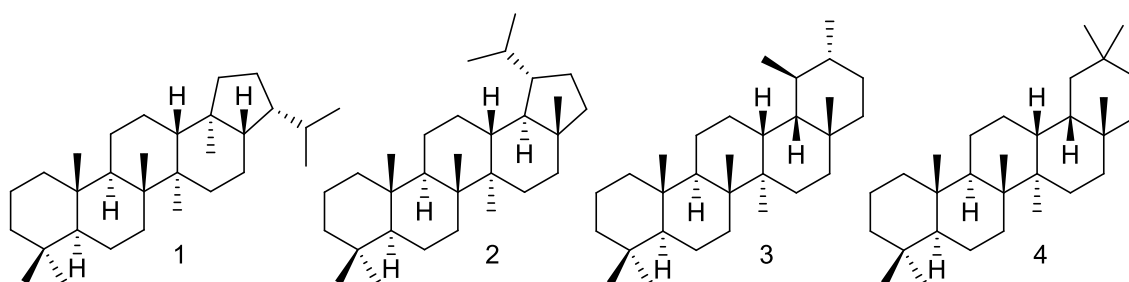
2.1 Triterpeny

Triterpeny jsou složeny ze šesti izoprenových jednotek. Výchozí sloučeninou pro jejich syntézu je skvalen. Z něj lze odvodit téměř všechny zástupce této skupiny. Základními drahami syntézy těchto látek jsou mevalonátová (MVA) a methylerithritol 4-fosfátová dráha (MEP). Mevalonátovou dráhu mají tyto látky společnou se steroidy. Poslední společný intermediát je 2,3-epoxyskvalen. K hlavním skupinám patří deriváty: skvalenu, lupanu, hohanu, holostanu, lanostanu, euphanu, cucurbitanu, dammaranu, ursanu a oleananu⁵.

Mezi organizmy s nejhojnějším výskytem těchto látek patří houby, rostliny, mořští živočichové, plísně a bakterie.

Triterpeny na rozdíl od sterolů nejsou esenciálními látkami a nejsou tak nutné pro správný růst a vývoj svého původce. U rostlin se mohou vyskytovat ve své základní nemodifikované podobě, ale často také vytvářejí konjugáty. Nejčastěji probíhá konjugace s cukry. Právě glykosidické konjugáty jsou důležité v zemědělství, kde zvyšují odolnost rostlin vůči některým škůdcům. Dále také našly své místo v potravinářském, kosmetickém a farmaceutickém průmyslu⁶. Práce s triterpeny v průmyslu má hned několik výhod. Za prvé mají velkou škálu biologických účinků a současně nízkou toxicitu. Za druhé jsou lehce dostupné z přírodních zdrojů jako druhotné produkty po zpracování dřeva a papíru. Za třetí jsou biologicky odbouratelné a nepředstavují hrozbu pro životní prostředí⁷.

Za posledních několik desetiletí byla u triterpenů objevena rozličná biologická aktivita. A to cytotoxická⁸, antimalarická⁹, hepatoprotektivní¹⁰, nefroprotektivní¹¹, anti-HIV¹², protizánětlivá¹³, antikariogenní¹⁴, protipožerová¹⁵.



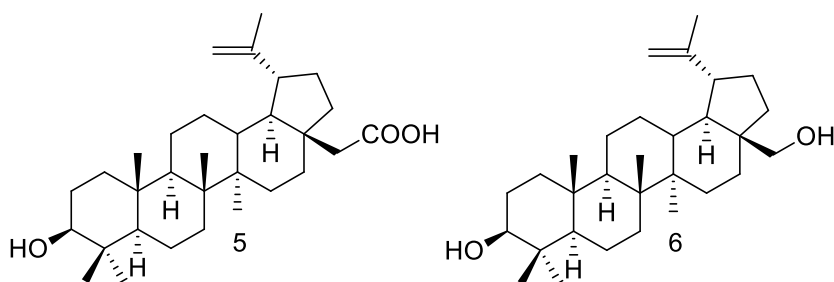
Obrázek 1: Hopan (1), Lupan (2), Ursan (3), Oleanan (4)

2.1.1 Kyselina betulinová

Kyselina betulinová (**5**, BA) je lupanový derivát a produkt oxidace betulinu. V přírodě byla objevena v roce 1902 v extraktu byliny Konitrudu lékařského (*Gratiola officinalis*). Od té doby byla však nalezena i u jiných druhů rostlin. Počáteční výzkum biologické aktivity této látky byl publikován v roce 1976¹⁶. Bylo objeveno, že extrakt obsahující kyselinu betulinovou (**5**) vykazuje aktivitu vůči rakovinným buňkám P388. Od té doby bylo připraveno mnoho derivátů této kyseliny (**5**) s prokázanou aktivitou vůči různým typů rakovinných buněk. Mimo to v nedávné době byly připraveny esterové deriváty BA (**5**), které narušovaly proces maturace části virionů HIV-1. Hlavním problémem této molekuly je efektivní koncentrace. Ta je pro použití ve farmakologických přípravcích moc vysoká. Cílem je tedy modifikovat BA (**5**) tak, aby se zlepšila její rozpustnost, hydrofilita a biologická aktivita¹⁷.

2.1.2 Betulin

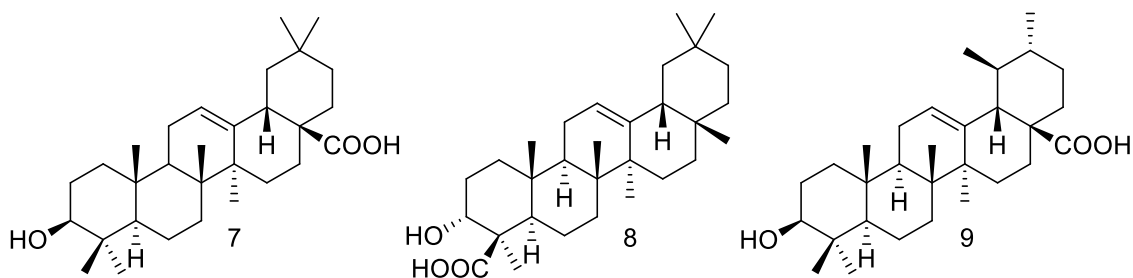
Betulin (**6**) byl poprvé izolován v roce 1788 Lowitzem z březové kůry¹⁸. Obecně jej můžeme získat z kůry stromů čeledi břízovitých, která se vyskytuje především severnějších světových šířkách. Tato látka představuje až 30 % hmotnosti suché kůry některých Skandinávských druhů (*B. verrucosa*). Zatímco druhy pocházející ze Severní Ameriky jako (*B. papyrifera*, *B. populifolia*) mají obsah betulinu (**6**) v suché kůře do 20 %¹⁹. Jeho role v kůře stromů není přesně známá, nicméně objevilo se několik studií biologické aktivity naznačujících, že by mohl sloužit jako protipožerová ochrana před některými škůdci²⁰. V případě užití betulinu (**6**) a jeho derivátů jako léčiva četné studie poukazují na antibakteriální, antimykotické, antivirové, chemoprotektivní a protirakovinné účinky²¹. Nejvýznamnější ze zmíněných se ukázala cytotoxická aktivita. Testované lidské buněčné linie zahrnují A549 (karcinom plic), neuroblastom GOTO a NB-1, T47-D (karcinom prsu), MCF-7 (adenokarcinom prsu), melanom G361, CCRF-CEM (leukemie), aj.²². Hlavním mechanismem selektivní cytotoxické aktivity látek odvozených od struktury betulinu je vyvolání buněčné smrti. To potvrzují objevené cytomorfologické změny na buňkách vystavených efektivní koncentraci vhodných derivátů betulinu jako kondenzace chromatinu, zakulacování buněk, fragmentace jádra, formace apoptózního tělíčka a zpuchýřování membrán²¹.



Obrázek 2: Kyselina betulinová (5), Betulin (6)

3 Biologická aktivita triterpenů

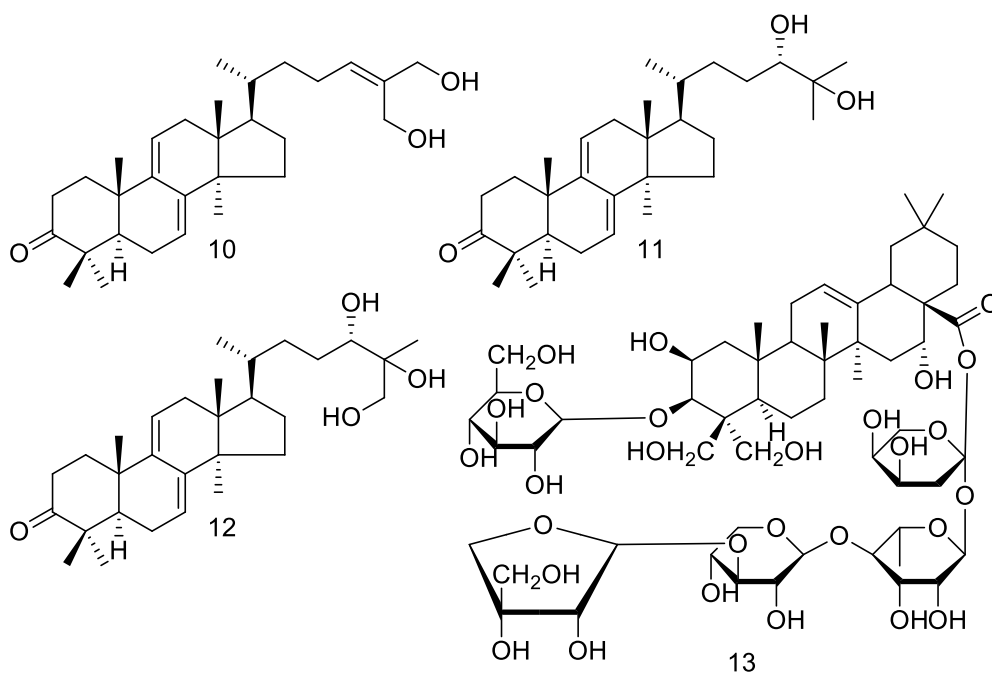
Oblasti biologických aktivit byly již zmíněny výše. Mechanizmy působení jsou dosti různorodé. Mezi časté jevy patří například ovlivnění signálních drah tlumící protizánětlivé procesy, transkripčních faktorů, blokace a uvolnění histaminu, inhibice enzymů nutných k replikaci virionů. Dosavadní bádání v této oblasti naznačuje, že za protizánětlivým účinkem triterpenů stojí schopnost inhibice 5-lipoxygenázy, lidské leukocytární elastázy²³. Dále jejich schopnost modulace imunitní odpovědi skrz tvorbu protilátek. 5-Lipoxygenáza je důležitým enzymem pro tvorbu leukotrienů. To jsou biologické mediátory nemocí, pro které je typická zánětlivá reakce. Tento enzym inhibují například deriváty kyseliny oleananové (7) a boswellové (8). Zástupcem inhibitorů lidské leukocytární elastázy je kyselina ursolová (9). Která také působí proti iniciaci vzniků nádorů²³.



Obrázek 3: Kyselina oleanolová (7), boswellová (8), ursolová (9)

Dalším enzymem potřebným pro imunitní odpověď je fosfolipáza A2²⁴. Vůči tomuto enzymu byly popsány inhibiční vlastnosti betulinu (6), kyseliny betulinové (5) a dalších triterpenoidů. Dalším místem ovlivňující vznik zánětů je komplement. Triterpenem zasahujícím do tohoto systému je kyselina oleanolová (7) a její deriváty. Účinek by měl být způsobený inhibicí C3-konvertáz komplementové dráhy a jednotlivých složek tohoto systému^{25, 26}. Tímto způsobem vedle kyseliny oleanové s $IC_{50} = 72,3 \mu M$ působí i další triterpeny. A to ganoderiol F (10) $IC_{50} = 4,8 \mu M$, ganodermanondiol (11) $IC_{50} = 41,7 \mu M$,

ganodermanontriol (**12**) $IC_{50} = 17,2 \mu M$. Zajímavou strukturou je terpenoidní glykosid platycodin D (**13**) s $IC_{50} = 10 \mu M$. U kterého bylo pozorováno snížení tvorby prostaglandinu-2 v důsledku inhibice cyklooxygenázy-2²⁷.



Obrázek 4: Genoderiol F (**10**), Genodermanondiol (**11**), Genodermanontriol (**12**), Platycodin D (**13**)

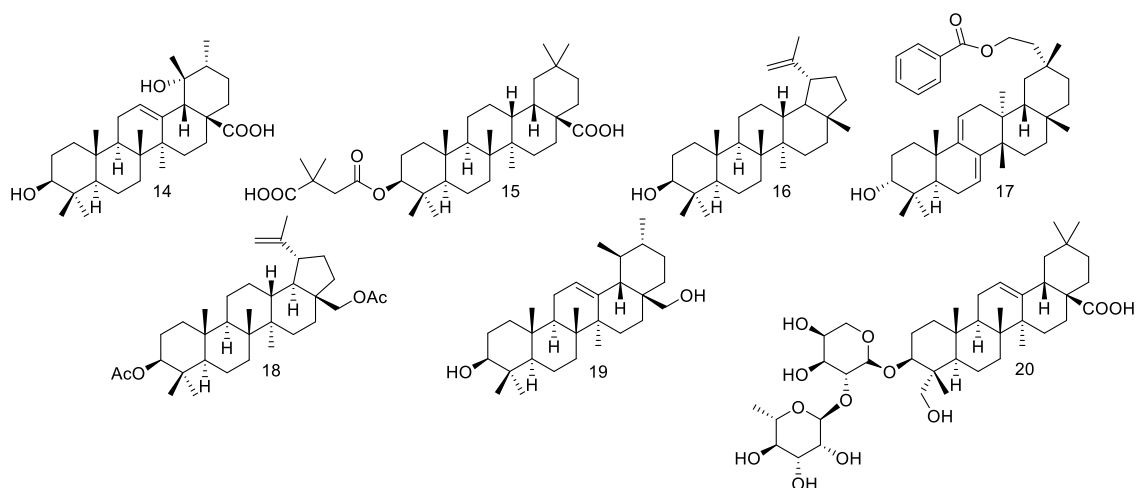
Dalším místem působení proti zánětům je Interleukin-1 β . Inhibice tohoto proteinu byla popsána u látek tripterinu, pristimerinu, tingenonu a to v koncentraci $IC_{50} = 40 \text{ nM}$ ²⁸. IL-1 β je mediátorem patogeneze chronických a akutních zánětlivých onemocnění.

Antimikrobiální účinky byly pozorovány u kyseliny betulinové (**5**) a to v koncentraci 6,5 $\mu g/ml$ na druhu *Candida albicans*. Mechanismus spočívá v inhibici aspartamové proteázy²⁹. Dalším účinkem této kyseliny je antiplazmodiální. Účinek byl objeven při testování na *Triphylophyllum peltatum* a *Ancistrocladus heyneanus* v koncentraci $EC_{50} = 10,46 \mu g/ml$ ³⁰.

U řady triterpenoidů (ursanové, hopanové, lupanové, oleananové deriváty) byla objevena antimikrobiální aktivita v rozsahu $MIC = 4-128 \mu g/ml$. Dle studie³¹ z roku 2001 důležitou roli hraje skupina připojená k uhlíku C-30. Ta v některých případech způsobuje rozdíly vysoká/zanedbatelná aktivita.

Jako antikariogenní se ukázala být kyselina oleanolová (**7**). K objevu došlo po prozkoumání houby *Ganoderma lucidum*, kterou využívala tradiční čínská medicína pro prevenci vzniku zubního kazu. Zubní kaz způsobuje bakterie *Streptococcus mutans*. Testy na této bakterii odhalily inhibici enzymu glukosyltransferázy³².

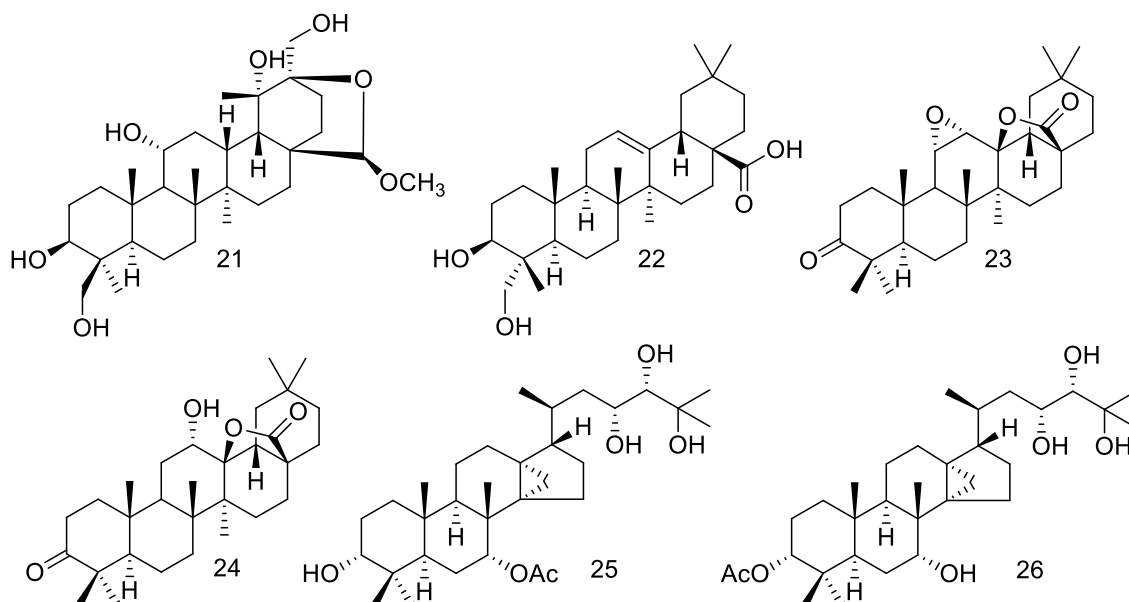
Dalším intenzivně zkoumaným účinkem je anti-HIV a antivirová aktivita. Kyselina betulinová (**5**) prokázala inhibiční účinek vůči HIV replikaci v H9 lymfocitech při koncentraci $EC_{50} = 1,4 \mu\text{M}$. Stejný inhibiční účinek byl pozorován u kyseliny platanové s koncentrací $EC_{50} = 6,5 \mu\text{M}$. V případě některých derivátů kyseliny betulinové jako například $3\beta\text{-O-(3',3'-dimethylhemisukcynyl)}$ bylo dosaženo lepších aktivit než u standardního inhibitoru Zidovudinu. Naměřené koncentrace se pohybovaly v rozmezí $EC_{50} = 0,04$ až $2,3 \cdot 10^{-3} \mu\text{M}$ s terapeutickým indexem 292 až 2344. Jiným inhibovaným procesem těmito deriváty je HIV-indukovaná membránová fúze. Nejnižší zaznamenaná koncentrace pro tento děj je $IC_{100} = 20 \mu\text{g/ml}$. Vybrané deriváty rovněž inhibovaly vznik soubuní s $IC_{100} = 20\text{--}40 \mu\text{M}$ ^{33, 34, 35}. Kyselina pomolová (**14**) a oleanolová (**7**) jsou v této oblasti rovněž aktivní. Oba dva zástupci působí na H9 lymfocytech pro replikaci HIV v koncentracích $1,4 \mu\text{g/ml}$ a $1,7 \mu\text{g/ml}$. Nejúčinnější derivát kyseliny oleanolové (**15**) vykazoval aktivitu již při hodnotě $EC_{50} = 0,0039 \mu\text{g/ml}$ s terapeutickým indexem 3 570³⁶. Některé terpeny vykazují aktivitu vůči HIV-1 reverzní transkriptáze. Jsou jimi například lupenol (**16**) ($IC_{50} = 2,1 \mu\text{M}$), betulin diacetát (**17**) ($IC_{50} = 1,4 \mu\text{M}$), karounidiol-29-benzoát (**18**) ($IC_{50} = 2,2 \mu\text{M}$)³⁷. Kyselina ursolová (**9**), oleanolová (**7**) a betulinová (**5**), uvaol (**19**), α -hederin (**20**) inhibovali enzym HIV-1 proteázu v koncentracích jednotek μM ³⁸. Dalším účinkem je inhibice uvolnění virionu při procesu zrání. Tento účinek prokazuje amidový derivát kyseliny betulinové a to již při koncentraci $EC_{50} = 0,011 \mu\text{g/ml}$ ³⁹.



Obrázek 5: Pomolová kyselina (**14**), derivát kyseliny oleanolové (**15**), Lupenol (**16**), Betulin diacetát (**17**), Karounidiol-29-benzoát (**18**), Uvaol (**19**), Hederin (**20**)

3.1 Cytotoxicita

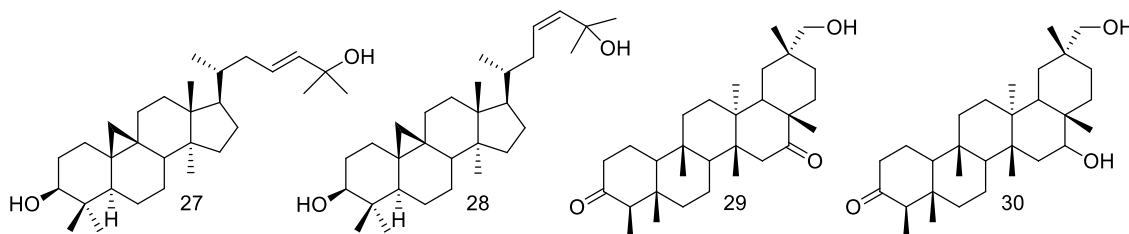
Cytotoxicita obecně je schopnost chemických látek zabíjet buňky. Buněčných linií, proti kterým triterpeny a jejich deriváty působí, je nepřeberné množství⁴⁰. Například extrakt z listů ořešáku čínského (*Juglans sinensis*) vykazoval cytotoxicitu vůči liniím B16F10 (melanom myši), Hep-2 (lidský karcinom hrtanu), MCF-7, U87-MG (gliom). Rozborem bylo zjištěno, že největší podíl extraktu tvoří tři deriváty ursanu (**3**). Jedním z nich je třeba derivát **21**⁴¹. Extrakt z plaménku (*Clematis argentilucida*) byl aktivní vůči linii HL-60 (leukémie), Hep-G2 (rakovina jater), U251MG (gliom). Majoritní složku extraktu tvoří saponinové deriváty hederageninu (**22**) a oleanolové kyseliny (**7**)⁴². Analýzou pryskyřice ambroně západní (*Liquidambar styraciflua*) byl zjištěn obsah celkem deseti triterpenoidů. Jako aktivní vůči linii MDA-MB435S (rakovina prsu) se prokázaly sloučeniny 3-oxo-11 α ,12 α -epoxy-olean-28,13 β -olid (**23**) s IC₅₀ = 3,06 μ g/ml, 3-oxo-12 α -hydroxy-olean-28,13 β -olid (**24**) s IC₅₀ = 6,19 μ g/ml, kyselina oleanolová (**7**) s IC₅₀ = 6,73 μ g/ml⁴³. Z listů mahagonového stromu *Dysoxylum cumingianum* bylo získáno celkem deset triterpenů s různou aktivitou vůči linii KB (rakovina kůže), MC7 (rakovina prsu), KB-C2 (rakovina děložního hrdla). KB-C2 patří mezi rezistentní kmeny a právě proti této linii byly objeveny 2 sloučeniny Cumingianol A (**25**) a Cumingianol B (**26**) s IC₅₀ = 1,2 a 1,3 μ g/ml⁴⁴.



Obrázek 6: Aktivní ursanový derivát (**21**), hederagenin (**22**), aktivní oleananové deriváty (**23,24**), cumingianol A (**25**), cumingianol B (**26**)

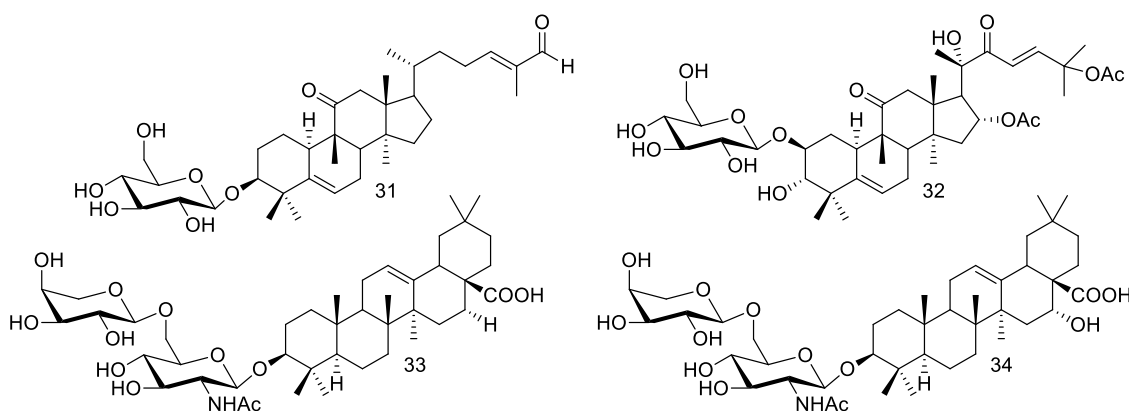
Extrakt z Pryšce (*Euphorbia macrostegia*) byly získány celkem 4 triterpeny z nichž jako aktivní vůči linii MDA-MB48 (rakovina prsu) se ukázal být cykloart-23(E)-ene-3 β ,

25-diol (**27**) s $IC_{50} = 2,05 \mu\text{g/ml}$. Také cykloart-23(Z)-ene-3 β , 25-diol (**28**) vůči MCF-7 s $IC_{50} = 5,4 \mu\text{g/ml}$ ⁴⁵. Z kůry rostliny *Maytenus robusta* bylo izolováno celkem 7 triterpenů. Z toho dvě látky byly aktivní vůči 4T1 (rakovina prsu) a to 3,16-dioxo-29-hydroxyfriedelan (**29**) s $IC_{50} = 9,8 \mu\text{g/ml}$ a 3-oxo-16 β ,29-hydroxyfriedelan (**30**) s $IC_{50} = 1,23 \mu\text{g/ml}$ ⁴⁶.



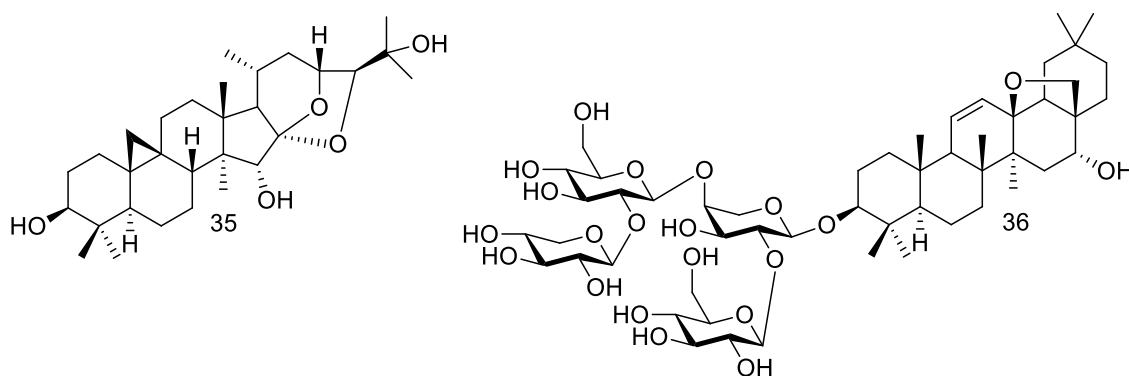
Obrázek 7: Látky 27-30

Z kořene rostliny *Hemsleya penxianensis* bylo získáno celkem 6 triterpenových derivátů. Nejzajímavějším z nich je hemslepensid A (**31**) s inhibiční konstantou $IC_{50} = 0,46 \mu\text{g/ml}$ vůči H460 (rakovina plic), $IC_{50} = 0,64 \mu\text{g/ml}$ na SW620 (rakovina tlustého střeva) a $IC_{50} = 0,78 \mu\text{g/ml}$ na COLO205 (rakovina tlustého střeva). Dále 16,25-O-diacetyl-cucurbitacin F-2-O- β -D-glucopyranosid (**32**) s $IC_{50}(\text{H460}) = 3,43 \mu\text{g/ml}$, $IC_{50}(\text{SW620}) = 0,42 \mu\text{g/ml}$ a $IC_{50}(\text{COLO205}) = 0,44 \mu\text{g/ml}$ ⁴⁷. V extraktu kůry a listů tropického stromu *Albizia inundata* bylo nalezeno celkem 9 triterpenů oleananového typu. Čtyři z toho se ukázaly jako aktivní vůči liniím B16F10, SKMEL28 (rakovina kůže) a JMAR, MDA1986 (epitelové buňky v krku). Konkrétně {3-O-[R-L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 6)]-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl oleanolová kyselina (**33**) s $IC_{50}(\text{B16F10}) = 4,7 \mu\text{g/ml}$, $IC_{50}(\text{MDA1986}) = 7,3 \mu\text{g/ml}$ a {3-O-[R-L-arabinopyranosyl(1 \rightarrow 6)]-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl echinocystová kyselina (**34**) s $IC_{50}(\text{JMAR}) = 2,8 \mu\text{g/ml}$, $IC_{50}(\text{SKMEL28}) = 9,2 \mu\text{g/ml}$ ⁴⁸.



Obrázek 8: Látky 31-34

Ve výtažku byliny ploštičnicku evropského (*Cimicifuga foetida*) bylo nalezeno celkem 19 triterpenových látek. Jednou z nich je cimigenol (**35**) s IC_{50} na SMMC-7721 (rakovina jater) rovnou 7,87 $\mu\text{g/ml}$ a $IC_{50}(\text{A549}) = 12,16 \mu\text{g/ml}$. Obě hodnoty jsou nižší než u použitého standardu DDP. Dalších třináct triterpenů mělo $IC_{50} > 40$ a zbylých pět se pohybovalo s hodnotou IC_{50} kolem 20 vůči jedné z linií (HL-60, SMMC-7721, A-549, MCF-7, SW-480)⁴⁹. Extrakcí z rostliny *Polycarpha corymbosa* byly získány celkem 4 triterpeny. Jeden z nich 3 β -O-(β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- α -L-arabinopyranosyl)-13 β ,28-epoxyolean-11-en-16 α -ol (**36**) který prokázal aktivitu vůči linii SW-480 s $IC_{50} = 4,61 \mu\text{g/ml}$ a DU145 (rakovina prostaty) s $IC_{50} = 17,82 \mu\text{g/ml}$. Další 3 látky se pohybovaly s IC_{50} kolem hodnoty 25 $\mu\text{g/ml}$ ⁵⁰.



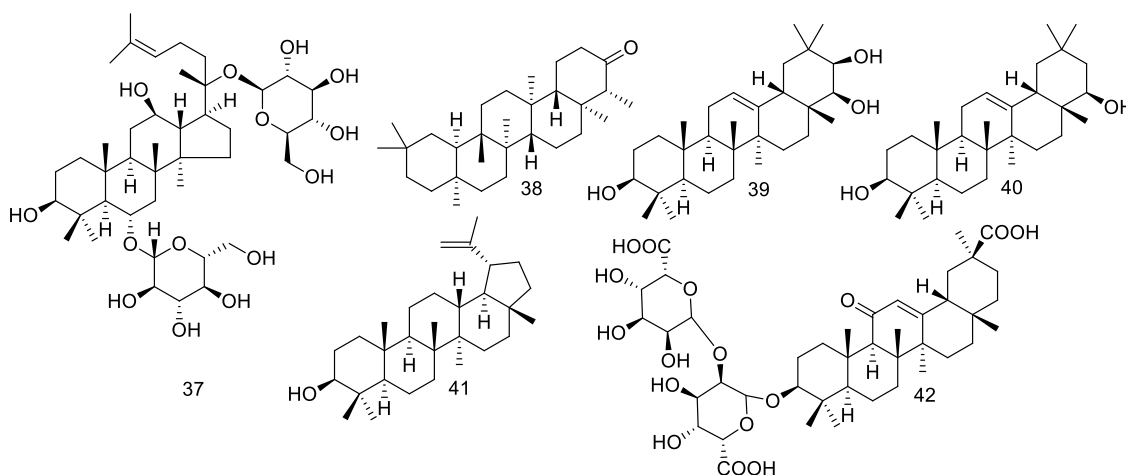
Obrázek 9: Cimigenol (**35**), látka **36**

3.2 Protektivita

3.2.1 Hepatoprotektivní účinky

Z triterpenických látek jsou Ursolová (**9**) a Oleanolová (**7**) kyselina zkoumány pro své hepatoprotektivní účinky. Mechanismus účinku není jednoduchý. Probíhá suprese enzymů podílejících se na poškození jater jako například cytochrom P450, cytochrom b5, cytochrom P1A, cytochrom P2A. Současně dochází ke zvýšení množství antioxidantních látek jako je glutathion, metalothionein, zinečnaté ionty, glutathion-S-transferasa, glukuronosyltransferasa. U myši byla pozorována ochrana jater po podání kyseliny oleanolové před tetrachlormetanem, což souvisí s inhibicí exprese cytochromu P450 2E1. Také před acetaminofenem. Jeho podání vedlo ke zvýšení aktivity glukuronosyltransferasy. Látka tak více podléhala glukuronizaci a vylučovala se močí ve větší míře. Indukce tvorby metalothieninu způsobilo vyšší odolnost jaterních buněk vůči brombenzenu, foloidinu, kademnatým iontům, endotoxinu, thioacetamidu, furosemidu, kolchicinu. Oleanová kyselina nemá žádný účinek vůči toxicitě dimethylnitrosaminu, α -

amanitinu, chloroformu, allylalkoholu. Větší hepatoprotektivitu měl v experimentálních modelech akutní a chronické toxicity ginsenosid (37) odvozený od oleanolové kyseliny (7). Ochrana hepatocytů není vlastní jen těmto kyselinám. Aktivní je řada dalších triterpenoidů jako ursolová kyselina (9), betulin (6), friedelin (38), soyasapogenol A a B (39, 40), uvaol (19), lupeol (41), α -hederin (20), glycyrrhizin (42), vůči acetaminofenu, tetrachlormetanu, chloridu kademnatému⁵¹.

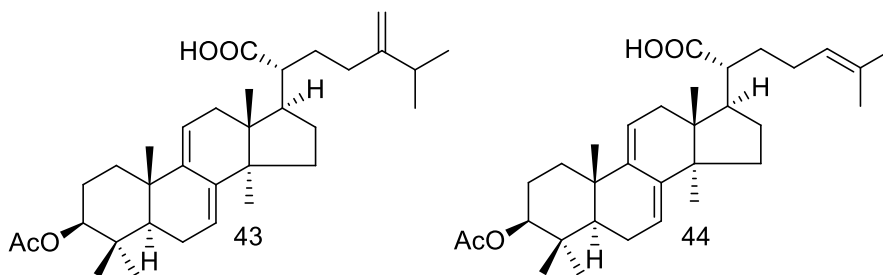


Obrázek 10: Ginsenosid (37), friedelin (38), soyasapogenol (39, 40), lupeol (41), glycyrrhizin (42)

3.2.2 Nefroprotektivní účinky

Novým potencionálním uplatněním triterpenů je zmírnění nefrotoxických účinků při léčbě rakoviny pomocí cis-platiny. Ta se hromadí v renálních tubulárních buňkách a způsobuje apoptózu, nekrózu a záněty v důsledku oxidativního stresu. Předpokládá se, že cis-platina vytváří v buňkách reaktivní kyslíkové sloučeniny které způsobují aktivaci MAP kináz a cytochrom c-dependentní kaspázy 3. Z houby pórnatky kokosové (*Poria cocos*) bylo extrahováno celkem 10 lanostanových triterpenoidů. Dva z nich inhibovaly aktivitu zmíněných enzymů. A to monoacetát kyseliny dehydroeburikové (43) a 3 β -acetoxylanosta-7,9(11),24-trien-21-ová kyselina (44). Testy byly prováděny na buňkách LLC-PK1 a prokázaly snížení úmrtnosti buněk během 24 hodin ze 40 % na 20 %⁵². Dalším případem, kdy byl prokázán protektivní účinek na ledvinách, byl dokumentován v případě kyseliny ursolové (9). Ta byla otestována s aminoglykosidyckým antibiotikem gentamycinem. To se používá kvůli rychlému nástupu účinku, nízké rezistenci a dobré synergii s ostatními léčivy. Nevýhodou tohoto antibiotika je nefrotoxicita způsobená zvýšením kreatininu v krevní plazmě, zvýšení hladiny močoviny v krvi. Rovněž jsou

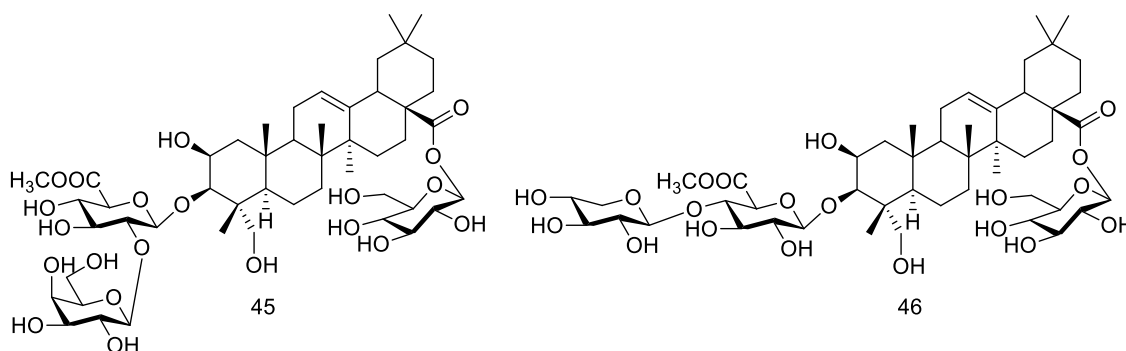
poškozovány tubulární buňky v důsledku oxidativního stresu. Test na myších prokázal značný efekt při podávání 10 mg/kg ursolové kyseliny proti 80 mg/kg gentamicinu⁵³.



Obrázek 11: Látky 43, 44

3.2.3 Neuroprotektivní účinky

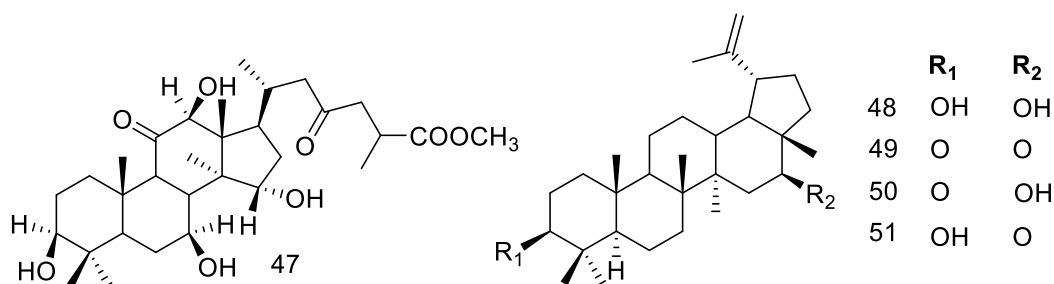
Nemoci jako Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, amyotrofická laterální skleróza, Huntingtonova choroba a jiné mají jeden společný znak. Tím jsou zvýšené hodnoty biomarkerů pro oxidativní stres. Oxidativní stres je rovněž důležitý pro regulaci buněčných funkcí jako aktivace apoptózy a transport iontů v astrocytech a mikroglíích. Rozbor výtažku z tolíce vojtěšky (*Medicago sativa*), rostliny užívané v tradiční čínské medicíně odhalil značný obsah triterpenických saponinů. Jsou jimi 3-O-[β -D-galactopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucuronopyranosid]-28-O- β -D-glucopyranosyl-bayogenin (45), 3-O-[β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-glucuronopyranosid]-28-O- β -D-glu-copyranosyl-bayogenin (46). Tyto látky byly otestovány na mozkových buňkách SH-SY5Y po vystavení 600 μ M roztoku peroxidu vodíku. První zmíněná látka zvýšila množství přeživších buněk o 6 % a druhá o 12 %. Jako pozitivní kontrola byl použit Trolox se 17% navýšením. Všechny látky byly podány v 100 μ M koncentraci⁵⁴.



Obrázek 12: Látky 45, 46

Z houby Lesklokorky lesklé (*Ganoderma lucidum*) bylo získáno 7 různých triterpenoidů. Látky byly podrobeny dvěma testům ABTS a ORAC na rozpoznání antioxidačních vlastností. Jako aktivní se ukázal být methyl ganoderát G1 (47). Tato látka byla dále testována na buňkách SH-SY5Y jako ochrana před oxidativním stresem způsobeným

roztokem 200 μM H_2O_2 . Ze skupiny bez přidaných triterpenoidů přežilo po dvanácti hodinách 42 % buněk. Triterpen byl přidán v dávce 40 μM . Ve vzorku s methyl ganoderátem G1 (**47**) po dvanácti hodinách přežilo 63 % buněk. Jako pozitivní kontrola byl použit Luteolin s kterým přežilo 74 % buněk⁵⁵. Z pryskyřice Topolu eufratského (*Populus euphratica*) bylo extrahováno celkem 10 triterpenů, mezi nimi struktury odvozené od oleananu (**4**) a ursanu (**3**). Všechny látky byly otestovány na buňkách myšího hipokampu HT-22 jako ochrana před oxidativním stresem způsobeným peroxidem vodíku. Jako aktivní se ukázaly být ursanové typy struktur s jedním společným znakem a to prezencí α , β -nenasycené ketonové skupiny⁵⁶. Dalším faktorem pro vznik neurodegenerativních onemocnění je hromadění látky amyloid- β v extracelulárním prostoru mozku. Amyloid- β je tvořen ze svého prekurzoru enzymem BACE1 (β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1). Nalezení vhodných inhibitorů tohoto enzymu je cíl řady vědců. Takovým inhibitorem je například 3,16-dioxo-lup-20(29)-en (**49**) připraveným oxidací calenduladiolu (**48**). Jedná se o kompetitivní inhibici. IC_{50} této látky bylo stanoveno 16,77 μM . Oproti tomu měl quercetin použitý jako pozitivní kontrola $\text{IC}_{50} = 8,68 \mu\text{M}$. Byly také připraveny deriváty calenduladiolu s pouze jednou oxidovanou hydroxy skupinou (**50**, **51**). Oba deriváty byly méně aktivní než výchozí látka. V případě dalších úprav bylo vždy nutné aby na uhlíku 3 byla keto skupina⁵⁷.



Obrázek 13: Schéma připravených derivátů **47-51**

4 Click reakce na triterpenech

Click reakce je 1,3-dipolární cykloadiční reakce azidu s terminálním, nebo vnitřním alkynelem za vzniku 1,2,3-triazolu. Jako první ji popsal v roce 1961 Rudolf Huisgen⁵⁸. Reakce obvykle proběhnou do 6 až 36 hodin za pokojové teploty, nebo mírného zahřívání. Pokud jsou katalyzovány měďnými ionty, vznikají 1,4-triazoly. Měďné ionty je možné do reakce přidat jako takové, nebo se do reakční směsi přidají

Cu^{+2} ionty a ty jsou pak redukovány například přidavkem askorbanu sodného. Dále je možné reakce katalyzovat ionty Ru^{+1} , kdy vznikají 1,5-triazoly. Reakci je možné provádět v široké paletě rozpouštědel od alkoholových s příměsí vody po organická halogenovaná⁵⁹.

