

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra organické chemie



**Studium využitelnosti Triazolizační reakce k přípravě
nových triterpenoidních 1,2,3-triazolů**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor: Nikola Jakubcová

Studijní obor: Bioorganická chemie a chemická biologie

Vedoucí práce: Mgr. Lucie Borková, Ph.D.

Olomouc 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla 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, 8. 6. 2020

.....

Podpis

Poděkování

Nejvíce bych chtěla poděkovat vedoucí své práce Mgr. Lucii Borkové, Ph.D. za skvělé vedení, rady a čas, který věnovala mě a mé práci. Dále bych ráda poděkovala vedoucímu naší skupiny doc. RNDr. Milanu Urbanovi, Ph.D. za jeho podporu a odborné rady. V neposlední řadě bych ráda poděkovala také RNDr. Sandře Benické za měření HRMS spekter a Mgr. Soně Krajčovičové, Ph.D. za měření NMR experimentů.

Mé další velké díky patří všem mým přátelům a jak bývalým, tak současným kolegům z výzkumné skupiny za jejich podporu během celého mého studia.

Tato závěrečná práce vznikla za podpory projektů studentské grantové soutěže na UP s registračním číslem IGA_PrF_2020_012 a s podporou grantu Ministerstva Zdravotnictví ČR s číslem NV19-03-00107.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora: Nikola Jakubcová

Název práce: Studium využitelnosti Triazolizační reakce k přípravě nových triterpenoidních 1,2,3-triazolů

Typ práce: Diplomová práce

Pracoviště: Katedra organické chemie

Vedoucí práce: Mgr. Lucie Borková, Ph.D.

Odborný konzultant: doc. RNDr. Milan Urban, Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2020

Abstrakt: Tato diplomová práce se věnuje studiu využitelnosti Triazolizační reakce pro přípravu nových triterpenoidních 1,2,3-triazolů. Cílem této práce je najít vhodné reakční podmínky pro průběh Triazolizační reakce na triterpenech, optimalizovat je a připravit triterpenoidní deriváty s triazolovým kruhem přikondenzovaným k A-kruhu triterpenu. V teoretické části práce jsou shrnuty obecné informace o terpenech, následované kapitolou popisující dosud popsané triazolové deriváty triterpenů, a nakonec kapitolou o samotné Triazolizační reakci. V diskuzní a experimentální části jsou popsány přípravy výchozích látek, provedené optimalizační reakce pro přípravu nesubstituovaných a substituovaných triazolů, jejich charakterizace a předběžné výsledky cytotoxické aktivity těchto derivátů.

Klíčová slova: Triterpeny, Triazolizační reakce, 1,2,3-triazoly, cytotoxicita

Počet stran: 88

Počet příloh: 1

Jazyk: Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Nikola Jakubcová

Title: Study of the usability of the Triazolization reaction for the preparation of novel triterpenoid 1,2,3-triazoles

Type of thesis: Master's

Department: Department of Organic Chemistry

Advisor: Mgr. Lucie Borková, Ph.D.

Advisor consultant: Assoc. Prof. RNDr. Milan Urban, Ph.D.

The year of presentation: 2020

Abstract: This diploma thesis deals with the study of the usability of the Triazolization reaction for the preparation of novel triterpenoid 1,2,3-triazoles. The aim of this work is to find suitable reaction conditions for the course of the Triazolization reaction on triterpenes, optimize them and prepare triterpenoid derivatives with a triazole ring fused to the A-ring of the triterpene. The theoretical part of the thesis summarizes general information about terpenes, followed by a chapter dedicated to the triazole derivatives of triterpenes described so far, and a chapter about the Triazolization reaction itself. The discussion and experimental part describes the preparation of starting materials, performed optimization reactions for the preparation of unsubstituted and substituted triazoles, their characterization and preliminary results of cytotoxic activity of these derivatives.

Keywords: Triterpenes, Triazolization reaction, 1,2,3-triazoles, cytotoxicity

Number of pages: 88

Number of appendixes: 1

Language: Czech

Seznam zkratek

AcOH	kyselina octová
AIBN	azobisisobutyronitril
AZT	azidothimydin
Bn	benzyl
Boc	<i>tert</i> -butyloxykarbonyl
BuONO	butylnitrát
DCC	N,N'-dicyklokarbodiimid
DCM	dichlormethan
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropylethylamin
DMA	dimethylacetamid
DMAP	4-dimethylaminopyridin
DMB	2,4-dimethoxybenzyl
DME	dimethoxyethan
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
Ekv.	ekvivalent/ekvivalenty
Et ₂ O	diethylether
EtOAc	ethylacetát
Hex	hexan
<i>i</i> -Pr	isopropyl
Me	methyl
MeOH	methanol
NBS	<i>N</i> -bromsukcinimid