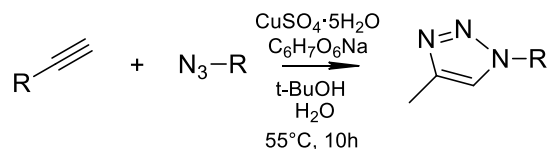
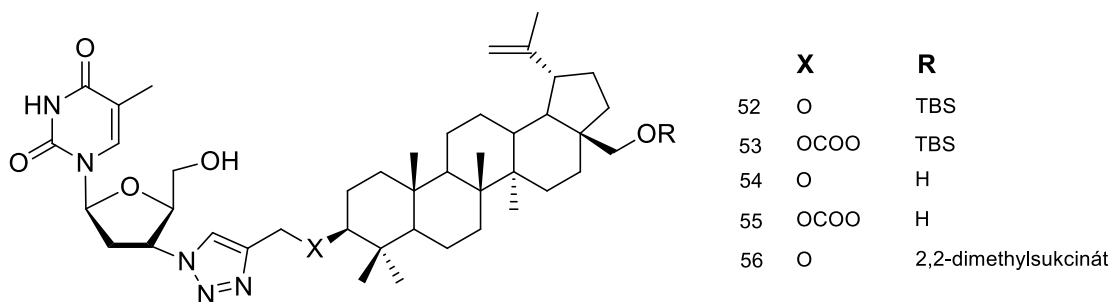


Schéma 1: Příklad click reakce

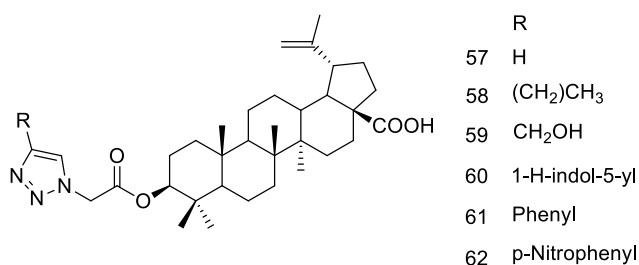
4.1 Modifikace na C-3

První kdo modifikoval lupanové triterpeny pomocí click reakce na pozici 3 byli Bori a kolektiv⁶⁰. Jednalo se o přípravu šesti konjugátů azidotymidinu (AZT) a betulinu, nebo betulinové kyseliny za použití azido-alkynové cykloadiční reakce s účelem nalézt anti-HIV aktivní sloučeniny. Terpen byl modifikován propargylovou skupinou za použití etherového, nebo karbonylového linkru. AZT tak reagoval skrze azidovou skupinu s trojnou vazbou. Látky **52** a **56** prokázaly antivirovou aktivitu s hodnotami EC_{50} 0,19 μM a 0,35 μM . Etherický linker v poloze 3 sloučeniny **52** byl pro aktivitu mnohem příznivější než její ekvivalent s karbonylovým linkerem. Dá se předpokládat, že karbonylový linker snáze podléhá enzymatickému štěpení a metabolické degradaci, a proto v případě jeho použití dochází ke ztrátě aktivity. Konjugáty s volnou hydroxy skupinou na uhlíku 28 (**54** a **55**) a karboxy skupinou jsou neaktivní oproti těm s *tert*-butyldimetylsilyl etherem nebo 2,2-dimetylsukcinylní esterem. V podstatě bylo zjištěno, že krátká vzdálenost mezi AZT a triterpenem, vyšší stabilita linkeru jsou důležité vlastnosti pro antivirovou aktivitu. Navíc je potřeba substituovat -OH nebo -COOH skupinu v poloze 28.



Obrázek 14: Připravené lupanové deriváty **52-56**⁶⁰

V publikaci z 2015 od Chakrabortyho a kolektivu⁶¹ bylo popsáno dvanáct nových derivátů betulinové kyseliny nesoucí triazolovou jednotku připravených azid-alkyn click reakcí. Nejprve zavedli 2-azidoacetát do pozice 3 betulinové kyseliny a pak jej nechali reagovat s řadou alkynů. Všechny sloučeniny byly testovány na pěti rakovinných buněčných liniích a jedné nerakovinné lidské linii. Všechny deriváty byly aktivní až při vysoké mikromolární koncentraci s výjimkou analogu **59** jehož IC₅₀ na linii HT-29 (rakovina tlustého střeva) byla 14,9 μM. Ukázalo se, že látka **59** je induktorem apoptózy, což bylo dokázáno několika nezávislými biologickými testy. Více pokročilé *in silico* biofyzikální studie naznačují že příčinou apoptózy je navázání této látky do malého žlábků DNA.



Obrázek 15: Příprava triazolových derivátů **57-62**⁶¹

4.2 Modifikace na C-28

V publikacích z 2010 a 2011 bylo připraveno devět nových 1,2,3-triazolových konjugátů betulinové kyseliny^{62, 63}. Reakční sekvence začíná přípravou aldehydu **63** který poté nechali reagovat se směsí vhodného alkynu a *n*-BuLi za vzniku triterpenického alkynu **64**. Následovala reakce s organickými azidy za vzniku sloučenin **65-67** a dalších analogů. Protinádorová aktivita všech připravených látek byla testována na sérii 15 lidských rakovinných typů buněk. Látky též prošly kalorimetrickým SRB testem. Pouze látky **65-67** byly aktivní s nejlepší hodnotou IC₅₀ 10,3 μM na A253 (rakovina plic), 3,6 μM na MCF-7 a 2,5 μM na HCT-8 (rakovina tlustého střeva). Přičemž analoga s cukernou jednotkou byly neaktivní.

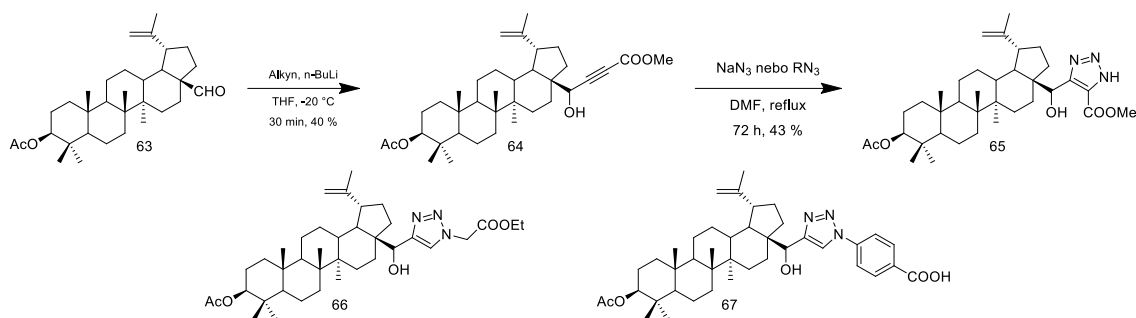


Schéma 2: Syntéza triterpenových triazolů na C-28^{62, 63}

4.3 Lupanové triterpeny modifikované na C-2, C-30, nebo jiných částech skeletu

Lupanová analoga upravená na uhlíku 30 (obsahující triazolový kruh) byla připravena Antimonovou a kolektivem⁶⁴. Autoři nejprve připravili výchozí látky **68** a **69** a poté je nechali reagovat s řadou alkynů za vzniku požadovaných triazolových derivátů **70-81**. Finální látky byly testovány na mutagenitu pomocí Amesova testu. Test byl proveden na kmenu bakterií *Salmonella typhimurium*. Látky byly testovány v koncentraci 0,01 M. Jako pozitivní kontrola byl použit DMSO. Statistická odchylka ve zvýšení mutagenity byly zanedbatelná a závěrem publikace bylo, že látky nemají mutagenní vlastnosti.

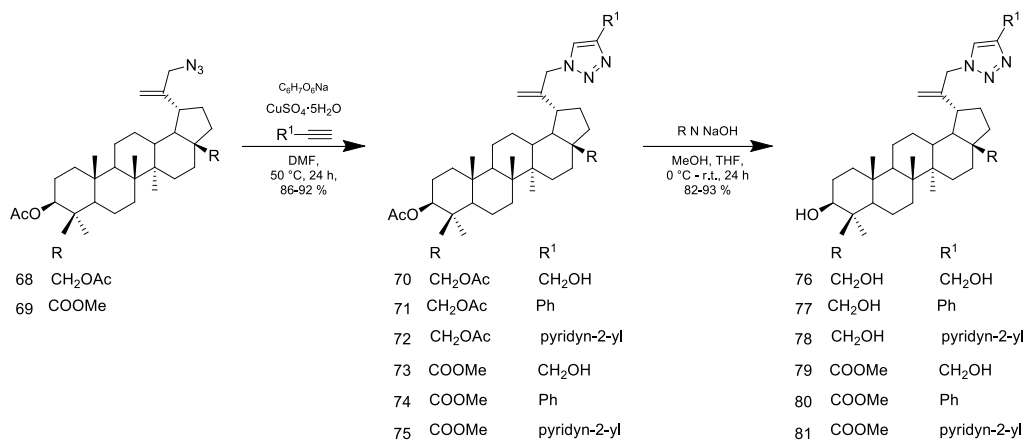
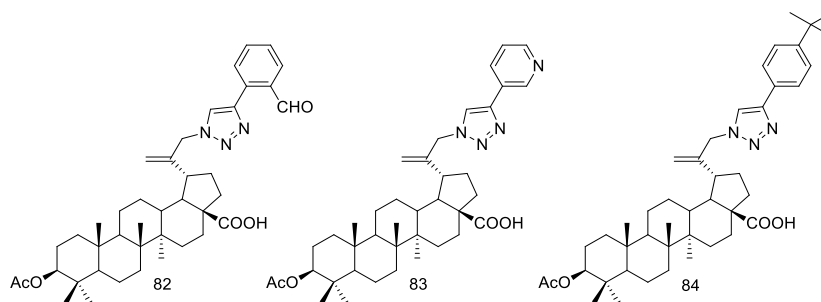


Schéma 3: Triazolové deriváty (**68-81**) od Antimonové a spoluautorů⁶⁴

V článku od Šidové a kol. bylo připraveno 24 nových substituovaných triazolových derivátů betulínové kyseliny a také byla měřena jejich cytotoxicita⁶⁵. Dle testů nejvíce aktivní látky byly ty s 3β-O-acetylem na uhlíku 3 uhlíku, zatím co látky s 3β-OH nebo 3β-O-Si-Ph₃ aktivní nebyly vůbec. Benzaldehydový substituent na triazolovém cyklu látky **82** byl nejvíce cytotoxický ze série s hodnotou IC₅₀ = 3,3 μM a terapeutickým indexem 9,1. Mimo látku **82** dosáhly ještě hodnot IC₅₀ pod 10 μM sloučeniny **83** a **84**.

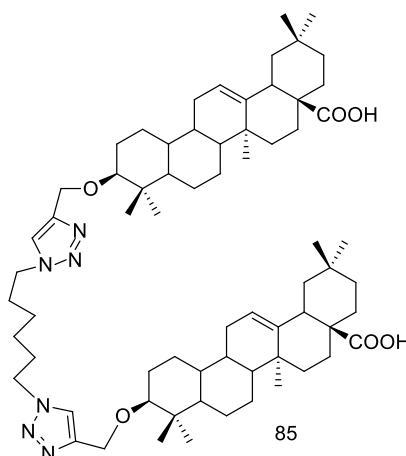
Mechanismem působení je zřejmě inhibice syntézy DNA a RNA a zastavení buněčného cyklu na rozhraní G0/G1 fází.



Obrázek 16: Triazolové konjugáty (82-84) připravené Šídovou a kol.⁶⁵

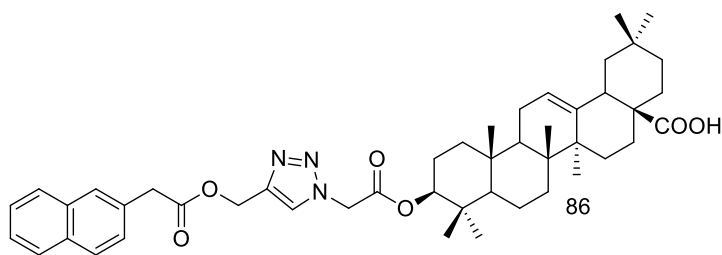
4.4 Oleananové triterpeny s modifikovaným C-3

Cheng a spoluautoři vydali dvě publikace zaměřené na inhibitory glykogenfosforyláz^{66, 67}. Autoři připravili čtyři glukokonjugáty a dva dimerní deriváty kyseliny oleanolové. Obě skupiny s triazolovým kruhem na C-3. Nejpotentnější se ukázala být látka **85** s $IC_{50} = 2,59 \mu M$.



Obrázek 17: Derivát (85) oleanolové kyseliny připravené Chengem a spol.^{66, 67}

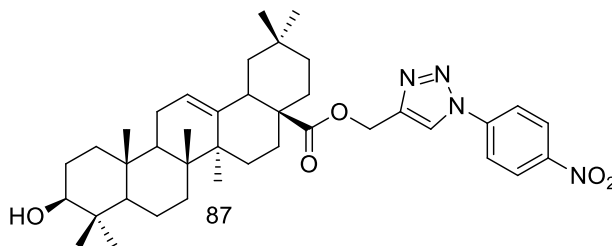
Publikace od Zhanga a spoluautorů popisuje sedm nových triazolových derivátů oleanolové kyseliny⁶⁸. Látky byly biologickými testy *in vitro* jako potencionální antidiabetika. Látky byly testovány jako inhibitory glykogen fosforylázy a také na rakovinných buňkách Hep G2 kde se sledovala jejich spotřeba glukózy. Z této série byla aktivní látka **86**, která měla inhibiční koncentraci na králičí glykogen fosforylázu $5,4 \mu M$ a její přidání k buňkám Hep G2 způsobilo zvýšení spotřeby glukózy. Mechanismus působení této látky byl studován dokováním.



Obrázek 18: Látka **86** ze série Zhanga a spoluautorů⁶⁸

4.5 Oleananové triterpeny s modifikovaným C-28

Knihovna 25 derivátů oleanolové kyseliny modifikované na uhlíku 28 Huisgenovou cykloadicí byla syntetizována a popsána Weiem a spoluautory⁶⁹. Látky byly poté testovány MTT testem proti buňkám HeLa (karcinom děložního čípku), Hep G2, HCT116 (rakovina tlustého střeva), A375-S2 (rakovina kůže), HT1080 (fibrosarkom). Většina ze syntetizovaných látek byla aktivnější než oleanolová kyselina. Nejvíce úspěšnou byla látka **87** s $IC_{50}(A375-S2) = 4,97 \mu M$ a $IC_{50}(HT1080) = 3,51 \mu M$.



Obrázek 19: Látka **87** od Weie a spol.⁶⁹

Cíle práce

1. Provedení literární rešerše na téma biologických aktivit triterpenů a click reakcí triterpenů.
2. Příprava výchozích sloučenin, zavedení propargylového substituentu do molekul aktivních triterpenů.
3. Prozkoumání reakcí propargylovaných derivátů s vybranými organickými azidy prostřednictvím Huisgenovy cykloadice za vzniku 1,2,3-triazolů. Vzniklé produkty by měly obsahovat další polární skupiny, čímž by se mohlo dosáhnout lepší rozpustnosti ve vodném prostředí.
4. Charakterizace nově připravených sloučenin a interpretace spektrálních dat (^1H a ^{13}C NMR, HRMS, IČ).
5. Příprava vzorků na testování cytotoxicity a neuroprotektivity ve spolupráci s laboratoří experimentální medicíny (ÚMTM, LF-UP) a ústavem experimentální botaniky (Př. F. UP a AV-ČR).

Výsledky a diskuse

5 Příprava výchozích sloučenin

K prozkoumání click reakcí triterpenů obsahujících propargylový substituent bylo nejprve potřeba připravit výchozí propargyl ester, tedy nejprve oxidovat polohu C-30 na aldehyd allylovou^{70, 71} oxidací a dále na kyselinu Pinnickovou oxidací upraveným postupem dle literatury⁷². Následně byla provedena alkylace karboxylové skupiny s využitím propargylbromidu.

5.1 Příprava propargylesterů 88 a 89

Ze sloučenin **6** a **17** byly připraveny aldehydy **6a** a **17a**. Reakce byla provedena dvěma ekvivalenty oxidu seleničitého v 2-metoxyethanolu⁷⁰ viz. **schéma 12**. Optimalizace byla provedena v minulosti týmem přírodních látek, který vycházel z publikace⁷¹. Obvyklý výtěžek optimalizované reakce (v rámci této práce byla opakována pětkrát) se pohyboval kolem 80 %.

Aldehydy **6a** a **17a** byly dále oxidovány na karboxylové kyseliny **6b** a **17b** pomocí Pinnickovy oxidace provedené dle článku⁷². Autoři popisují oxidaci alifatických i aromatických aldehydů za tvorby kyselin s vysokou výtěžností, mnohdy kolem 90 %. Kvůli omezené rozpustnosti jsme oproti literatuře⁷² použili *tert*-butyl alkohol jako rozpouštědla místo acetonitrilu. Dále bylo potřeba použít více ekvivalentů chloritanu sodného a dihydrogenfosforečnanu draselného. Na rozdíl od lit.⁷² byl v našem případě pro průběžné odstraňování radikálů z reakce použit 2-methylbut-2-en místo peroxidu vodíku; reakcí peroxidu vodíku s dvojnou vazbou v poloze 20(29) u lupenových derivátů vzniká epoxid a mohlo by tak dojít ke vzniku nechtěných vedlejších produktů. Obvyklý výtěžek reakce (byla opakována pětkrát) se pohyboval kolem 85 %.

Alkylace karboxylových kyselin **6b** a **17b** byla provedena v THF s pěti molárními ekvivalenty propargylbromidu a dvaceti molárními ekvivalenty uhličitanu draselného. Reakční směs byla přivedena k varu a míchána minimálně tři a půl hodiny. Mírné zlepšení výtěžku reakce bylo pozorováno, pokud byl nejprve přidán samotný K₂CO₃ a až po 30

min refluxu byl přidán propargylbromid. Výtěžek této reakce pro látky **88** a **89** se pohyboval okolo 81 %.

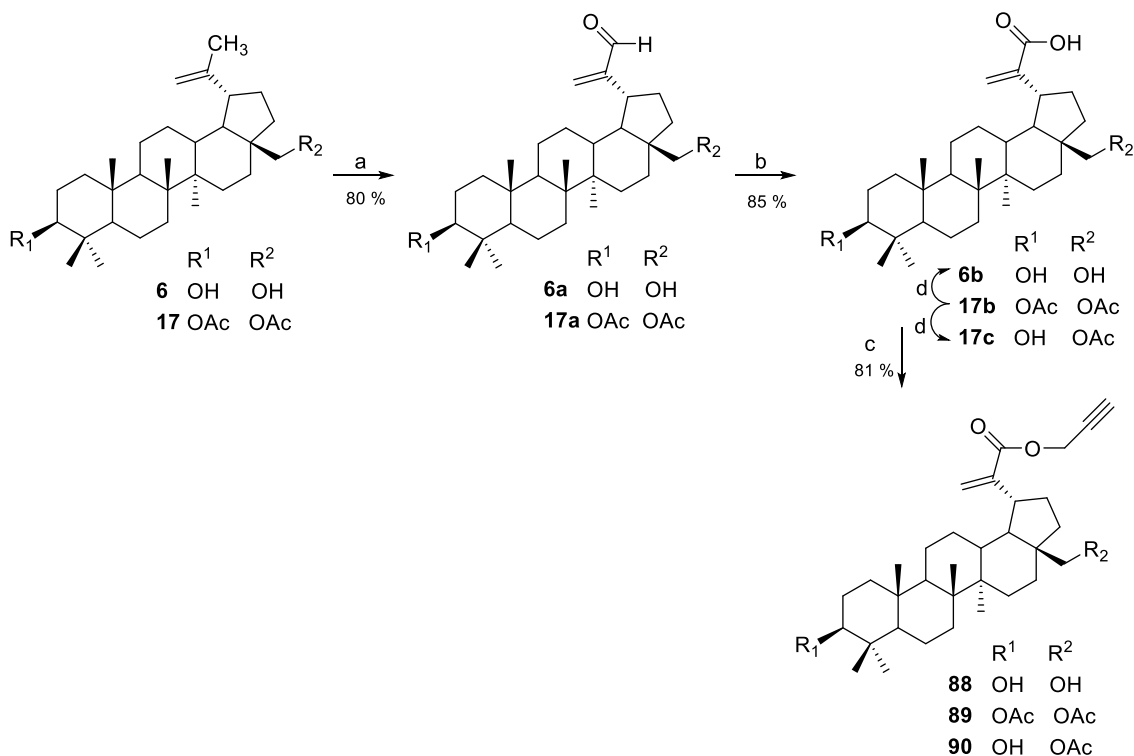


Schéma 4: Příprava propargylesterů (**88-90**). Reakční podmínky: a) SeO_2 (2 ekviv.), 2-methoxyethanol, reflux, 4 h; b) NaClO_2 (5 ekviv.), KH_2PO_4 (5 ekviv.), 2-methylbut-2-en, *t*-BuOH, H_2O ; c) K_2CO_3 (20 ekviv.), propargyl bromid (5 ekviv.), THF, reflux, 3,5 h; d) NaOH (12 ekviv.), THF, MeOH, 85 °C, 10 h

Struktura všech výchozích látek byla potvrzena spektrálními daty. U molekuly **6a** a **17a** byl kromě obvyklých signálů triterpenické molekuly nalezen v ^1H spektru nový signál aldehydického vodíku při $\delta = 9.5$ ppm. V IČ spektrech byla detekována absorpce 1732 (**17a**) a 1735 (**6a**) cm^{-1} charakteristická pro aldehydickou skupinu. Dále hodnota 1612 (**6a**) a 1687 (**17a**) cm^{-1} charakteristická pro dvojnou vazbu mezi uhlíkem 20 a 29. V případě látky **6a** hodnota 3393 cm^{-1} charakteristická pro OH skupinu. Analýzou obou látek **6a** a **17a** v HRMS byly identifikovány píky odpovídající molekulovým iontům těchto látek.

U molekul **6b** a **17b** v ^1H spektrech zmizely oproti molekulám **6a** a **17a** signály aldehydického vodíku a došlo k mírné změně chemického posunu signálů vodíků dvojně vazby H-29. V IČ spektrech byly detekovány absorpční pásy okolo vlnočtu 1720 cm^{-1} charakteristická pro karboxylovou skupinu. Dále 1690 (**17b**) a 1621 (**6b**) cm^{-1} což je charakteristická hodnota pro C=C vazbu a 3300 (**17b**), 3364 (**6b**) cm^{-1} charakterizující

OH skupinu. V HRMS spektrech sloučenin **6b** a **17b** byly detekovány píky molekulových iontů těchto látek.

U molekuly **88**, **89** a **90** byly kromě obvyklých signálů triterpenu nalezeny v ^1H spektru signály vodíků propargylové skupiny: triplet při $\delta = 2.47$ ppm ($\text{C}\equiv\text{CH}$) a dva dublety dubletů diastereotopních vodíků $\text{HC}\equiv\text{C}-\text{CH}_2$ skupiny při 4.74 a 4.77 ppm. V IČ spektrech byla detekována absorpce 2130 (**88**), 2132 (**90**) a 2121 (**89**) cm^{-1} charakteristická pro trojnou vazbu. Potom 1715 (**88**), 1716 (**89**) a 1728 (**90**) cm^{-1} což je charakteristická hodnota pro $\text{C}=\text{O}$ vazbu. Následně hodnoty 1632 (**88**), 1702 (**89**) a 1632 (**90**) charakteristické pro dvojnou vazbu. V neposlední řadě také 3303 (**89**) a 3551, 3286 (**90**) charakteristické hodnoty absorpce hydroxylových skupin. V HRMS spektrech všech tří sloučenin **88**, **89**, **90** byly detekovány píky odpovídající molekulovým iontům.

Sloučenina **17c** a z ní připravená molekula **90** byly získány omylem při jednom z přísunů, kdy došlo k neúplnému ochránění acetylových skupin molekuly **17b** – acetát v poloze 28 zůstal a místo **6b** byla získána látka **17c**, což bylo zjištěno až v dalších krocích až z NMR spektra sloučeniny **90**. Vzhledem k malému množství připravené látky **90** jsme provedli pouze dvě průzkumné cykloadiční reakce, pokus o další hydrolyzu proveden, neboť bychom se dostali o krok zpět a získali jen nepatrné množství produktu **6a**. Potvrzení, že acetátová skupina zůstala v poloze 28 je jednoznačné z ^1H NMR spektra, které obsahuje pouze jeden singlet o intenzitě 3H v oblasti acetátů (δ kolem 2 ppm) a chemický posun signálu vodíku H-3 α (velmi charakteristický, nezaměnitelný dublet dubletů) se pohybuje kolem hodnoty δ 3.17 ppm. V případě, že by acetátová skupina zůstala v poloze 3, byl by tento chemický posun až při δ cca 4.50 ppm.

5.2 Příprava výchozích azidů

Kromě dvou případů byly všechny organické azidy připraveny nukleofilní substitucí bromu, nebo chloru z komerčně dostupných halogenderivátů za azidovou skupinu. Výchozí halogenderivát byl nejprve rozpuštěn v dimethylformamidu (DMF) a následně k němu byly přidány dva molární ekvivalenty azidu sodného. Reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě po dobu šesti hodin. Následně byl produkt extrahován do ethylacetátu a odparek byl použit do click reakcí.

V případě furfurylalkoholu a 2-Thiophenmethanolu byla substituovaná alkoholová skupina za azidovou podle publikace Thompsona a spoluautorů⁷³. Použitý alkohol byl rozpuštěn v suchém toluenu a bylo k němu přidáno 1,2 molárního ekvivalentu DPPA. Směs byla ochlazená na 0 °C a poté bylo přidáno 1,2 molárního ekvivalentu DBU. Reakce proběhla v souladu s lit.⁷³ a surový odparek byl přidán do click reakce.

Odhad dokončení reakce halogenderivátů s azidem sodným pomocí TLC byl mnohdy obtížný. V některých případech byla výchozí látka i produkt UV aktivní a skvrny byly patrné i po vypálení kyselinou sírovou. Někdy však šla vidět pouze jedna z látek, nebo žádná. Rovněž bylo třeba z produktu důkladně odsát zbytková rozpouštědla, nebo jej neprodleně použít do click reakce. V opačném případě produkt degradoval, což se projevilo změnou barvy. Špatná stabilita těchto azidů byl jeden z hlavních důvodů, proč byly připraveny a ne koupeny a proč nebyly zcela vyčištěny a charakterizovány, ale použity do reakcí v surovém stavu.

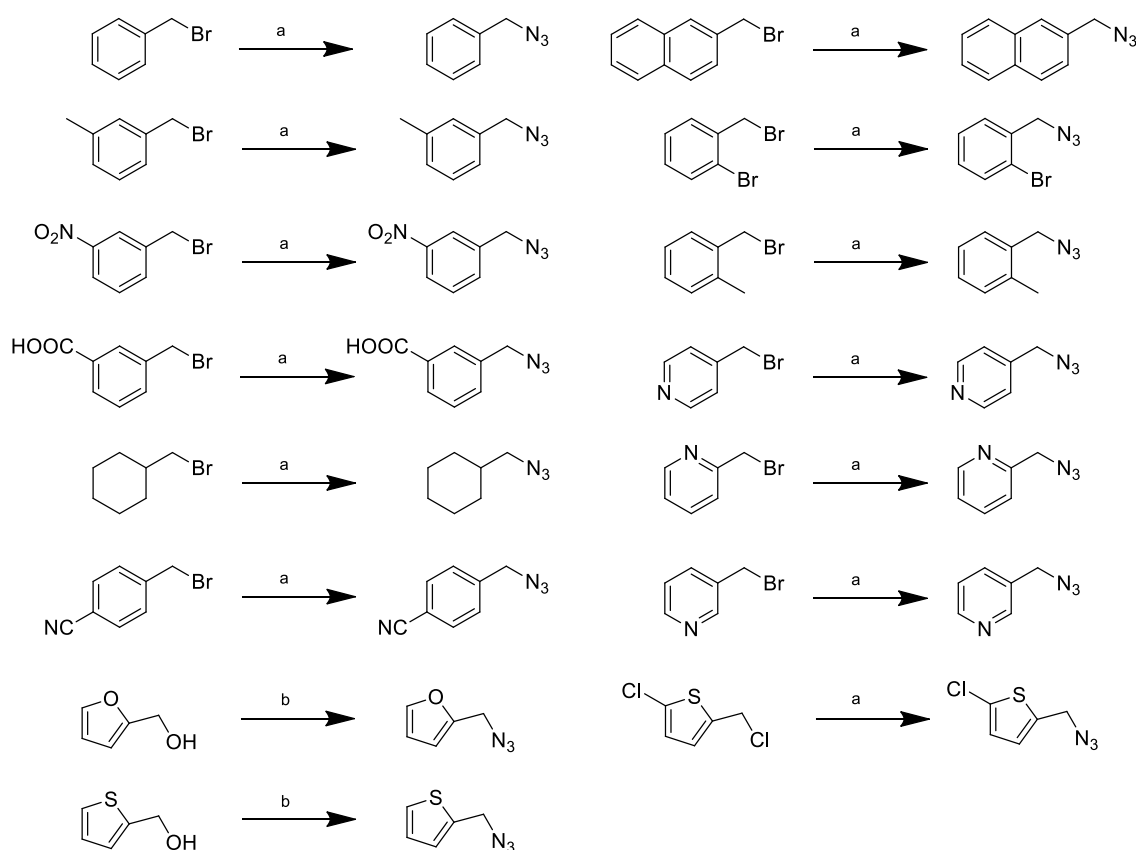


Schéma 5: Připravené azidy. Reakční podmínky: a) NaN_3 (2 ekv.), DMF, 6 h, r.t.; b) DBU (1,2 ekv.), DPPA (1,2 ekv.), TOL, 16 h, 0 °C – r.t.

6 Huisgenova cykloadice s látkami 88, 89, 90

Poslední reakční krok v přípravě klíčových derivátů této práce zahrnuje 1,3-dipolární cykloadici látek **88** a **89** s vybranými organickými azidy – 3-(azidomethyl)benzoovou kyselinou, 1-(azidomethyl)-3-methylbenzenem, 1-(azidomethyl)-3-nitrobenzenem, 2-(azidomethyl)naphthalenem, (azidomethyl)benzenem, 4-(azidomethyl)benzonitrilem, 2-(azidomethyl)thiophenem, 2-(azidomethyl)furanem, 2-(azidomethyl)-5-chlorothiophenem, (azidomethyl)cyklohexanem, 2-(azidomethyl)pyridinem, 3-(azidomethyl)pyridinem, 4-(azidomethyl)pyridinem. A látka **90** s 1-(azidomethyl)-2-bromobenzenem, 1-(azidomethyl)-2-methylbenzenem. Další reaktanty byly pro všechny tři výchozí triterpeny stejné.

Výchozí triterpen byl rozpuštěn v *tert*-butyl alkoholu a následně k němu byl přidán vybraný azid v nadbytku 3-5 molárních ekvivalentů. Dále byla přidána voda, 0,8 molárního ekvivalentu askorbanu sodného a 0,4 molárního ekvivalentu pentahydrátu síranu měďnatého. Poté byla reakční směs míchána po dobu deseti hodin při teplotě 55 °C. Po ukončení reakce byly produkty extrahovány do ethylacetátu a purifikovány sloupcovou chromatografií.

Pro chromatografii byla použita mobilní fáze složená z Tol a Et₂O v různých poměrech pro produkty vycházející z látek **89** a **90**. Pro produkty vycházející z látky **88** byla použita mobilní fáze z dichlormethanu a methanolu, nebo dichlormethanu a diethyl etheru. Konkrétní poměry jsou uvedeny v experimentální části

Reaktivita použitých azidů se v podstatě nelišila. Podle TLC analýzy po dokončení reakcí reakční směsi výchozí triterpen obsahovaly v nedetekovatelném množství, nebo stopy. Nejčistitelnější byly deriváty se substituovaným pyridinem. A to především na triterpenu **88** čemuž odpovídají i výtěžky. Výtěžnost viz schéma níže. Písmenem **a** jsou označeny látky vycházející z látky **88** a písmenem **b** vycházející z látky **89**.

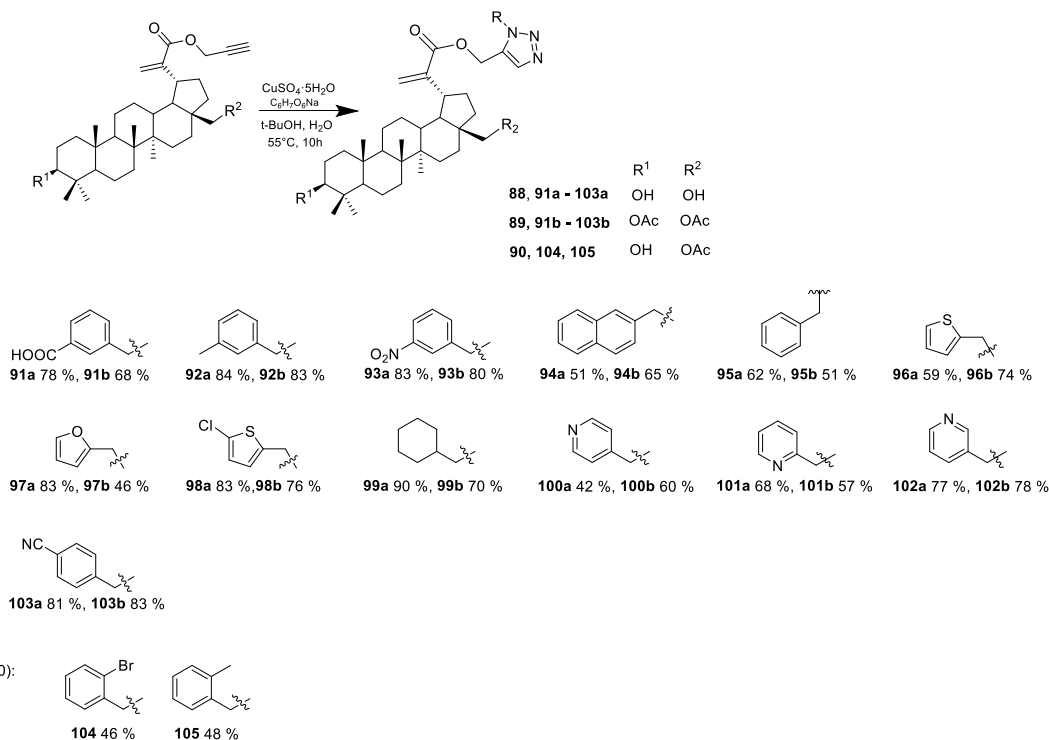


Schéma 6: Huisgenova cykloadice s látkami **88-90**

Nové sloučeniny byly charakterizovány pomocí spektrálních dat. Zejména v ¹H NMR spektru je charakteristická přítomnost nových signálů, odpovídajících zavedenému aromatickému substituentu (konkrétní hodnoty jsou přiřazeny v experimentální části u výpisů spekter). Pro všechny nové deriváty je charakteristická přítomnost singletu vodíku triazolového heterocyklu při $\delta = 7.4 - 7.8$ ppm a na první pohled jsou patrné signály diastereotopních vodíků skupiny 31-CH₂ (číslování viz str. 35) při $\delta = 5.2$ a 5.3 ppm s interakční konstantou cca 12.8 Hz s výrazným dach efektem. Další charakteristický signál v ¹H NMR spektrech je singlet dvou vodíků okolo $\delta 5.5$ ppm, který potvrzuje přítomnost 34-CH₂ skupiny (mezi triazolem a novým substituentem). Vodíky této skupiny jsou sice také diastereotopní, ale vzhledem k větší vzdálenosti od chirálních center terpenu je jejich chemický posun identický. V případě IČ byly nalezeny hodnoty absorpcí odpovídající novým substituentům. U všech molekul byl v HRMS nalezen pík odpovídající molekulovým iontům.

7 Cytotoxická aktivita připravených sloučenin

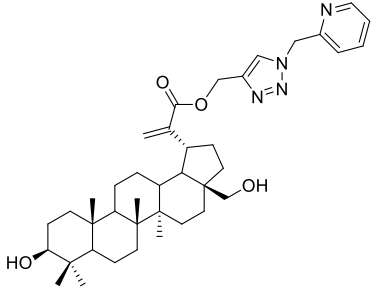
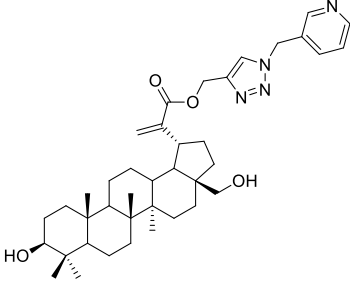
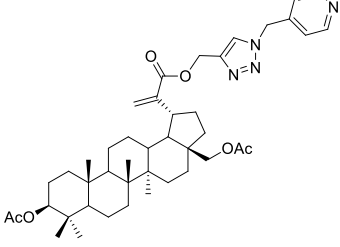
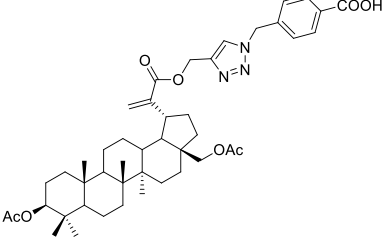
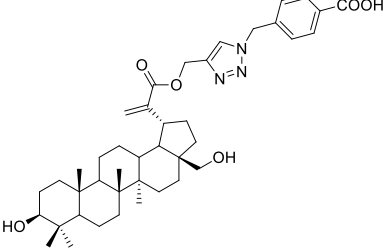
Všechny finální produkty připravené v rámci této bakalářské práce byly dány na otestování jejich *in vitro* cytotoxické aktivity vůči osmi nádorovým buněčným liniím a

dvěma nenádorovým. Z nádorových buněčných linií jsou v testování zastoupeny sensitivní leukemické linie CCRF-CEM a K562, a jejich multidrug rezistentní analoga CEM-DNR a K-562-Tax. Dále se jedná o linii plicního nádoru A549, linie nádorů tlustého střeva HCT116 a HCT116-p53, a osteosarkomu U2OS. Z nenádorových linií jsou sloučeniny testovány na buněčných liniích odvozených od fibroblastů BJ, MRC-5 a to za dvou různých koncentrací buněk v médiu (LD = low density). Testování je prováděno v laboratoři experimentální medicíny na ÚMTM LF-UP v Olomouci, avšak kvůli přednostnímu testování vzorků pacientů na koronavirus byly sice již změřeny všechny sloučeniny, ale výsledky pro některé linie u některých sloučenin chybí (Tabulka 1). Tabulka uvádí hodnoty IC_{50} pro otestované sloučeniny, které vykazaly aktivitu nad detekčním limitem. Tato hodnota je koncentrací dané sloučeniny ($\mu\text{mol}/\text{dm}^3$), která usmrtí 50 % nádorových buněk. Za neúčinnou je sloučenina považována, je-li hodnota IC_{50} vyšší než $50 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$. Z tabulky plyne, že aktivitu vykazují konjugáty terpenů s molekulou pyridinu nebo kyseliny benzoové, zdá se, že přítomnost acetátových skupin na obou hydroxylech nemá vliv. Pro formulaci přesnější hypotézy ohledně vztahu struktury a biologické aktivity však bude nutno počkat na finální a kompletní výsledky všech testů.

Fakt, že většina derivátů připravených v rámci této bakalářské práce je cytotoxicky neaktivní, není v tomto případě na závadu, podobné sloučeniny, připravené v našem týmu dříve, vykazovaly silný neuroprotektivní a regenerační účinek a mohly by být dále vyvíjeny jako terapeutika proti neurodegenerativním onemocněním. Pro další vývoj takových sloučenin je cytotoxická aktivita nežádoucím jevem.

Látka	IC_{50} (μM)									
	A549	BJ	BJ LD	HCT116	HCT116p53-	K562	K562-TAX	MRC-5	MRC-5 LD	U2OS
94	>50	-	-	>50	>50	>50	7,7	12	10	33
96	>50	>50	>50	>50	40	>50	6,7	29	32	29
97	>50	>50	>50	>50	>50	>50	-	>50	11	>50
103	24	29	28	24	28	30	23	17	13	23
104	>50	50	50	34	35	44	>50	32	29	38

Tabulka 1: Tabulka s hodnotami IC_{50} na vybraných nádorových liniích. Uvedeny jsou pouze sloučeniny, u nichž hodnota IC_{50} alespoň na jedné buněčné linii byla pod hodnotou $50 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$. V případě, že výsledky ještě nebyly uvolněny, je uvedena pomlčka.

Látka	Struktura	Vzorec
94		$C_{39}H_{56}N_4O_4$
96		$C_{39}H_{56}N_4O_4$
97		$C_{43}H_{60}N_4O_6$
103		$C_{45}H_{61}N_3O_8$
104		$C_{41}H_{57}N_3O_6$

8 Závěr

1. Byly připraveny tři výchozí propargyl estery (**88**, **89**, **90**) betulinu (**6**), betulin diacetátu (**17**) a betulin monoacetátu.
2. Propargylové molekuly (**88**, **89**, **90**) byly dále podrobeny Huisgenově 1,3-dipolární cykloadici s vybranými organickými azidy za vzniku 1,2,3-triazolů. Lipofilní charakter původních triterpenů by vzhledem k většímu množství polárních skupin na modifikující části mohl být snížen a tím by mohlo být dosaženo lepší rozpustnosti ve vodných médiích. Tento předpoklad je však ještě nutné potvrdit v biologických testech.
3. Celkem bylo připraveno 28 nových, dosud nepopsaných derivátů. Tyto deriváty byly plně charakterizovány pomocí fyzikálně-chemických metod (^1H NMR, ^{13}C NMR, HRMS, IČ).
4. Všechny nově připravené sloučeniny v rámci této práce jsou testovány na cytotoxickou aktivitu na nádorových liniích viz. **Tabulka 1** a v blízké budoucnosti budou testovány i na neuroprotektivní aktivitu.

Seznam použitých zkratek

Ac	acetyl
Tol	toluen
DPPA	difenyl fosfoazid
DBU	1,8-diazabicyklo(5.4.0)undec-7-en
TLC	tenkovrstvá chromatografie
Et ₂ O	diethylether
DCM	dichlormethan
MeOH	methanol
THF	tetrahydrofuran
RVO	rotační vakuová odparka
DMF	dimethylformamid
<i>t</i> -BuOH	terc-butylalkohol
t.t	teplota tání
Hex	hexan

Experimentální část

Obecné poznámky k experimentální části získány z literatury⁷⁰. Monitorování průběhu reakcí a čistoty produktů bylo prováděno pomocí TLC na hliníkových fóliích TLC Silica gel 60 F254 (Merck). Jako mobilní fáze sloužily různé směsi rozpouštědel uvedené u jednotlivých experimentů. Po vyvolání v příslušné soustavě mobilní fáze byly skvrny látek detekovány pomocí UV záření při vlnové délce 254 nm, a pak vizualizovány postříkem 10 % roztokem H₂SO₄ a záhřevem na 200 – 220 °C. Purifikace látek byla zpravidla prováděna kolonovou chromatografií. Jako pevná fáze byl používán Silikagel 60, high-purity grade, 40 – 63 μm (Fluka), složení mobilní fáze je popsáno u jednotlivých experimentů. Odpařování rozpouštědel bylo prováděno na RVO Rotovapor R-210 (Büchi). Připravené látky byly analyzovány pomocí metod NMR, IR a stanovení teploty tání. Měření spekter ¹H bylo prováděno na přístroji JEOL s frekvencí 500 Hz v roztocích CDCl₃, (CD₃)₂SO, THF-d₈ za laboratorní teploty. Posuny signálů v ¹H spektrech byly referencovány vůči posunu přítomného zbytkového rozpouštědla CHCl₃, (CD₃)₂SO, THF-d₈ a to 7,27 ppm, 2,50 ppm, 3,58 a 1,73 ppm. Hodnoty naměřených interakčních konstant a posunů byly stanoveny dle analýzy prvního řádu a veškeré hodnoty byly zaokrouhleny. Hodnoty interakčních konstant byly zaokrouhleny na jedno desetinné číslo a hodnoty posunů na dvě desetinná čísla. Zpracování dat spekter bylo provedeno v programu JEOL Delta v5.0.2. a MestReNova

IR spektra byla měřena na FTIR spektrometru Nicolet iZ10 (Thermo Scientific) a zpracování dat ze střední oblasti (400 – 4000 cm⁻¹), bylo provedeno v programu OMNIC 8.3.

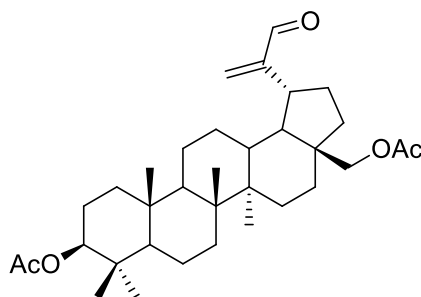
Pro měření HRMS bylo použito toto zařízení: kapalinový chromatograf (Dionex UltiMate 3000, Thermo Fischer Scientific, MA, USA) a hmotnostní spektrometr Exactive Plus Orbitrap high-resolution (Thermo Fischer Scientific, MA, USA).

Ionizační zdroj: elektrosprej nebo APCI. Snímání spekter: kladný i záporný mód v rozsahu 100 - 1000 m/z. Chromatografická separace: kolona Phenomenex Gemini (C18, 50 x 2 mm, 3 μm částice), eluce izokratická, MF 80 % ACN a 20 % pufru (0,01M octan amonný) nebo 95% MeOH + 5% voda + 0.1% HCOOH

Ve výpisech spekter používáme místo desetinné čárky desetinnou tečku, jak je zvykem v anglicky psané literatuře. Je to z důvodu větší přehlednosti. S interpretací spektrálních dat mi napomohl školitel.

9 Příprava 30-oxolup-20(29)-en-3,28-diol diacetátu (17a)

Betulin diacetát (**17**, 5 g, 9,49 mmol) byl rozpuštěn v 2-metoxyethanolu (200 ml) a k roztoku byl přidán oxid seleničitý (2,1 g, 18,98 mmol, 2 ekv.). Reakce probíhala po dobu čtyř hodin při teplotě varu rozpouštědla. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC. Jako mobilní fáze byla zvolena směs Tol/Et₂O v poměru 10:1. Po zreagování byla reakční směs přefiltrována, vyloučený šedý selen byl zachycen na filtru. Látka **17a** byla extrahována do ethylacetátu a přečištěna na silikagelu ve směsi Tol/Et₂O (gradientově 100 % Tol – 10 % Et₂O v Tol). Čištění bylo potřeba provést dvakrát, protože po prvním čištění byla látka žlutá v důsledku zbytkového koloidního selenu. Sloučeninu nebylo možné krystalizovat, protože vytvářela gel, byla tedy odpařena do sucha. Celkem bylo získáno 4,21 g (82 %) sloučeniny **17a**.



Obrázek 20: 30-oxolup-20(29)-en-3,28-diol diacetát (**17a**)

Látka byla popsána ve článku Ghoshe a spol.⁷⁴. Naměřené IČ a t.t. jsou shodné s literaturou⁷⁴.

IČ (DRIFT): ν 1732 (OCOCH₃, C=O), 1691 (C=C) cm⁻¹.

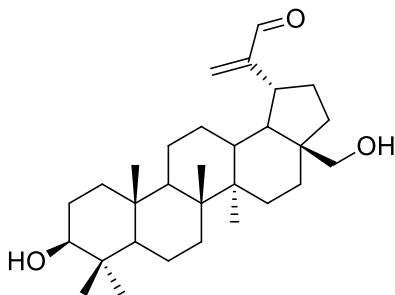
Teplota tání: 246-248 °C.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 0.83 (s, 6H), 0.84 (s, 3H), 0.94 (s, 3H), 1.02 (s, 3H, 5×CH₃), 2.03 (s, 3H), 2.07 (s, 3H, 2×CH₃ – Ac), 2.80 (m, 1H, H – 19 β), 3.87 (d, J = 11.0 Hz, 1H, H – 28a), 4.28 (d, J = 11.0 Hz, 1H, H – 28b), 4.46 (dd, J_1 = 10.0 Hz, J_2 = 5.2 Hz, 1H, H – 3 α), 5.92 (s, 1H, H – 29 *pro-E*), 6.27 (s, 1H, H – 29 *pro-Z*), 9.51 (s, 1H, H – 30). ¹H spektrum je totožné s literaturou⁷⁴.

HRMS (ESI): m/z vypočteno pro $C_{34}H_{52}O_5$ $[M+H]^+ = 541,3888$, nalezeno $[M+H]^+ = 541,3894$

10 Příprava 30-oxolup-20(29)-en-3,28- diolu (6a)

Látka **6a** byla připravena analogickým způsobem jako **17a** s tím rozdílem, že ji nebylo možné extrahovat do ethylacetátu ani DCM. V obou případech se vysrážela. Nejschůdnější z hlediska výtěžku bylo reakční směs přefiltrovat přes krátký sloupec silikagelu a poté provést čištění na chromatografické koloně. Chromatografie byla provedena izokraticky s mobilní fází z DCM a methanolu v poměru 30:1. Jelikož byla látka v této mobilní fázi špatně rozpustná, bylo třeba ji nejprve sorbovat na silikagel a poté čistit. Celkem bylo získáno 4,07 g (79 %) sloučeniny **6a**.



Obrázek 21: 30-oxolup-20(29)-en-3,28- diol (**6a**)

Látka byla popsána ve článku Ghoshe a spol.⁷⁴. Naměřené IČ a t.t. jsou shodné s literaturou⁷⁴.

IČ (DRIFT): ν 3393 (OH), 1688 ($CH_2=C-CHO$) cm^{-1} .

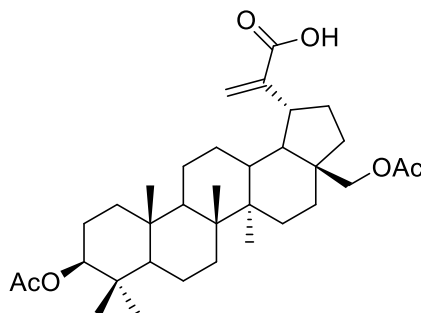
Teplota tání: 274-276 °C.

1H NMR (500 MHz, DMSO- D_6): $\delta = 0.73$ (s, 3H), 0.83 (s, 3H), 0.94 (s, 3H), 0.98 (s, 3H), 1.05 (s, 3H, $5 \times CH_3$), 2.79 (td, $J_1 = 11.2$ Hz, $J_2 = 5.5$ Hz, 1H, H – 19 β), 3.02 (m, 1H), 3.25 (dd, $J_1 = 10.4$ Hz, $J_2 = 4.1$ Hz, 1H, H – 28a), 3.31 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H), 3.34 (m, 1H), 3.67 (dd, $J_1 = 10.4$ Hz, $J_2 = 3.3$ Hz, 1H, H – 28b), 5.90 (s, 1H, H – 29 *pro-E*), 6.28 (s, 1H, H – 29 *pro-Z*), 9.47 (s, 1H, H-30). 1H spektrum je totožné s literaturou⁷⁴.

HRMS (ESI): m/z vypočteno pro $C_{34}H_{52}O_5$ $[M+H]^+ = 457,3676$, nalezeno $[M+H]^+ = 457,3676$

11 Příprava kyseliny 3,28-diacetoxylup-20(29)-en-30-ové (17b)

Aldehyd **17a** (4,21 g, 7,79 mmol) byl rozpuštěn v *t*-BuOH 108 ml. Následně bylo přidáno 50 ml vody, NaClO₂ (3,52 g, 38,95 mmol, 5 ekv.), KH₂PO₄ (5,30 g, 38,95 mmol, 5 ekv-) a 25 ml 2-methylbut-2-enu. Reakční směs byla silně míchána za laboratorní teploty po dobu šesti hodin. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC. Jako mobilní fáze byla zvolena směs Tol a Et₂O v poměru 10:1. Látka **17b** byla extrahována do ethylacetátu a přečištěna na silikagelu ve směsi Tol/Et₂O (izokraticky v poměru 10:1). Sloučeninu nebylo možné krystalizovat, protože vytvářela gel, byla tedy odpařena do sucha. Celkem bylo získáno 3,90 g (90 %) sloučeniny **17b**.



Obrázek 22: Kyselina 3,28-diacetoxylup-20(29)-en-30-ová (**17b**)

IČ (DRIFT): ν 3300 a 3178 (OH), 1720 (C=O), 1690 (C=C) cm⁻¹.

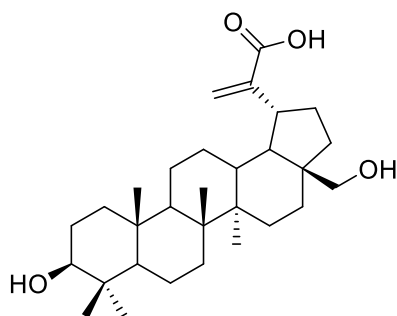
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 0.83 (s, 3H), 0.84 (s, 6H), 0.96 (s, 3H), 1.03 (s, 3H, 5×CH₃), 2.04 (s, 3H), 2.07 (s, 3H, 2×CH₃ – Ac), 2.79 (td, J_1 = 11.3 Hz, J_2 = 5.6 Hz, 1H, H – 19 β), 3.87 (d, J = 11.1 Hz, 1H, H - 28a), 4.28 (d, J = 10.8 Hz, 1H, H – 28b), 4.47 (dd, J_1 = 10.4 Hz, J_2 = 5.4 Hz, 1H, H - 3 α), 5.68 (s, 1H, H – 29 *pro-E*), 6.26 (s, 1H, H – 29 *pro-Z*).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 14.25, 14.82, 16.18, 16.27, 16.64, 18.32, 21.04, 21.18, 21.45, 22.79, 23.84, 27.33, 27.62, 28.10, 29.21, 29.95, 31.73, 34.30, 34.39, 37.21, 37.39, 37.95, 38.54, 41.02, 42.79, 46.62, 50.26, 55.52, 62.80, 81.07, 146.04, 171.20, 171.72, 171,91.

HRMS (ESI): m/z vypočteno pro C₃₄H₅₁O₆ [M+H]⁺ = 555.3680, nalezeno [M+H]⁺ = 555.3682.

12 Příprava kyseliny 3,28-dihydroxylup-20(29)-en-30-ové (6b)

Látka **6b** byla připravena analogickým způsobem jako látka **17b** s tím rozdílem, že byla zvolena jiná mobilní fáze při čištění na silikagelu. A to směs DCM/MeOH v poměru 30:1. Sloučeninu nebylo možné krystalizovat, protože vytvářela gel, byla tedy odpařena do sucha. Celkem bylo získáno 3,88 g (92 %) látky **6b**.



Obrázek 23: Kyselina 3,28-dihydroxylup-20(29)-en-30-ová (**6b**)

IR (DRIFT): ν 3364 (OH), 1683 (C=O), 1621 (C=C) cm^{-1} .

^1H NMR (500 MHz, DMSO- D_6): δ = 0.65 (s, 3H), 0.76 (s, 3H), 0.87 (s, 3H), 0.90 (s, 3H), 0.98 (s, 3H, $5\times\text{CH}_3$), 2.03 (m, 1H), 2.66 (td, $J_1 = 11.2$ Hz, $J_2 = 5.6$ Hz, 1H, H – 19 β), 2.97 (dd, $J_1 = 10.8$ Hz, $J_2 = 5.5$ Hz, 1H), 3.08 (dd, $J_1 = 10.6$ Hz, $J_2 = 5.1$ Hz, 1H), 3.53 (dd, $J_1 = 10.5$ Hz, $J_2 = 5.0$ Hz, 1H), 4.23 (m, 2H, $2\times\text{H} - 28$), 5.56 (s, 1H, H – 29 *pro-Z*), 5.94 (s, 1H, H – 29 *pro-E*), 12.25 (s, 1H, COOH).

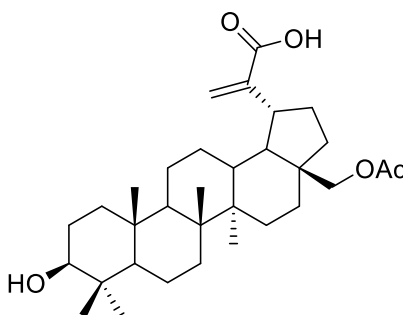
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- D_6): δ = 15.00, 16.21, 16.33, 16.41, 18.50, 21.57, 27.20, 27.61, 27.70, 28.63, 29.58, 32.93, 33.99, 34.39, 36.92, 37.70, 38.77, 39.03, 40.68, 40.95, 42.68, 48.03, 50.23, 51.43, 55.37, 58.44, 77.31, 122.73, 148.25, 169.93.

HRMS (ESI): m/z vypočteno pro $\text{C}_{30}\text{H}_{47}\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+ = 471,3469$, nalezeno $[\text{M}+\text{H}]^+ = 471, 3470$

13 Příprava kyseliny 3-hydroxy-28-acetoxylup - 20(29)-en-30-ové (17c)

Látka **17b** (1g, 1,80 mmol) byla rozpuštěna ve směsi 20 ml THF a 20 ml MeOH. Následně bylo k roztoku přidáno NaOH (1,73 g, 43,14 mmol, 12 ekv.). Reakce probíhala

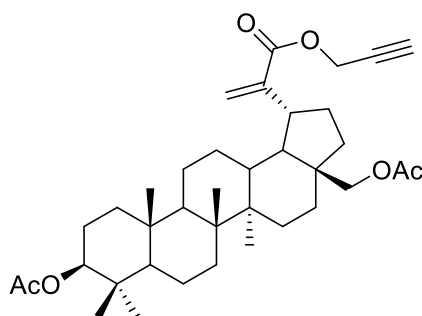
deset hodin při 85 °C. Sloučenina **17c** vznikla omylem nedokončenou hydrolyzou acetátů v poloze 3 a 28 v rámci jednoho z mnoha přísunů a nebyla proto analyzována, ale rovnou využita pro další syntézy. Až po následném vyhodnocení spekter z těchto reakcí vyšlo najevo, že místo očekávané struktury **6b** byla získána sloučenina **17c**. Ta byla navíc již spotřebována a při dalších přísunových experimentech se ji už nepodařilo získat. Pokusy o cílenou syntézou byly přerušeny karanténou a cílená syntéza a charakterizace sloučeniny **17c** byly odloženy, vzhledem k doporučení pracovat jen na nezbytných věcech, do budoucnosti.



Obrázek 24: kyseliny 3-hydroxy-28-acetoxylup -20(29)-en-30-ové (**17c**)

14 Příprava propargylesteru kyseliny 3,28-diacetoxylup-20(29)-en-30-ové (**89**)

Látka **17b** (3,90 g, 7 mmol) byla rozpuštěna v 180ml THF. K roztoku byl přidán K_2CO_3 (9,69 g, 70 mmol, 20 ekv.). Reakční směs byla poté třicet minut refluxována. Následně byl přidán propargyl bromid (4,16 g, 35 mmol, 5 ekv.). Reakční směs byla míchána při teplotě varu rozpouštědla po dobu tří a půl hodiny. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC. Jako mobilní fáze byla zvolena směs Tol/ Et_2O v poměru 10:1. Reakční směs byla přefiltrována, nezreagovaný uhličitan draselný byl zachycen na filtru. Produkt byl extrahován do ethylacetátu. Ethylacetát s produktem byl vytřepáván s 10% roztokem NH_4Cl dokud nebylo pH ethylacetátu neutrální (kontrola pH indikátorovým papírkem). Látka byla čištěna na silikagelu izokraticky s mobilní fází Tol/ Et_2O v poměru 15:1. Pro krystalizaci bylo nutné sloučeninu rozpustit za horka v methanolu a tento roztok poté zchladit ve směsi ledu a NaCl. Methanol byl poté odpařen na RVO. Celkem bylo získáno 3,54 g (85 %) sloučeniny **89**.



Obrázek 25: propargylester kyseliny 3,28-diacetoxylup-20(29)-en-30-ové (**89**)

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 0.83 (s, 3H), 0.84 (s, 6H), 0.94 (s, 3H), 1.02 (s, 3H, $5\times\text{CH}_3$), 2.03 (s, 3H), 2.07 (s, 3H, $2\times\text{CH}_3 - \text{Ac}$), 2.16 (m, 1H), 2.47 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H, $-\text{C}\equiv\text{CH}$), 2.77 (td, $J_1 = 11.4$ Hz, $J_2 = 5.6$ Hz, 1H, H - 19 β), 3.86 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H, H - 28a), 4.27 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H, H - 28b), 4.46 (dd, $J_1 = 10.3$ Hz, $J_2 = 5.3$ Hz, 1H, H - 3 α), 4.74 (dd, $J_1 = 15.6$ Hz, $J_2 = 2.4$ Hz, 1H, $-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{CH}$), 4.77 (dd, $J_1 = 15.6$ Hz, $J_2 = 2.5$ Hz, 1H, $-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{CH}$), 5.61 (s, 1H, H - 29 *pro-E*), 6.14 (s, 1H, H - 29 *pro-Z*).

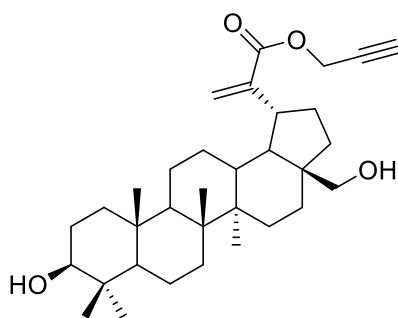
^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 14.78, 16.17, 16.26, 16.63, 18.31, 20.99, 21.18, 21.45, 23.83, 27.36, 27.42, 28.09, 29.94, 32.16, 34.29, 34.41, 37.20, 37.34, 37.96, 38.54, 41.01, 42.81, 46.60, 50.25, 51.18, 52.27, 55.52, 62.81, 74.95, 77.90, 81.06, 98.78, 124.55, 146.11, 166.56, 171.16, 171.70.

IČ (DRIFT): ν 2121 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 1716 ($\text{C}=\text{O}$), 1702 ($\text{C}=\text{C}$) cm^{-1}

HRMS (ESI): m/z vypočteno pro $\text{C}_{37}\text{H}_{54}\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+ = 595,3993$, nalezeno $[\text{M}+\text{H}]^+ = 595,3994$.

15 Příprava propargylesteru kyseliny 3,28-dihydroxylup-20(29)-en-30-ové (**88**)

Látka **88** byla připravena analogicky jako sloučenina **89**, s tím rozdílem že jako mobilní fáze pro TLC a čištění na silikagelu byla použita směs DCM/MeOH v poměru 10:1. Sloučeninu nebylo možné krystalizovat, protože vytvářela gel. Byla tedy lyofilizována ze směsi DMF/ H_2O v poměru 1:4. Celkem bylo získáno 3,86 g (92 %) sloučeniny **88**.



Obrázek 26: Propargylester kyseliny 3,28-dihydroxylup-20(29)-en-30-ové (**88**)

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 0.75 (s, 3H), 0.81 (s, 3H), 0.95 (s, 3H) 0.96 (s, 3H), 1.01 (s, 3H, $5\times\text{CH}_3$), 2.18 (m, 1H), 2.47 (t, J = 2.4 Hz, 1H, $-\text{C}\equiv\text{CH}$), 2.73 (td, J_1 = 11.4 Hz, J_2 = 5.7 Hz, 1H, H – 19 β), 3.18 (dd, J_1 = 10.9 Hz, J_2 = 4.9 Hz, 1H, H - 3 α), 3.35 (d, J = 10.8 Hz, 1H, H - 28a), 3.80 (d, J = 10.8 Hz, 1H, H – 28b), 4.73 (dd, J_1 = 15.6 Hz, J_2 = 2.4 Hz, 1H, $-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{CH}$), 4.77 (dd, J_1 = 15.6 Hz, J_2 = 2.5 Hz, 1H, $-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{CH}$), 5.62 (s, 1H, H – 29 *pro-E*), 6.14 (s, 1H, H – 29 *pro-Z*).

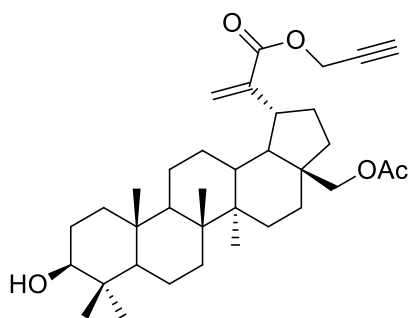
^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 14.81, 15.50, 16.11, 16.21, 18.44, 21.02, 27.12, 27.52, 27.61, 28.13, 29.33, 32.51, 33.79, 34.39, 37.05, 37.29, 38.85, 39.00, 41.02, 41.50, 42.80, 48.05, 50.36, 51.41, 52.28, 55.42, 60.51, 74.92, 77.92, 79.09, 124.19, 146.39, 166.75.

IČ (DRIFT): ν 3303 (OH), 2130 ($\text{C}\equiv\text{C}$), 1715 ($\text{C}=\text{O}$), 1634 ($\text{C}=\text{C}$) cm^{-1} .

HRMS (ESI): m/z vypočteno pro $\text{C}_{33}\text{H}_{50}\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+ = 511,3782$, nalezeno $[\text{M}+\text{H}]^+ = 511,3782$.

16 Příprava propargylesteru kyseliny 3-hydroxy-28-acetoxylup -20(29)-en-30-ové (90)

Látka **90** byla připravena analogickým způsobem ze sloučeniny **17c** (1 g, 1,8 mmol) jako sloučenina **89**. Odlišná byla mobilní fáze použitá pro TLC a čištění na silikagelu. Konkrétně směs Hex:Ethylacetát v poměru 1:1. V reakční směsi vznikly dva terpenické produkty, které od sebe byly na chromatografické koloně odděleny. Oba produkty byly lyofilizovány ze směsi DMF/ H_2O v poměru 1:4 a posléze analyzovány. Výtěžek látky **90** činil 97 mg (10 %). Druhým produktem byla látka **88** a její výtěžek činil 0,63 g (63 %)



Obrázek 27: Propargylester kyseliny 3-hydroxy-28-acetoxylup -20(29)-en-30-ové (**90**)

IČ (DRIFT): ν 3551, 3286 (OH), 2132 (C≡C), 1728 (C=O), 1632 (C=C) cm^{-1} .

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 0.75 (s, 3H), 0.81 (s, 3H), 0.95 (s, 3H), 0.96 (s, 3H), 1.02 (s, 3H, $5\times\text{CH}_3$), 2.07 (s, 3H, $\text{CH}_3 - \text{Ac}$), 2.16 (m, 1H), 2.47 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H, $-\text{C}\equiv\text{CH}$), 2.77 (td, $J_1 = 11.3$ Hz, $J_2 = 5.6$ Hz, 1H, H - 19 β), 3.17 (dd, $J_1 = 11.4$ Hz, $J_2 = 4.7$ Hz, 1H, H - 3 α), 3.86 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H, H - 28a), 4.26 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H, H - 28b), 4.73 (dd, $J_1 = 15.6$ Hz, $J_2 = 2.5$ Hz, 1H, $-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{CH}$), 4.78 (dd, $J_1 = 15.6$ Hz, $J_2 = 2.4$ Hz, 1H, $-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{CH}$), 5.61 (s, 1H, H - 29 *pro-E*), 6.13 (s, 1H, H - 29 *pro-Z*).

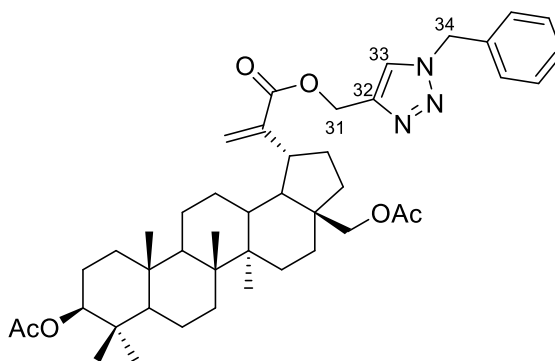
^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 14.83, 15.50, 16.17, 16.20, 18.43, 20.98, 21.18, 27.17, 27.46, 27.55, 28.14, 29.96, 31.39, 32.13, 34.37, 34.42, 37.29, 37.35, 38.30, 38.86, 39.01, 41.00, 42.82, 46.60, 50.35, 52.26, 55.26, 62.80, 74.95, 77.91, 79.12, 124.50, 146.10, 166.56, 171.69.

HRMS (ESI): m/z vypočteno pro $\text{C}_{35}\text{H}_{52}\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+ = 552,3815$, nalezeno $[\text{M}+\text{H}]^+ = 552,3816$.

17 Obecný postup pro přípravu triazolových derivátů 91-118 Huisgenovou cykloadicí

Terpenický propargylester (0,25 mmol) byl rozpuštěn v 12 ml *t*-BuOH. K tomu byly přidány 3 ekv. organického azidu, 6 ml H_2O , 0,4 ekv. $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,8 ekv. Askorbátu sodného. Reakce probíhala deset hodin při 55 °C. Produkt byl extrahován do ethylacetátu, chromatografován na silikagelu ve směsi Tol/ Et_2O a lyofilizován ze směsi DMF/ H_2O . Byly získány následující sloučeniny:

Triazol **91**: Výtěžek 101,3 mg (51 %)



Obrázek 28: Triazolový derivát **91**

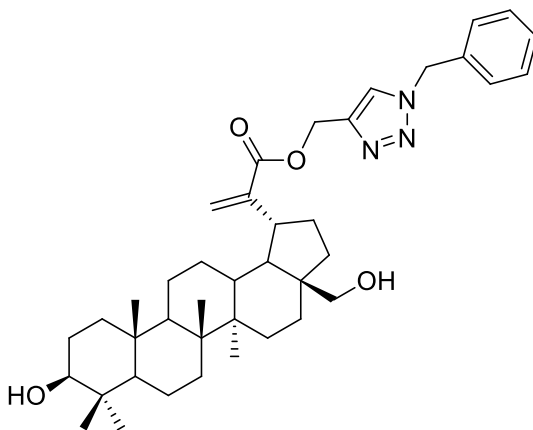
^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 0.82 (s, 6H), 0.83 (s, 3H), 0.86 (s, 3H), 1.00 (s, 3H, $5\times\text{CH}_3$), 2.03 (s, 3H), 2.06 (s, 3H, $2\times\text{CH}_3 - \text{Ac}$), 2.73 (td, $J_1 = 11.2$ Hz, $J_2 = 5.4$ Hz, 1H, H – 19 β), 3.83 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H, H - 28a), 4.24 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H, H – 28b), 4.46 (dd, $J_1 = 9.9$ Hz, $J_2 = 4.6$ Hz, 1H, H - 3 α), 5.24 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H, H – 31a), 5.29 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H, H – 31b), 5.52 (s, 2H, H-34), 5.55 (s, 1H, H – 29 *pro-E*), 6.08 (s, 1H, H – 29 *pro-Z*), 7.28 (m, 2H), 7.36 (m, 3H, $5\times\text{H} - \text{Ph}$), 7.53 (s, 1H, triazol).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 14.67, 16.14, 16.25, 16.63, 18.29, 20.94, 21.16, 21.44, 23.82, 27.10, 27.42, 28.09, 29.90, 32.18, 34.26, 34.35, 36.58, 37.18, 37.30, 37.94, 38.53, 40.98, 42.74, 46.57, 50.21, 51.09, 54.37, 55.51, 58.00, 62.72, 81.01, 123.76, 124.14, 128.24, 128.98, 129.30, 134.57, 143.45, 146.25, 167.25, 171.12, 171.64.

IČ (DRIFT): ν 1728 (C=O), 1623 (C=C) cm^{-1} .

HRMS (ESI): m/z vypočteno pro $\text{C}_{44}\text{H}_{61}\text{N}_3\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+ = 728,4633$, nalezeno $[\text{M}+\text{H}]^+ = 728,4637$.

Triazol **92**: Výtěžek 86,3 mg (62 %)



Obrázek 29: Triazolový derivát **92**

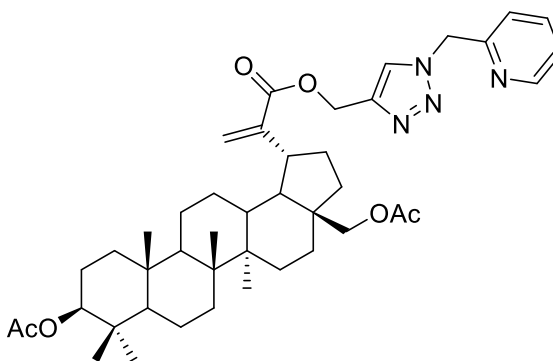
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 0.75 (s, 3H), 0.81 (s, 3H), 0.88 (s, 3H), 0.96 (s, 3H), 0.99 (s, 3H, 5×CH₃), 1.93 (m, 1H), 2.12 (m, 1H), 2.69 (td, J_1 = 11.3 Hz, J_2 = 5.6 Hz, 1H, H – 19 β), 3.18 (dd, J_1 = 11.4 Hz, J_2 = 4.7 Hz, H - 3 α), 3.32 (d, J = 10.8 Hz, 1H, H - 28a), 3.77 (d, J = 11.3 Hz, 1H, H – 28b), 5.25 (d, J = 12.8 Hz, 1H, H – 31a), 5.28 (d, J = 12.8 Hz, 1H, H – 31b), 5.52 (s, 2H, H-34), 5.55 (s, 1H, H – 29 *pro-E*), 6.07 (s, 1H, H – 29 *pro-Z*), 7.27 (m, 2H), 7.36 (m, 3H, 5×H – Ph), 7.53 (s, 1H, triazol).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 14.72, 15.50, 16.09, 16.21, 18.43, 20.98, 25.75, 27.09, 27.52, 27.80, 28.14, 29.33, 30.47, 32.51, 33.76, 34.38, 37.02, 37.28, 38.86, 39.00, 41.01, 42.75, 48.01, 50.33, 54.37, 55.42, 57.98, 60.47, 68.11, 79.08, 123.77, 128.23, 128.99, 129.31, 134.55, 143.49, 146.58, 167.45.

IČ (DRIFT): ν 3393 (OH), 2939, 1715 (C=O), 1623 (C=C) cm⁻¹.

HRMS (ESI): m/z vypočteno pro C₄₀H₅₇N₃O₄ [M+H]⁺ = 644,4422, nalezeno [M+H]⁺ = 644,4424.

Triazol **93**: Výtěžek 56,7 mg (57 %)



Obrázek 30: Triazolový derivát **93**

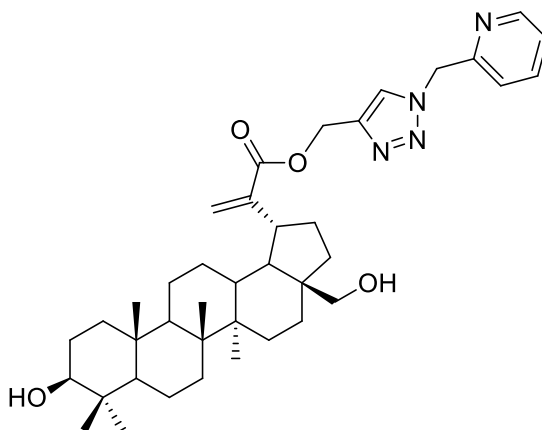
^1H NMR (500 MHz, DMSO- D_6): δ = 0.79 (s, 9H), 0.81 (s, 3H), 0.97 (s, 3H, $5\times\text{CH}_3$), 1.84 (m, 1H), 1.99 (s, 3H), 2.02 (s, 3H, $2\times\text{CH}_3 - \text{Ac}$), 2.74 (td, $J_1 = 11.1$ Hz, $J_2 = 5.3$ Hz, 1H, H – 19 β), 3.75 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H, H - 28a), 4.22 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H, H – 28b), 4.36 (dd, $J_1 = 11.3$ Hz, $J_2 = 4.9$ Hz, 1H, H - 3 α), 5.21 (d, $J = 12.7$ Hz, 1H, H – 31a), 5.27 (d, $J = 12.7$ Hz, 1H, H – 31b), 5.69 (s, 1H, H – 29 *pro-E*), 5.72 (s, 2H, H-34), 5.97 (s, 1H, H – 29 *pro-Z*), 7.29 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, pyridin), 7.35 (ddd, $J_1 = 7.6$ Hz, $J_2 = 4.9$ Hz, $J_3 = 1.1$ Hz, 1H, pyridin), 7.81 (td, $J_1 = 7.7$ Hz, $J_2 = 1.8$ Hz, 1H, pyridin), 8.24 (s, 1H, triazol), 8.54 (ddd, $J_1 = 4.8$ Hz, $J_2 = 1.7$ Hz, $J_3 = 0.9$ Hz, 1H, pyridin).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- D_6): δ = 14.18, 15.53, 15.74, 16.39, 17.63, 20.24, 20.70, 20.94, 23.34, 26.51, 27.64, 29.13, 30.39, 33.51, 33.59, 36.52, 36.57, 37.33, 37.70, 40.28, 42.13, 46.04, 49.24, 54.34, 54.54, 57.41, 61.41, 79.88, 122.16, 123.19, 124.29, 125.55, 137.26, 141.85, 145.86, 149.39, 154.87, 166.27, 170.06, 170.65.

IČ (DRIFT): ν 1731 (C=O), 1623 (C=C) cm^{-1} .

HRMS (ESI): m/z vypočteno pro $\text{C}_{43}\text{H}_{60}\text{N}_4\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+ = 729,4586$, nalezeno $[\text{M}+\text{H}]^+ = 729,4587$.

Triazol **94**: Výtěžek 94 mg (68 %)



Obrázek 31: Triazolový derivát **94**

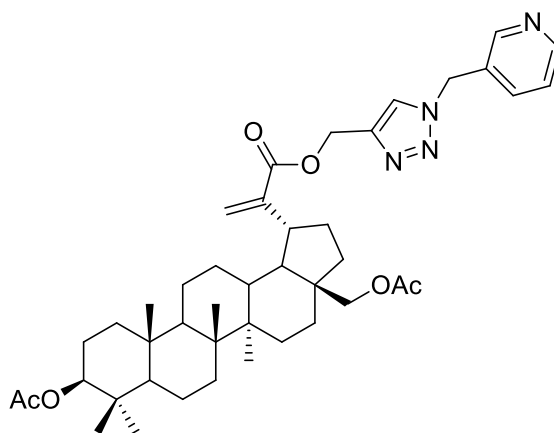
IČ (DRIFT): ν 3354 (OH), 2935, 1714 (C=O), 1627 (C=C) cm^{-1} .

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 0.74 (s, 3H), 0.79 (s, 3H), 0.88 (s, 3H), 0.95 (s, 3H), 0.98 (s, 3H, $5\times\text{CH}_3$), 2.68 (td, $J_1 = 11.2$ Hz, $J_2 = 5.5$ Hz, 1H, H - 19 β), 3.17 (dd, $J_1 = 11.1$ Hz, $J_2 = 4.9$ Hz, H - 3 α), 3.32 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H, H - 28a), 3.76 (d, $J = 10.4$ Hz, 1H, H - 28b), 5.26 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H, H - 31a), 5.30 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H, H - 31b), 5.55 (s, 1H, H - 29 *pro-E*), 5.65 (s, 2H, H-34), 6.08 (s, 1H, H - 29 *pro-Z*), 7.22 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.28 (ddd, $J_1 = 8.6$ Hz, $J_2 = 4.9$ Hz, $J_3 = 0.8$ Hz, 1H), 7.71 (td, $J_1 = 8.3$ Hz, $J_2 = 1.8$ Hz, 1H, 3 \times H - pyridin), 7.80 (s, 1H, triazol), 8.59 (bd, $J = 4.7$ Hz, 1H, pyridin).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 14.70, 15.49, 16.07, 16.19, 18.40, 20.96, 27.07, 27.43, 27.61, 28.11, 29.33, 31.03, 32.51, 33.75, 34.35, 37.00, 37.25, 38.82, 38.98, 40.98, 42.73, 47.99, 50.30, 50.89, 55.39, 55.56, 57.98, 60.31, 79.06, 122.77, 123.73, 124.46, 137.77, 143.48, 146.57, 149.71, 154.19, 167.43, 207.13.

HRMS (ESI): m/z vypočteno pro $\text{C}_{39}\text{H}_{56}\text{N}_4\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+ = 645,4374$, nalezeno $[\text{M}+\text{H}]^+ = 645,4377$.

Triazol **95**: Výtěžek 78,2 mg (78 %)



Obrázek 32: Triazolový derivát **95**

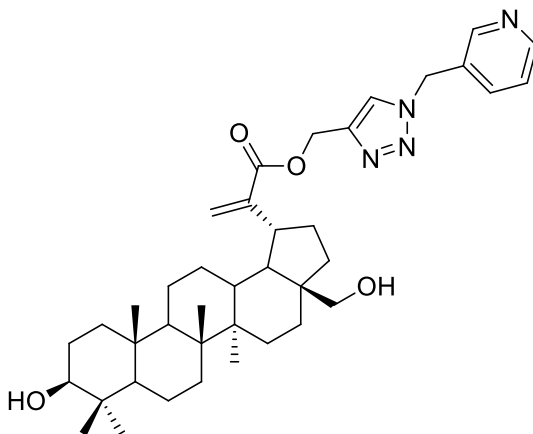
IČ (DRIFT): ν 1720 (C=O), 1630 (C=C) cm^{-1} .

HRMS (ESI): m/z vypočteno pro $\text{C}_{43}\text{H}_{60}\text{N}_4\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+ = 729,4586$, nalezeno $[\text{M}+\text{H}]^+ = 729,4589$.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 0.82$ (s, 6H), 0.83 (s, 3H), 0.87 (s, 3H), 1.00 (s, 3H, $5\times\text{CH}_3$), 2.03 (s, 3H), 2.06 (s, 3H, $2\times\text{CH}_3 - \text{Ac}$), 2.73 (td, $J_1 = 11.3$ Hz, $J_2 = 5.5$ Hz, 1H, H – 19 β), 3.84 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H, H - 28a), 4.23 (d, $J = 10.9$ Hz, 1H, H – 28b), 4.46 (dd, $J_1 = 9.9$ Hz, $J_2 = 5.0$ Hz, 1H, H - 3 α), 5.25 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H, H – 31a), 5.30 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H, H – 31b), 5.56 (s, 3H, H – 29 *pro-E*, $2\times\text{H} - 34$), 6.08 (s, 1H, H – 29 *pro-Z*), 7.33 (dd, $J_1 = 7.8$ Hz, $J_2 = 4.8$ Hz, 1H, pyridin), 7.60 (s, 1H, triazol), 7.63 (dt, $J_1 = 7.8$ Hz, $J_2 = 1.7$ Hz, 1H, pyridin), 8.62 (bs, 2H, pyridin).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 14.67, 16.14, 16.25, 16.61, 18.28, 20.94, 21.16, 21.43, 23.81, 27.09, 27.47, 28.08, 29.89, 31.04, 32.64, 34.25, 34.32, 37.17, 37.29, 37.93, 38.53, 40.98, 42.73, 46.56, 50.21, 50.94, 51.70, 55.49, 57.91, 62.68, 77.36, 81.00, 123.82, 124.17, 130.55, 136.07, 143.85, 146.17, 149.12, 150.28, 167.24, 171.14, 171.66$.

Triazol **96**: Výtěžek 77,4 mg (77 %)



Obrázek 33: Triazolový derivát **96**

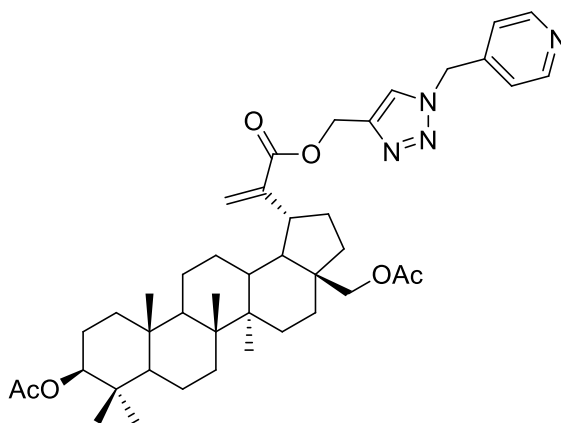
^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 0.75 (s, 3H), 0.80 (s, 3H), 0.89 (s, 3H), 0.96 (s, 3H), 0.99 (s, 3H, $5\times\text{CH}_3$), 2.68 (td, $J_1 = 11.3$ Hz, $J_2 = 5.5$ Hz, 1H, H - 19 β), 3.17 (dd, $J_1 = 11.4$ Hz, $J_2 = 4.7$ Hz, H - 3 α), 3.31 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H, H - 28a), 3.76 (d, $J = 10.7$ Hz, 1H, H - 28b), 5.25 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H, H - 31a), 5.29 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H, H - 31b), 5.55 (s, 3H, H - 29 *pro-E*, $2\times\text{H}$ - 34), 6.08 (s, 1H, H - 29 *pro-Z*), 7.32 (dd, $J_1 = 5.8$ Hz, $J_2 = 4.8$ Hz, 1H, pyridin), 7.58 (s, 1H, triazol), 7.61 (dt, $J_1 = 7.8$ Hz, $J_2 = 1.8$ Hz, 1H), 8.58 (bs, 1H), 8.62 (bs, 1H, $3\times\text{H}$ - pyridin).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 14.73, 15.50, 16.09, 16.21, 18.41, 20.99, 27.09, 27.51, 27.70, 28.13, 29.35, 32.57, 33.74, 34.37, 36.59, 37.02, 37.26, 38.85, 38.99, 41.01, 42.74, 48.01, 50.33, 51.19, 51.74, 55.41, 57.92, 60.35, 79.05, 123.77, 124.14, 130.47, 135.89, 143.91, 146.50, 149.22, 150.45, 162.65, 167.43.

IČ (DRIFT): ν 3350 (OH), 1714 (C=O), 1668 (C=C) cm^{-1} .

HRMS (ESI): m/z vypočteno pro $\text{C}_{39}\text{H}_{56}\text{N}_4\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+ = 645,4374$, nalezeno $[\text{M}+\text{H}]^+ = 645,4373$.

Triazol **97**: Výtěžek 59,8 mg (60 %)



Obrázek 34: Triazolový derivát **97**

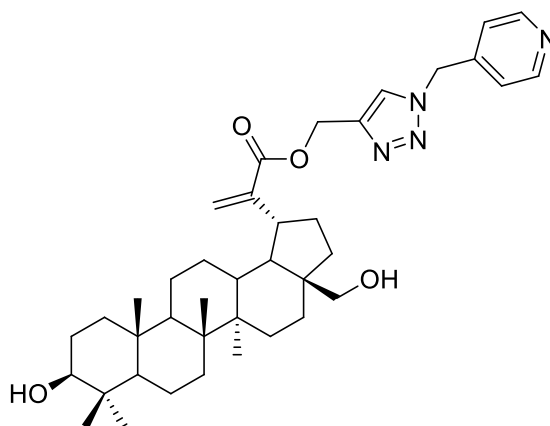
IČ (DRIFT): ν 1724 (C=O), 1620 (C=C) cm^{-1} .

HRMS (ESI): m/z vypočteno pro $\text{C}_{43}\text{H}_{60}\text{N}_4\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+ = 729,4586$, nalezeno $[\text{M}+\text{H}]^+ = 729,4583$.

^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-\text{D}_6$): $\delta = 0.79$ (s, 3H), 0.79 (s, 3H), 0.80 (s, 3H), 0.96 (s, 3H, $5\times\text{CH}_3$), 1.83 (m, 1H), 1.99 (s, 3H), 2.02 (s, 3H, $2\times\text{CH}_3 - \text{Ac}$), 2.74 (td, $J_1 = 11.2$ Hz, $J_2 = 5.5$ Hz, 1H, H - 19 β), 3.75 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H, H - 28a), 4.21 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H, H - 28b), 4.37 (dd, $J_1 = 11.1$ Hz, $J_2 = 4.7$ Hz, 1H, H - 3 α), 5.22 (d, $J = 12.7$ Hz, 1H, H - 31a), 5.28 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H, H - 31b), 5.69 (s, 1H, H - 29 *pro-E*), 5.72 (s, 2H, H - 34), 5.97 (s, 1H, H - 29 *pro-Z*), 7.26 (d, $J = 6.1$ Hz, 2H, pyridin), 8.31 (s, 1H, triazol), 8.59 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H, pyridin).

^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO}-\text{D}_6$): $\delta = 14.16, 15.52, 15.73, 16.39, 17.67, 20.23, 20.70, 20.95, 23.34, 26.50, 27.62, 29.13, 31.26, 33.50, 33.60, 36.51, 36.56, 37.33, 37.69, 40.28, 42.12, 46.04, 49.22, 49.99, 51.46, 54.48, 57.34, 61.39, 79.87, 122.59$ (2C), 124.40, 125.51, 142.20, 145.67, 145.80, 149.29 (2C), 166.26, 170.08, 170.65.

Triazol **98**: Výtěžek 42,2 mg (42%)



Obrázek 35: Triazolový derivát **98**

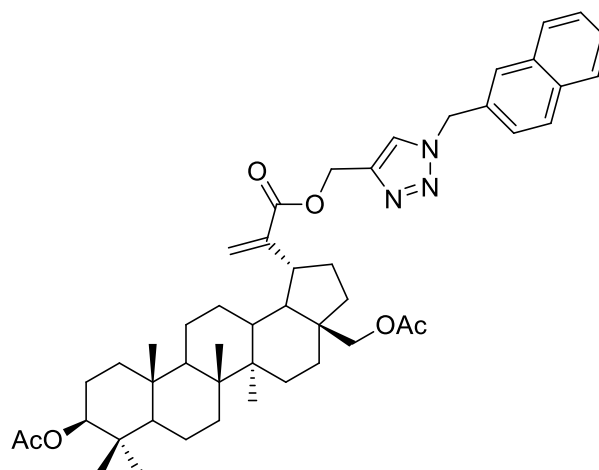
IČ (DRIFT): ν 3356 (OH), 1720 (C=O), 1634 (C=C) cm^{-1} .