NMP	<i>N</i> -methylpyrrolidon
P	produkt
PCC	pyridinium chlorochromát
r.t.	pokožová teplota
<i>sec</i> -Bu	<i>sec</i> -butyl
TBAB	tetra <i>n</i> -butylamonium bromid
TBTU	2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborát
<i>t</i> -BuOH	2-methyl-2-propanol
<i>t</i> -BuOK	2-methyl-2-propoxid draselný
THF	tetrahydrofuran
TI	terapeutický index
Tol	toluen
t.t.	teplota tání
VL	výchozí látka
VP	vedlejší produkty

Seznam nádorových linií

A375-S2	linie lidského maligního melanomu
A549	linie lidského adenokarcinomu plic
AGS	linie žaludečního epiteliálního karcinomu
BJ	linie lidského nenádorového fibroblastu
CCRF-CEM	linie lidské T-lymfoblastické leukemie
CEM-DNR	linie lidské T-lymfoblastické leukemie, daunorubicin rezistentní
HCT116	linie lidské rakoviny střev
HCT116p53--	linie lidské rakoviny střev se změnou exprese genu p53
HepG2	linie lidského hepatocelulárního karcinomu
HL-60	linie lidské promyelocytární leukemie
HT1080	linie lidského fibrosarkomu
HT-29	linie lidského kolorektálního adenokarcinomu
K562	linie lidské chronické myeloidní leukemie
K562-TAX	linie lidské chronické myeloidní leukemie, taxol rezistentní
KB	podlinie epiteloidního karcinomu produkující keratin
MRC-5	linie lidského nenádorového fibroblastu
P-388	linie lidské lymfocytární leukemie
U2OS	linie lidského osteosarkomu

Obsah

1	Úvod.....	11
2	Cíle diplomové práce.....	12
3	Teoretická část.....	13
3.1	Terpeny a jejich vlastnosti.....	13
3.1.1	Triterpeny.....	15
3.2	Heterocyklické deriváty triterpenů.....	19
3.2.1	Deriváty s přikondenzovaným triazolovým kruhem ke kruhu A.....	22
3.2.2	Deriváty s triazolem v poloze C-2.....	22
3.2.3	Deriváty s triazolem v poloze C-3.....	24
3.2.4	Deriváty s triazolem v poloze C-28.....	28
3.2.5	Deriváty s triazolem v poloze C-30 lupanových skeletů.....	32
3.3	Triazolizační reakce.....	33
4	Výsledky a diskuze.....	38
4.1	Příprava výchozích látek.....	38
4.2	Příprava nesubstituovaných 1,2,3-triazolů.....	40
4.3	Příprava substituovaných 1,2,3-triazolů.....	45
4.3.1	<i>p</i> -Methoxybenzyl-1,2,3-triazolové deriváty.....	45
4.3.2	Fenyl-1,2,3-triazolové deriváty.....	51
4.3.3	Triazoly odvozené od aminokyselin.....	55
5	Cytotoxická aktivita připravených derivátů.....	59
6	Závěr.....	60
7	Experimentální část.....	62
7.1	Obecné poznámky k experimentální části.....	62
7.2	Charakteristické signály skeletálních vodíků triterpenů v ¹ H NMR spektrech.....	63
7.3	Obecný postup zpracování reakčních směsí.....	64
7.4	Příprava výchozích látek.....	64

7.5	Příprava nesubstituovaných 1,2,3-triazolových derivátů	65
7.6	Příprava <i>p</i> -methoxybenzyl-1,2,3-triazolových derivátů.....	68
7.7	Příprava <i>tert</i> -butyl-3-fenylpropionát-1,2,3-triazolových derivátů	71
8	Seznam literatury	73
9	Příloha č. 1: ¹ H a ¹³ C NMR spektra nově připravených sloučenin	79

1 Úvod

Obliba syntézy semi-syntetických derivátů triterpenů narůstá již několik let. V současnosti se medicínální chemici navrací k přírodním zdrojům, mezi kterými často hledají inspiraci pro vývoj nových potencionálně aktivních látek. Terpeny, neustále se rozrůstající skupina prakticky všudypřítomných přírodních látek, jsou pro tento účel ideální. Zvýšené pozornosti se v této souvislosti dostává především triterpenickým kyselinám, o jejichž farmakologických účincích nemůže být pochyb, přesto si deriváty triterpenů ještě stále nenalezly místo v našich lékopisech. Několik nevýhod, jako je například vyšší lipofilita či vyšší terapeutická koncentrace nefavorizují triterpeny jako potenciální léčiva. Pro vědce to ovšem není překážka, kterou by nešlo překonat a pro zlepšení farmakologických vlastností začali připravovat semi-syntetické deriváty, jejichž cílem je nejčastěji zvýšení aktivity či biologické dostupnosti. Aktuálně je většina používaných léčiv heterocyklického charakteru, a proto je nasnadě připravovat i heterocyklické deriváty triterpenů. Výsostné postavení si mezi léčivy heterocyklického charakteru drží heterocykly dusíkaté, které jsou součástí 59 % léčiv.¹ Menší význam mezi dusíkatými heterocykly pak mají triazolové deriváty. Triazolový kruh, zejména ten 1,2,3-triazolový, obsahuje zatím velice málo léčiv. Doposud také chyběla metoda přípravy těchto derivátů, která by byla univerzální, jednoduchá, a kterou by se daly připravit také 1,5-disubstituované či přikondenzované 1,2,3-triazoly. Nově vyvinutá metodika Triazolizační reakce umožňuje syntézu 1,2,3-triazolů z jednoduchých výchozích látek bez potřeby katalýzy kovovými katalyzátory, a to na celé řadě substrátů. Potenciál 1,2,3-triazolových derivátů, a to zejména těch přikondenzovaných k jiným skeletům, zůstával dosud prakticky nevyužit, nicméně díky vyvinuté Triazolizační reakci se jim snad dostane zaslouženého zájmu.

2 Cíle diplomové práce

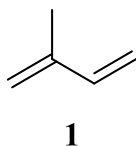
1. Vypracovat literární rešerši se zaměřením na známé triazolové deriváty odvozené od triterpenů a na samotnou Triazolizační reakci.
2. Připravit výchozí látky v dostatečném množství pro studium Triazolizační reakce.
3. Optimalizovat podmínky Triazolizační reakce pro různé typy substituentů a pro různé skeletální typy triterpenů.
4. Připravit sérii nových, různě substituovaných triterpenoidních 1,2,3-triazolů.
5. Připravené deriváty plně charakterizovat a nechat otestovat na cytotoxickou aktivitu.

3 Teoretická část

3.1 Terpeny a jejich vlastnosti

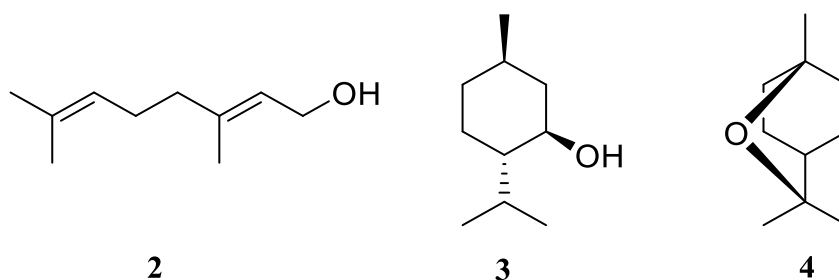
Terpeny jsou široká skupina přírodních látek čítající zhruba 50 000 identifikovaných sloučenin, jejichž počet každým rokem narůstá.² Vyskytují se především v rostlinné říši, ale jsou produkovány také houbami,³ řasami⁴ či jednoduchými mořskými živočichy.⁴ Rostliny produkují terpeny jako sekundární metabolity, které sice nejsou pro rostlinu životně důležité, zastávají však funkci obrany před škůdci a predátory či slouží jako ochrana před různými chorobami a parazity.

Chemicky jsou terpeny odvozeny od pětiuhlíkatého izoprenu (**1**) (Obr. č. 1), jehož molekuly se mohou vzájemně spojovat třemi různými způsoby za tvorby rozličných terpenů. Podle počtu těchto jednotek (počtu uhlíků) dělíme terpeny na monoterpeny (10 C), seskviterpeny (15 C), diterpeny (20 C), sesterterpeny (25 C), triterpeny (30 C), tetraterpeny (40 C) a polyterpeny.



Obr. č. 1: *Struktura izoprenu (1)*

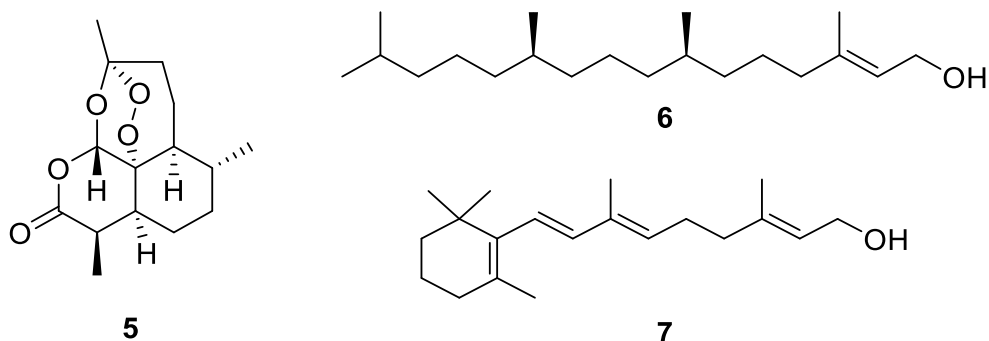
Monoterpeny jsou známé především jako rostlinné silice, příkladem jsou geraniol (**2**) obsažený v růžovém oleji, menthol (**3**), obsažený v silici máty peprné či eukalyptol (**4**) (Obr. č. 2), hlavní součást eukalyptového oleje.