HRMS (ESI): m/z vypočteno pro $\text{C}_{39}\text{H}_{56}\text{N}_4\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+ = 645,4374$, nalezeno $[\text{M}+\text{H}]^+ = 645,4377$.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 0.75$ (s, 3H), 0.80 (s, 3H), 0.89 (s, 3H), 0.96 (s, 3H), 0.99 (s, 3H, $5\times\text{CH}_3$), 2.69 (td, $J_1 = 11.2$ Hz, $J_2 = 5.7$ Hz, 1H, H - 19 β), 3.17 (dd, $J_1 = 11.2$ Hz, $J_2 = 4.7$ Hz, H - 3 α), 3.31 (d, $J = 10.9$ Hz, 1H, H - 28a), 3.77 (d, $J = 10.7$ Hz, 1H, H - 28b), 5.28 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H, H - 31a), 5.31 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H, H - 31b), 5.54 (s, 2H, H-34), 5.57 (s, 1H, H - 29 *pro-E*), 6.09 (s, 1H, H - 29 *pro-Z*), 7.11 (bd, $J = 5.3$ Hz, 2H, pyridin), 7.61 (s, 1H, triazol), 8.62 (bs, 2H, pyridin).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 14.73, 15.50, 16.08, 16.21, 18.41, 20.99, 27.08, 27.50, 27.66, 28.12, 29.35, 32.57, 33.77, 34.36, 37.02, 37.26, 38.85, 38.99, 41.00, 42.74, 48.02, 50.32, 51.37, 52.90, 55.40, 57.87, 60.38, 79.03, 122.30, 123.93, 124.22$ (2C), 143.55, 143.99, 146.53, 150.66 (2C), 167.47

Triazol **99**: Výtěžek 64,8 mg (65 %)



Obrázek 36: Triazolový derivát **99**

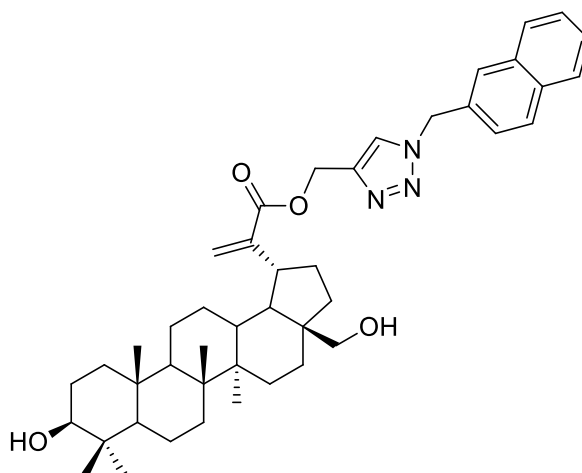
^1H NMR (500 MHz, DMSO- D_6): δ = 0.67 (bs, 3H), 0.76 (s, 3H), 0.79, (s, 3H), 0.80 (s, 3H), 0.91 (s, 3H, 5 \times CH $_3$), 2.00 (s, 3H), 2.01 (s, 3H, 2 \times CH $_3$ – Ac), 2.71 (m, 1H, H – 19 β), 3.73 (d, J = 11.1 Hz, 1H, H - 28a), 4.18 (d, J = 11.0 Hz, 1H, H – 28b), 4.36 (dd, J_1 = 11.1 Hz, J_2 = 4.6 Hz, 1H, H - 3 α), 5.17 (d, J = 12.7 Hz, 1H, H – 31a), 5.28 (d, J = 12.7 Hz, 1H, H – 31b), 5.66 (s, 1H, H – 29 *pro-E*), 5.77 (s, 2H, H-34), 5.95 (s, 1H, H – 29 *pro-Z*), 7.46 (dm, 1H), 7.53 (m, 2H), 7.89 (m, 4H, 7 \times H – naftalen), 8.28 (s, 1H, triazol).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- D_6): δ = 13.99, 15.48, 15.70, 16.38, 17.63, 20.17, 20.70, 20.95, 23.33, 26.36, 26.44, 27.66, 29.07, 31.11, 33.42, 33.55, 36.48, 37.31, 37.68, 40.20, 42.03, 45.99, 49.19, 49.89, 52.97, 54.54, 57.36, 61.39, 79.88, 124.42, 124.96, 125.72, 126.39, 126.50, 126.97, 127.58, 127.74, 128.44, 132.51, 132.74, 133.35, 141.99, 145.80, 166.27, 170.08, 170.63.

IČ (DRIFT): ν 1727 (C=O), 1623 (C=C) cm^{-1} .

HRMS (ESI): m/z vypočteno pro $\text{C}_{48}\text{H}_{63}\text{N}_3\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+ = 778,4790$, nalezeno $[\text{M}+\text{H}]^+ = 778,4788$.

Triazol **100**: Výtěžek 51,4 mg (51 %)



Obrázek 37: Triazolový derivát **100**

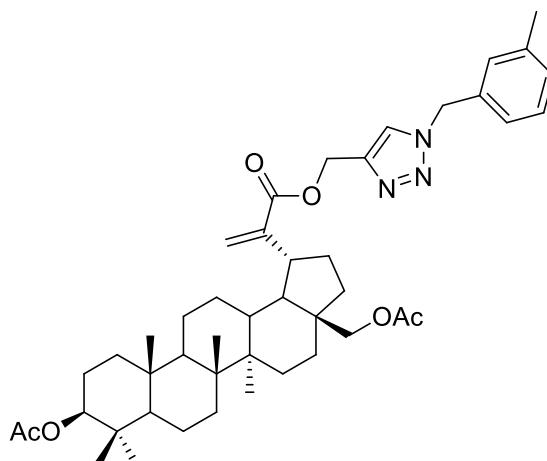
^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 0.75 (bs, 3H), 0.80 (s, 3H), 0.85, (s, 3H), 0.97 (s, 3H), 0.98 (s, 3H, $5\times\text{CH}_3$), 2.10 (m, 1H), 2.67 (dt, $J_1 = 11.3$ Hz, $J_2 = 5.6$ Hz, 1H, H – 19 β), 3.17 (dd, $J_1 = 11.3$ Hz, $J_2 = 4.7$ Hz, 1H, H – 3 α), 3.30 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H, H – 28a), 3.74 (m, 1H, H – 28b), 5.25 (d, $J = 12.7$ Hz, 1H, H – 31a), 5.29 (d, $J = 12.7$ Hz, 1H, H – 31b), 5.54 (s, 1H, H – 29 *pro-E*), 5.68 (s, 2H, H-34), 6.07 (s, 1H, H – 29 *pro-Z*), 7.46 (dd, $J_1 = 8.4$ Hz, $J_2 = 1.8$ Hz, 1H, naftalen), 7.52 (m, 2H, naftalen), 7.75 (s, 1H, triazol), 7.83 (m, 4H, naftalen).

^{13}C NMR (75 MHz, Chloroform-d): δ = 14.69, 15.50, 16.08, 16.20, 18.41, 20.96, 21.58, 25.75, 27.05, 27.52, 28.14, 29.31, 32.46, 33.74, 34.35, 37.00, 37.26, 38.84, 39.00, 40.98, 42.72, 47.98, 50.31, 54.58, 55.41, 57.99, 60.46, 68.11, 79.07, 123.84, 125.43, 126.95, 127.62, 127.95, 128.08, 128.36, 129.17, 129.38, 131.87, 133.37, 138.00, 143.53, 146.54, 167.44

IČ (DRIFT): ν 3392 (OH), 1713 (C=O), 1622 (C=C) cm^{-1} .

HRMS (ESI): m/z vypočteno pro $\text{C}_{44}\text{H}_{59}\text{N}_3\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+ = 694,4578$, nalezeno $[\text{M}+\text{H}]^+ = 694,4577$.

Triazol **101**: Výtěžek 82,7 mg (83 %)



Obrázek 38: Triazolový derivát **101**

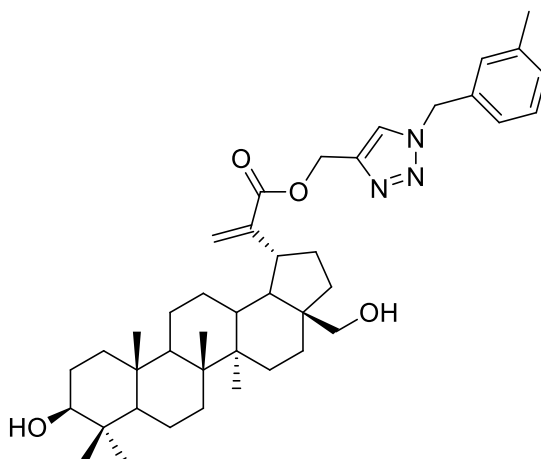
IČ (DRIFT): ν 1724 (C=O), 1623 (C=C) cm^{-1} .

HRMS (ESI): m/z vypočteno pro $\text{C}_{45}\text{H}_{63}\text{N}_3\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+ = 742,4790$, nalezeno $[\text{M}+\text{H}]^+ = 742,4790$.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 0.83$ (s, 6H), 0.84 (s, 3H), 0.87 (s, 3H), 1.00 (s, 3H, $5\times\text{CH}_3$), 2.03 (s, 3H), 2.06 (s, 3H, $2\times\text{CH}_3 - \text{Ac}$), 2.16 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-Ph-CH}_2\text{-}$), 2.73 (td, $J_1 = 11.2$ Hz, $J_2 = 5.5$ Hz, 1H, H - 19 β), 3.85 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H, H - 28a), 4.22 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H, H - 28b), 4.46 (dd, $J_1 = 9.6$ Hz, $J_2 = 5.2$ Hz, 1H, H - 3 α), 5.27 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H, H - 31a), 5.31 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H, H - 31b), 5.56 (s, 1H, H - 29 *pro-E*), 5.64 (s, 2H, H-34), 6.09 (s, 1H, H - 29 *pro-Z*), 7.59 (m, 2H, $2\times\text{H} - \text{Ph}$), 7.65 (s, 1H, triazol), 8.16 (m, 1H), 8.23 (dt, $J_1 = 7.6$ Hz, $J_2 = 2.0$ Hz, 1H, $2\times\text{H} - \text{Ph}$).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 14.67, 16.13, 16.25, 16.62, 18.28, 20.94, 21.15, 21.43, 23.80, 27.09, 27.49, 28.07, 29.88, 31.04, 32.18, 34.25, 37.17, 37.30, 37.93, 38.54, 40.98, 42.73, 46.56, 50.22, 50.97, 51.09, 53.30, 55.51, 57.90, 62.65, 77.36, 81.01, 123.01, 123.98, 124.03, 130.47, 134.00, 136.68, 143.99, 146.15, 148.75, 167.26, 171.15, 171.69, 207.05$

Triazol **102**: Výtěžek 84,4 mg (84 %)



Obrázek 39: Triazolový derivát **102**

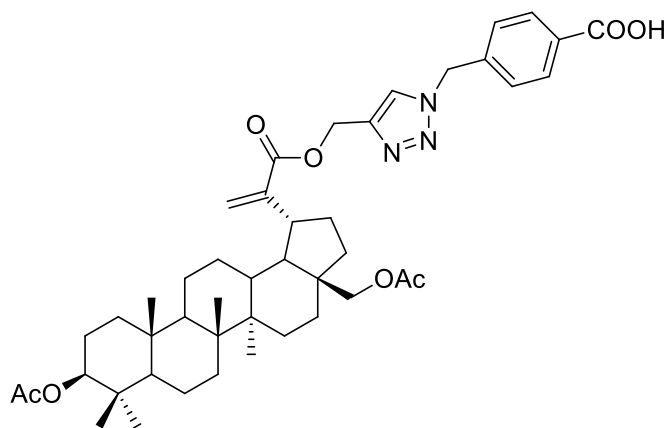
IČ (DRIFT): ν 3412 (OH), 1715 (C=O), 1668 (C=C) cm^{-1} .

HRMS (ESI): m/z vypočteno pro $\text{C}_{41}\text{H}_{59}\text{N}_3\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+ = 658,4578$, nalezeno $[\text{M}+\text{H}]^+ = 658,4579$.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 0.76$ (s, 3H), 0.81 (s, 3H), 0.88 (s, 3H), 0.96 (s, 3H), 0.99 (s, 3H, $5\times\text{CH}_3$), 2.34 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-Ph-CH}_2$), 2.69 (td, $J_1 = 11.3$ Hz, $J_2 = 5.7$ Hz, 1H, H – 19 β), 3.18 (dd, $J_1 = 11.4$ Hz, $J_2 = 4.6$ Hz, H – 3 α), 3.32 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H, H – 28a), 3.77 (d, $J = 10.5$ Hz, 1H, H – 28b), 5.24 (d, $J = 12.7$ Hz, 1H, H – 31a), 5.28 (d, $J = 12.7$ Hz, 1H, H – 31b), 5.47 (s, 2H, H-34), 5.55 (s, 1H, H – 29 *pro-E*), 6.07 (s, 1H, H – 29 *pro-Z*), 7.07 (m, 2H), 7.16 (m, 1H), 7.25 (m, 1H, $4\times\text{H-Ph}$), 7.52 (s, 1H, triazol).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 14.72, 15.50, 16.09, 16.21, 18.42, 20.97, 21.47, 27.09, 27.52, 28.13, 29.32, 31.05, 31.57, 32.53, 33.76, 34.37, 36.60, 37.02, 37.27, 38.85, 39.00, 41.00, 42.74, 48.01, 50.33, 54.38, 55.42, 57.99, 60.47, 79.07, 123.78, 125.30, 128.96, 129.17, 129.74, 134.44, 139.16, 143.44, 146.60, 162.66, 167.45$

Triazol **103**: Výtěžek 68,1 mg (68 %)



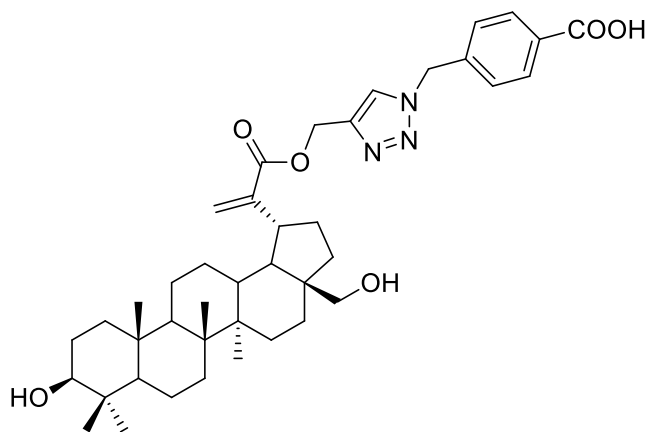
Obrázek 40: Triazolový derivát **103**

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 0.82$ (s, 6H), 0.84 (s, 6H), 1.00 (s, 3H, $5\times\text{CH}_3$), 2.04 (s, 3H), 2.06 (s, 3H, $2\times\text{CH}_3 - \text{Ac}$), 2.73 (td, $J_1 = 11.1$ Hz, $J_2 = 5.4$ Hz, 1H, H - 19 β), 3.84 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H, H - 28a), 4.23 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H, H - 28b), 4.46 (dd, $J_1 = 9.5$ Hz, $J_2 = 5.5$ Hz, 1H, H - 3 α), 5.28 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H, H - 31a), 5.32 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H, H - 31b), 5.55 (s, 1H, H - 29 *pro-E*), 5.60 (s, 2H, H-34), 6.08 (s, 1H, H - 29 *pro-Z*), 7.34 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, $2\times\text{H} - \text{Ar}$), 7.60 (s, 1H, triazol), 8.09 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, $2\times\text{H} - \text{Ar}$).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 14.62, 16.13, 16.24, 16.60, 18.26, 20.90, 21.15, 21.47, 23.77, 27.08, 28.03, 29.77, 29.84, 31.80, 32.02, 34.24, 34.31, 37.16, 37.31, 37.92, 38.52, 40.96, 42.72, 46.58, 50.19, 53.87, 55.49, 57.85, 62.71, 81.25, 124.08, 128.00, 128.11, 130.33, 130.83, 131.04, 132.16, 139.94, 143.75, 167.22, 169.57, 171.50, 171.76$
IČ (DRIFT): ν 1717 (C=O), 1615 (C=C) cm^{-1} .

HRMS (ESI): m/z vypočteno pro $\text{C}_{45}\text{H}_{61}\text{N}_3\text{O}_8$ $[\text{M}+\text{H}]^+ = 772,4531$, nalezeno $[\text{M}+\text{H}]^+ = 772,4529$.

Triazol **104**: Výtěžek 77,7 mg (78 %)



Obrázek 41: Triazolový derivát **104**

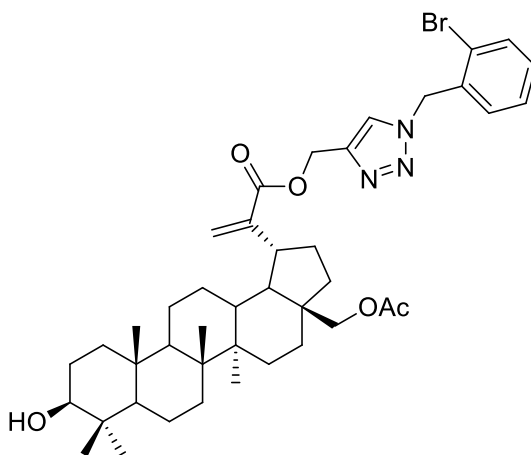
$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ = 0.75 (s, 3H), 0.80 (s, 3H), 0.88 (s, 3H), 0.96 (s, 3H), 0.99 (s, 3H, $5\times\text{CH}_3$), 2.68 (td, $J_1 = 11.3$ Hz, $J_2 = 5.6$ Hz, 1H, H – 19 β), 3.19 (dd, $J_1 = 11.2$ Hz, $J_2 = 4.4$ Hz, H - 3 α), 3.32 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H, H - 28a), 3.77 (d, $J = 10.7$ Hz, 1H, H – 28b), 5.27 (d, $J = 12.7$ Hz, 1H, H – 31a), 5.30 (d, $J = 12.7$ Hz, 1H, H – 31b), 5.56 (s, 1H, H – 29 *pro-E*), 5.59 (s, 2H, H-34), 6.08 (s, 1H, H – 29 *pro-Z*), 7.32 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, $2\times\text{H} - \text{Ar}$), 7.53 (s, 1H, triazol), 7.32 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, $2\times\text{H} - \text{Ar}$).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ = 14.72, 15.51, 16.08, 16.20, 18.41, 20.97, 27.07, 27.45, 27.62, 28.11, 29.33, 31.04, 31.67, 33.76, 34.36, 36.72, 37.02, 37.25, 38.85, 38.98, 40.99, 42.74, 48.00, 50.33, 53.90, 55.42, 57.91, 60.44, 79.13, 124.05, 128.01 (2C), 131.05 (2C), 139.76, 143.78, 146.54, 159.65, 162.93, 167.49, 169.17.

IČ (DRIFT): ν 3349 (OH), 1720 (C=O), 1668 (C=C) cm^{-1} .

HRMS (ESI): m/z vypočteno pro $\text{C}_{41}\text{H}_{57}\text{N}_3\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+ = 688,4320$, nalezeno $[\text{M}+\text{H}]^+ = 688,4321$.

Triazol **105**: Výtěžek 46,3 mg (46 %)



Obrázek 42: Triazolový derivát **105**

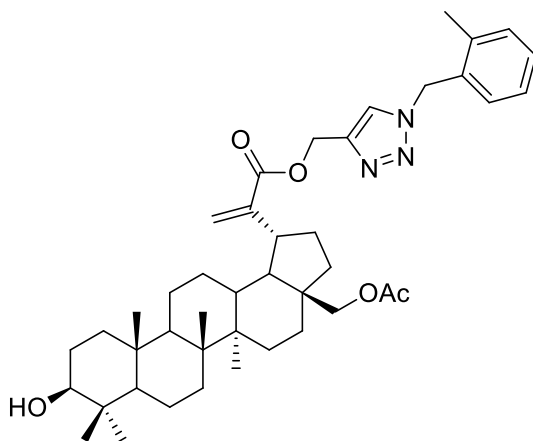
$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ = 0.75 (s, 3H), 0.80 (s, 3H), 0.87 (s, 3H), 0.96 (s, 3H), 1.00 (s, 3H, $5\times\text{CH}_3$), 2.06 (s, 3H, Ac), 2.73 (td, $J_1 = 11.3$ Hz, $J_2 = 5.6$ Hz, 1H, H - 19 β), 3.17 (dd, $J_1 = 11.1$ Hz, $J_2 = 4.8$ Hz, 1H, H - 3 α), 3.83 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H, H - 28a), 4.24 (d, $J = 10.7$ Hz, 1H, H - 28b), 5.26 (d, $J = 12.7$ Hz, 1H, H - 31a), 5.31 (d, $J = 12.7$ Hz, 1H, H - 31b), 5.55 (s, 1H, H - 29 *pro-E*), 5.65 (s, 2H, H-34), 6.08 (s, 1H, H - 29 *pro-Z*), 7.16 (dd, $J_1 = 7.6$ Hz, $J_2 = 1.7$ Hz, 1H), 7.23 (td, $J_1 = 7.6$ Hz, $J_2 = 1.7$ Hz, 1H), 7.31 (td, $J_1 = 7.4$ Hz, $J_2 = 1.2$ Hz, 1H), 7.62 (dd, $J_1 = 7.9$ Hz, $J_2 = 1.2$ Hz, 1H, $4\times\text{H} - \text{Ph}$), 7.65 (s, 1H, triazol).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ = 14.24, 14.72, 15.49, 16.13, 16.19, 18.40, 20.92, 21.16, 27.10, 27.41, 27.52, 28.13, 29.82, 29.91, 34.33, 37.26, 37.29, 38.86, 38.99, 40.95, 42.74, 46.55, 50.29, 51.20, 54.00, 55.43, 57.92, 62.73, 77.37, 79.06, 123.64, 124.20, 128.38, 130.50, 130.62, 133.40, 134.11, 143.36, 146.27, 150.06, 167.23, 171.64

IČ (DRIFT): ν 3400 (OH), 1716 (C=O), 1623 (C=C) cm^{-1} .

HRMS (ESI): m/z vypočteno pro $\text{C}_{42}\text{H}_{58}\text{BrN}_3\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+ = 764,3633$, nalezeno $[\text{M}+\text{H}]^+ = 764,3632$.

Triazol **106**: Výtěžek 47,9 mg (48 %)



Obrázek 43: Triazolový derivát **106**

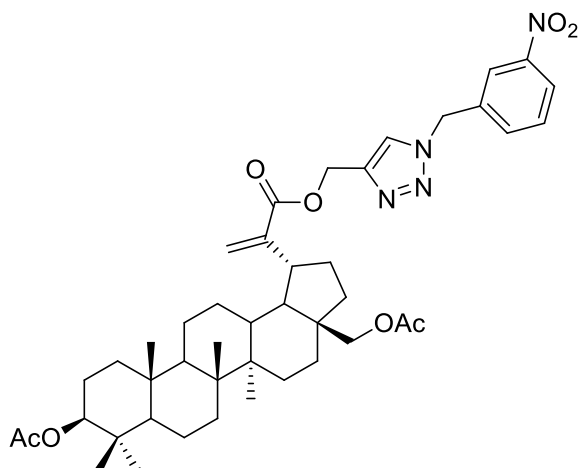
^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 0.75 (s, 3H), 0.80 (s, 3H), 0.87 (s, 3H), 0.96 (s, 3H), 1.00 (s, 3H, $5\times\text{CH}_3$), 2.06 (s, 3H, $\text{CH}_3 - \text{Ac}$), 2.28 (s, 3H, Ph-CH_3), 2.72 (td, $J_1 = 11.3$ Hz, $J_2 = 5.5$ Hz, 1H, H – 19 β), 3.17 (dd, $J_1 = 11.1$ Hz, $J_2 = 4.8$ Hz, 1H, H - 3 α), 3.83 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H, H - 28a), 4.24 (d, $J = 10.6$ Hz, 1H, H – 28b), 5.23 (d, $J = 12.7$ Hz, 1H, H – 31a), 5.27 (d, $J = 12.7$ Hz, 1H, H – 31b), 5.53 (s, 2H, H-34), 5.54 (s, 1H, H – 29 *pro-E*), 6.06 (s, 1H, H – 29 *pro-Z*), 7.15 (m, 1H), 7.22 (m, 2H), 7.29 (m, 1H, $4\times\text{H-Aryl}$), 7.42 (s, 1H, triazol).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 14.73, 15.49, 16.14, 16.19, 18.41, 19.12, 20.92, 21.16, 27.11, 27.43, 27.52, 28.13, 29.91, 31.04, 32.10, 34.34, 37.26, 37.30, 38.86, 38.99, 40.96, 42.74, 46.55, 50.96, 51.12, 52.55, 55.44, 57.92, 62.73, 77.37, 79.07, 123.67, 124.14, 126.85, 129.37, 129.54, 131.22, 132.42, 137.01, 143.19, 146.25, 167.23, 171.66.

IČ (DRIFT): ν 3420 (OH), 1716 (C=O), 1623 (C=C) cm^{-1} .

HRMS (ESI): m/z vypočteno pro $\text{C}_{43}\text{H}_{61}\text{N}_3\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+ = 700,4684$, nalezeno $[\text{M}+\text{H}]^+ = 700,4685$.

Triazol **107**: Výtěžek 80,4 mg (80 %)



Obrázek 44: Triazolový derivát **107**

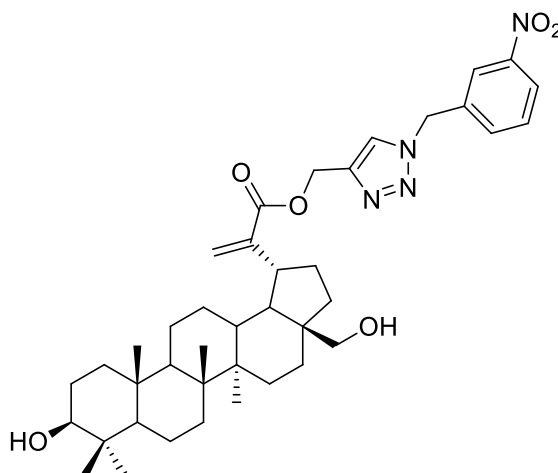
$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ = 0.83 (s, 6H), 0.84 (s, 3H), 0.88 (s, 3H), 1.01 (s, 3H, $5\times\text{CH}_3$), 2.03 (s, 3H), 2.06 (s, 3H, $2\times\text{CH}_3 - \text{Ac}$), 2.74 (td, $J_1 = 11.3$ Hz, $J_2 = 5.6$ Hz, 1H, H – 19 β), 3.85 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H, H - 28a), 4.22 (d, $J = 10.9$ Hz, 1H, H – 28b), 4.46 (dd, $J_1 = 11.3$ Hz, $J_2 = 4.8$ Hz, 1H, H - 3 α), 5.28 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H, H – 31a), 5.31 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H, H – 31b), 5.56 (s, 1H, H – 29 *pro-E*), 5.64 (s, 2H, H-34), 6.09 (s, 1H, H – 29 *pro-Z*), 7.59 (m, 2H, pyridin), 7.64 (s, 1H, triazol), 8.16 (m, 1H, pyridin), 8.23 (dt, $J_1 = 7.7$ Hz, $J_2 = 2.0$ Hz, 1H, pyridin).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ = 14.68, 16.14, 16.25, 16.62, 18.28, 20.95, 21.16, 21.44, 23.81, 27.10, 27.49, 28.08, 28.19, 29.89, 32.20, 34.26, 34.31, 37.18, 37.31, 37.94, 38.55, 40.99, 42.74, 46.57, 50.23, 51.10, 53.30, 55.52, 57.92, 62.66, 81.00, 123.01, 123.98, 124.01, 130.47, 133.99, 136.69, 144.01, 146.17, 148.76, 167.26, 171.14, 171.68.

IČ (DRIFT): ν 1724 (C=O), 1623 (C=C) cm^{-1} .

HRMS (ESI): m/z vypočteno pro $\text{C}_{44}\text{H}_{60}\text{N}_4\text{O}_8$ $[\text{M}+\text{H}]^+ = 773,4484$, nalezeno $[\text{M}+\text{H}]^+ = 773,4484$.

Triazol **108**: Výtěžek 83,1 mg (83 %)



Obrázek 45: Triazolový derivát **108**

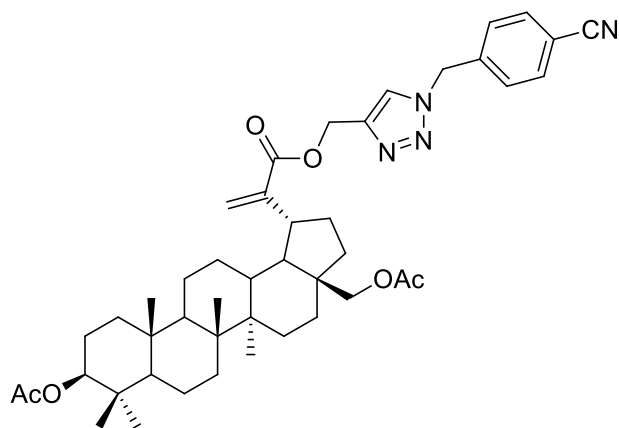
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 0.75 (s, 3H), 0.80 (s, 3H), 0.89 (s, 3H), 0.96 (s, 3H), 0.99 (s, 3H, 5×CH₃), 2.69 (td, J_1 = 11.7 Hz, J_2 = 5.7 Hz, 1H, H – 19 β), 3.18 (dd, J_1 = 11.2 Hz, J_2 = 4.6 Hz, H - 3 α), 3.32 (d, J = 10.8 Hz, 1H, H - 28a), 3.77 (d, J = 10.8 Hz, 1H, H – 28b), 5.27 (d, J = 12.8 Hz, 1H, H – 31a), 5.31 (d, J = 12.8 Hz, 1H, H – 31b), 5.57 (s, 1H, H – 29 *pro-E*), 5.63 (s, 2H, H-34), 6.09 (s, 1H, H – 29 *pro-Z*), 7.59 (m, 2H, 2×H - Ar), 7.64 (s, 1H, triazol), 8.14 (bs, 1H), 7.22 (dt, J_1 = 7.6 Hz, J_2 = 1.9 Hz, 1H, 2×H - Ar).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 14.72, 15.50, 16.08, 16.21, 18.41, 20.98, 27.08, 27.51, 27.65, 28.12, 29.33, 31.04, 32.54, 33.76, 34.36, 37.02, 37.26, 38.86, 38.99, 41.00, 42.74, 48.01, 50.33, 51.34, 53.29, 55.41, 57.86, 60.44, 79.05, 122.97, 123.98, 124.04, 130.47, 133.97, 136.67, 144.01, 146.51, 148.75, 162.66, 167.47,

IČ (DRIFT): ν 3407 (OH), 1714 (C=O), 1631 (C=C), 1531, 1350 (NO₂) cm⁻¹.

HRMS (ESI): m/z vypočteno pro C₄₀H₅₆N₄O₆ [M+H]⁺ = 689,4273, nalezeno [M+H]⁺ = 689,4273.

Triazol **109**: Výtěžek 82,6 mg (83 %)



Obrázek 46: Triazolový derivát **109**

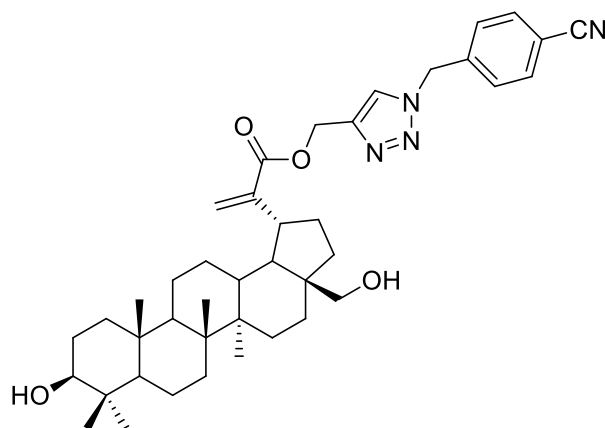
^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 0.82 (s, 6H), 0.83 (s, 3H), 0.87 (s, 3H), 1.00 (s, 3H, $5\times\text{CH}_3$), 2.03 (s, 3H), 2.06 (s, 3H, $2\times\text{Ac}$), 2.73 (td, $J_1 = 11.2$ Hz, $J_2 = 5.5$ Hz, 1H, H – 19 β), 3.84 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H, H - 28a), 4.22 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H, H – 28b), 4.45 (dd, $J_1 = 9.5$ Hz, $J_2 = 5.2$ Hz, 1H, H - 3 α), 5.26 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H, H – 31a), 5.30 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H, H – 31b), 5.56 (s, 2H, H-34), 5.59 (s, 1H, H – 29 *pro-E*), 6.08 (s, 1H, H – 29 *pro-Z*), 7.37 (bd, $J = 8.3$ Hz, 2H, aryl), 7.60 (s, 1H, triazol), 6.36 (bd, $J = 8.3$ Hz, 2H, aryl).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 14.67, 16.12, 16.24, 16.60, 18.26, 20.94, 21.15, 21.42, 23.79, 27.07, 27.48, 28.06, 29.81, 29.87, 31.03, 32.16, 34.25, 37.16, 37.29, 37.91, 38.54, 40.97, 42.72, 46.55, 50.22, 50.93, 53.56, 55.51, 57.87, 62.65, 81.01, 113.05, 118.17, 124.11, 124.27, 128.56 (2C), 133.05 (2C), 139.74, 143.93, 146.16, 167.26, 171.18, 171.71.

IČ (DRIFT): ν 2230 (CN), 1724 (C=O), 1612 (C=C) cm^{-1} .

HRMS (ESI): m/z vypočteno pro $\text{C}_{45}\text{H}_{60}\text{N}_4\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+ = 753,4586$, nalezeno $[\text{M}+\text{H}]^+ = 753,4583$.

Triazol **110**: Výtěžek 81 mg (81 %)



Obrázek 47: Triazolový derivát **110**

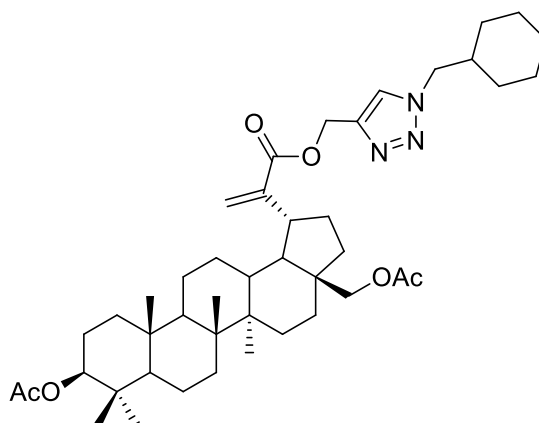
^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 0.75 (s, 3H), 0.81 (s, 3H), 0.90 (s, 3H), 0.96 (s, 3H), 1.00 (s, 3H, $5\times\text{CH}_3$), 2.69 (td, $J_1 = 11.2$ Hz, $J_2 = 5.6$ Hz, 1H, H – 19 β), 3.17 (dd, $J_1 = 11.3$ Hz, $J_2 = 4.6$ Hz, H - 3 α), 3.32 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H, H - 28a), 3.77 (d, $J = 10.7$ Hz, 1H, H – 28b), 5.26 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H, H – 31a), 5.30 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H, H – 31b), 5.57 (s, 1H, H – 29 *pro-E*), 5.59 (s, 2H, H-34), 6.08 (s, 1H, H – 29 *pro-Z*), 7.34 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, $2\times\text{H}$ - Ar), 7.60 (s, 1H, triazol), 7.67 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, $2\times\text{H}$ - Ar).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 14.74, 15.50, 16.09, 16.22, 18.41, 21.00, 27.09, 27.51, 27.66, 28.13, 29.34, 31.04, 32.58, 33.76, 34.37, 37.03, 37.27, 38.88, 38.99, 41.01, 42.75, 48.22, 50.34, 51.34, 53.57, 55.43, 57.85, 60.44, 79.05, 113.09, 118.16, 123.96, 124.10, 128.54, 133.06, 139.71, 143.97, 146.53, 167.47.

IČ (DRIFT): ν 3366 (OH), 2229 (CN), 1713 (C=O), 1669 (C=C) cm^{-1} .

HRMS (ESI): m/z vypočteno pro $\text{C}_{41}\text{H}_{56}\text{N}_4\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+ = 669,4374$, nalezeno $[\text{M}+\text{H}]^+ = 669,4376$.

Triazol **111**: Výtěžek 70,2 mg (70 %)



Obrázek 48: Triazolový derivát **111**

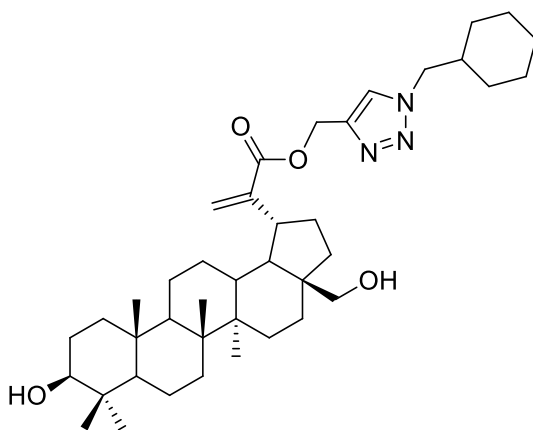
^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 0.82 (s, 9H), 0.82 (s, 3H), 1.00 (s, 3H, $5\times\text{CH}_3$), 2.02 (s, 3H), 2.05 (s, 3H, $2\times\text{Ac}$), 2.74 (td, $J_1 = 11.2$ Hz, $J_2 = 5.5$ Hz, 1H, H – 19 β), 3.83 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H, H - 28a), 4.15 (s, H, H-34a), 4.17 (s, H, H-34b), 4.24 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H, H – 28b), 4.44 (dd, $J_1 = 10.7$ Hz, $J_2 = 5.5$ Hz, 1H, H - 3 α), 5.26 (d, $J = 12.7$ Hz, 1H, H – 31a), 5.31 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H, H – 31b), 5.56 (s, 1H, H – 29 *pro-E*), 6.10 (s, 1H, H – 29 *pro-Z*), 7.55 (s, 1H, triazol).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 14.67, 16.12, 16.22, 16.60, 18.27, 20.93, 21.13, 21.41, 23.79, 25.62, 26.16, 27.09, 27.42, 28.06, 29.87, 30.61, 31.02, 31.95, 34.24, 34.34, 37.16, 37.30, 37.91, 38.52, 38.84, 40.96, 42.73, 46.56, 50.21, 50.92, 55.49, 56.72, 58.00, 62.72, 81.01, 124.17, 124.35, 142.77, 146.27, 167.32, 171.15, 171.67.

IČ (DRIFT): ν 1731 (C=O), 1623 (C=C) cm^{-1} .

HRMS (ESI): m/z vypočteno pro $\text{C}_{44}\text{H}_{67}\text{N}_3\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+ = 734,5103$, nalezeno $[\text{M}+\text{H}]^+ = 734,5103$.

Triazol **112**: Výtěžek 90,1 mg (90 %)



Obrázek 49: Triazolový derivát **112**

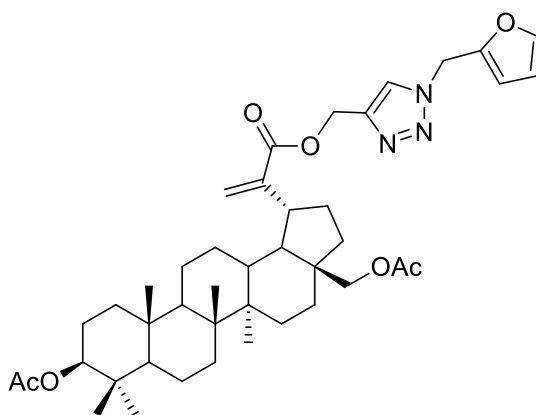
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 0.75 (s, 3H), 0.80 (s, 3H), 0.90 (s, 3H), 0.96 (s, 3H), 1.00 (s, 3H, 5×CH₃), 2.14 (m, 1H), 2.70 (td, J_1 = 11.3 Hz, J_2 = 5.6 Hz, 1H, H – 19 β), 3.17 (dd, J_1 = 11.4 Hz, J_2 = 4.7 Hz, H - 3 α), 3.33 (d, J = 10.8 Hz, 1H, H - 28a), 3.78 (d, J = 10.8 Hz, 1H, H - 28b), 4.16 (s, 1H, H-34a), 4.17 (s, 1H, H-34b), 5.27 (d, J = 12.7 Hz, 1H, H – 31a), 5.31 (d, J = 12.7 Hz, 1H, H – 31b), 5.57 (s, 1H, H – 29 *pro-E*), 6.10 (s, 1H, H – 29 *pro-Z*), 7.55 (s, 1H, triazol).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 14.74, 15.49, 16.09, 16.20, 18.42, 20.99, 25.64, 26.18, 27.10, 27.51, 27.60, 28.13, 29.32, 30.64, 31.57, 32.55, 33.78, 34.38, 37.03, 37.27, 38.85, 38.99, 41.01, 42.75, 48.03, 50.34, 51.48, 53.55, 55.42, 56.70, 58.06, 60.47, 79.07, 123.92, 124.31, 142.87, 146.65, 167.51.

IČ (DRIFT): ν 3420 (OH), 1707 (C=O), 1623 (C=C) cm⁻¹.

HRMS (ESI): m/z vypočteno pro C₄₀H₆₃N₃O₄ [M+H]⁺ = 650,4891, nalezeno [M+H]⁺ = 650,4891.

Triazol **113**: Výtěžek 46 mg (46 %)



Obrázek 50: Triazolový derivát **113**

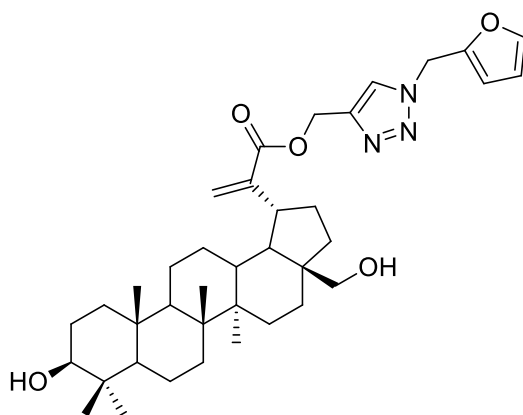
^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 0.83 (s, 3H), 0.83 (s, 3H), 0.84 (s, 3H), 0.87 (s, 3H), 1.01 (s, 3H, $5\times\text{CH}_3$), 2.03 (s, 3H), 2.06 (s, 3H, $2\times\text{Ac}$), 2.74 (td, $J_1 = 11.2$ Hz, $J_2 = 5.5$ Hz, 1H, H - 19 β), 3.83 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H, H - 28a), 4.25 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H, H - 28b), 4.46 (dd, $J_1 = 10.9$ Hz, $J_2 = 5.2$ Hz, 1H, H - 3 α), 5.25 (d, $J = 12.7$ Hz, 1H, H - 31a), 5.29 (d, $J = 12.7$ Hz, 1H, H - 31b), 5.52 (s, 2H, H-34), 5.56 (s, 1H, H - 29 *pro-E*), 6.09 (s, 1H, H - 29 *pro-Z*), 6.39 (dd, $J_1 = 3.2$ Hz, $J_2 = 1.9$ Hz, 1H, H - furan), 6.45 (bd, $J = 3.2$ Hz, 1H, H - furan), 7.43 (dd, $J_1 = 1.8$ Hz, $J_2 = 0.7$ Hz, 1H, H - furan), 7.63 (s, 1H, triazol).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 14.67, 16.15, 16.26, 16.63, 18.30, 20.94, 21.16, 21.44, 23.83, 27.12, 27.42, 28.09, 29.90, 30.47, 32.14, 34.27, 34.37, 37.19, 37.31, 37.94, 38.54, 40.99, 42.75, 46.58, 46.88, 50.22, 51.20, 55.52, 57.94, 62.74, 81.02, 110.56, 111.02, 123.71, 124.11, 143.36, 143.88, 146.29, 147.23, 167.26, 171.13, 171.65.

IČ (DRIFT): ν 1717 (C=O), 1623 (C=C) cm^{-1} .

HRMS (ESI): m/z vypočteno pro $\text{C}_{42}\text{H}_{59}\text{N}_3\text{O}_7$ $[\text{M}+\text{H}]^+ = 718,4426$, nalezeno $[\text{M}+\text{H}]^+ = 718,4426$.

Triazol **114**: Výtěžek 82,9 mg (83 %)



Obrázek 51: Triazolový derivát **114**

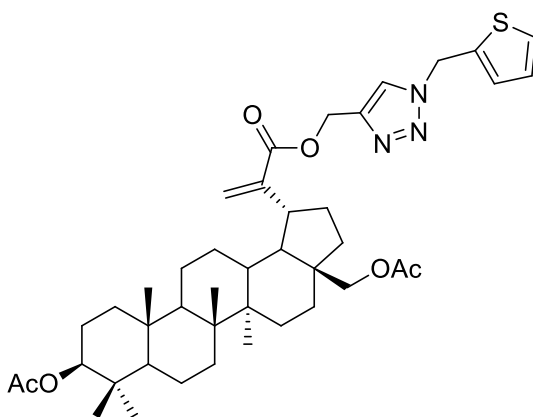
^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 0.75 (s, 3H), 0.81 (s, 3H), 0.89 (s, 3H), 0.96 (s, 3H), 1.00 (s, 3H, $5\times\text{CH}_3$), 2.14 (m, 1H), 2.69 (td, $J_1 = 11.3$ Hz, $J_2 = 5.6$ Hz, 1H, H – 19 β), 3.17 (dd, $J_1 = 11.4$ Hz, $J_2 = 4.7$ Hz, H - 3 α), 3.32 (d, $J = 10.7$ Hz, 1H, H - 28a), 3.77 (d, $J = 10.7$ Hz, 1H, H – 28b), 5.25 (d, $J = 12.7$ Hz, 1H, H – 31a), 5.28 (d, $J = 12.7$ Hz, 1H, H – 31b), 5.52 (s, 2H, H-34), 5.56 (s, 1H, H – 29 *pro-E*), 6.08 (s, 1H, H – 29 *pro-Z*), 6.38 (dd, $J_1 = 3.3$ Hz, $J_2 = 1.9$ Hz, 1H, H – furan), 6.45 (dd, $J_1 = 3.4$ Hz, $J_2 = 0.5$ Hz, 1H, H – furan), 7.43 (dd, $J_1 = 1.9$ Hz, $J_2 = 0.8$ Hz, 1H, H – furan), 7.62 (s, 1H, triazol).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 14.70, 15.50, 16.09, 16.21, 18.42, 20.97, 27.09, 27.52, 27.60, 28.13, 29.32, 32.52, 33.77, 34.37, 37.02, 37.27, 38.27, 38.85, 39.00, 41.00, 42.75, 46.87, 48.01, 50.33, 51.38, 55.42, 57.92, 60.47, 79.07, 110.56, 111.01, 123.71, 124.85, 143.38, 143.88, 146.60, 147.21, 167.45.