Obr. č. 2: *Struktura geraniolu (2), mentholu (3) a eukalyptolu (4)*

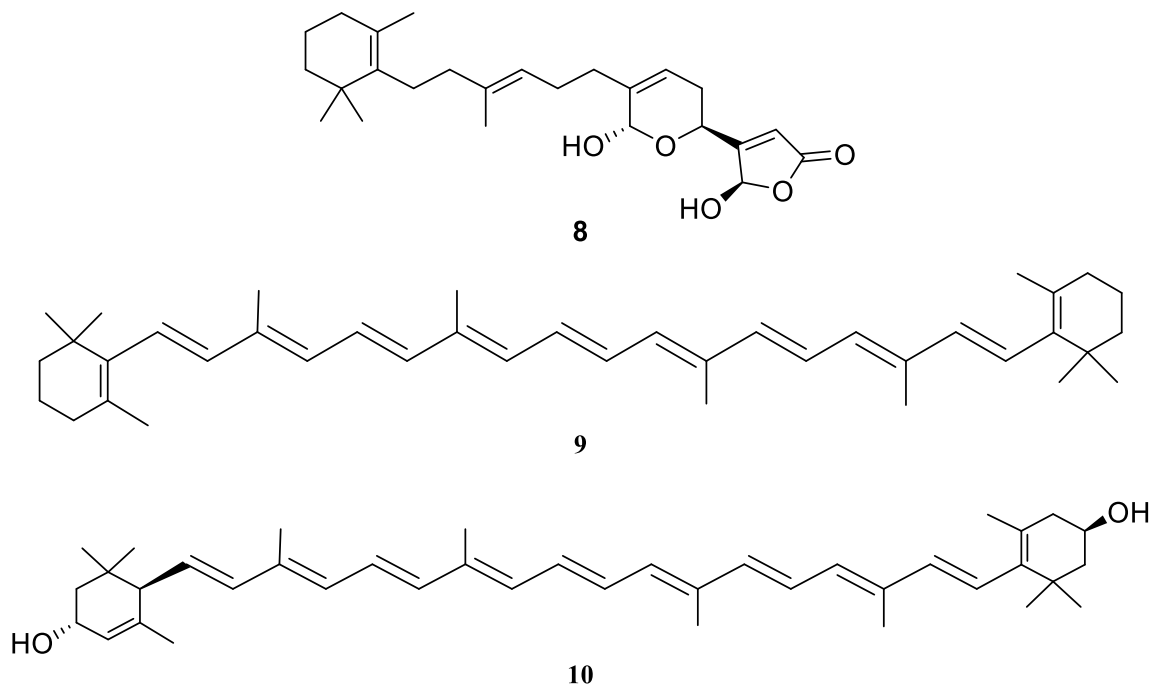
Ze skupiny seskviterpenů je nejznámější artemisinin (**5**) izolovaný z pelyňku ročního (*Artemisia annua*), který se používá jako antimalarikum. Fytol (**6**), terpenický alkohol

esterově vázaný v chlorofylu, a retinol (7), součást vitamínu A (Obr. č. 3), jsou pak významnými zástupci diterpenů.



Obr č. 3: *Struktura artemisininu (5), fytolu (6) a retinolu (7)*

Nejméně početnou skupinu tvoří sesterterpeny, z nichž nejznámější je manoalid (8) obsažený v mořské houbě *Luffariella variabilis*, který vykazuje protizánětlivé účinky.⁵ Karotenoidy jsou pak významnou skupinou spadající pod tetraterpeny, patří sem látky jako β -karoten (9) či lutein (10) (Obr. č. 4). β -karoten (9), zástupce karotenů, slouží jako prekurzor vitamínu A a lze ho nalézt v mrkvi. Lutein (10) patří do skupiny xanthofylů, lze nalézt ve žluté skvrně lidského oka, kdy tuto oblast chrání před volnými radikály.



Obr č. 4: *Struktura manoalidu (8), β -karotenu (9) a luteinu (10)*

Mezi polyterpeny se řadí přírodní kaučuk, který se získává z kaučukovníku brazilského (*Hevea brasiliensis*), a gutaperča, geometrický izomer přírodního kaučuku, získávající se

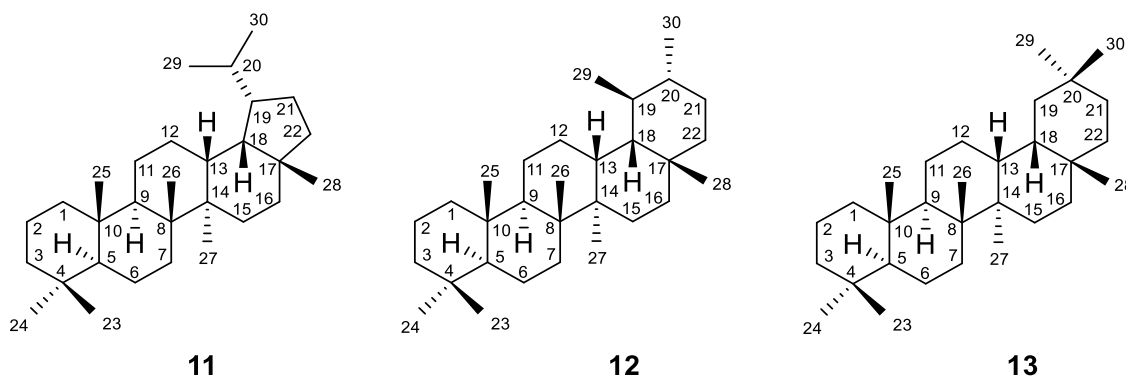
ze stromu perčovníku pravého (*Palaquium gutta*). Vulkanizací kaučuku pak vzniká pryž, která má celou řadu využití.

Zdaleka nejvýznamnější a nejstudovanější skupinou terpenů, co se týče medicínální chemie, jsou bezesporu triterpeny.

3.1.1 Triterpeny

Z těchto třicetihlíkatých sloučenin mají největší význam pentacyklické triterpeny. Obecně jsou triterpeny studovány pro své hepatoprotektivní, analgetické, hypoglykemické, hypolipidemické, antimikrobiální, antimykotické, virostatické, imunomodulační a tonizující účinky.⁶

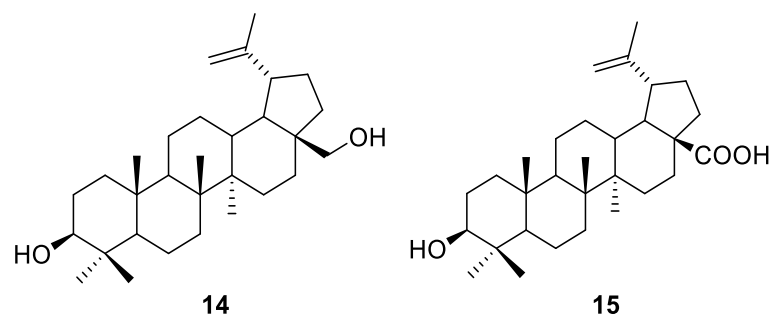
Pentacyklické triterpeny se dále dělí podle skeletálních typů. Mezi nejvýznamnější patří lupanový (**11**), ursanový (**12**) a oleanonový typ (**13**) (Obr. č. 5).



Obr. č. 5: Skeletální typy triterpenoidů: lupanový (**11**), ursanový (**12**) a oleanonový (**13**)

3.1.1.1 Zástupci lupanového skeletálního typu

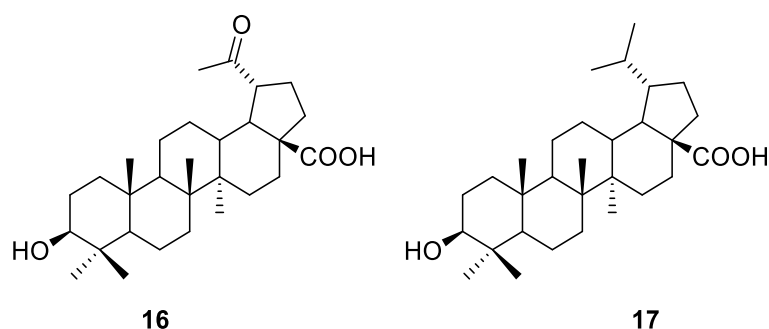
Betulin (**14**) a kyselina betulinová (**15**) (Obr. č. 6) jsou hlavními zástupci sloučenin s lupanovým skeletálním typem. Nejznámějším zdrojem betulinu (**14**) a kyseliny betulinové (**15**) u nás je kůra břízy bělokoré (*Betula pendula*), ve které je obsaženo kolem 20 % betulinu a 1 % kyseliny betulinové. Obsah jednotlivých látek se v různých druzích bříz liší, například více kyseliny betulinové (**15**), 12,5 %, lze nalézt v kůře severoamerického druhu břízy *Betula neoalaskana*.⁷ Kyselina betulinová (**15**) je zajímavá celou řadou svých biologických vlastností, z nichž nejvýznamnějším jsou její účinky cytotoxické a antivirové, především anti-HIV.



Obr. č. 6: *Struktura betulinu (14) a kyseliny betulinové (15)*

Cytotoxické účinky kyseliny betulinové (**15**) byly poprvé zaznamenány v roce 1976 Trumbullem *et al.* Ti popsali cytotoxickou aktivitu extraktu z rostliny *Vauquelinia corymbosa* proti lymfocytární leukemické linii P-388. Součástí extraktu nebyla jen kyselina betulinová (**15**) ale i uvaol a kyselina ursolová.⁸ Cytotoxické účinky samotné kyseliny betulinové (**15**) byly potvrzeny v roce 1991,⁹ ovšem až práce z roku 1995 od Pishiho *et al* popisující cytotoxické účinky kyseliny betulinové (**15**) na linii lidského melanomu vyvolala zájem jak o kyselinu betulinovou (**15**), tak i její deriváty.¹⁰