IČ (DRIFT): ν 3376 (OH), 1713 (C=O), 1624 (C=C) cm^{-1} .

HRMS (ESI): m/z vypočteno pro $\text{C}_{38}\text{H}_{55}\text{N}_3\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+ = 634,4214$, nalezeno $[\text{M}+\text{H}]^+ = 634,4215$.

Triazol **115**: Výtěžek 74,2 mg (74 %)



Obrázek 52: Triazolový derivát **115**

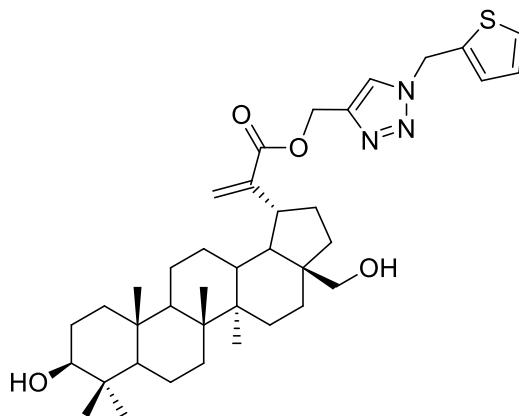
^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 0.83 (s, 3H), 0.83 (s, 3H), 0.84 (s, 3H), 0.87 (s, 3H), 1.01 (s, 3H, $5\times\text{CH}_3$), 2.03 (s, 3H), 2.06 (s, 3H, $2\times\text{Ac}$), 2.73 (td, $J_1 = 11.3$ Hz, $J_2 = 5.6$ Hz, 1H, H - 19 β), 3.83 (d, $J = 11.1$ Hz, 1H, H - 28a), 4.24 (d, $J = 10.6$ Hz, 1H, H - 28b), 4.46 (dd, $J_1 = 11.1$ Hz, $J_2 = 5.1$ Hz, 1H, H - 3 α), 5.24 (d, $J = 12.7$ Hz, 1H, H - 31a), 5.28 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H, H - 31b), 5.55 (s, 1H, H - 29 *pro-E*), 5.70 (s, 2H, H-34), 6.08 (s, 1H, H - 29 *pro-Z*), 7.01 (dd, $J_1 = 5.1$ Hz, $J_2 = 3.5$ Hz, 1H, H - thiofen), 7.12 (dd, $J_1 = 3.4$ Hz, $J_2 = 0.8$ Hz, 1H, H - thiofen), 7.34 (dd, $J_1 = 5.1$ Hz, $J_2 = 1.2$ Hz, 1H, H - thiofen), 7.59 (s, 1H, triazol).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 14.67, 16.15, 16.26, 16.62, 18.30, 20.95, 21.16, 21.44, 23.82, 27.11, 27.42, 28.09, 29.90, 31.04, 32.23, 34.27, 34.36, 37.19, 37.30, 37.94, 38.55, 40.98, 42.75, 46.57, 48.68, 50.22, 51.16, 53.55, 57.96, 62.73, 81.02, 123.48, 124.18, 127.36, 127.53, 128.46, 135.93, 143.44, 146.26, 167.26, 171.13, 171.65.

IČ (DRIFT): ν 1727 (C=O), 1623 (C=C) cm^{-1} .

HRMS (ESI): m/z vypočteno pro $\text{C}_{42}\text{H}_{59}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+ = 734,4197$, nalezeno $[\text{M}+\text{H}]^+ = 734,4197$.

Triazol **116**: Výtěžek 58,9 mg (59 %)



Obrázek 53: Triazolový derivát **116**

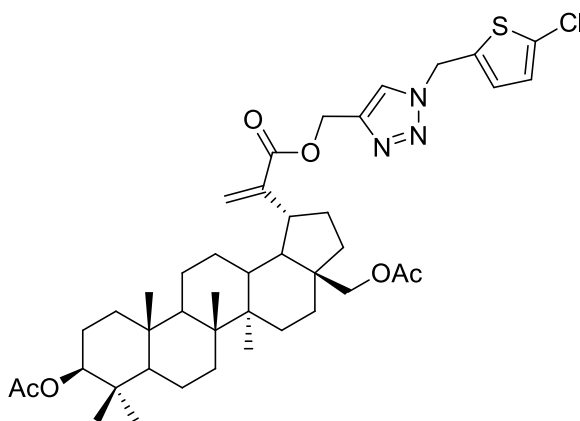
$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ = 0.75 (s, 3H), 0.81 (s, 3H), 0.88 (s, 3H), 0.96 (s, 3H), 0.99 (s, 3H, $5\times\text{CH}_3$), 2.13 (m, 1H), 2.68 (td, $J_1 = 11.3$ Hz, $J_2 = 5.6$ Hz, 1H, H – 19 β), 3.17 (dd, $J_1 = 11.3$ Hz, $J_2 = 4.6$ Hz, H - 3 α), 3.32 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H, H - 28a), 3.77 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H, H – 28b), 5.24 (d, $J = 12.7$ Hz, 1H, H – 31a), 5.28 (d, $J = 12.7$ Hz, 1H, H – 31b), 5.55 (s, 1H, H – 29 *pro-E*), 5.69 (s, 2H, H - 34), 6.07 (s, 1H, H – 29 *pro-Z*), 7.01 (dd, $J_1 = 5.1$ Hz, $J_2 = 3.5$ Hz, 1H, H – furan), 7.11 (dd, $J_1 = 3.5$ Hz, $J_2 = 1.0$ Hz, 1H, H – furan), 7.33 (dd, $J_1 = 5.1$ Hz, $J_2 = 1.2$ Hz, 1H, H – furan), 7.59 (s, 1H, triazol).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): δ = 14.71, 15.50, 16.09, 16.21, 18.42, 20.98, 25.74, 27.08, 27.52, 27.59, 28.13, 29.32, 32.50, 33.76, 34.37, 37.01, 37.27, 38.86, 38.99, 41.00, 42.74, 48.00, 48.67, 50.32, 55.42, 57.92, 60.45, 68.10, 79.07, 123.48, 127.34, 127.52, 128.44, 129.71, 135.91, 143.46, 146.58, 167.44.

IČ (DRIFT): ν 3389 (OH), 1715 (C=O), 1623 (C=C) cm^{-1} .

HRMS (ESI): m/z vypočteno pro $\text{C}_{38}\text{H}_{55}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+ = 650,3986$, nalezeno $[\text{M}+\text{H}]^+ = 650,3985$.

Triazol **117**: Výtěžek 76,3 mg (76 %)



Obrázek 54: Triazolový derivát **117**

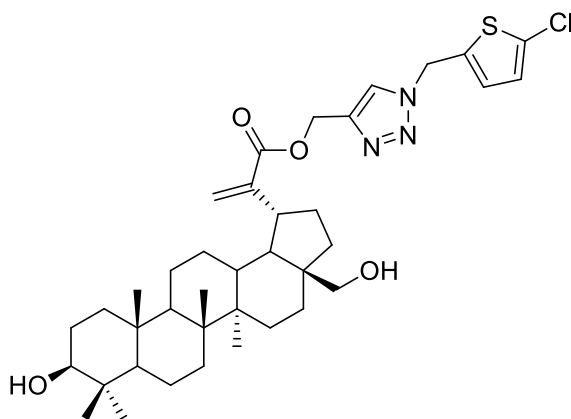
^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 0.83 (s, 3H), 0.83 (s, 3H), 0.84 (s, 3H), 0.87 (s, 3H), 1.01 (s, 3H, $5\times\text{CH}_3$), 2.03 (s, 3H), 2.06 (s, 3H, $2\times\text{Ac}$), 2.73 (td, $J_1 = 11.3$ Hz, $J_2 = 5.6$ Hz, 1H, H – 19 β), 3.84 (d, $J = 11.0$ Hz, 1H, H - 28a), 4.24 (d, $J = 10.9$ Hz, 1H, H – 28b), 4.46 (dd, $J_1 = 11.0$ Hz, $J_2 = 5.2$ Hz, 1H, H - 3 α), 5.25 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H, H – 31a), 5.29 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H, H – 31b), 5.56 (s, 1H, H – 29 *pro-E*), 5.59 (s, 2H, H-34), 6.09 (s, 1H, H – 29 *pro-Z*), 6.82 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H, H – thiofen), 6.90 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H, H – thiofen), 7.61 (s, 1H, triazol).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 14.67, 16.15, 16.26, 16.63, 18.29, 20.95, 21.16, 21.44, 23.82, 25.75, 27.10, 27.44, 28.09, 29.90, 34.26, 34.34, 37.19, 37.31, 37.94, 38.55, 40.98, 42.75, 46.57, 48.86, 50.22, 55.51, 57.90, 62.71, 68.11, 81.01, 123.45, 124.27, 125.43, 126.44, 127.84, 132.07, 134.69, 143.64, 146.20, 159.20, 167.26, 171.13, 171.66.

IČ (DRIFT): ν 1719 (C=O), 1623 (C=C) cm^{-1} .

HRMS (ESI): m/z vypočteno pro $\text{C}_{42}\text{H}_{58}\text{ClN}_3\text{O}_6\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+ = 768,3808$, nalezeno $[\text{M}+\text{H}]^+ = 768,3806$.

Triazol **118**: Výtěžek 83,4 mg (83 %)



Obrázek 55: Triazolový derivát **118**

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): δ = 0.75 (s, 3H), 0.80 (s, 3H), 0.88 (s, 3H), 0.96 (s, 3H), 0.99 (s, 3H, $5\times\text{CH}_3$), 2.13 (m, 1H), 2.68 (td, $J_1 = 11.1$ Hz, $J_2 = 5.5$ Hz, 1H, H – 19 β), 3.17 (dd, $J_1 = 11.4$ Hz, $J_2 = 4.6$ Hz, H - 3 α), 3.32 (d, $J = 10.8$ Hz, 1H, H - 28a), 3.77 (d, $J = 11.2$ Hz, 1H, H – 28b), 5.24 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H, H – 31a), 5.28 (d, $J = 12.8$ Hz, 1H, H – 31b), 5.56 (s, 1H, H – 29 *pro-E*), 5.58 (s, 2H, H-34), 6.08 (s, 1H, H – 29 *pro-Z*), 6.81 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H, H – thiofen), 6.89 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H, H – thiofen), 7.60 (s, 1H, triazol).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 14.71, 15.50, 16.09, 16.21, 18.42, 20.98, 27.08, 27.52, 27.60, 28.13, 29.33, 32.52, 33.77, 34.37, 37.02, 37.27, 38.86, 39.00, 41.00, 41.35, 42.75, 48.01, 48.86, 50.33, 51.36, 55.41, 57.87, 60.46, 79.06, 123.46, 123.96, 126.43, 127.83, 132.08, 134.64, 143.66, 146.53, 167.46.

IČ (DRIFT): ν 3392 (OH), 1720 (C=O), 1623 (C=C) cm^{-1} .

HRMS (ESI): m/z vypočteno pro $\text{C}_{38}\text{H}_{54}\text{ClN}_3\text{O}_4\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+ = 684,3596$, nalezeno $[\text{M}+\text{H}]^+ = 684,3595$.

Literatura

- (1) Narwal, S.; Szajdak, L.; Sampietro, D. A. *Soil Allelochemicals. Research Methods in Plant Sciences Vol.1*; **2011**.
- (2) Ajikumar, P. K.; Tyo, K.; Carlsen, S.; Mucha, O.; Phon, T. H.; Stephanopoulos, G. Terpenoids: *Mol. Pharm.* **2008**, 5 (2), 167–190.
- (3) De Carvalho, C. C. C. R.; Da Fonseca, M. M. R. *Biotechnol. Adv.* **2006**, 24 (2), 134–142.
- (4) Langenheim, J. H. *J. Chem. Ecol.* **1994**, 20 (6), 1223–1280.
- (5) Zoufalý, Pavel. Studium Click Reakcí u Triterpenoidů Obsahující Propargylovou Skupinu, Diplomová Práce. Univerzita Palackého v Olomouci. Přírodovědecká fakulta. Olomouc **2016**.
- (6) Thimmappa, R.; Geisler, K.; Louveau, T.; O’Maille, P.; *Annu. Rev. Plant Biol.* **2014**, 65 (1), 225–257.
- (7) Pokorný, J.; Borková, L.; Urban, M. *Curr. Med. Chem.* **2017**, 25 (5), 636–658.
- (8) Borková, L.; Popa, I.; Dickinson, N. J.; Jasiková, L.; Frisonsova, K.; Rehulka, J.; Frydrych, I.; Hajduch, M.; Urban, M.; Vlk, M.; et al. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, 96, 482–490.
- (9) Silva, G. N. S.; Schuck, D. C.; Cruz, L. N.; Moraes, M. S.; Nakabashi, M.; Gosmann, G.; Garcia, C. R. S.; Gnoatto, S. C. B. *Trop. Med. Int. Heal.* **2015**, 20 (1), 29–39.
- (10) Gutiérrez-Rebolledo, G. A.; Siordia-Reyes, A. G.; Meckes-Fischer, M.; Jiménez-Arellanes, A. *Asian Pac. J. Trop. Med.* **2016**, 9 (7), 644–651.
- (11) Ding, Y.-J.; Sun, C.-Y.; Wen, C.-C.; Chen, Y.-H. *Toxins (Basel)*. **2015**, 7 (1), 97–109.
- (12) Aiken, C.; Chen, C. H. *Trends Mol. Med.* **2005**, 11 (1), 31–36.
- (13) Pandey, H.; Pandey, P.; Singh, S.; Gupta, R.; Banerjee, S. *Protoplasma* **2015**, 252 (2), 647–655.
- (14) Kozai, K.; Suzuki, J.; Okada, M.; Nagasaka, N. *Microbios* **1999**, 97 (388), 179–188.
- (15) Lang, K. L.; Deagosto, E.; Zimmermann, L. A.; Machado, V. R.; Campos Bernardes, L. S.; Schenkel, E. P.; Duran, F. J.; Palermo, J.; Rossini, C. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, 61 (23), 5534–5539.

- (16) Trumbull, E. R.; Bianchi, E.; Eckert, D. J.; Wiedhopf, R. M.; Cole, J. R. *J. Pharm. Sci.* **1976**, *65* (9), 1407–1408.
- (17) Borkova, L.; Hodon, J.; Urban, M. *Asian J. Org. Chem.* **2018**, *7* (8), 1542–1560.
- (18) Lowitz, J.T. *Crell's Annalen.* **1788**. 312-317.
- (19) Green, B.; Bentley, M. D.; Chung, B. Y.; Lynch, N. G.; Jensen, B. L. *J. Chem. Educ.* **2007**, *84* (12), 1985–1987.
- (20) Kapoor, V. K.; Chawla, A. S. *J. Sci. Ind. Res.* **1986**, *45*, 503–505.
- (21) Elmore, S. *Toxicol. Pathol.* **2007**, (35), 495-516.
- (22) Krol, S. K.; Kielbus, M.; Muller, A. R.; Stepulak, A. *Biomed Res. Int.* **2015**, 1–12.
- (23) Koeberle, A.; Henkel, A.; Verhoff, M.; Tausch, L.; Koenig, S.; Fischer, D.; Kather, N.; Seitz, S.; Paul, M.; Jauch, J.; et al. *Molecules* **2018**, *23* (2), 506/1-506/14.
- (24) Bernard, P.; Scior, T.; Didier, B.; Hibert, M.; Berthon, J.-Y. *Phytochemistry* **2001**, *58* (6), 865–874.
- (25) Kapil, A.; Sharma, S. *J. Pharm. Pharmacol.* **1995**, *47* (7), 585–587.
- (26) Kapil, A.; Sharma, S. *J. Pharm. Pharmacol.* **1994**, *46* (11), 922–923.
- (27) Kim, Y. P.; Lee, E. B.; Kim, S. Y.; Li, D.; Ban, H. S.; Lim, S. S.; Shin, K. H.; Ohuchi, K. *Planta Med.* **2001**, *67* (4), 362–364.
- (28) Huang, F.-C.; Chan, W.-K.; Moriarty, K. J.; Zhang, D.-C.; Chang, M. N.; He, W.; Yu, K.-T.; Zilberstein, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8* (14), 1883–1886.
- (29) Zhang, Z.; ElSohly, H. N.; Jacob, M. R.; Pasco, D. S.; Walker, L. A.; Clark, A. *M. J. Nat. Prod.* **2002**, *65* (7), 979–985.
- (30) Bringmann, G.; Saeb, W.; Assi, L. A.; Francois, G.; Narayanan, A. S. S.; Peters, K.; Peters, E. M. *Planta Med.* **1997**, *63* (3), 255–257.
- (31) Cantrell, C. L.; Franzblau, S. G.; Fischer, N. H. *Planta Med.* **2001**, *67* (8), 685–694.
- (32) Kozai, K.; Miyake, Y.; Kohda, H.; Kametaka, S.; Yamasaki, K.; Suginaka, H.; Nagasaka, N. *Caries Res.* **1987**, *21* (2), 104–108.
- (33) Kashiwada, Y.; Hashimoto, F.; Cosentino, L. M.; Chen, C.-H.; Garrett, P. E.; Lee, K.-H. *J. Med. Chem.* **1996**, *39* (5), 1016–1017.
- (34) Kashiwada, Y.; Wang, H.-K.; Nagao, T.; Kitanaka, S.; Yasuda, I.; Fujioka, T.; Yamagishi, T.; Cosentino, L. M.; Kozuka, M.; Okabe, H.; et al. *J. Nat. Prod.*

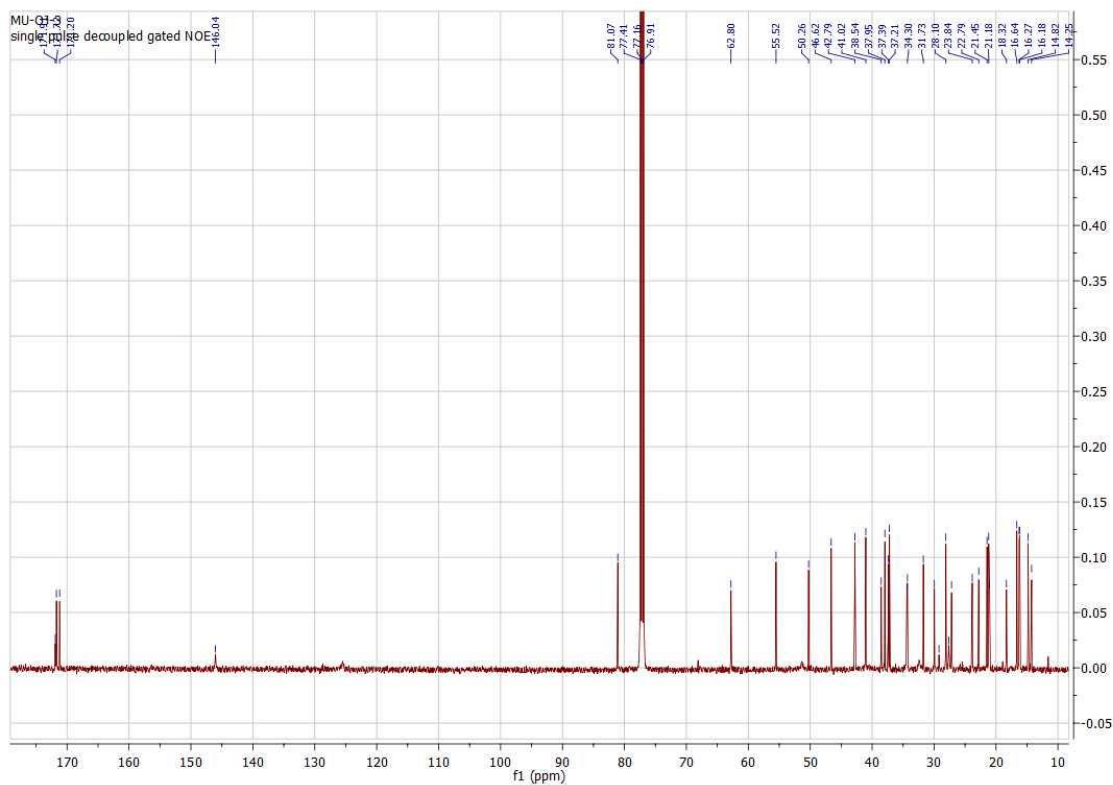
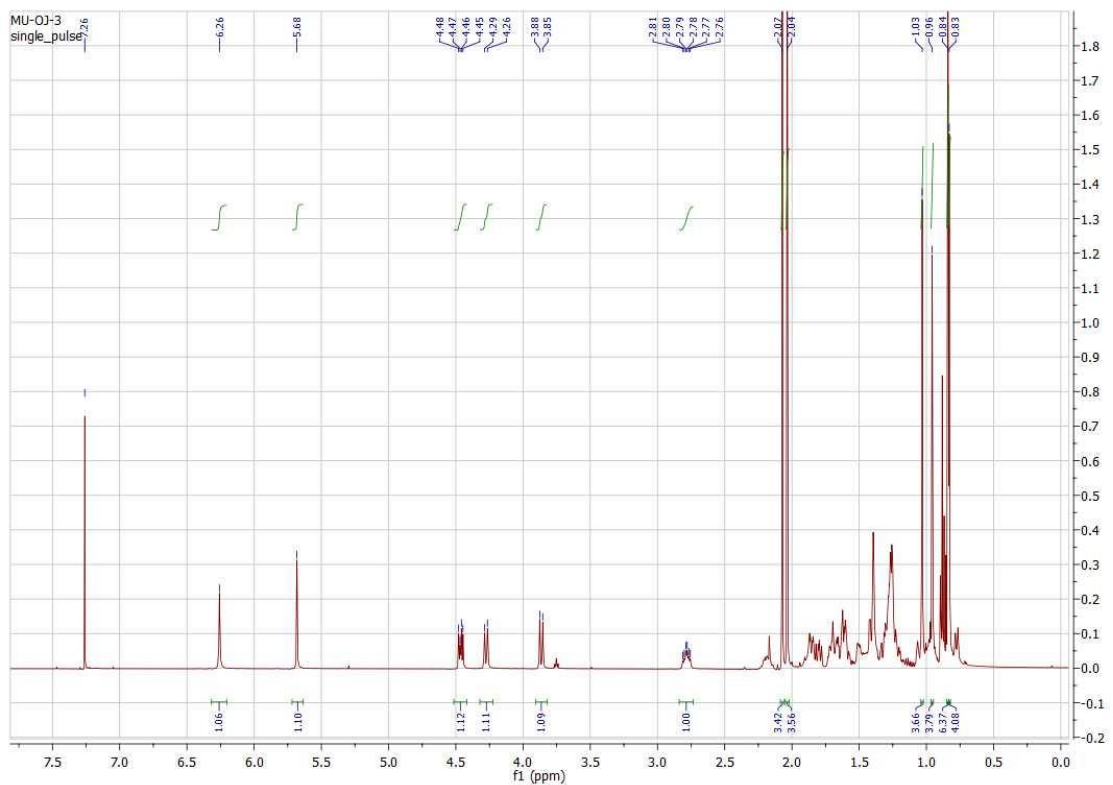
- 1998**, *61* (9), 1090–1095.
- (35) Hashimoto, F.; Kashiwada, Y.; Cosentino, L. M.; Chen, C.-H.; Garrett, P. E.; Lee, K.-H. *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5* (12), 2133–2143.
- (36) Zhu, Y.-M.; Shen, J.-K.; Wang, H.-K.; Cosentino, L. M.; Lee, K.-H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11* (24), 3115–3118.
- (37) Akihisa, T.; Ogihara, J.; Kato, J.; Yasukawa, K.; Ukiya, M.; Yamanouchi, S.; Oishi, K. *Lipids* **2001**, *36* (5), 507–512.
- (38) Quere, L.; Wenger, T.; Schramm, H. J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, *227* (2), 484–488.
- (39) Kanamoto, T.; Kashiwada, Y.; Kanbara, K.; Gotoh, K.; Yoshimori, M.; Goto, T.; Sano, K.; Nakashima, H. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, *45* (4), 1225–1230.
- (40) Chudzik, M.; Korzonek-Szlacheta, I.; Krol, W. *Molecules* **2015**, *20* (1), 1610-1625/1-1610-1625/16, 16 pp.
- (41) Yang, H.; Cho, H.-J.; Sim, S. H.; Chung, Y. K.; Kim, D.-D.; Sung, S. H.; Kim, J.; Kim, Y. C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22* (5), 2079–2083.
- (42) Hai, W.; Cheng, H.; Zhao, M.; Wang, Y.; Hong, L.; Tang, H.; Tian, X. *Fitoterapia* **2012**, *83* (4), 759–764.
- (43) Yang, N.-Y.; Chen, J.-H.; Zhou, G.-S.; Tang, Y.-P.; Duan, J.-A.; Tian, L.-J.; Liu, X.-H. *Fitoterapia* **2011**, *82* (6), 927–931.
- (44) Kurimoto, S.; Kashiwada, Y.; Lee, K.-H.; Takaishi, Y. *Phytochemistry* **2011**, *72* (17), 2205–2211.
- (45) Baniadam, S.; Rahiminejad, M. R.; Ghannadian, M.; Saeidi, H.; Ayatollahi, A. M.; Aghaei, M. *Iran. J. Pharm. Res.* **2014**, *13* (1), 135–141.
- (46) Souza, G.; Soares, D. C.; Mussel, W.; Pompeu, N.; Silva, G.; Vieira Filho, S. A.; Duarte, L. *J. Braz. Chem. Soc.* **2014**, *00*, 1–8.
- (47) Xu, X.; Bai, H.; Zhou, L.; Deng, Z.; Zhong, H.; Wu, Z.; Yao, Q. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24* (9), 2159–2162.
- (48) Zhang, H.; Samadi, A. K.; Rao, K. V; Cohen, M. S.; Timmermann, B. N. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74* (3), 477–482.
- (49) Lu, L.; Chen, J.-C.; Li, Y.; Qing, C.; Wang, Y.-Y.; Nian, Y.; Qiu, M.-H. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **2012**, *60* (5), 571–577.
- (50) Manase, M. J.; Mitaine-Offer, A.-C.; Miyamoto, T.; Tanaka, C.; Delemeasure, S.; Dutartre, P.; Lacaille-Dubois, M.-A. *Phytochemistry* **2014**, *100*, 150–155.

- (51) Patočka, J. *J. Appl. Biomed.* **2012**, *10* (3), 7–12.
- (52) Lee, D.; Lee, S.; Shim, S. H.; Lee, H.-J.; Choi, Y.; Jang, T. S.; Kim, K. H.; Kang, K. S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27* (13), 2881–2885.
- (53) Pai, P. G.; Nawarathna, S. C.; Kulkarni, A.; Habeeba, U.; Sudarshan Reddy, C.; Teerthanath, S.; Shenoy, J. P. *ISRN Pharmacol.* **2012**, 410902, 6 pp.
- (54) Li, D.; Liu, D.; Lv, M.; Gao, P.; Liu, X. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2020**, *30* (4), 126956.
- (55) Wang, C.; Liu, X.; Lian, C.; Ke, J.; Liu, J. *Molecules* **2019**, *24* (23), 4353.
- (56) Liu, Y.-Y.; Huang, D.-L.; Dong, Y.; Qin, D.-P.; Yan, Y.-M.; Cheng, Y.-X. *Molecules* **2019**, *24* (23), 4379.
- (57) Wagle, A.; Seong, S. H.; Castro, M. J.; Faraoni, M. B.; Murray, A. P.; Jung, H. A.; Choi, J. S. *Comput. Biol. Chem.* **2019**, *83*, 107101.
- (58) Hueisgen, R. Centenary Lecture. *Proc. Chem. Soc. London* **1961**, 357–369.
- (59) Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2002**, *41* (14), 2596–2599.
- (60) Bori, I. D.; Hung, H.-Y.; Qian, K.; Chen, C.-H.; Morris-Natschke, S. L.; Lee, K.-H. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53* (15), 1987–1989.
- (61) Chakraborty, B.; Dutta, D.; Mukherjee, S.; Das, S.; Maiti, N. C.; Das, P.; Chowdhury, C. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *102*, 93–105.
- (62) Csuk, R.; Barthel, A.; Kluge, R.; Stroehl, D. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18* (20), 7252–7259.
- (63) Csuk, R.; Barthel, A.; Sczepek, R.; Siewert, B.; Schwarz, S. *Arch. der Pharm. (Weinheim, Ger.)* **2011**, *344* (1), 37–49.
- (64) Antimonova, A. N.; Petrenko, N. I.; Shakirov, M. M.; Rybalova, T. V.; Frolova, T. S.; Shul'ts, E. E.; Kukina, T. P.; Sinitsyna, O. I.; Tolstikov, G. A. *Chem. Nat. Compd.* **2013**, *49* (4), 657–664.
- (65) Sidova, V.; Zoufaly, P.; Pokorny, J.; Dzubak, P.; Hajduch, M.; Popa, I.; Urban, M. *PLoS One* **2017**, *12* (2), e0171621/1-e0171621/25.
- (66) Cheng, K.; Liu, J.; Liu, X.; Li, H.; Sun, H.; Xie, J. *Carbohydr. Res.* **2009**, *344* (7), 841–850.
- (67) Cheng, K.; Liu, J.; Sun, H.; Xie, J. *Chem. Biodivers.* **2010**, *7* (3), 690–697.
- (68) Zhang, L.; Jia, X.; Dong, J.; Chen, D.; Liu, J.; Zhang, L.; Wen, X. *Chem. Biol. Drug Des.* **2014**, *83* (3), 297–305.
- (69) Wei, G.; Luan, W.; Wang, S.; Cui, S.; Li, F.; Liu, Y.; Liu, Y.; Cheng, M. *A Org.*

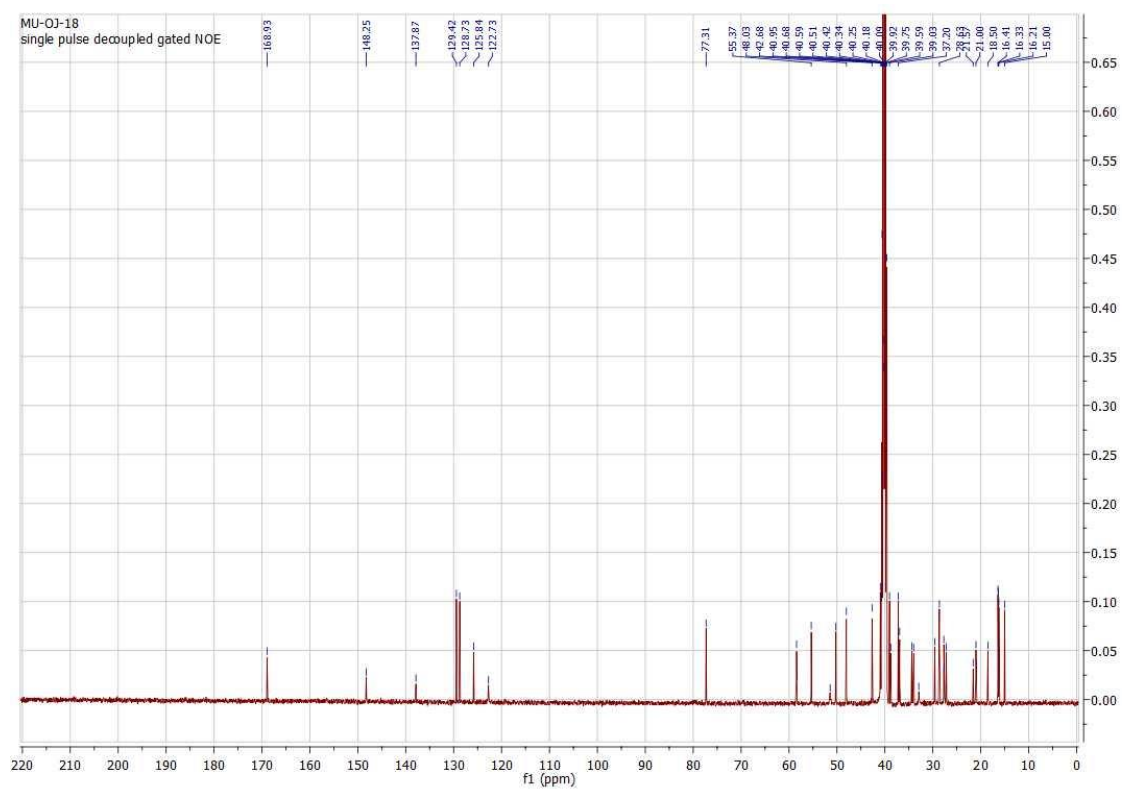
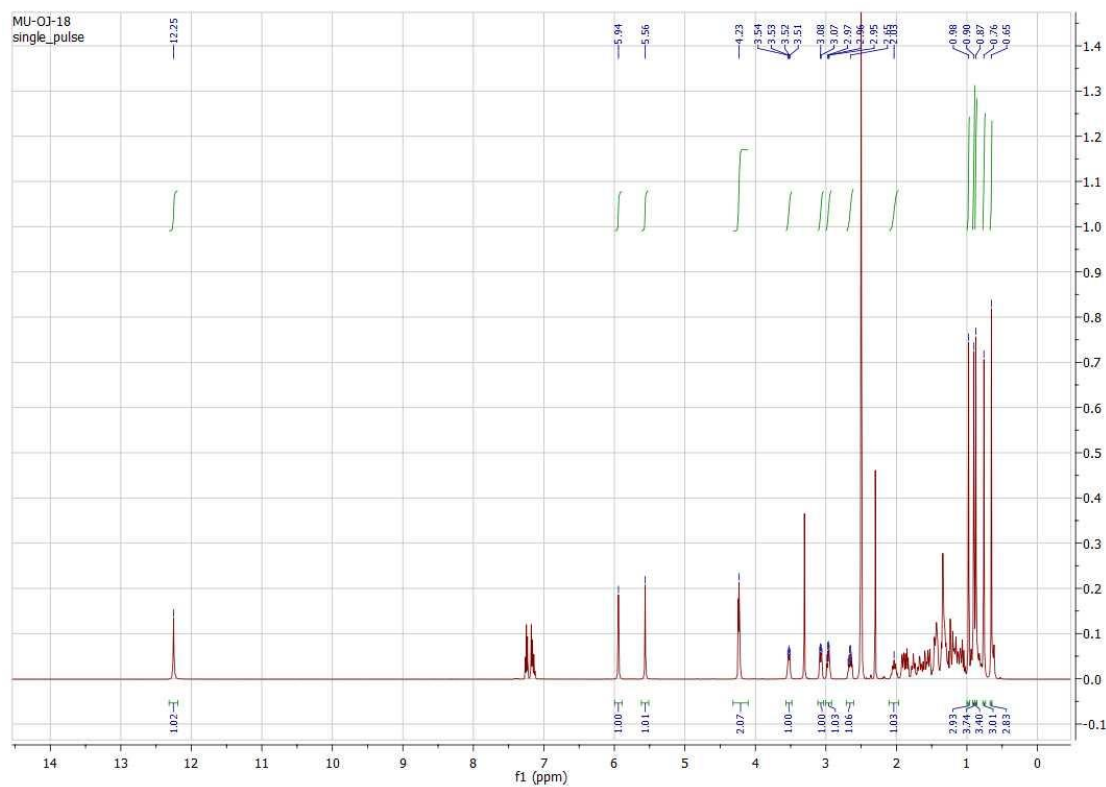
- Biomol. Chem.* **2015**, *13* (5), 1507–1514.
- (70) ŠIDOVÁ, Veronika. Syntéza Cytotoxicky Aktivních Derivátů Terpenů s Využitím Click Reakcí. Olomouc, **2015**. Diplomová Práce (Mgr.). Univerzita Palackého v Olomouci. Přírodovědecká Fakulta. Olomouc **2015**.
- (71) Sarek, J.; Klinot, J.; Dzubak, P.; Klinotova, E.; Noskova, V.; Krecek, V.; Korinkova, G.; Thomson, J. O.; Janostakova, A.; Wang, S.; et al. *J. Med. Chem.* **2003**, *46* (25), 5402–5415.
- (72) Dalcanale, E.; Montanari, F. *J. Org. Chem.* **1986**, *51* (4), 567–569.
- (73) Thompson, A. S.; Humphrey, G. R.; DeMarco, A. M.; Mathre, D. J.; Grabowski, E. J. J. *J. Org. Chem.* **1993**, *58* (22), 5886–5888.
- (74) Ghosh, P.; Mandal, A.; Ghosh, J.; Pal, C.; Nanda, A. K. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2012**, *14* (2), 141–153.

Přílohy – NMR spektra finálních produktů

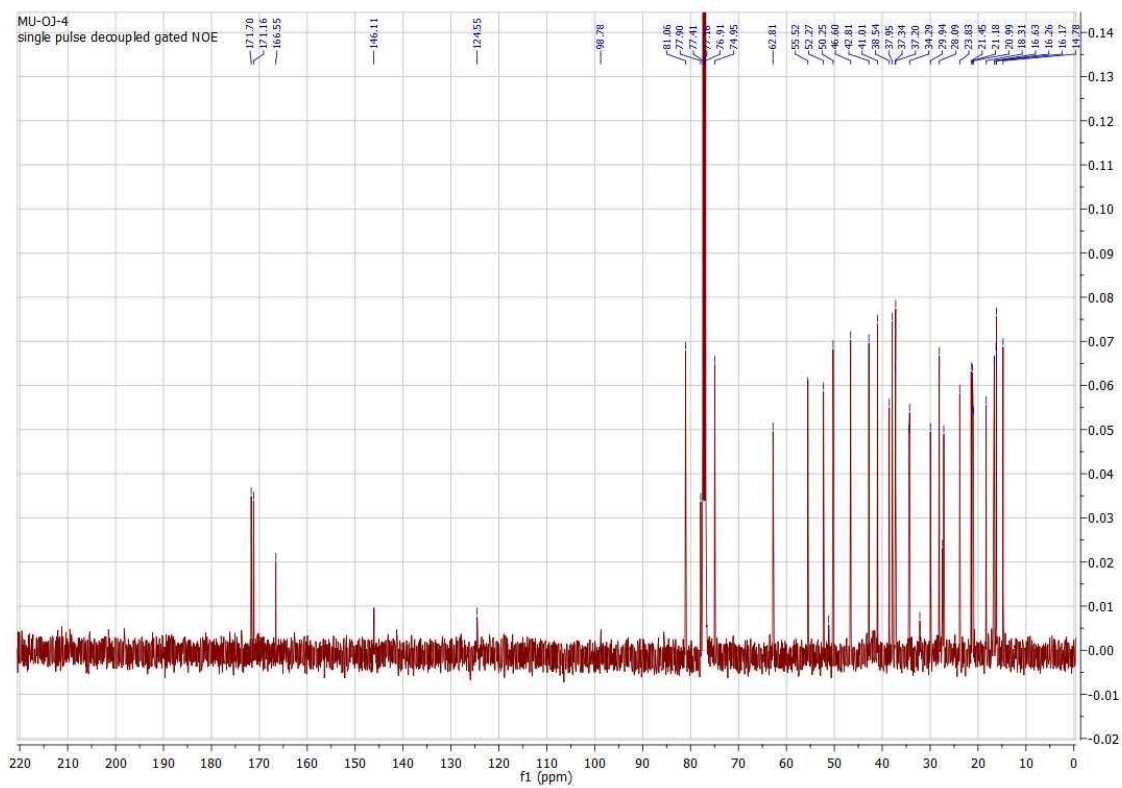
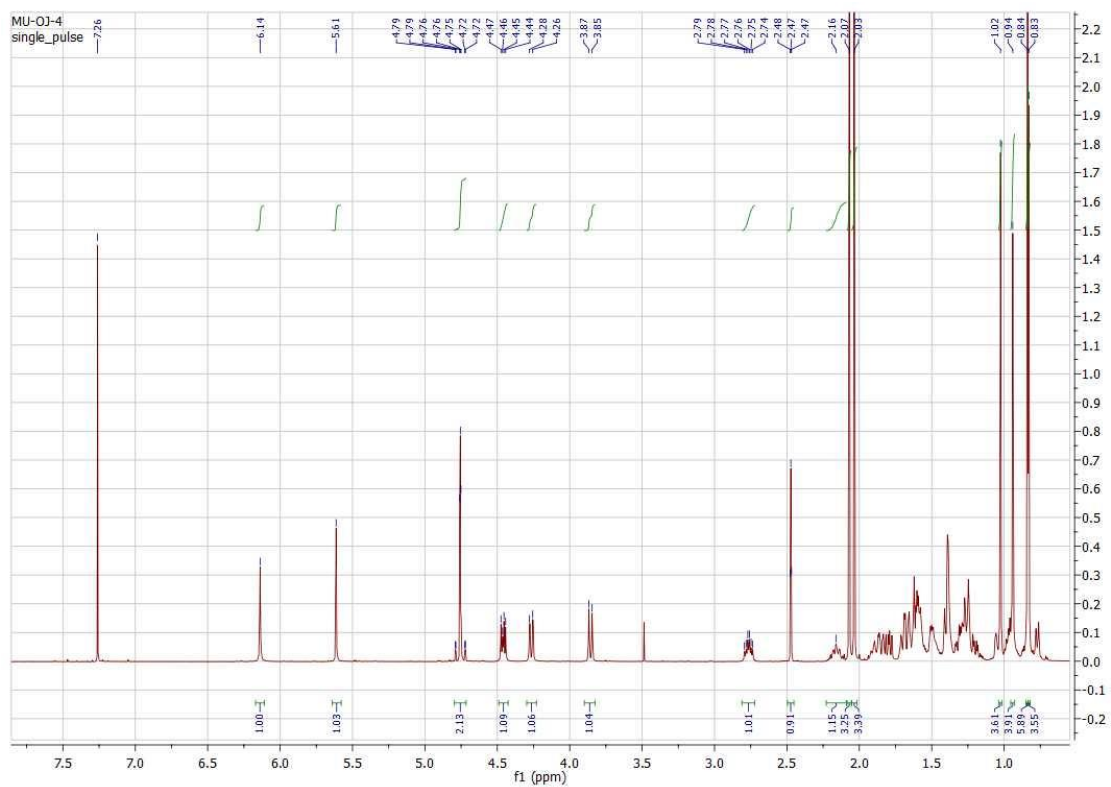
^1H a ^{13}C NMR sloučeniny **17b**



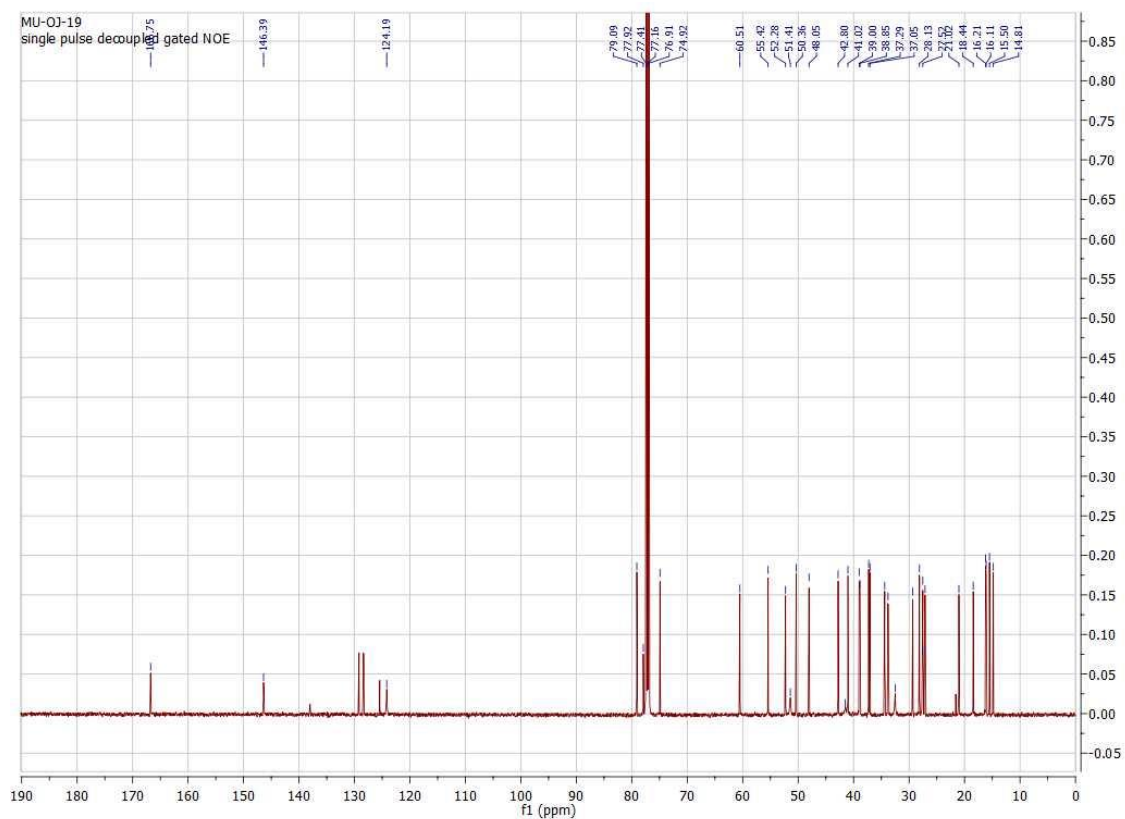
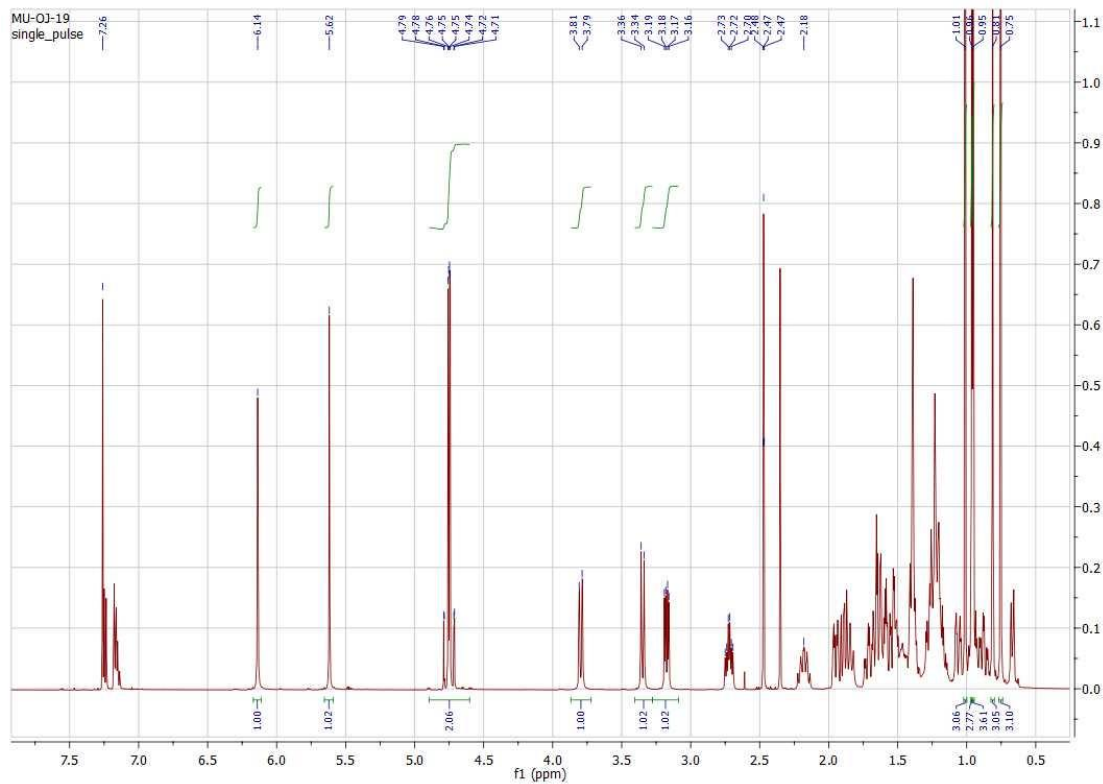
^1H a ^{13}C NMR sloučeniny **6b**