Anti-HIV účinky kyseliny betulinové (**15**) byly poprvé prokázány Fujiokou *et al* v roce 1994. Ti izolovali kyselinu betulinovou (**15**) z listů hřebíčkovce *Syzygium claviflorum* a prokázali, že inhibuje replikaci viru HIV v H9 lymfocytech v koncentraci $EC_{50} = 1,4 \mu\text{M}$. Další izolovanou triterpenoidní látkou, která také vykazovala anti-HIV aktivitu, byla kyselina platanová (**16**). Její hodnota $EC_{50} = 6,5 \mu\text{M}$ je vyšší než u kyseliny betulinové (**15**), avšak sloučenina **16** vykázala lepší terapeutický index ($TI = 13$) v porovnání s kyselinou betulinovou (**15**) ($TI = 9,3$). V rámci této práce byly dále připraveny nejrůznější estery kyseliny betulinové (**15**) a také kyselina dihydrobetulinová (**17**) (Obr. č. 7), která vykázala lepší anti-HIV účinky než obě výše zmíněné kyseliny **15** a **16**. Kyselina dihydrobetulinová (**17**) dosáhla terapeutického indexu $TI = 14$ a hodnoty $EC_{50} = 0,9 \mu\text{M}$.¹¹ Dle literatury¹², kyselina betulinová (**15**) rovněž inhibuje dimerizaci HIV-1 proteázy.



Obr. č. 7: *Struktura kyseliny platanové (16) a kyseliny dihydrobetulinové (17)*

Mnoho dalších derivátů betulinu (**14**) a kyseliny betulinové (**15**) vykazuje vysoké anti-HIV aktivity a působí různými mechanismy účinku. Byla prokázána inhibice vzniku syncytia (mnohojaderný buněčný útvar, který vzniká rozrušením buněčných membrán několika sousedících buněk a dochází tak ke splynutí jejich cytoplazem; tento jev je pozorován například právě při virových onemocněních a u některých pacientů je tvorba syncytia spojena s rychlejší progresí infekce), čímž dochází k blokování vstupu viru HIV-1 do buněk,¹³ inhibice HIV-1 reverzní transkriptázy,¹⁴ či inhibice uvolnění virionové částice z buňky, což ovlivňuje zrání virionu.¹⁵

3.1.1.2 Zástupci ursanového skeletálního typu

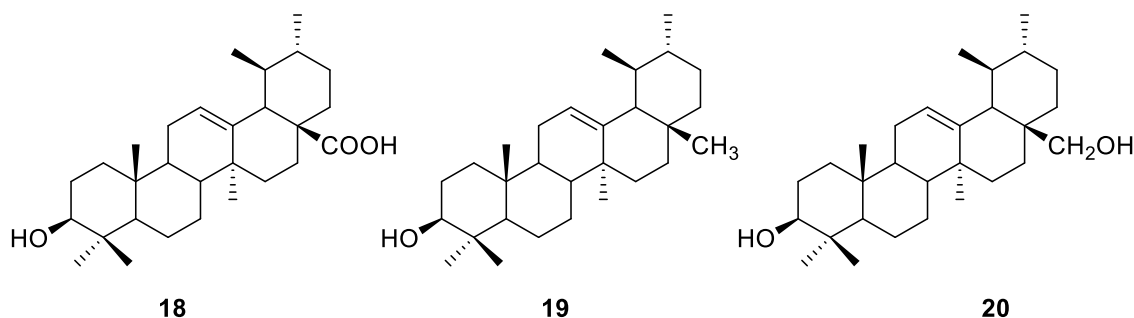
Hlavním zástupcem této skupiny je kyselina ursolová (**18**). Jako všechny triterpeny i ona vykazuje široké množství biologických aktivit. Jedná se o prakticky všudypřítomnou látku v rostlinné říši, kterou lze v největším množství nalézt v rozmarýnu lékařském (*Rosmarinus officinalis*), který jí obsahuje 1,58 %, či v šalvěji lékařské (*Salvia officinalis*), kde obsah kyseliny ursolové (**18**) dosahuje 1,52 %.¹⁶

Mezi její nejvýznamnější účinky patří ty, které jsou využitelné v protinádorové terapii. Ve studii provedené na buněčné nádorové linii HepG2 docházelo vlivem působení kyseliny ursolové (**18**) k indukci apoptózy uvolněním cytochromu c z mitochondrií do buňky a aktivaci mitochondriální apoptotické dráhy.¹⁷ Podobné účinky byly prokázány i v další studii.¹⁸ Dle literatury^{17,19} kyselina ursolová (**18**) ovlivňuje také buněčný cyklus jeho zastavením ve fázi G0/G1. V neposlední řadě byla zjištěna také její antimetastatická²⁰ a antiangiogenní aktivita.²¹

Dále kyselina ursolová (**18**) disponuje antibakteriálními vlastnostmi, které byly testovány na několika bakteriálních kmenech. Ještě zajímavější je její synergický efekt s aminoglykosidickými antibiotiky (neomycin, kanamycin atd.), kdy například aktivita

neomycinu proti *Staphylococcus aureus* byla MIC = 128 µg/ml, avšak při podání společně s kyselinou ursolovou (**18**) byla hodnota MIC = 18 µg/ml.²² Mezi další popsané účinky kyseliny ursolové (**18**) patří protizánětlivá^{23,24} a hepatoprotektivní aktivita.²⁵

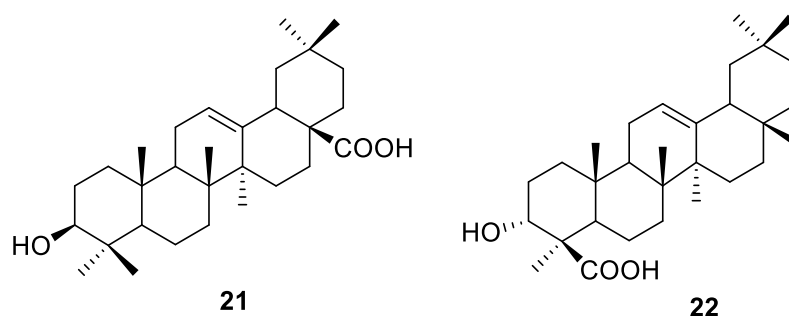
Dalšími zástupci ursanového skeletu jsou α -amyrin (**19**) nebo uvaol (**20**) (Obr. č. 8).



Obr. č. 8: Struktura kyseliny ursolové (**18**), α -amyrinu (**19**) a uvaolu (**20**)

3.1.1.3 Zástupci oleanonového skeletálního typu

Nejvýznamnějšími zástupci triterpenů s oleanonovým skeletem jsou kyselina oleanolová (**21**) a kyselina boswellová (**22**) (Obr. č. 9). Kyselinu oleanolovou (**21**) lze nalézt jak v medicijních bylinách a rostlinách jako je libora *Lantana camara* či ptačí zob lesklý (*Ligustrum lucidum*), tak v různých druzích ovoce a zeleniny. Nejznámějším zdrojem kyseliny oleanolové (**21**) je bezesporu olivovník evropský (*Olea europaea*), který obsahuje ve svých listech 3,0–3,5 % kyseliny **21** v závislosti na olivovém kultivaru. Plody olivovníku obsahují kyseliny oleanolové (**21**) výrazně méně, a to přibližně 0,2 %.²⁶



Obr. č. 9: Struktura kyseliny oleanolové (**21**) a kyseliny boswellové (**22**)

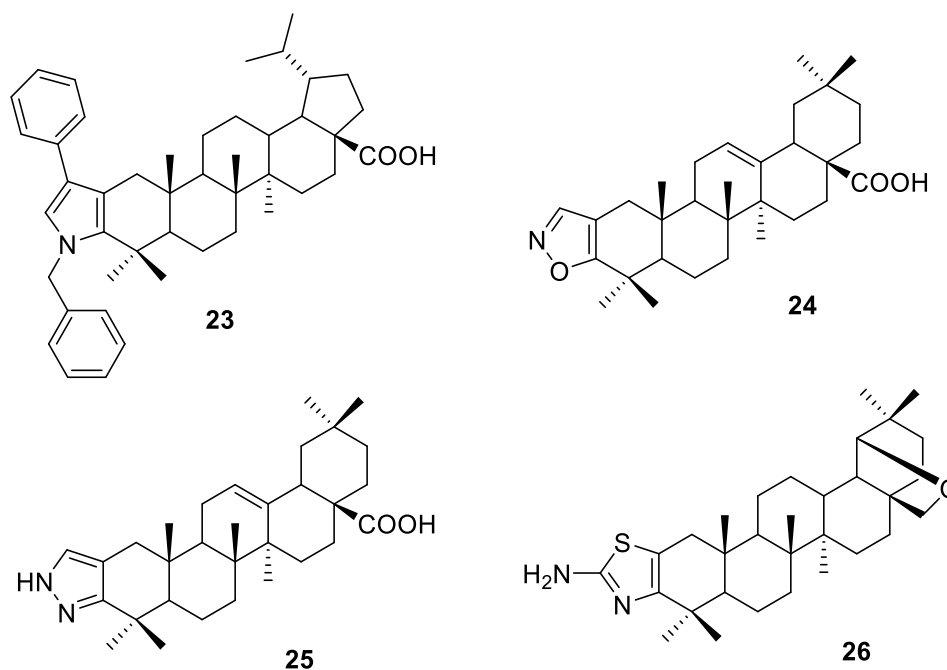
Kyselina oleanolová (**21**) vykazuje podobné účinky jako kyselina ursolová (**18**). Byla prokázána její cytotoxická,²⁷ protizánětlivá²⁸ a hepatoprotektivní aktivita.^{29,30,31} Kyselina boswellová (**22**) získala svůj název podle svého hlavního zdroje – kadidlovníku pilovitého (*Boswellia serrata*).