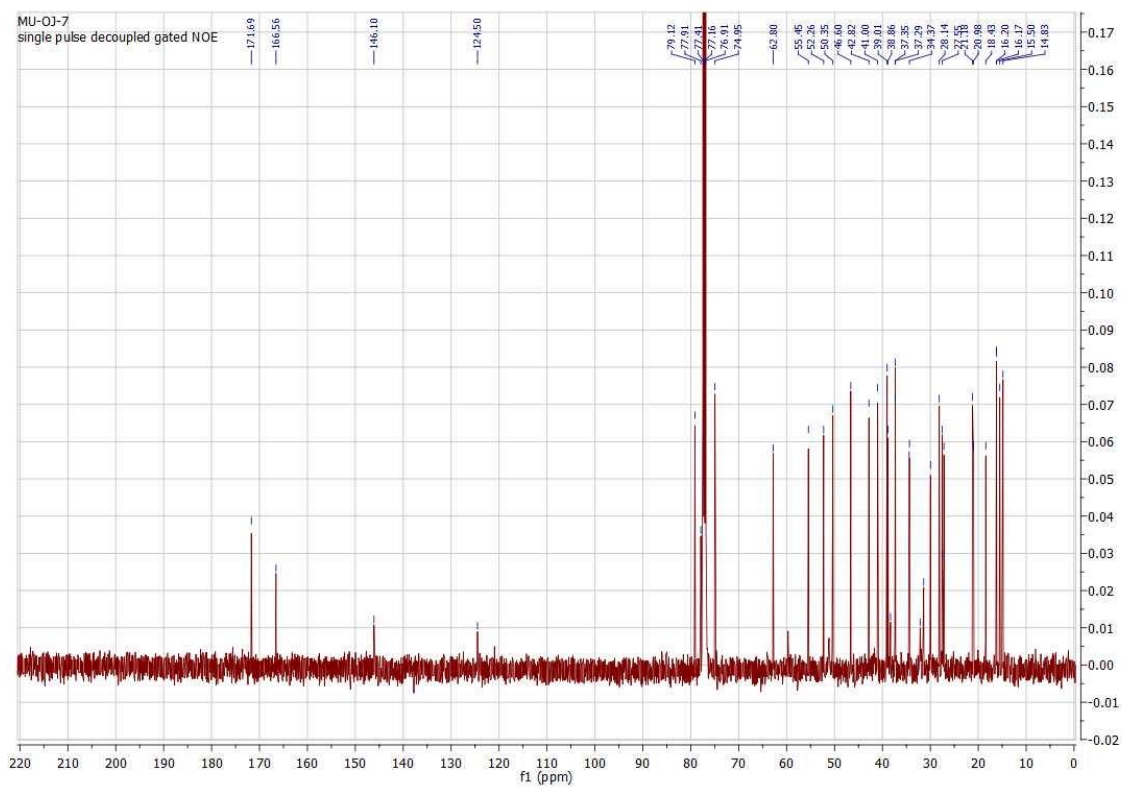
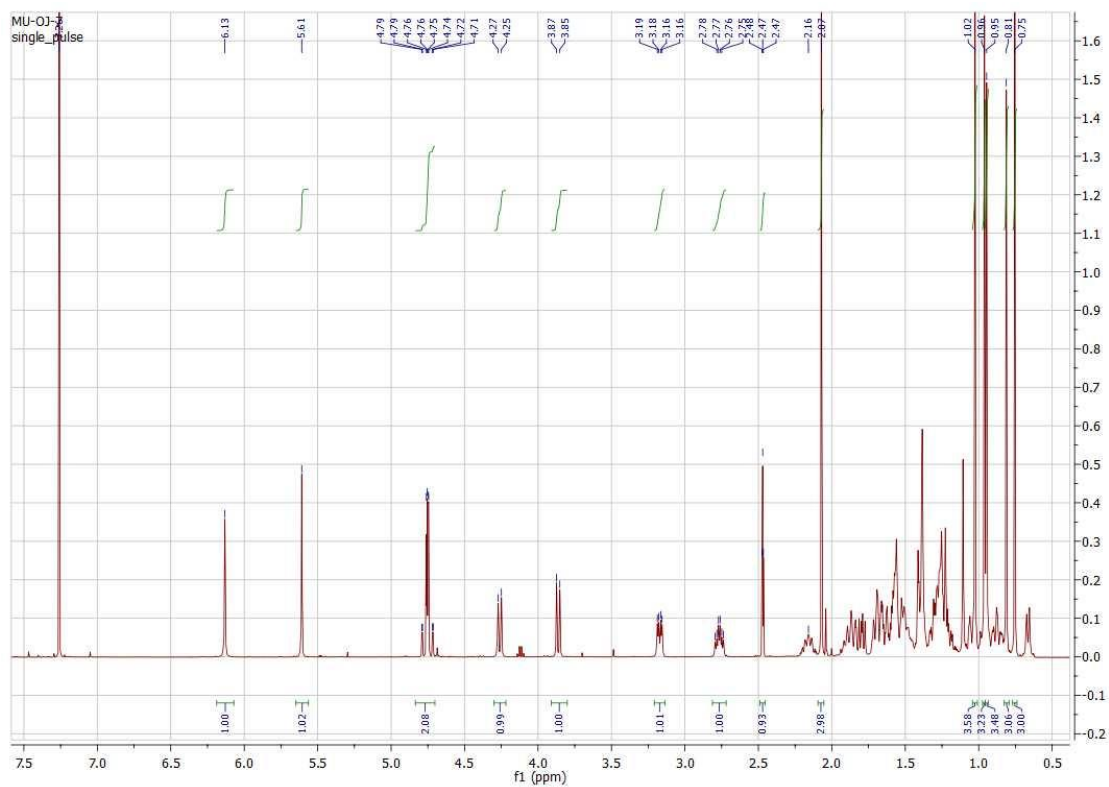
^1H a ^{13}C NMR sloučeniny **89**



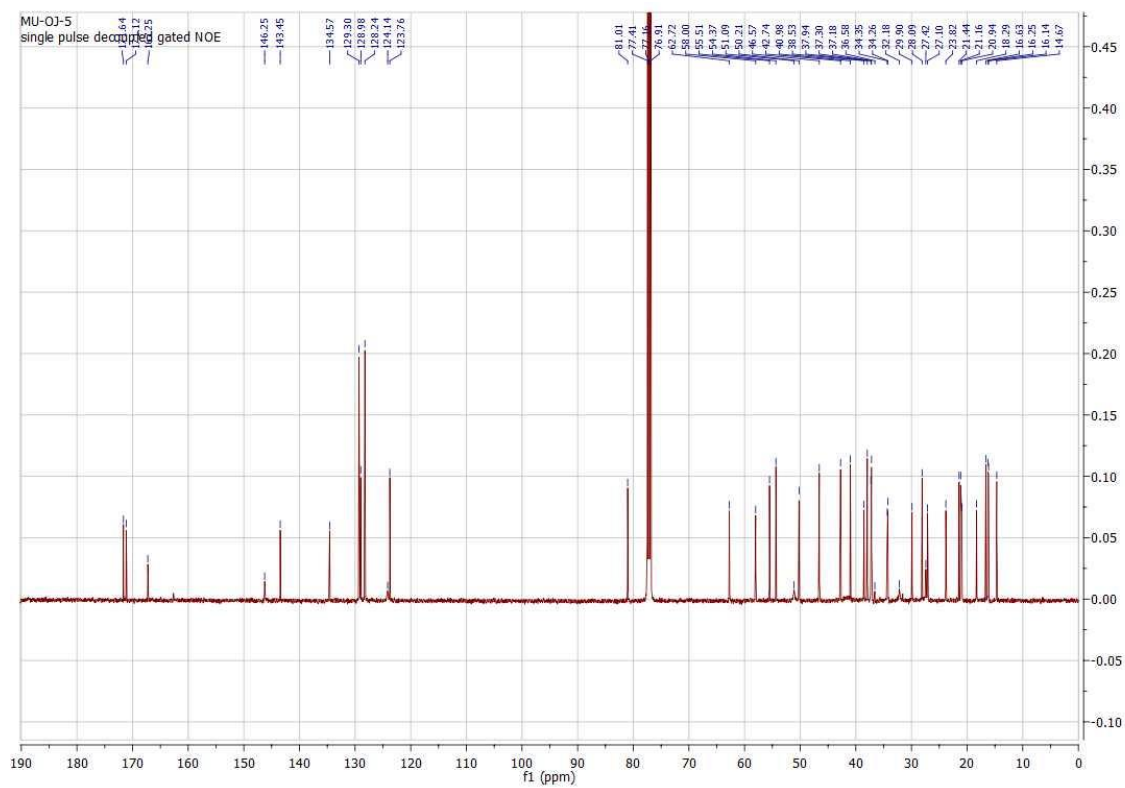
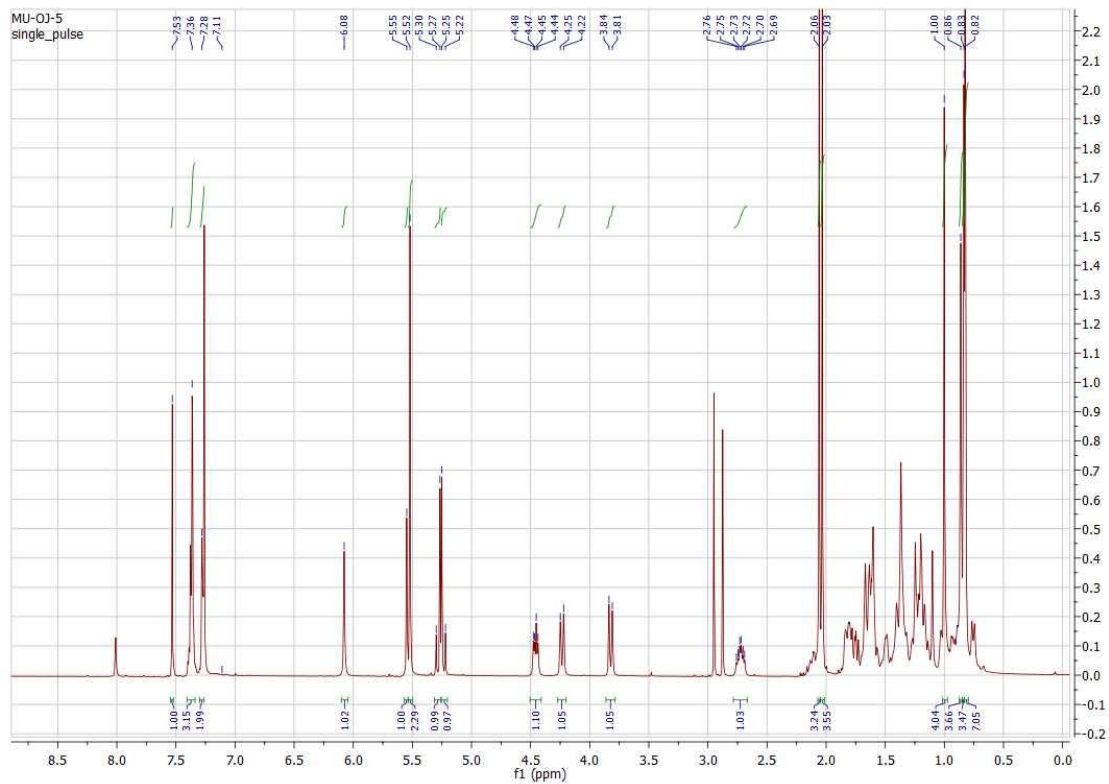
^1H a ^{13}C NMR sloučiny **88**



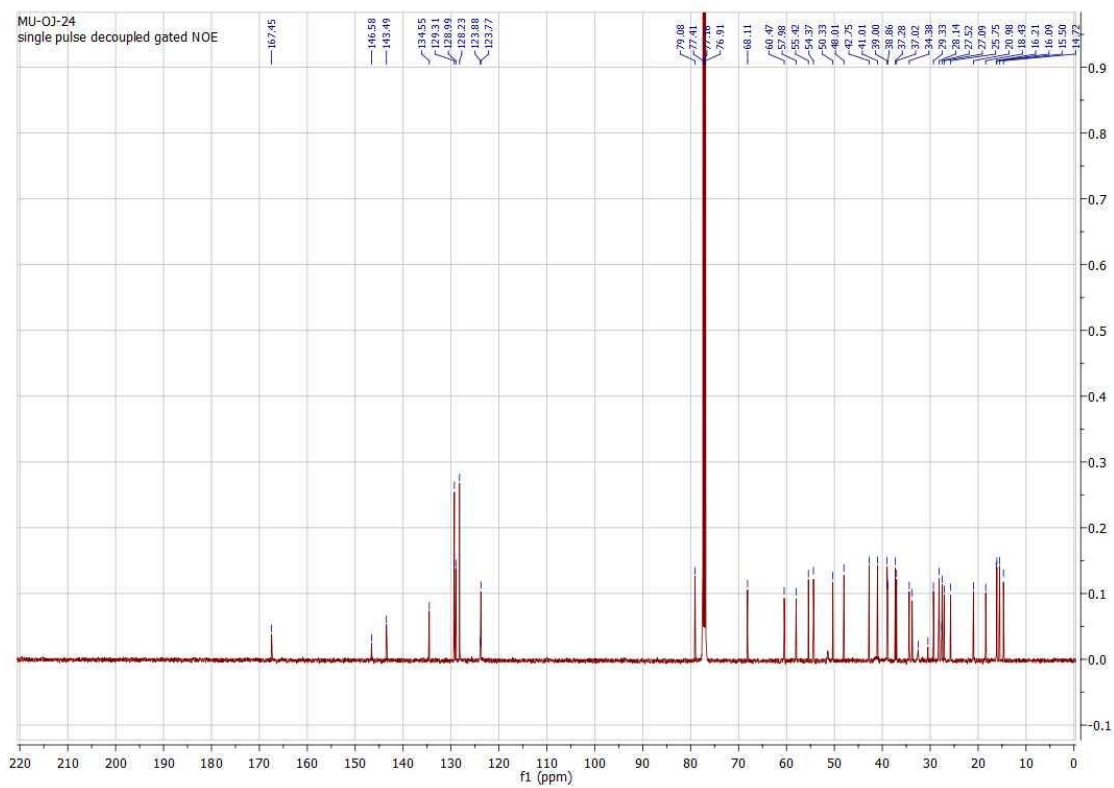
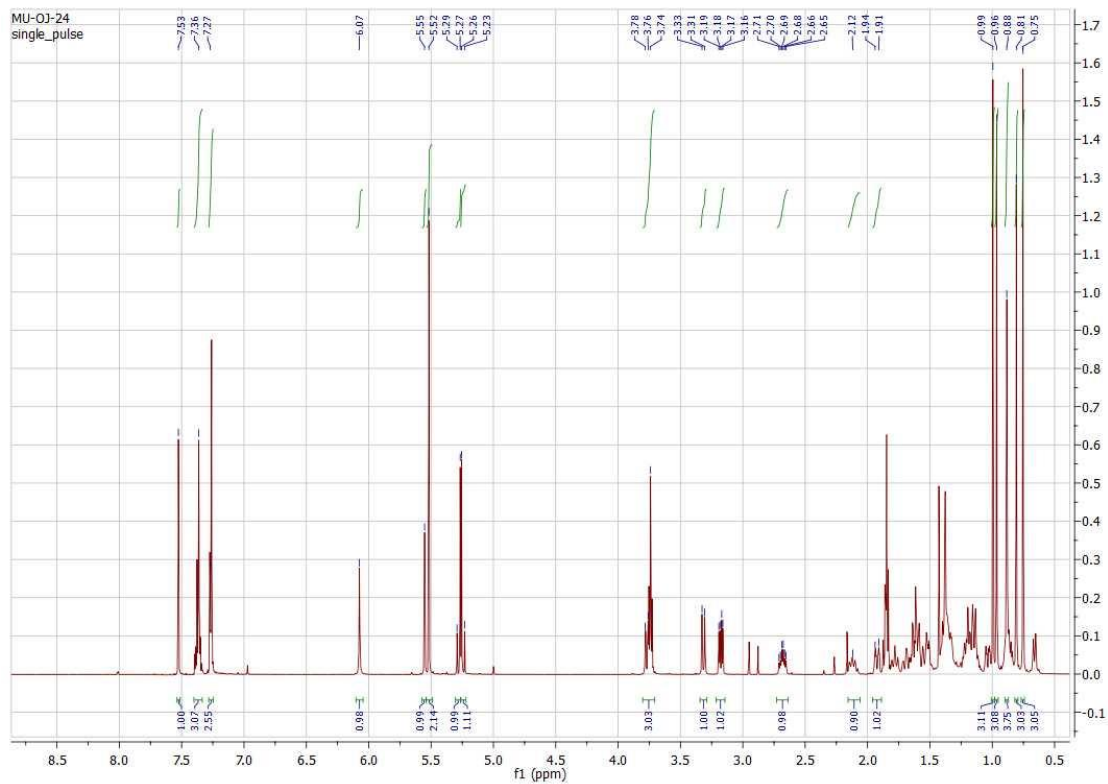
^1H a ^{13}C NMR sloučeniny **90**



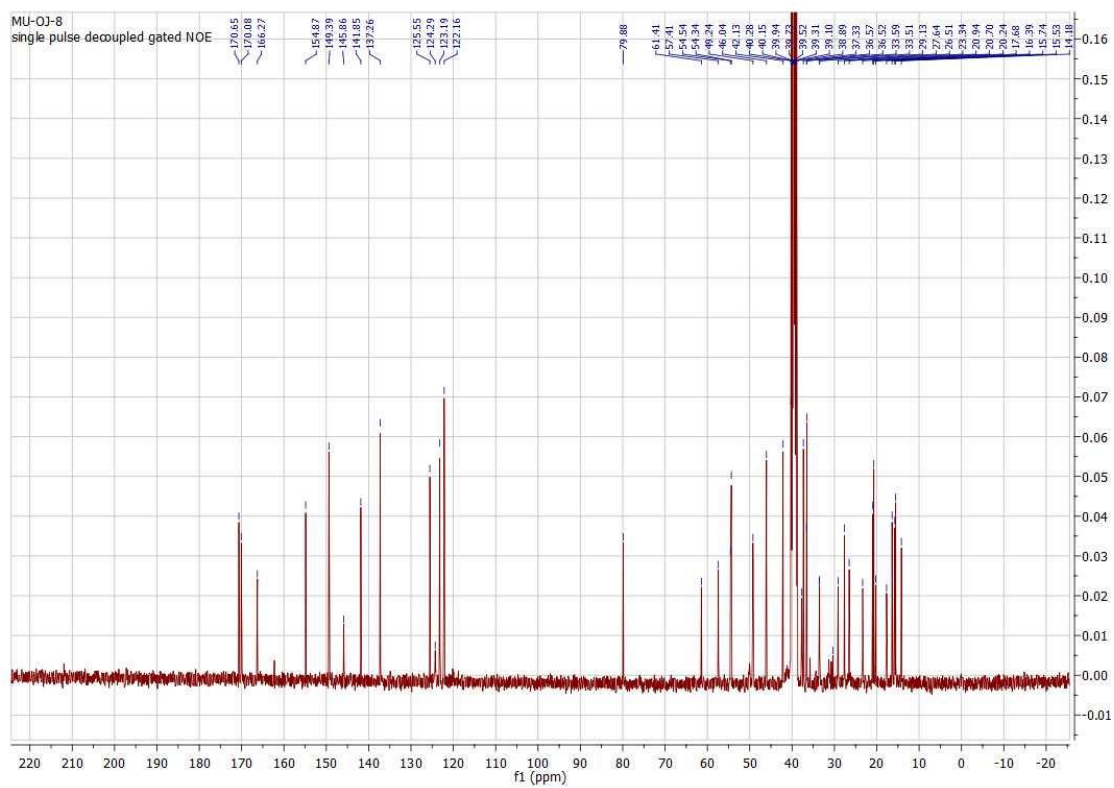
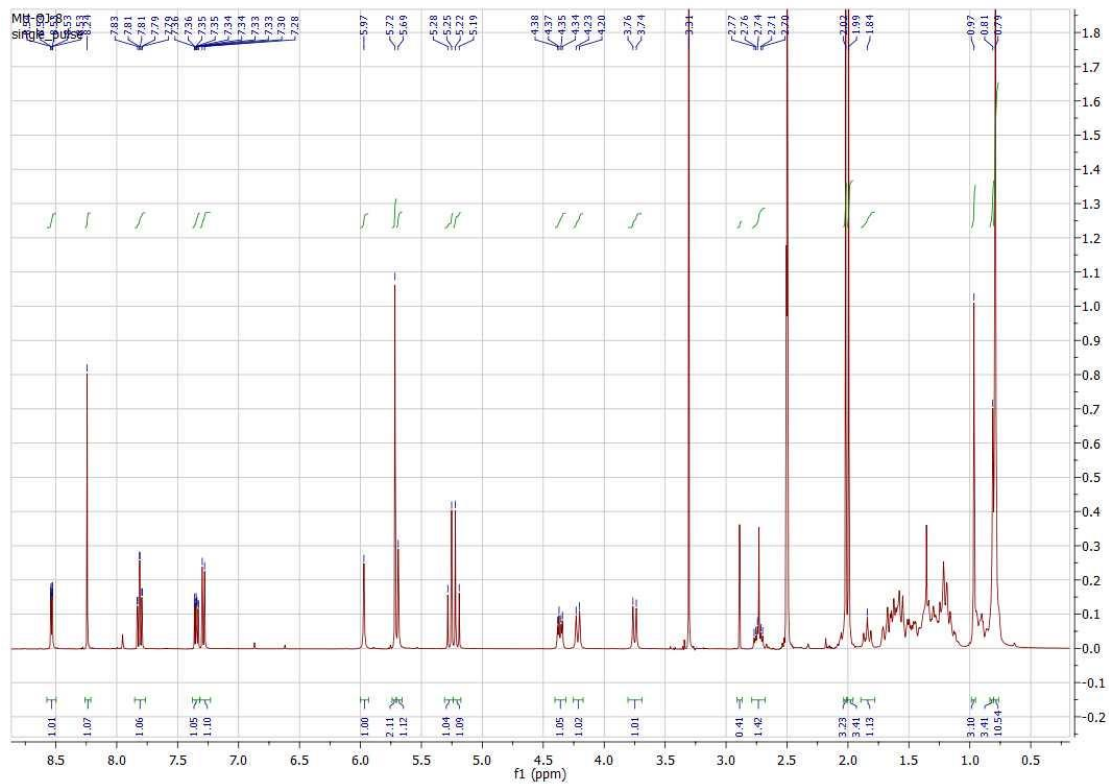
^1H a ^{13}C NMR sloučeniny **91**



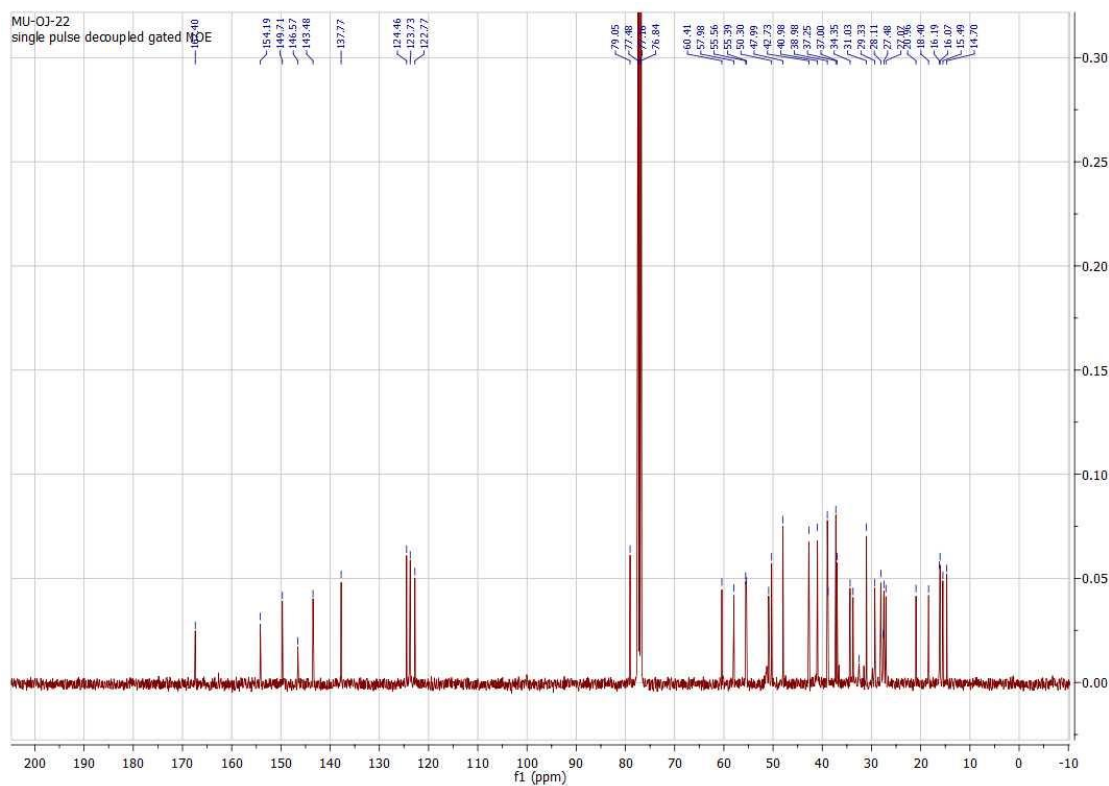
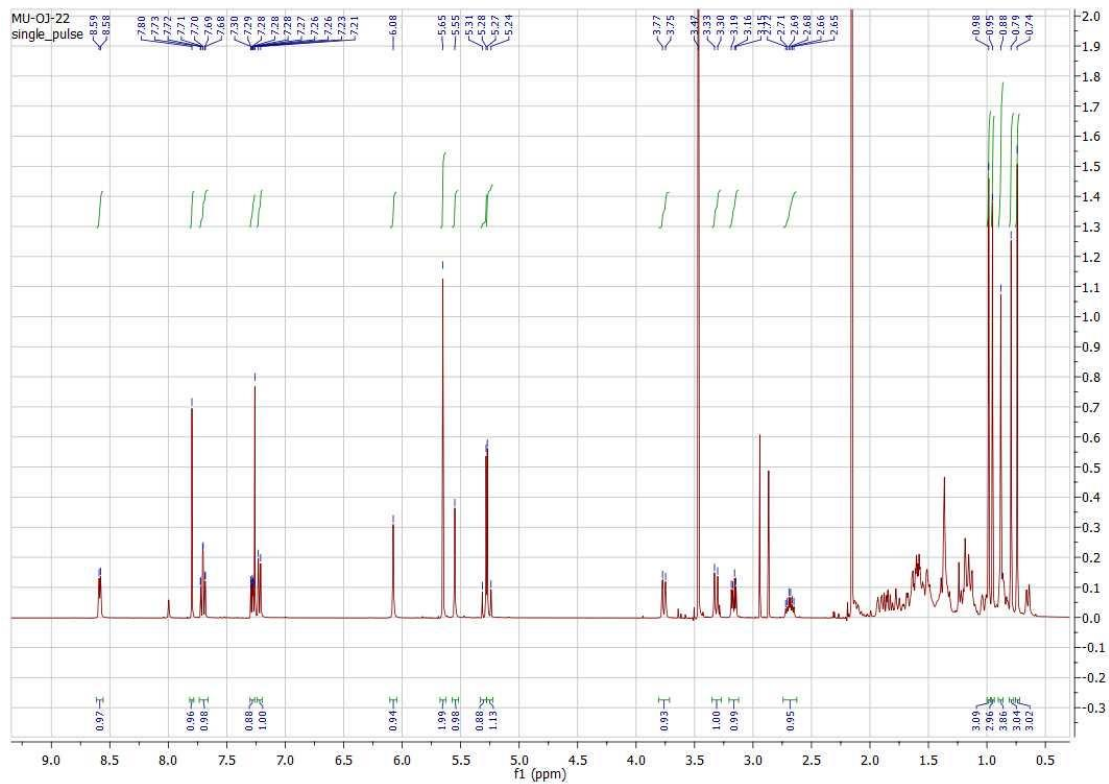
^1H a ^{13}C NMR sloučeniny **92**



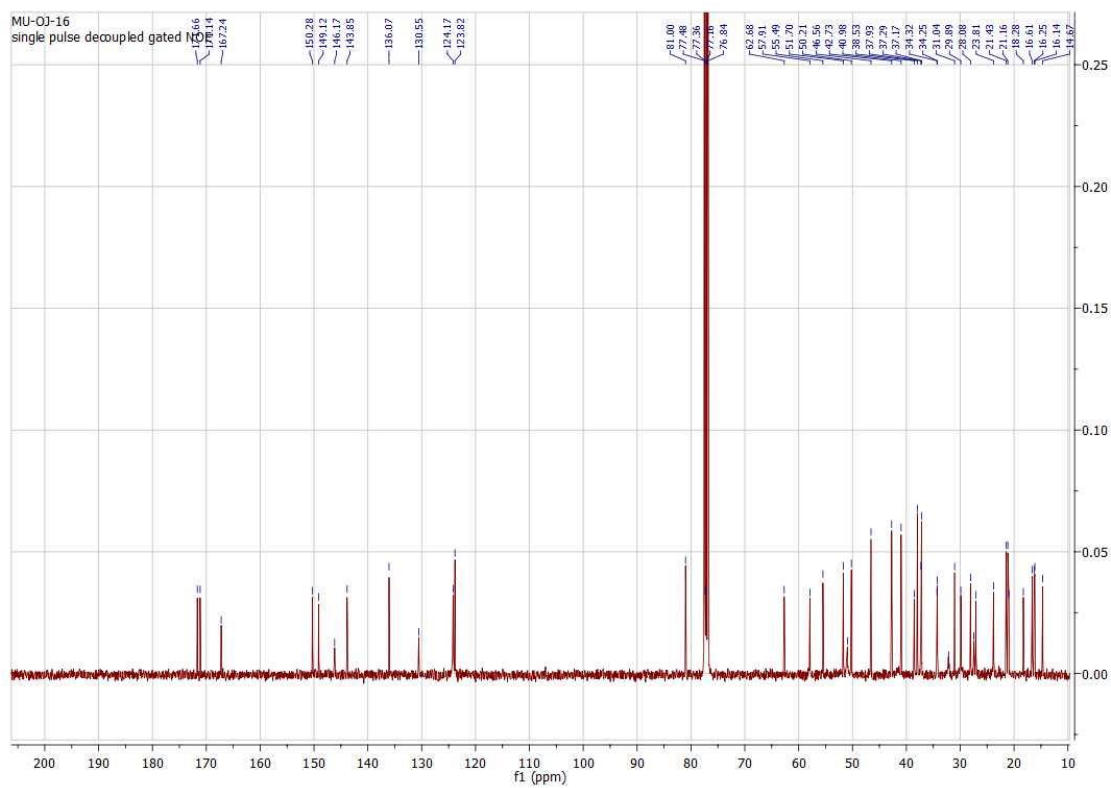
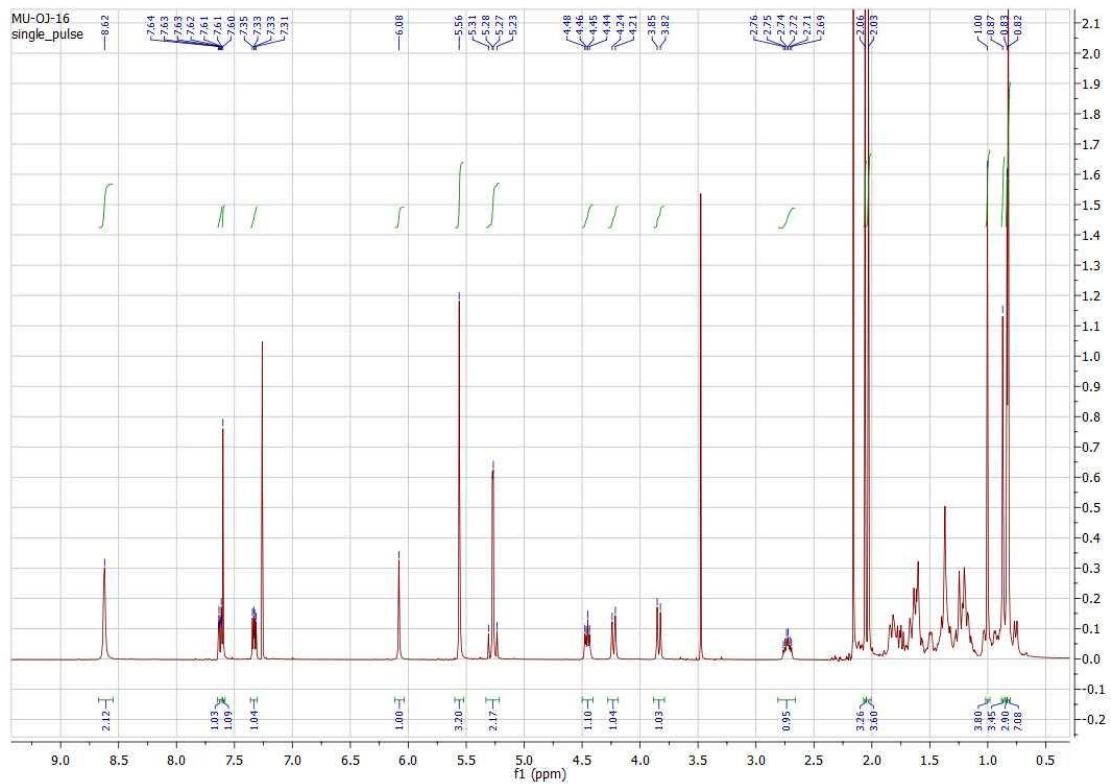
^1H a ^{13}C NMR sloučeniny **93**



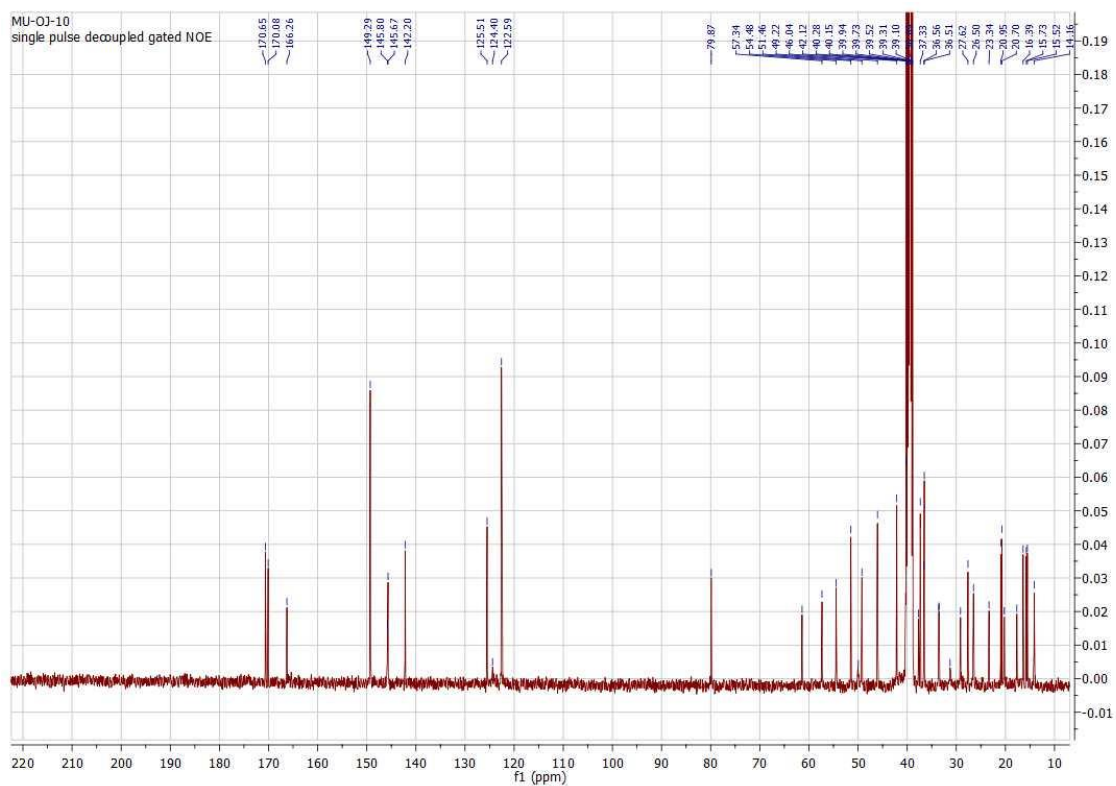
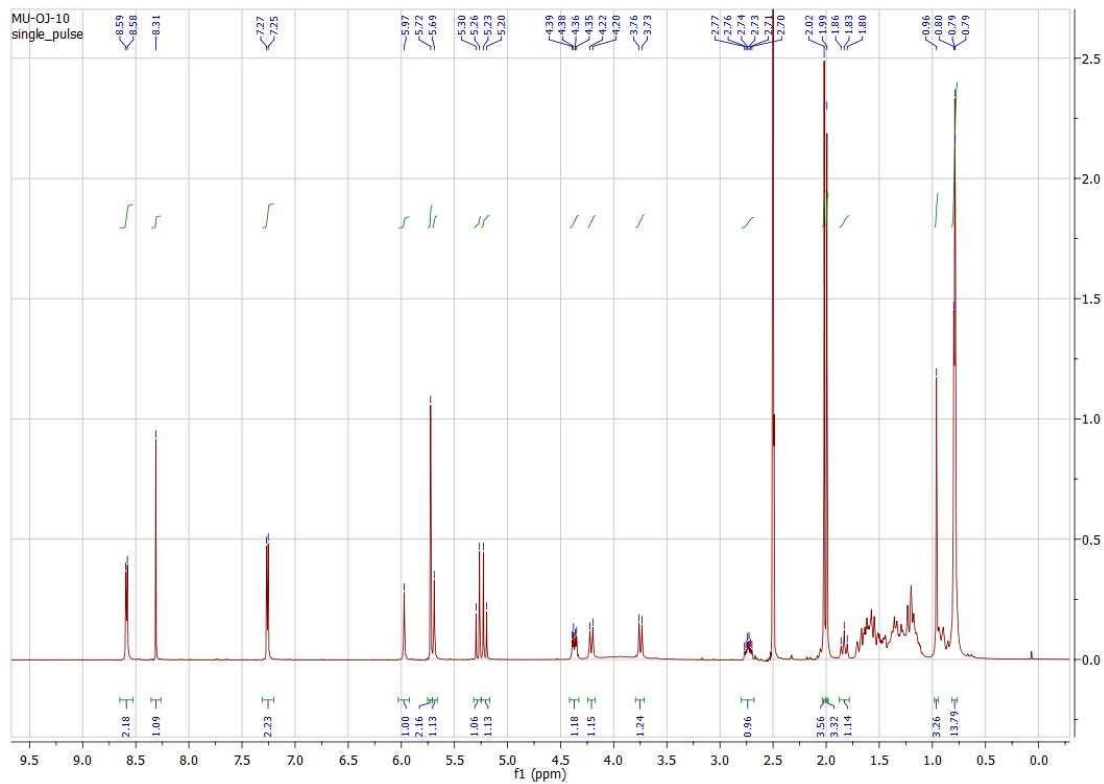
^1H a ^{13}C NMR sloučeniny **94**



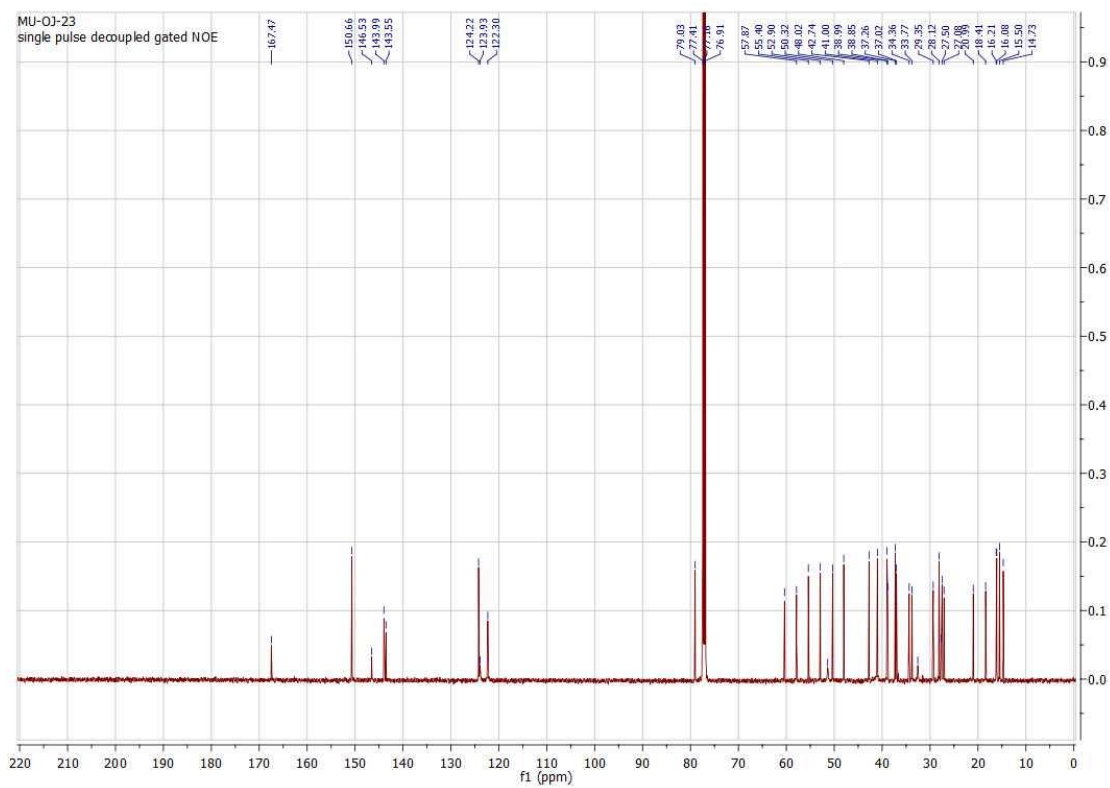
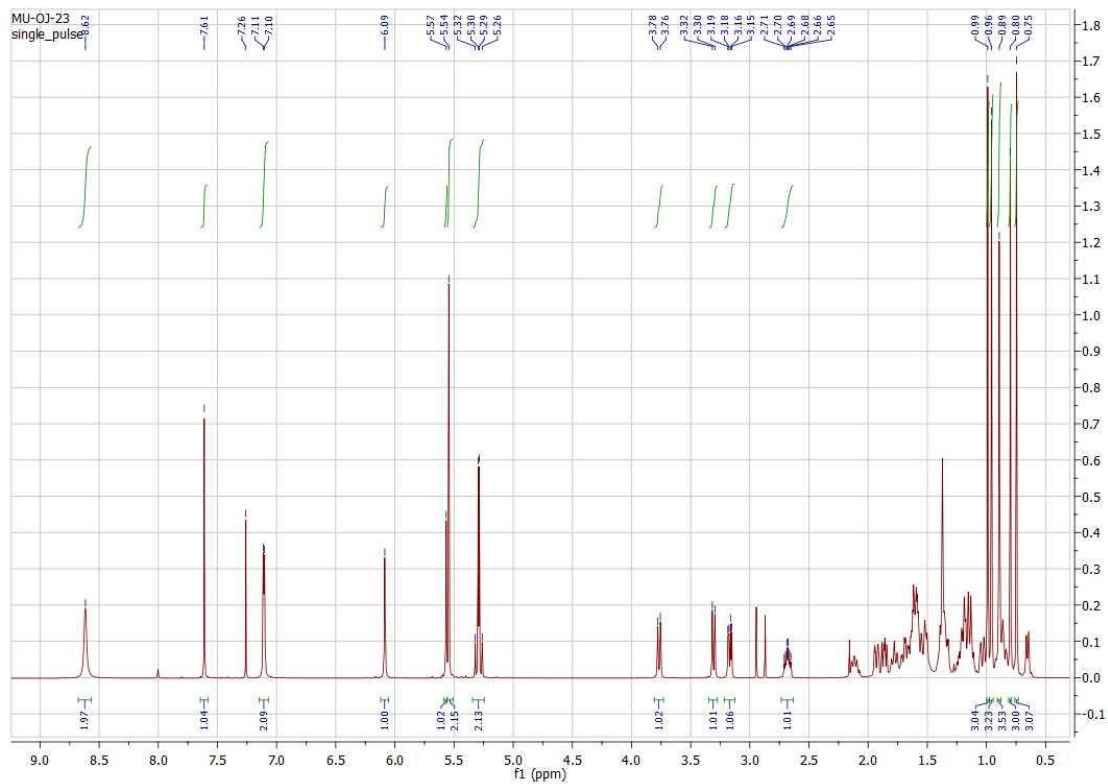
^1H a ^{13}C NMR sloučeniny **95**



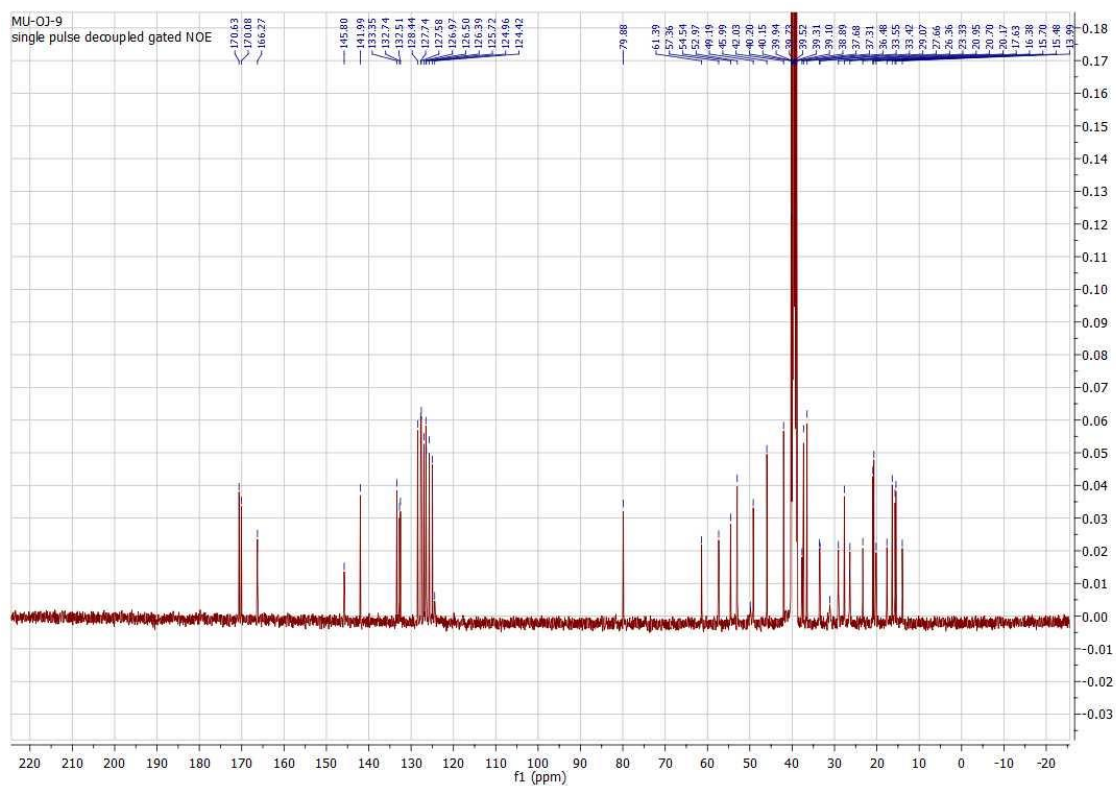
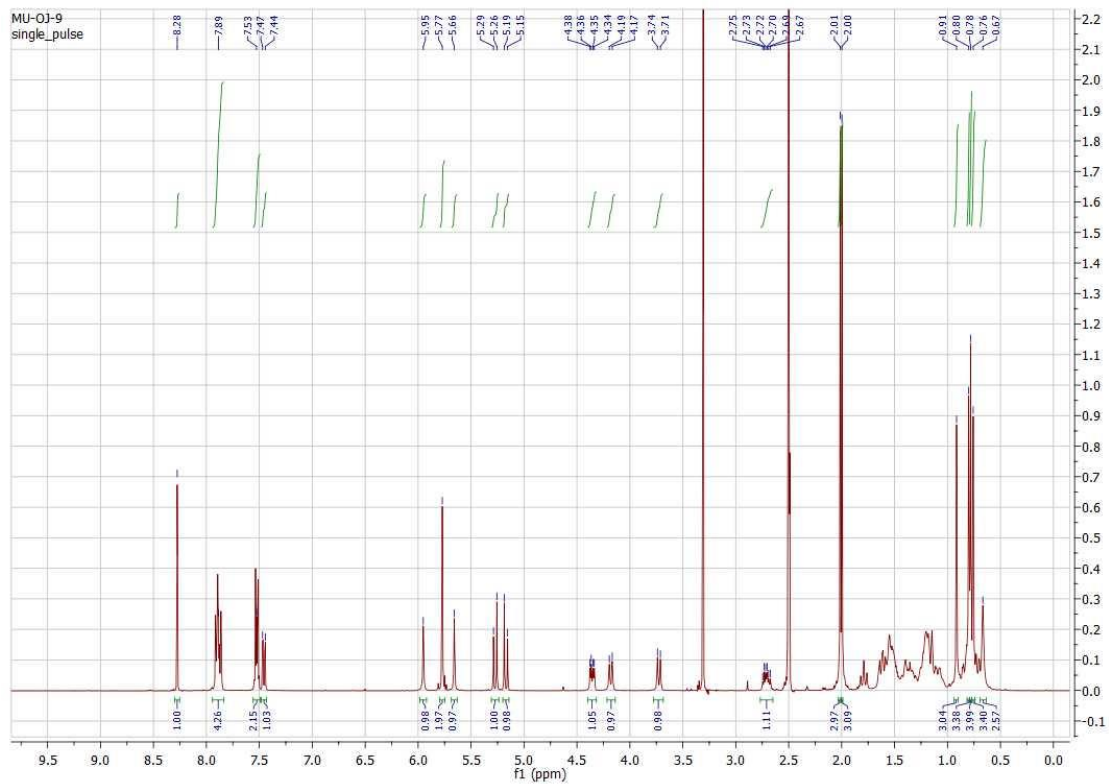
^1H a ^{13}C NMR sloučiny 97



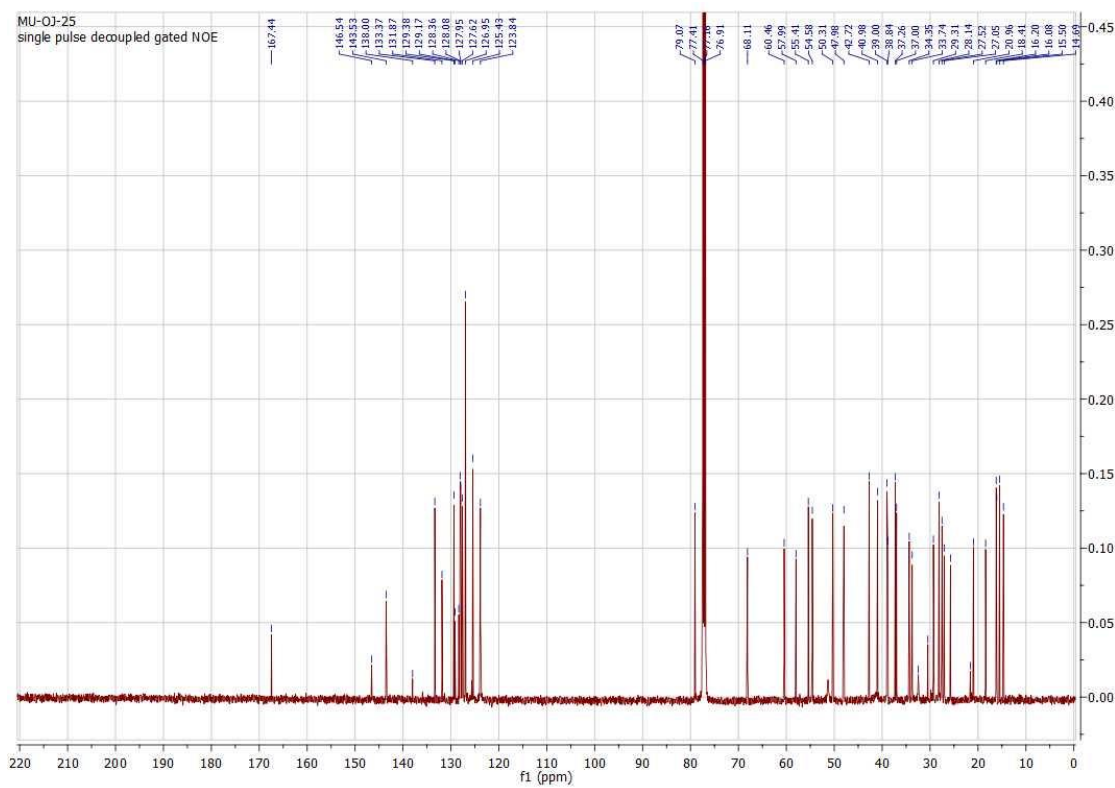
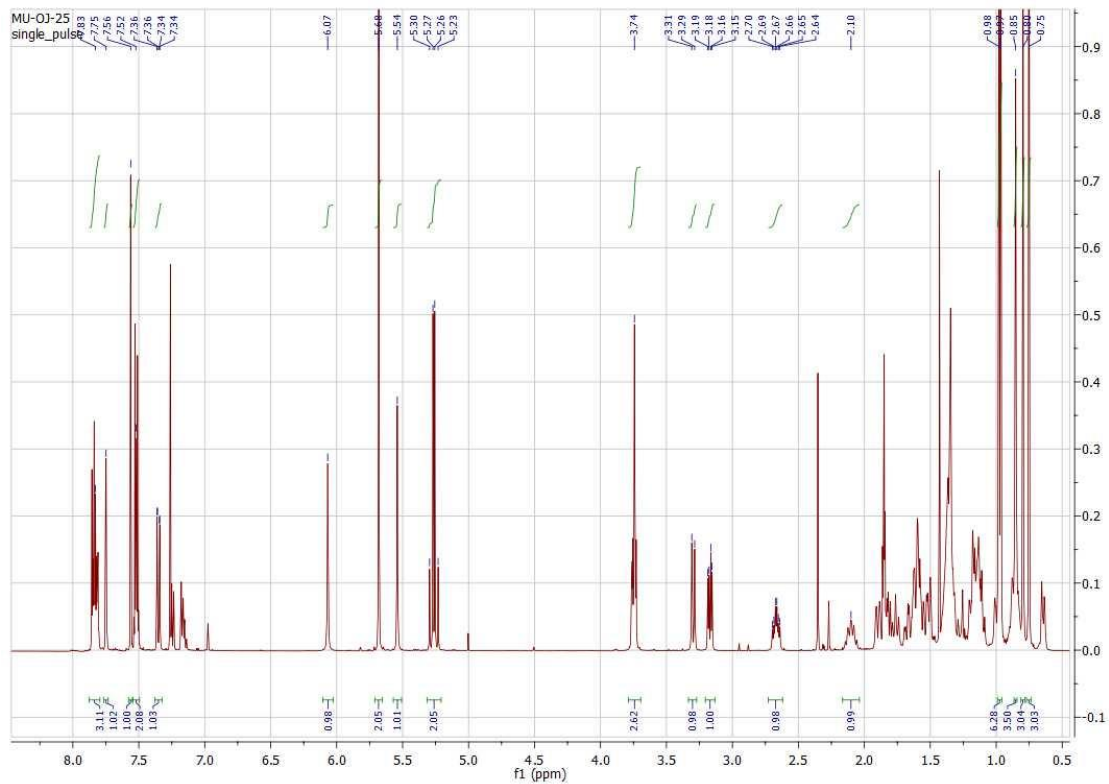
^1H a ^{13}C NMR sloučiny 98



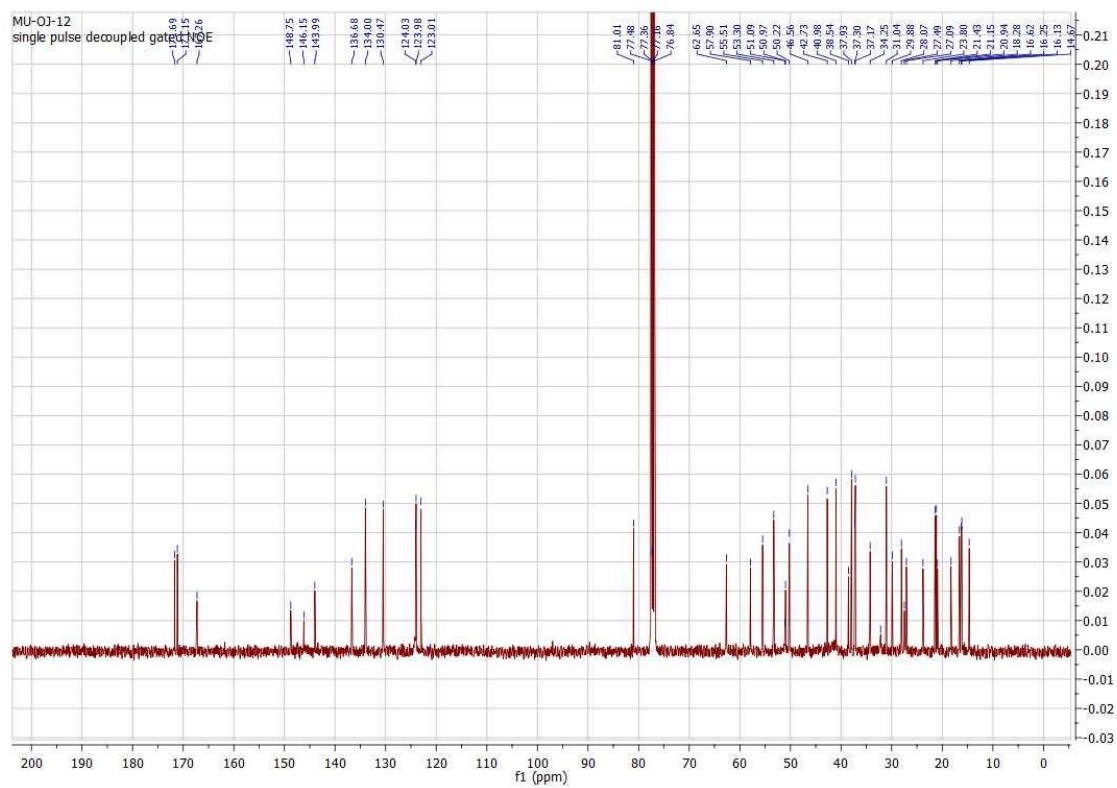
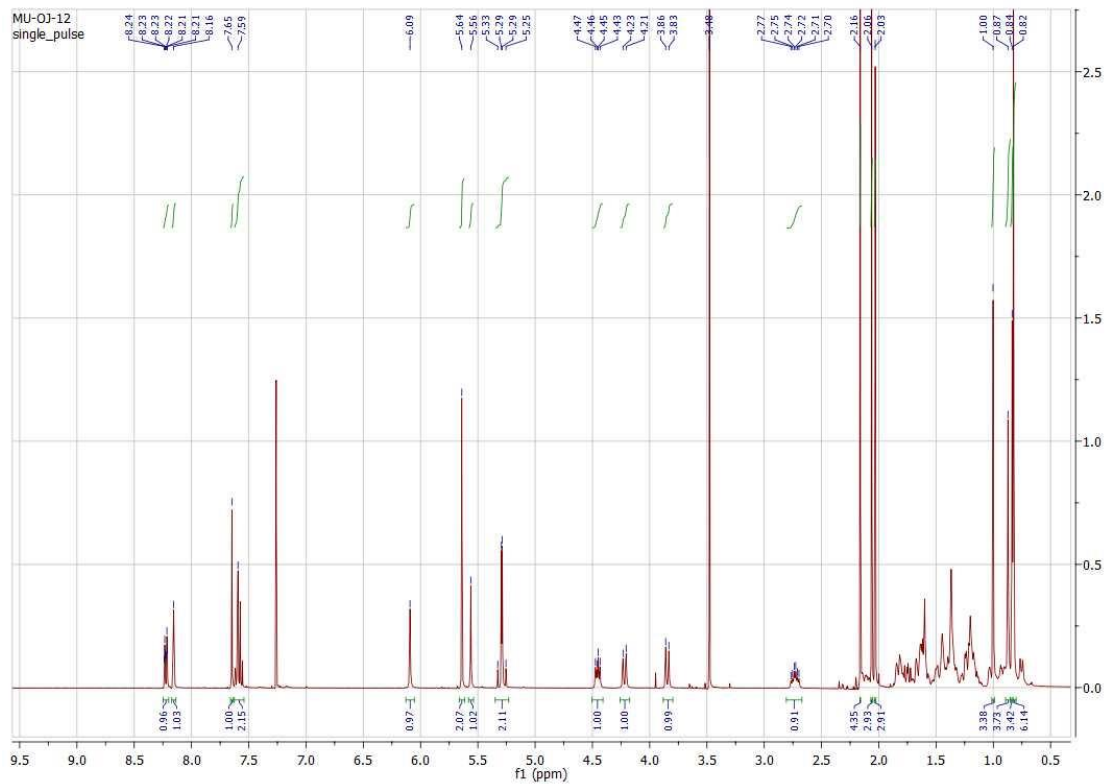
^1H a ^{13}C NMR sloučeniny 99



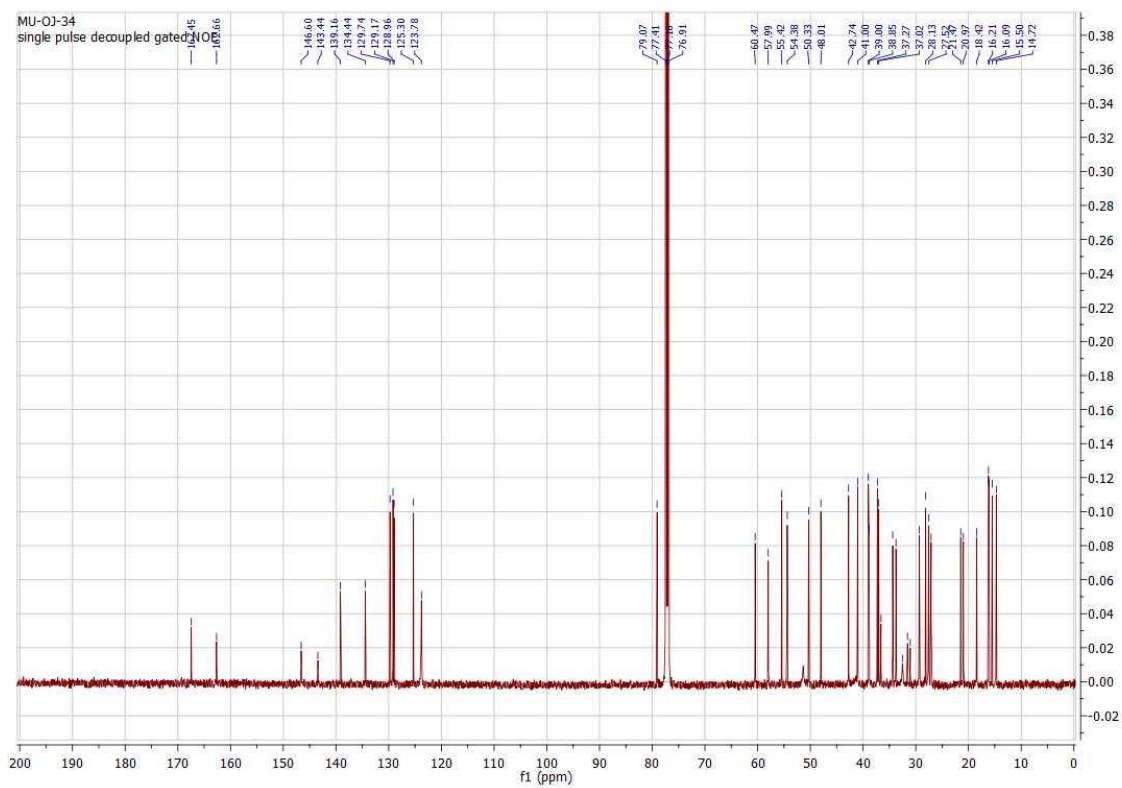
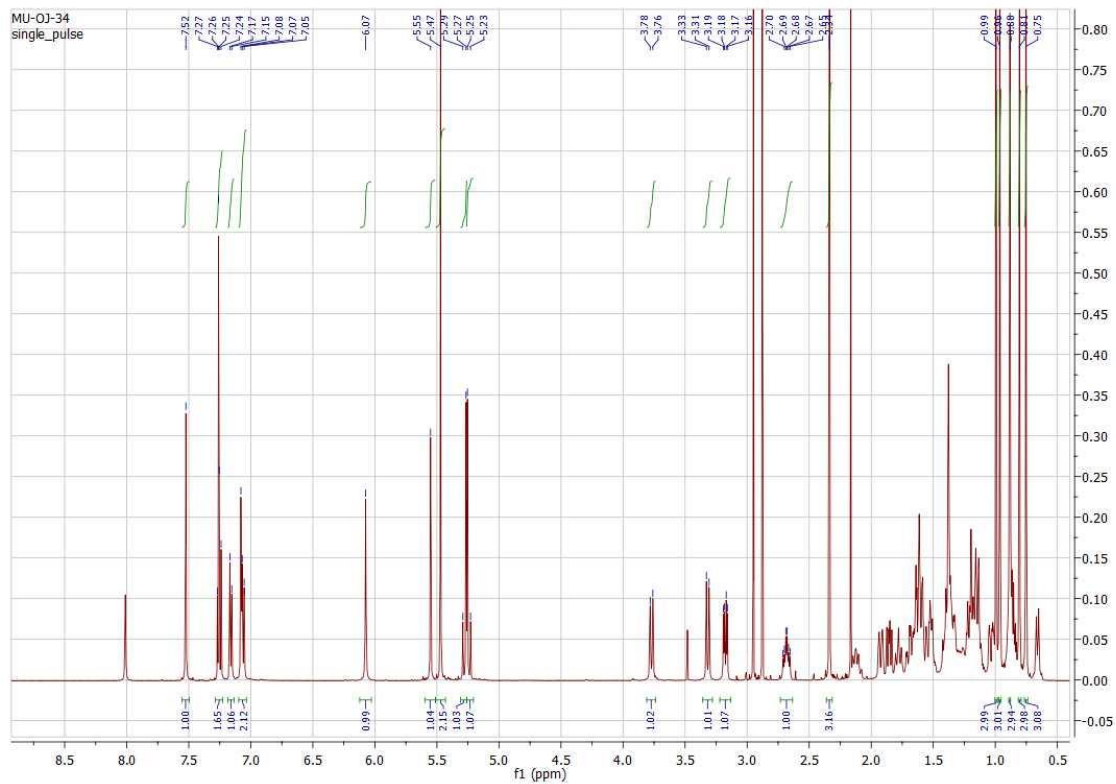
^1H a ^{13}C NMR sloučeniny **100**



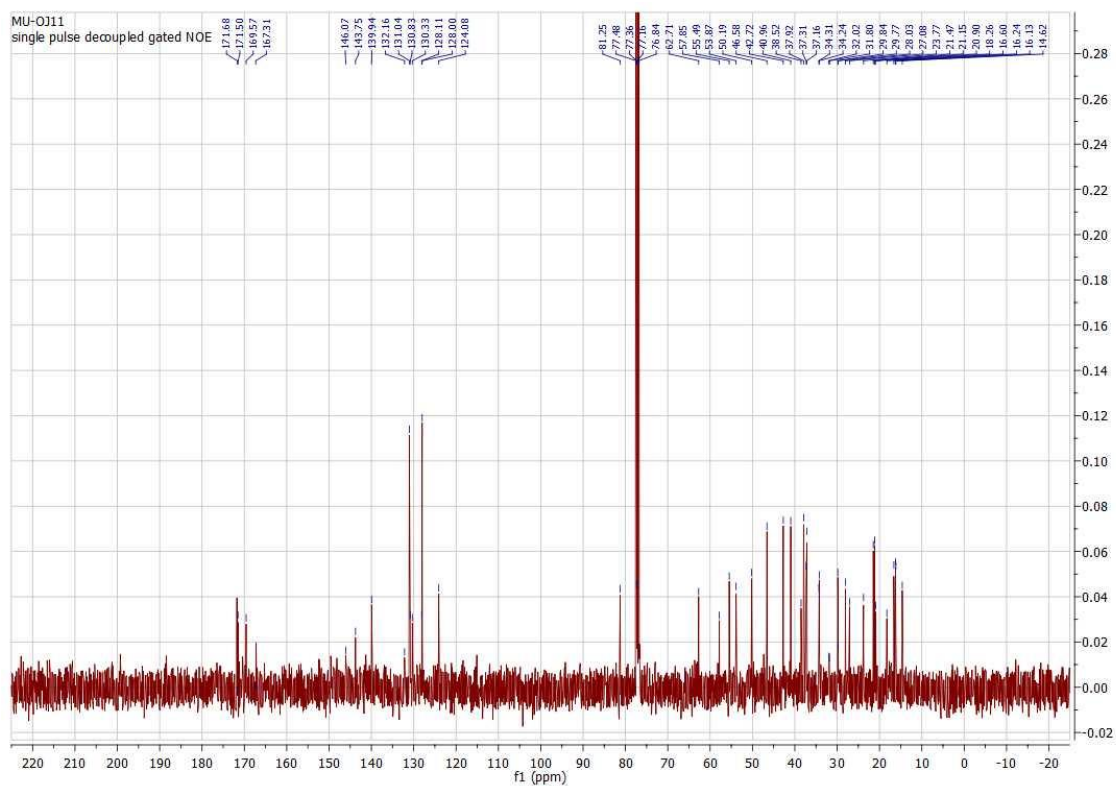
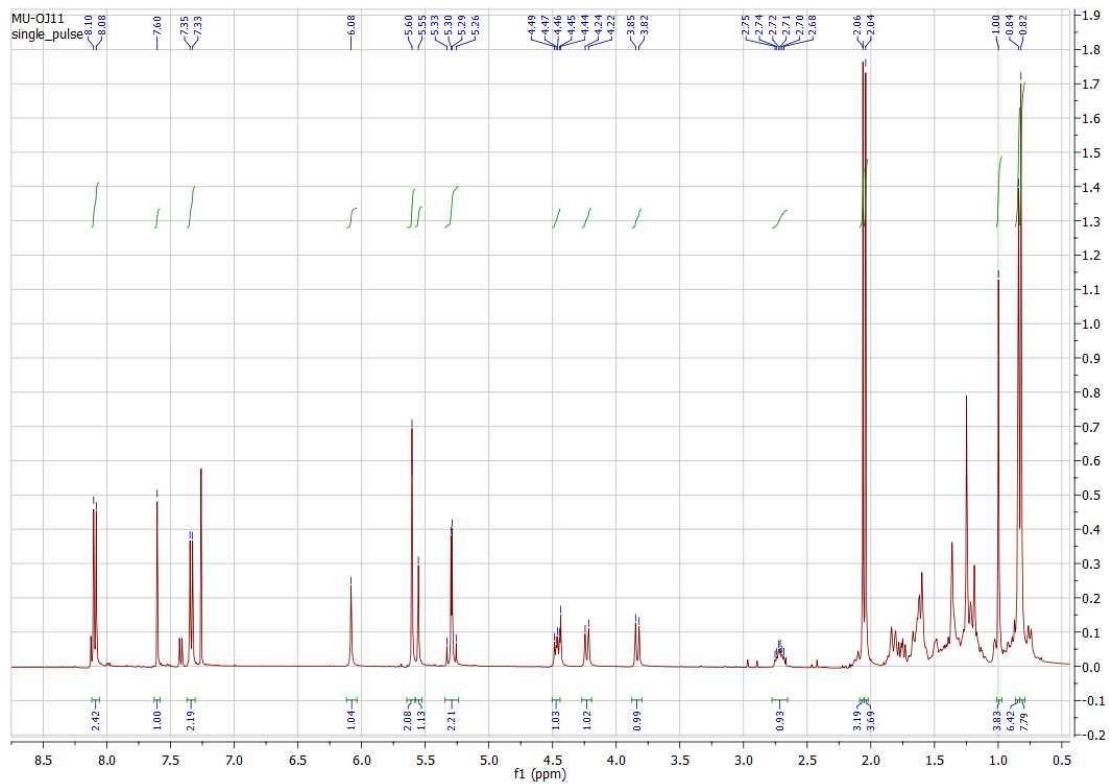
^1H a ^{13}C NMR sloučeniny **101**



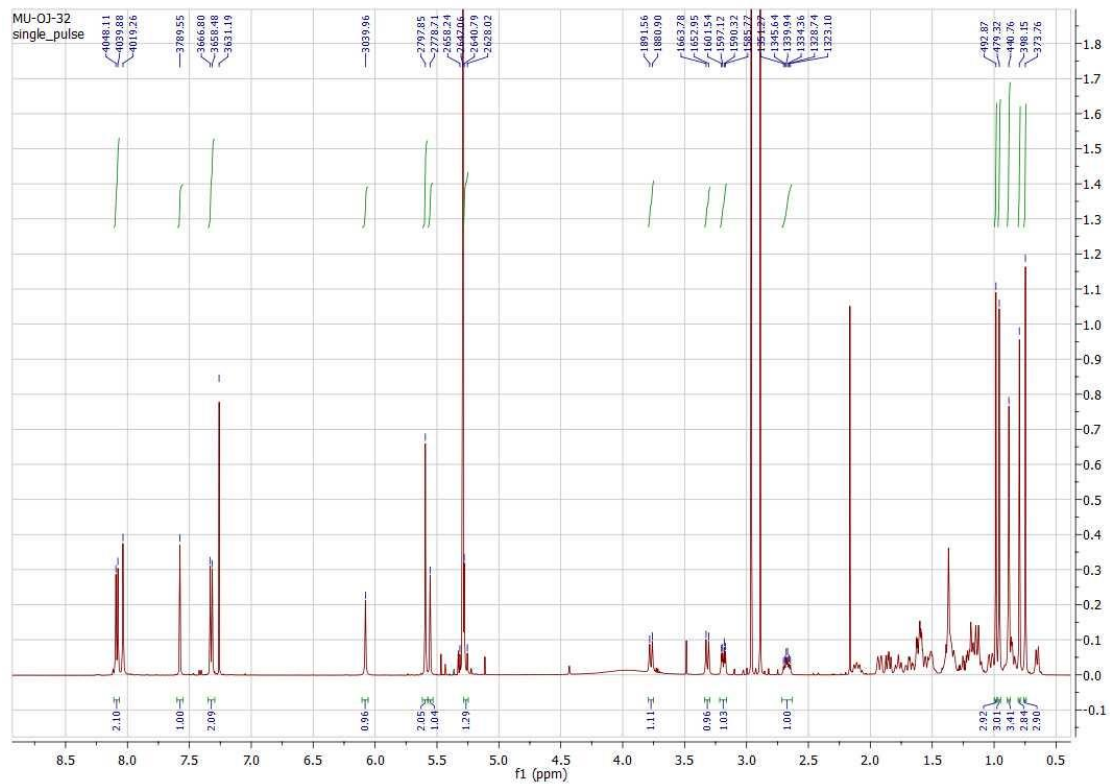
^1H a ^{13}C NMR sloučeniny 102



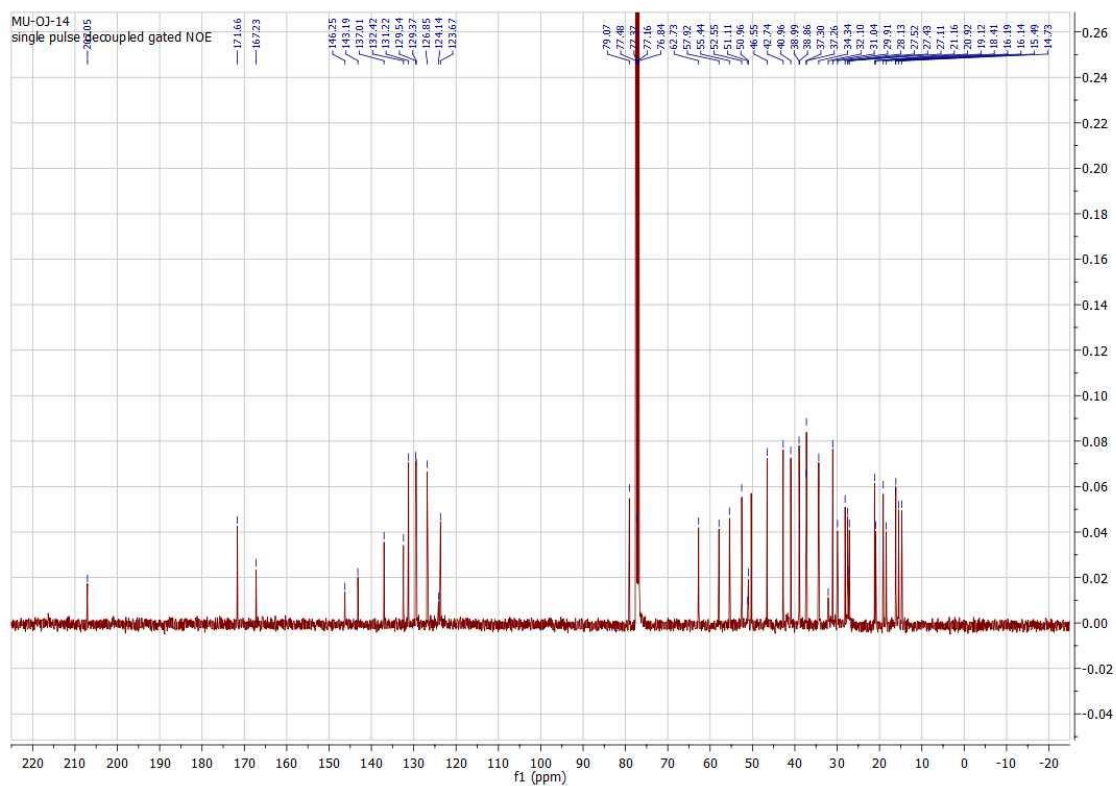
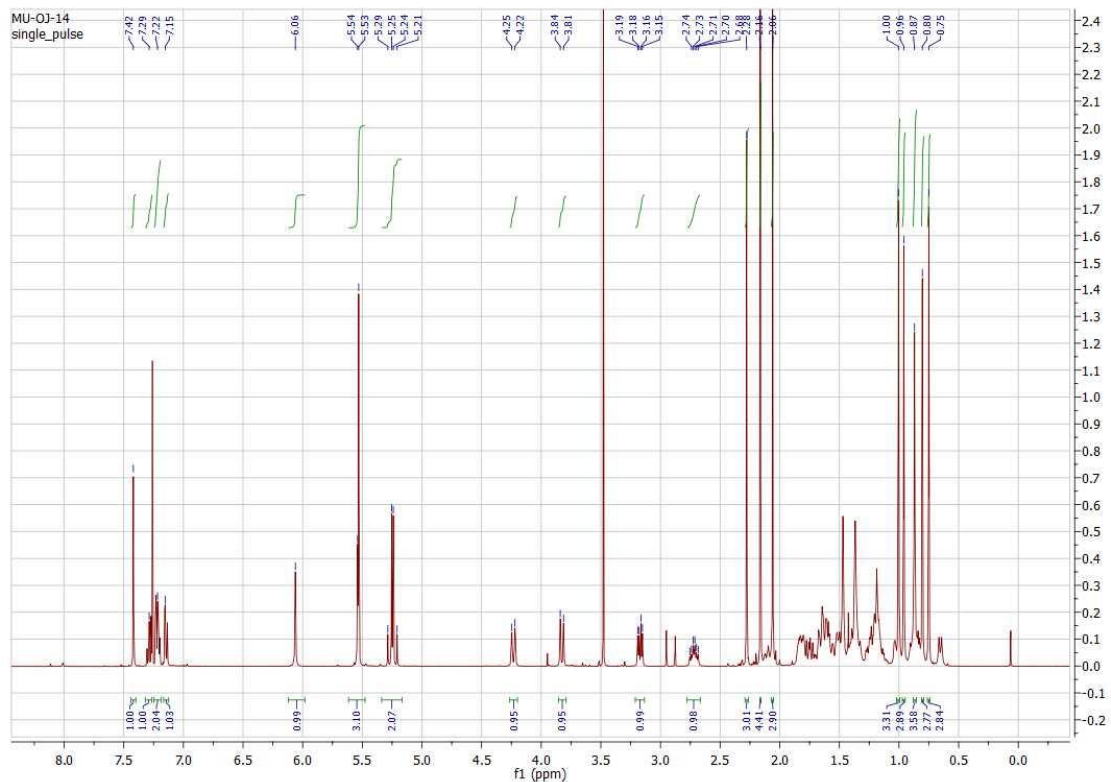
^1H a ^{13}C NMR sloučeniny 103



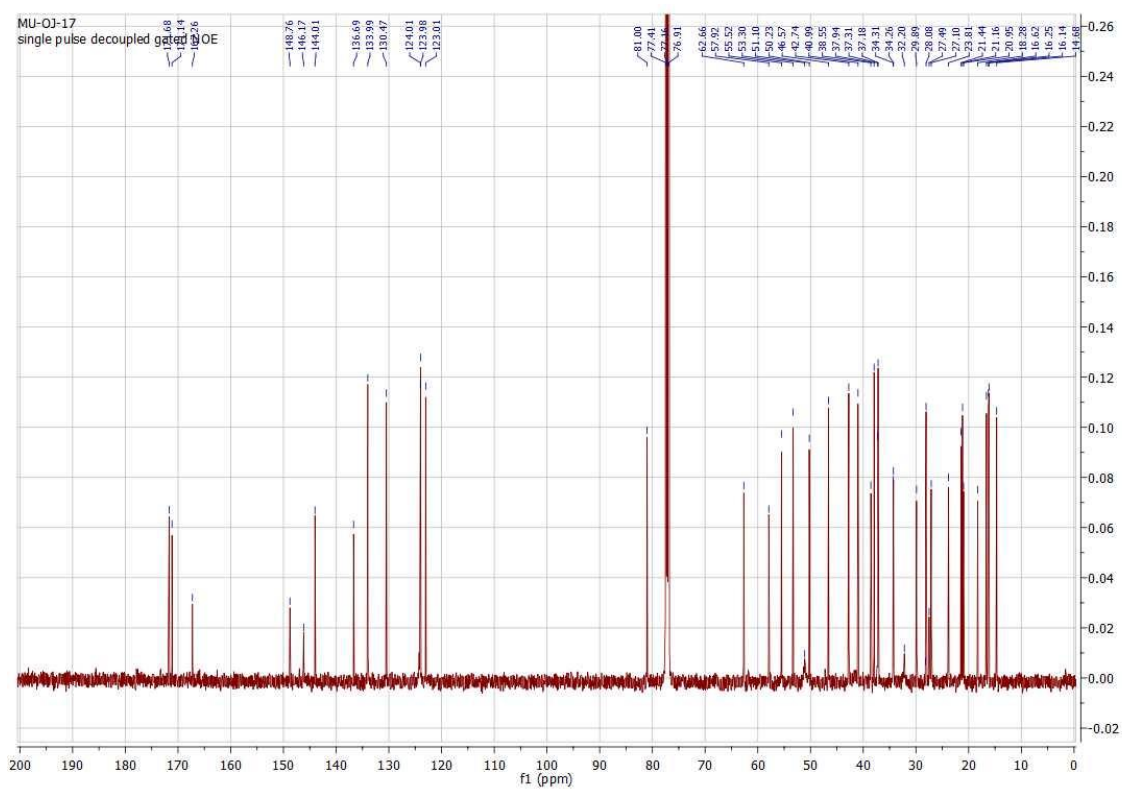
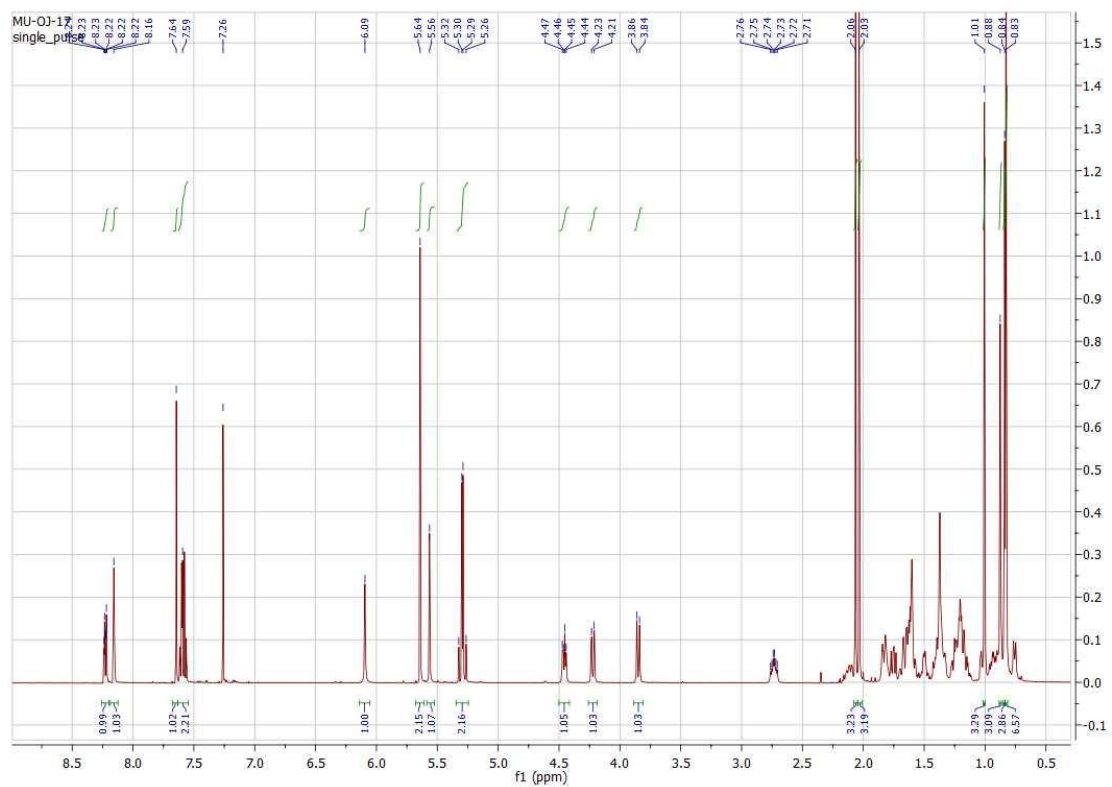
^1H a ^{13}C NMR sloučeniny **104**



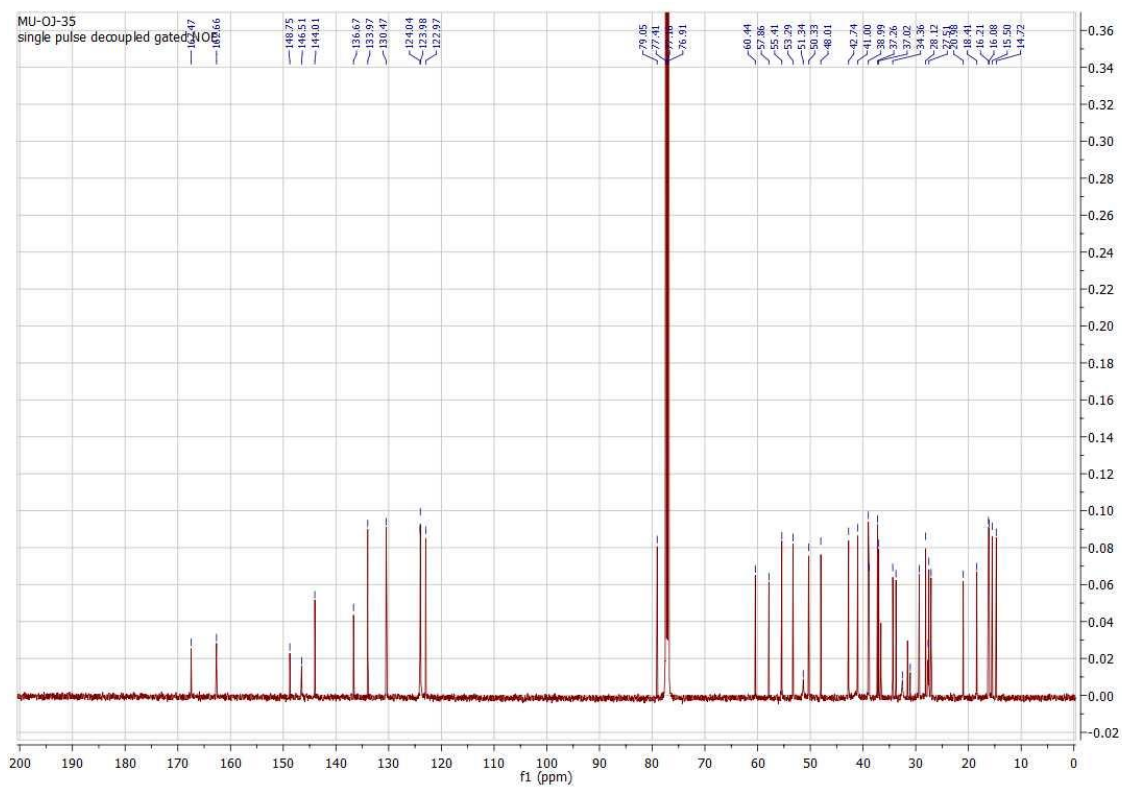
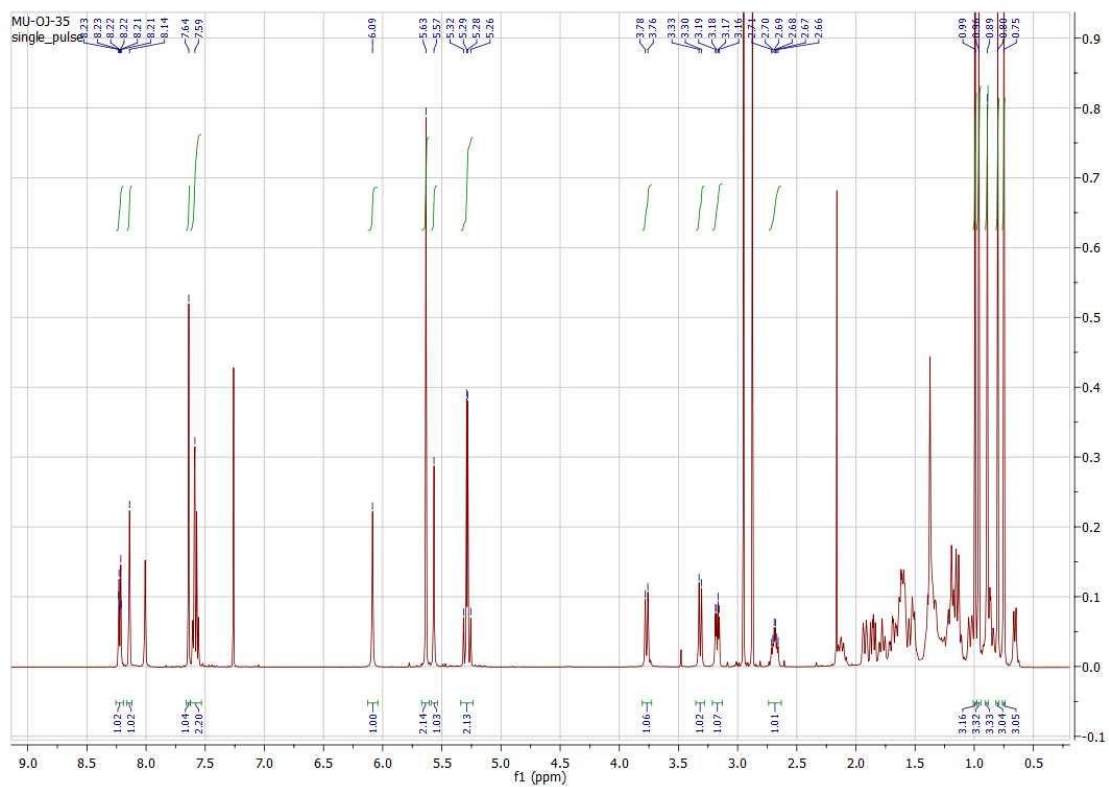
^1H a ^{13}C NMR sloučeniny **106**



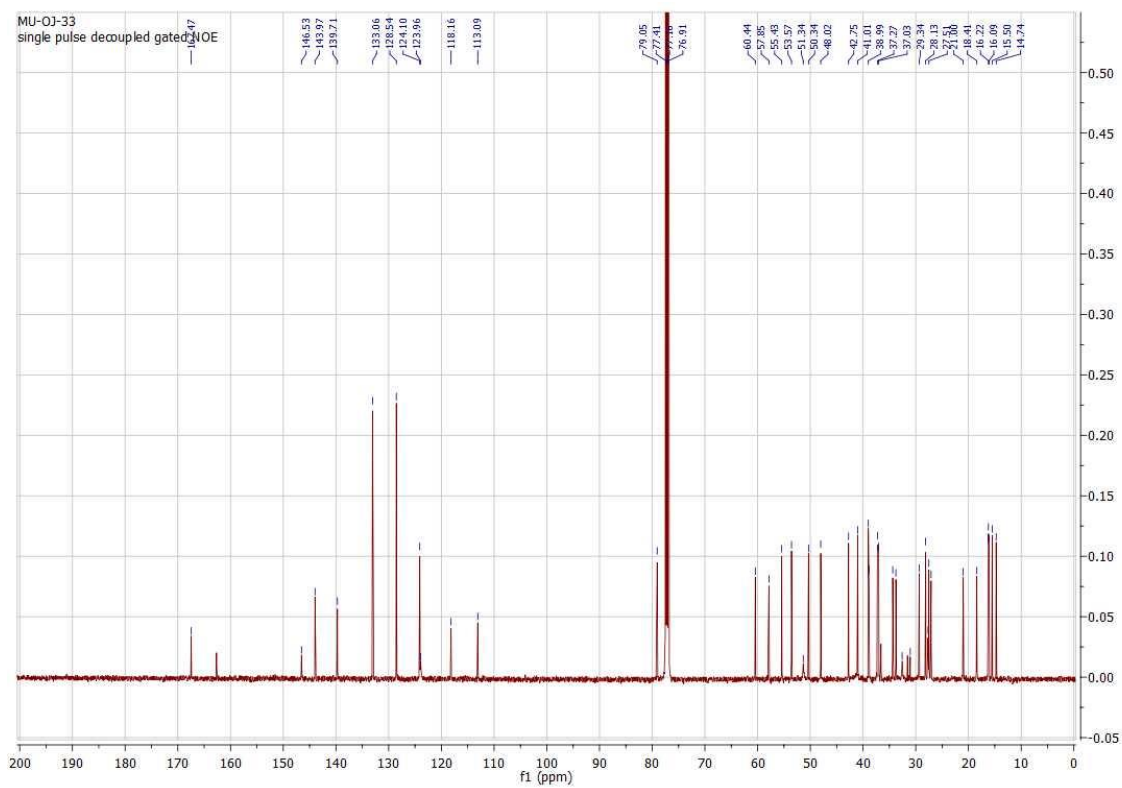
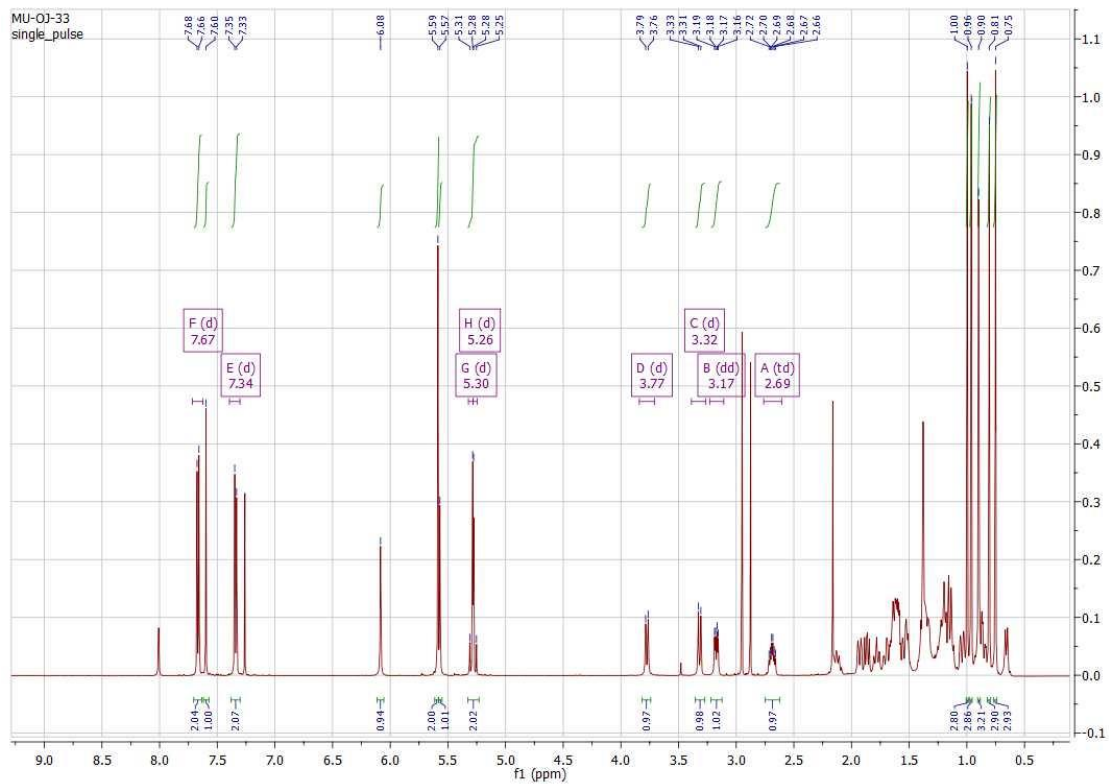
^1H a ^{13}C NMR sloučeniny **107**



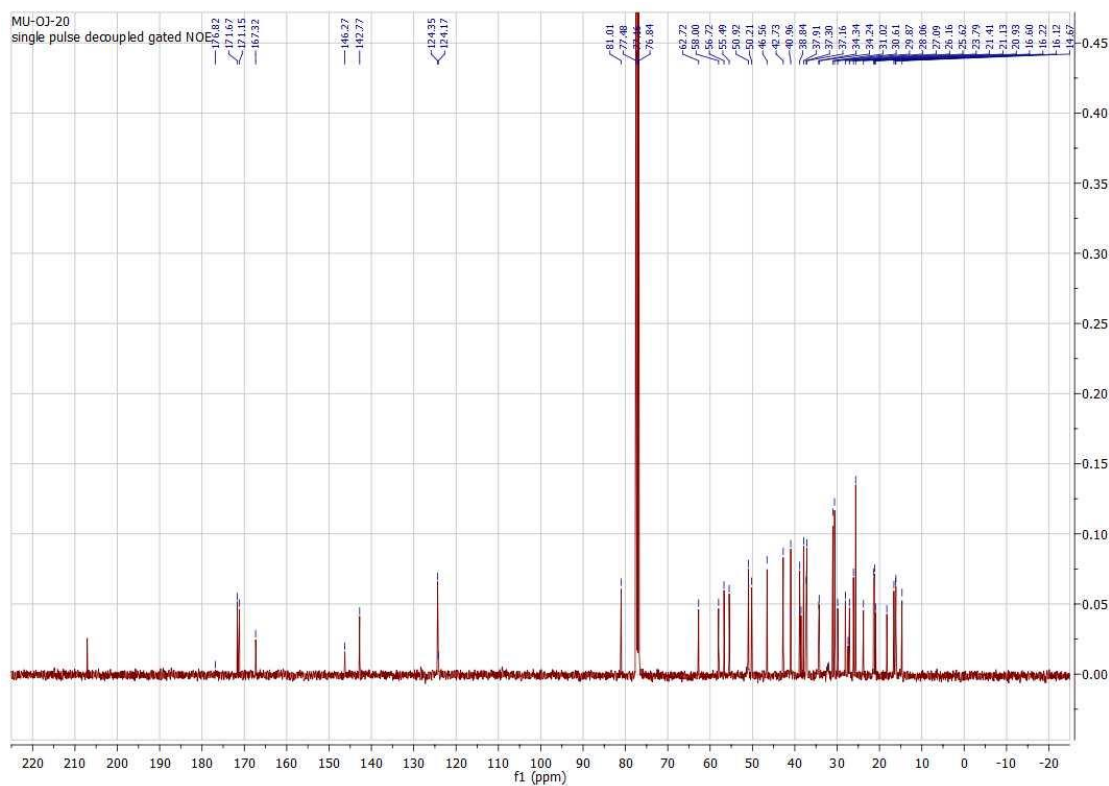
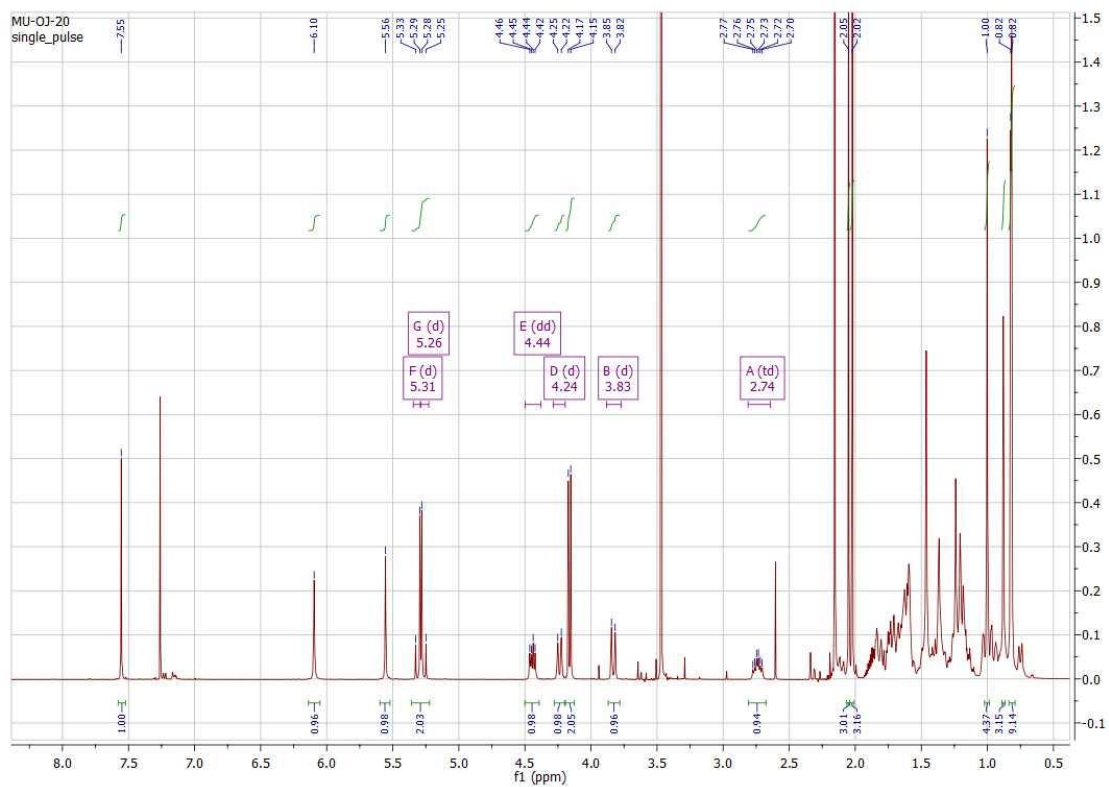
^1H a ^{13}C NMR sloučeniny **108**



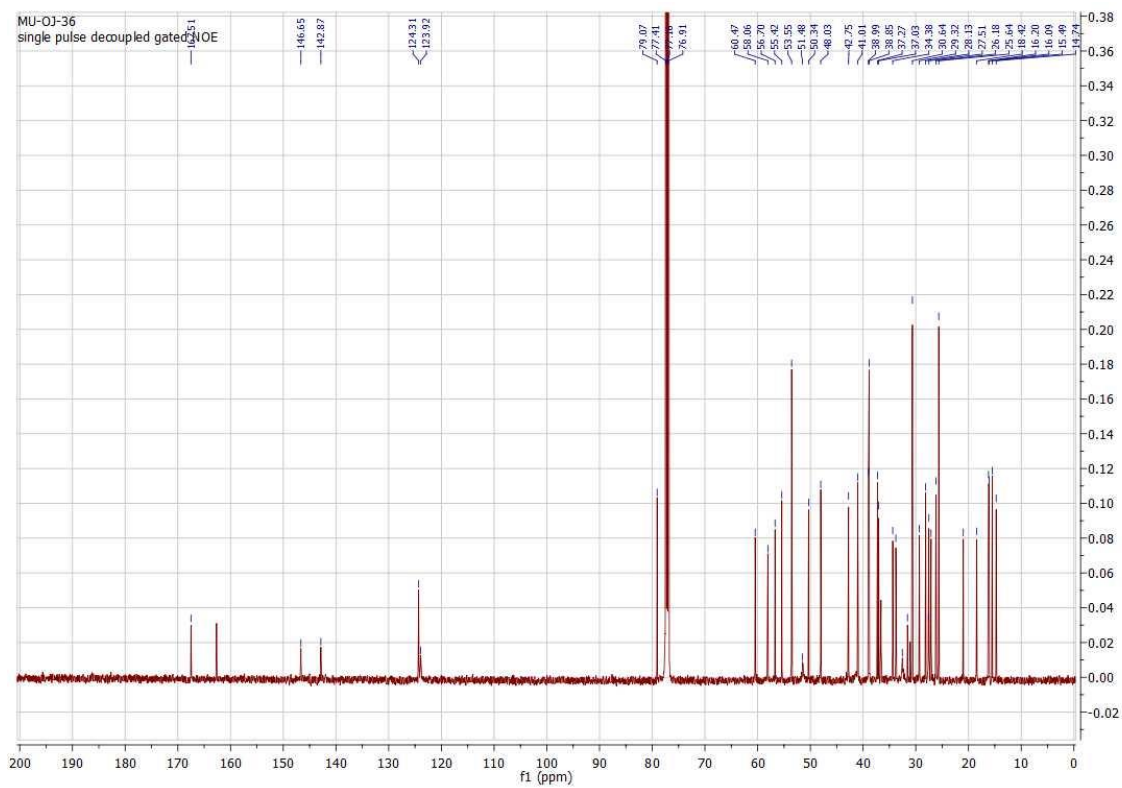
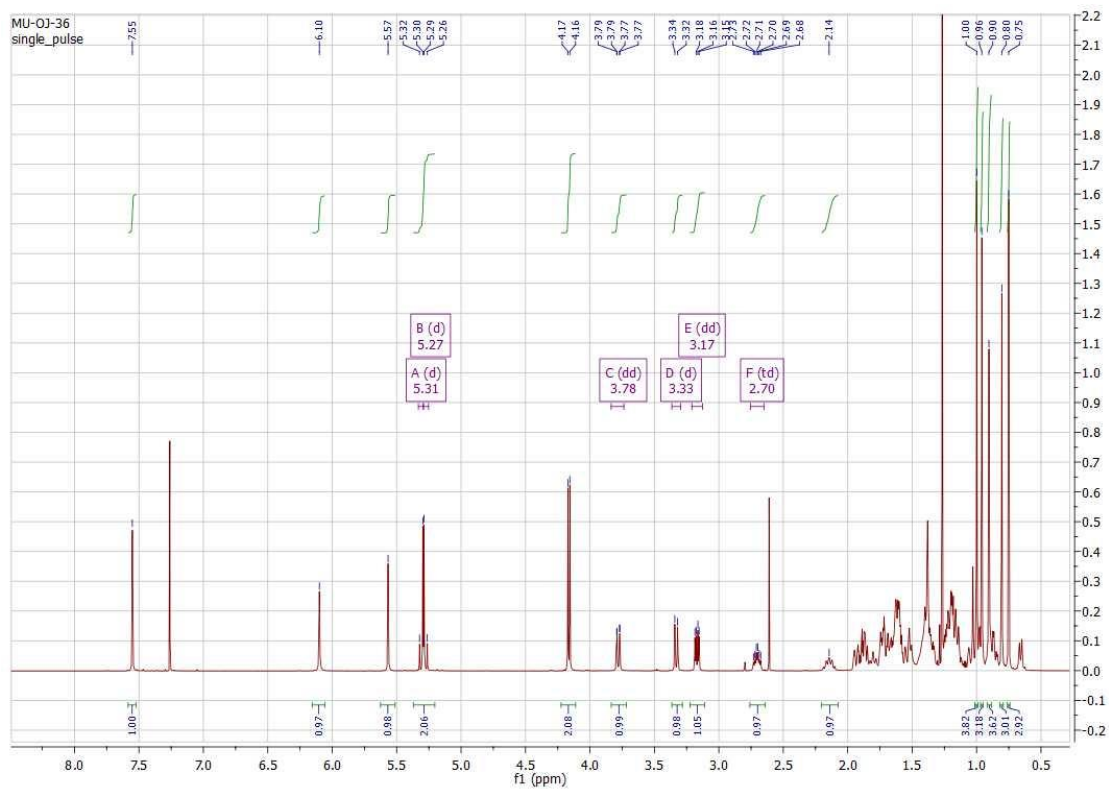
^1H a ^{13}C NMR sloučeniny **110**



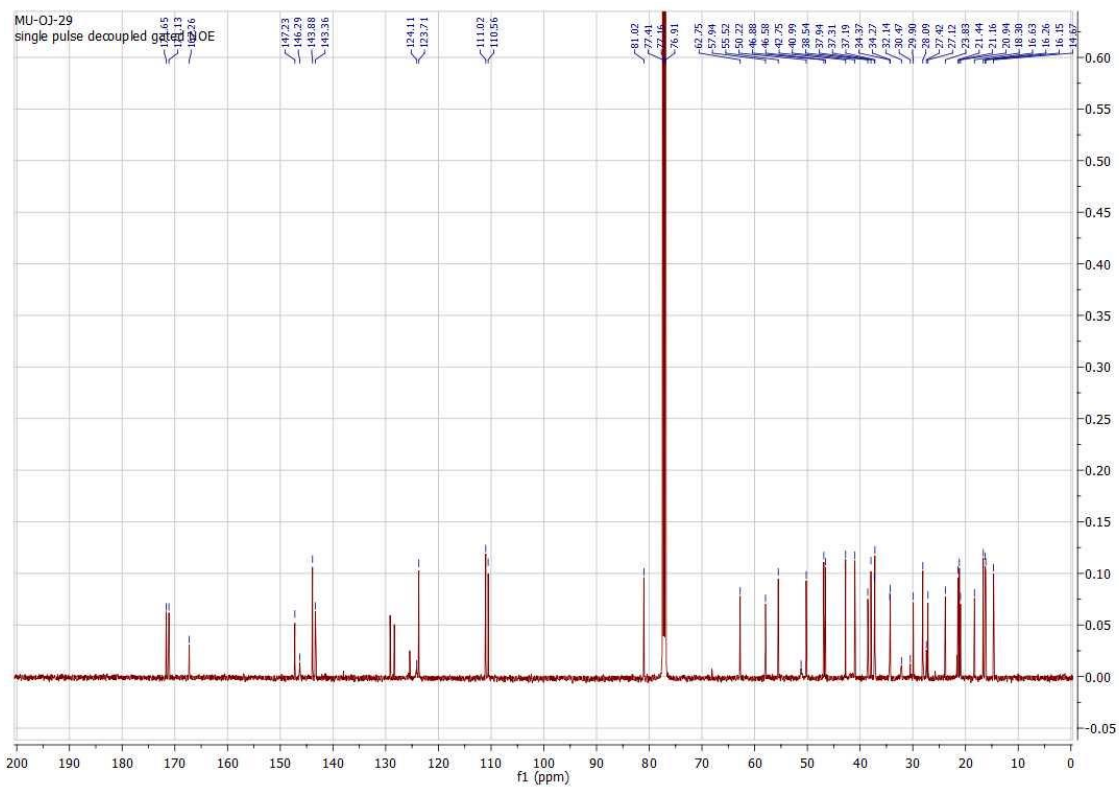
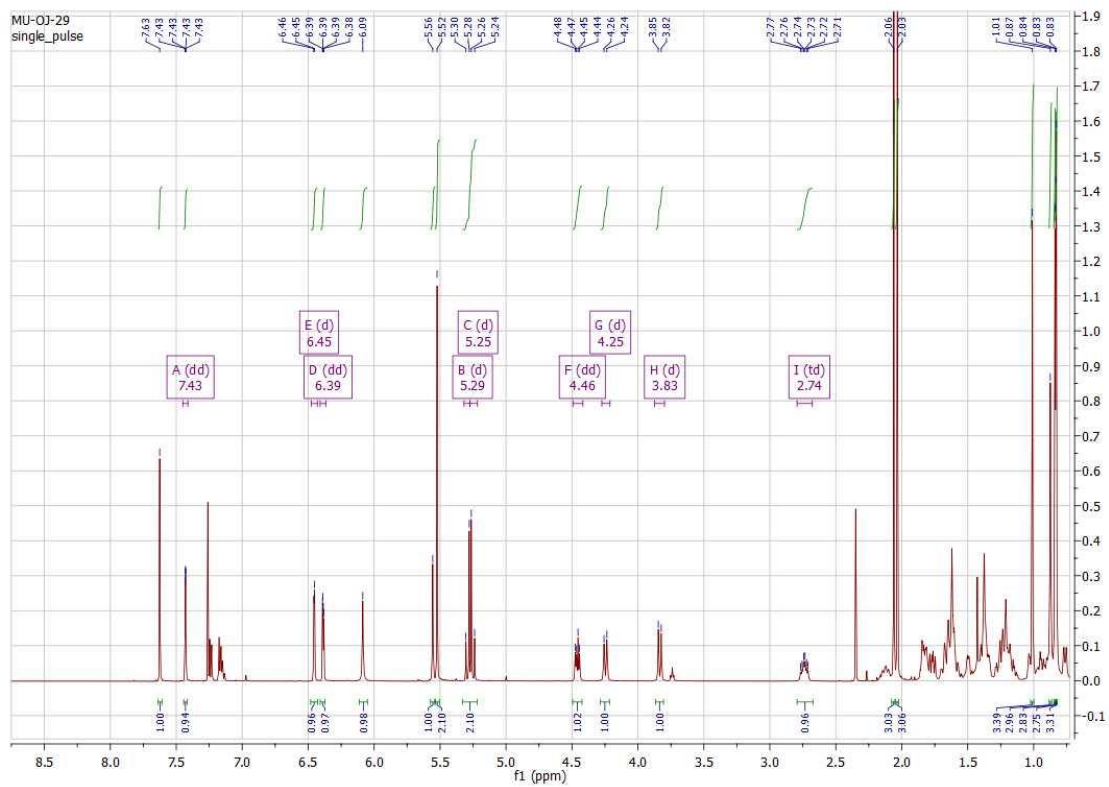
^1H a ^{13}C NMR sloučiny 111



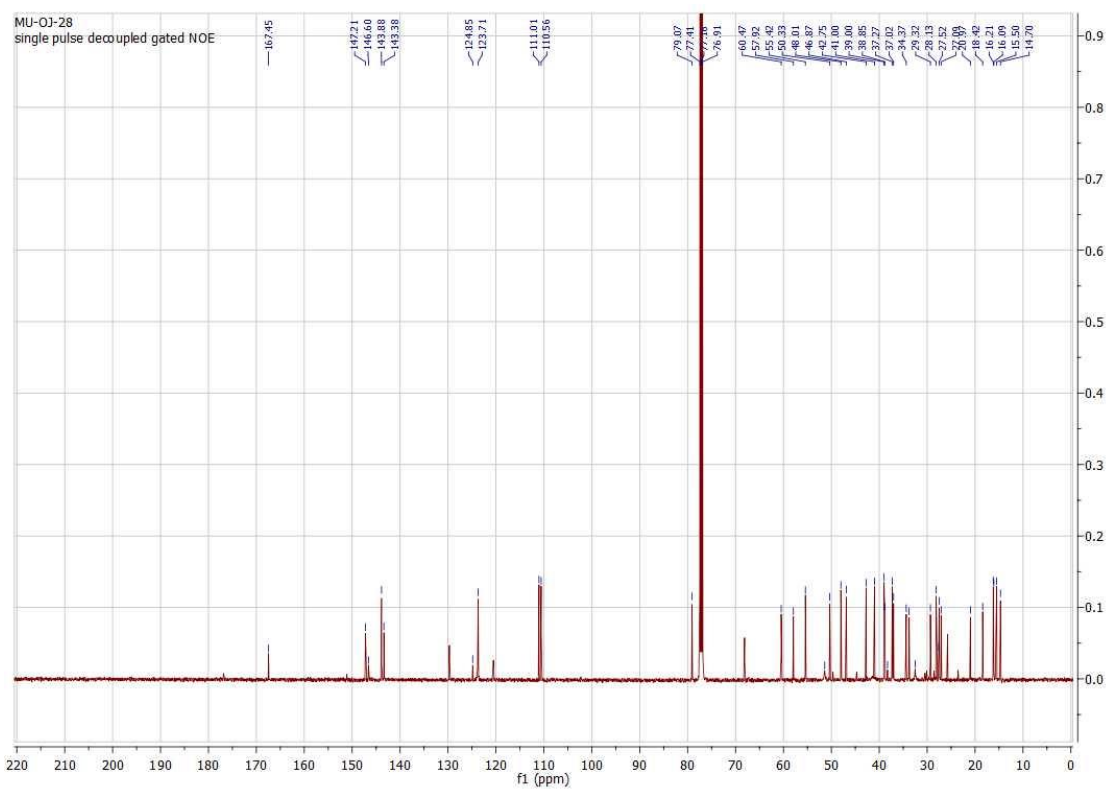
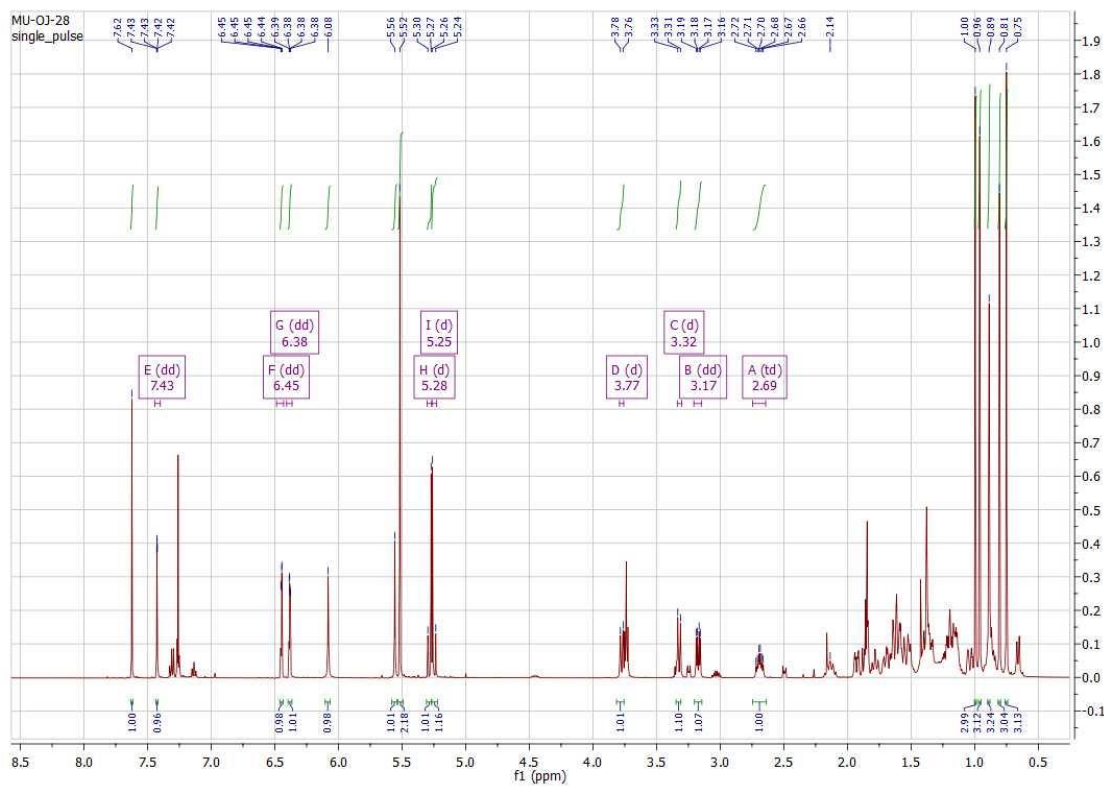
^1H a ^{13}C NMR sloučeniny **112**



^1H a ^{13}C NMR sloučeniny **113**

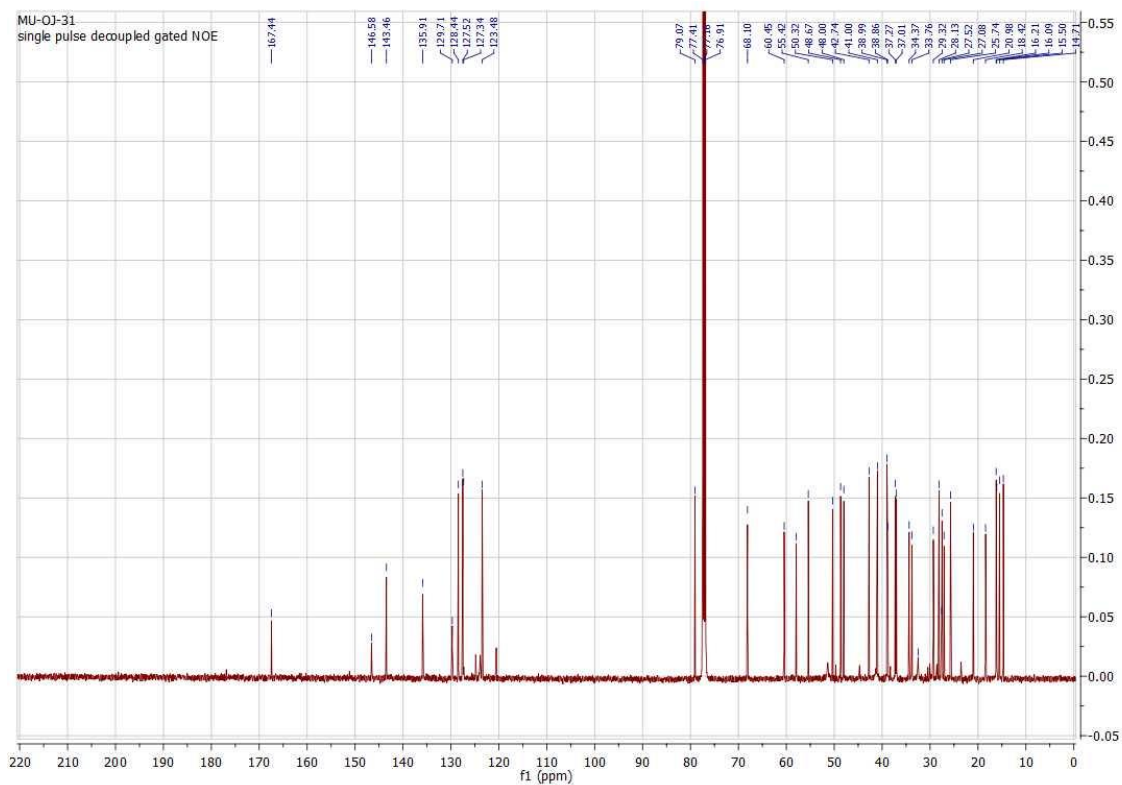
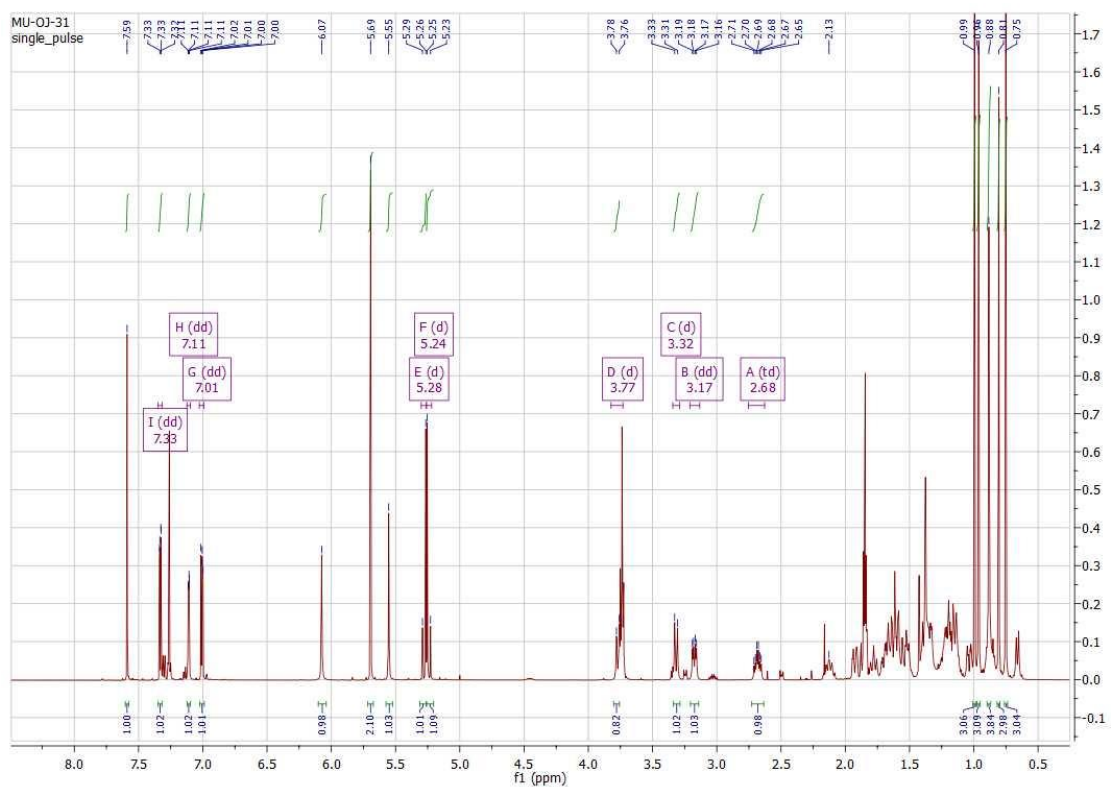


^1H a ^{13}C NMR sloučiny **114**

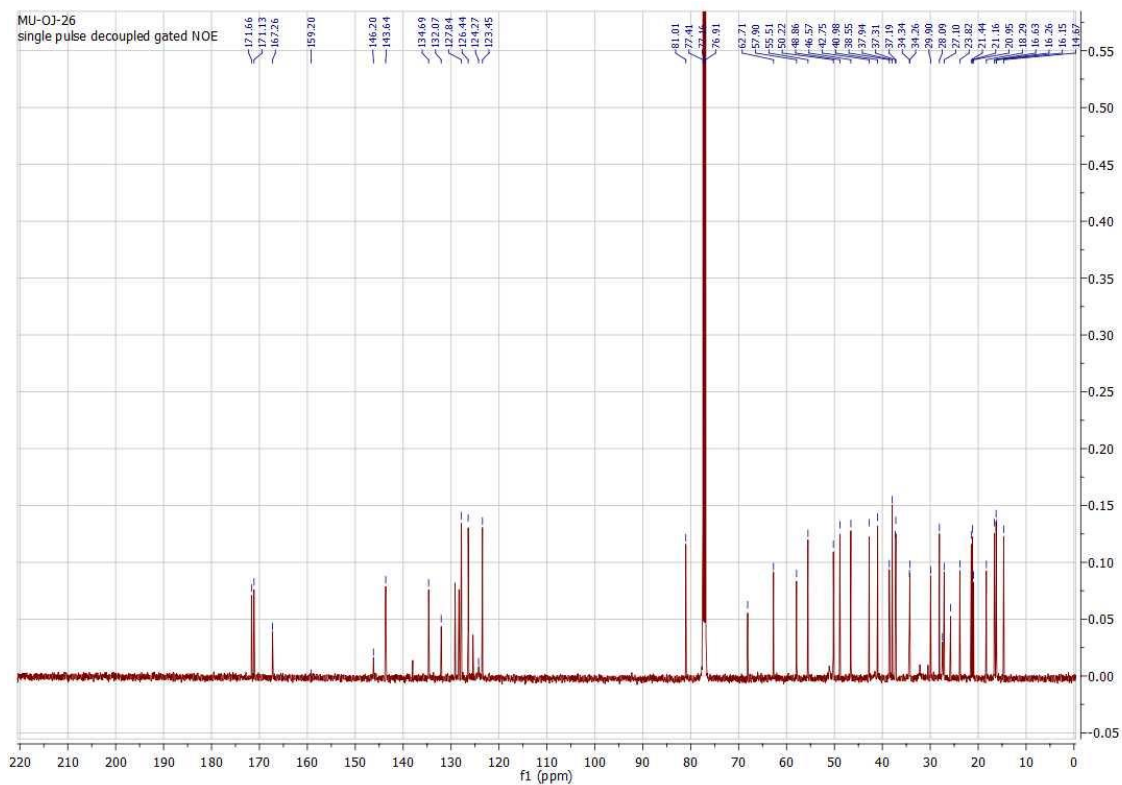
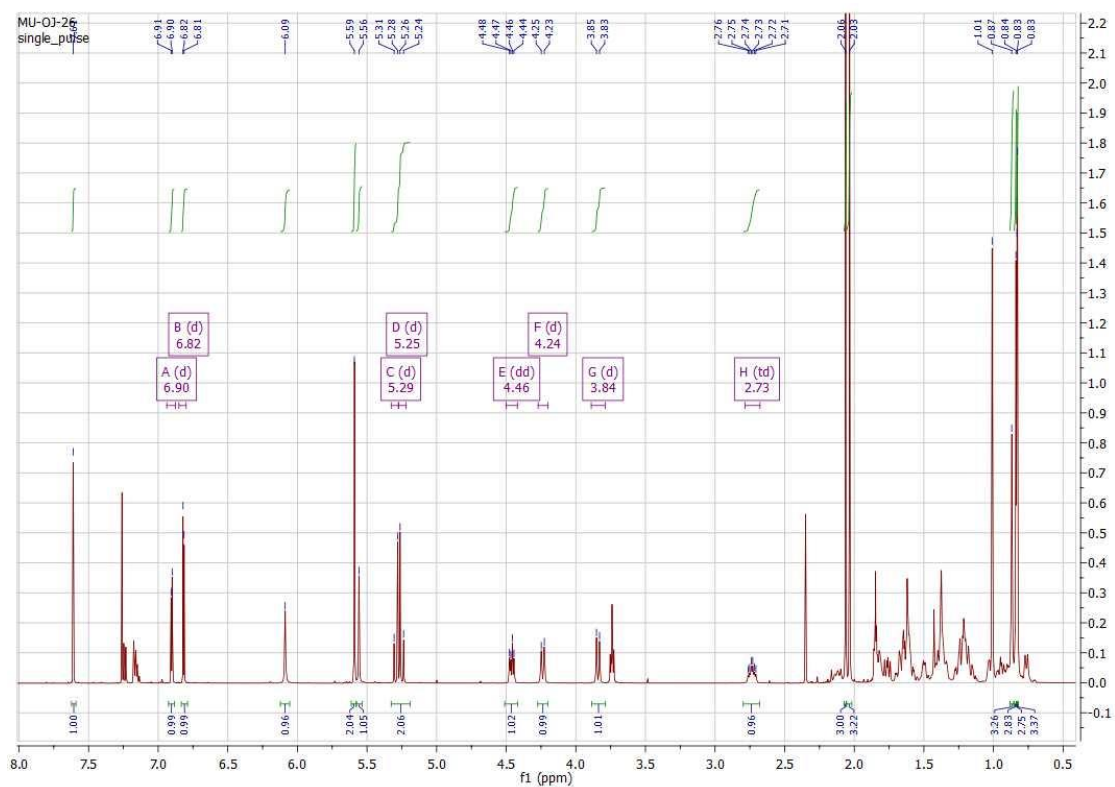


^1H a ^{13}C NMR sloučeniny **115**

^1H a ^{13}C NMR sloučiny 116



^1H a ^{13}C NMR sloučiny **117**



^1H a ^{13}C NMR sloučiny **118**