3.2 Heterocyklické deriváty triterpenů

Triterpeny mají oproti čistě syntetickým léčivům řadu výhod. Mají širokou škálu biologických aktivit a nízkou toxicitu. Triterpeny se dají jednoduše získat z mnoha přírodních zdrojů, jsou biologicky rozložitelné a tím, že se jedná o přírodní látky, nepředstavují žádné riziko pro životní prostředí. I přes všechny tyto výhody je využití triterpenů jako léčiv vzácné, a to z několika důvodů. Terapeutická koncentrace triterpenů je obvykle vyšší než u současných léčiv. Triterpeny jsou také látky, které ovlivňují mnoho biologických cílů – kvůli tomu je obtížné najít *in silico* model pro vyhodnocení vztahu mezi strukturou a aktivitou, čímž je ztížen design nových molekul s lepšími vlastnostmi (aktivita, rozpustnost atd.). Poslední nevýhodou je často velká lipofilita těchto molekul, což ztěžuje jejich vstřebávání v gastrointestinálním traktu. Existuje několik přístupů, jak zlepšit vlastnosti triterpenů, cílem nejčastěji bývá zvýšení aktivity nebo biologické dostupnosti. Nejčastěji používanou metodou je příprava jejich semi-syntetických derivátů.³²

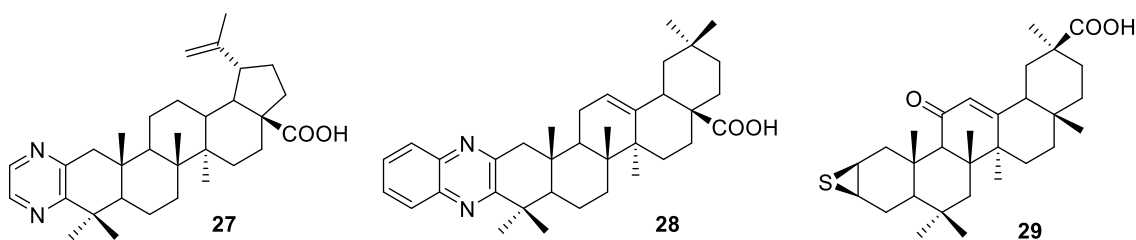
Pokud se podíváme na struktury nyní používaných léčiv, tak zjistíme, že 59 % léčiv (schválených FDA) obsahuje dusíkatý heterocyklus.¹ Proto je syntéza dusíkatých heterocyklických derivátů triterpenů aktuální téma, kterému se věnuje řada výzkumných skupin po celém světě. Na rozdíl od sloučenin neobsahujících heterocyklus mají ty heterocyklické několik výhod – jsou například stálejší a odolnější vůči metabolické degradaci a snáze identifikovatelné při použití analytických metod využívajících pro detekci UV záření.³³

Triterpeny se nejčastěji modifikují v polohách C-3 a C-28 a dále také v polohách C-2 či C-29/30 (u lupanových triterpenoidů). V případě heterocyklických modifikací se dále velmi často vyskytují deriváty s přikondenzovaným heterocyklem ke kruhu A přes uhlíky C-2 a C-3 a méně častěji přes C-1 a C-2. Nejčastěji se připravují deriváty s přikondenzovaným pětičlenným heterocyklem jako je pyrrol³⁴ (**23**), isoxazol³⁵ (**24**), pyrazol³⁶ (**25**), thiazol³⁷ (**26**) (Obr. č. 10).



Obr. č. 10: Příklady triterpenických derivátů obsahující přikondenzovaný pětičlenný heterocyklický kruh jako je pyrrol (23), isoxazol (24), pyrazol (25) či thiazol (26).

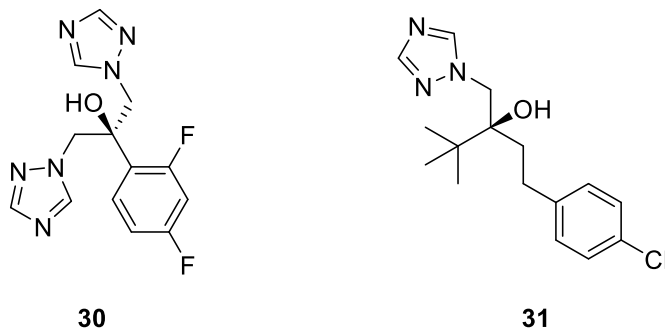
Méně často se můžeme setkat s přikondenzovanými šestičlennými heterocykly, kdy nejčastější jsou deriváty odvozené od pyrazinu³⁸ (27) či chinoxalinu³⁵ (28) (Obr. č. 11). V ojedinělých případech byly popsány i deriváty s přikondenzovaným tříčlenným heterocyklem jako derivát kyseliny glycyrrhetové 29.³⁹



Obr. č. 11: Příklady triterpenických derivátů s přikondenzovaným pyrazinem (27), chinoxalinem (28) a thiiranem (29).

Kromě již zmíněných, nejčastěji používaných pětičlenných heterocyklů, jsou triazolové deriváty triterpenů také často připravované, ovšem ne ve formě přikondenzovaného heterocyklu (dosud byl popsán pouze jeden derivát, viz níže), ale nejčastěji formou click reakcí právě v polohách C-3 a C-28. V současných léčivech se triazolový motiv objevuje jen vzácně, přičemž se téměř výlučně jedná 1,2,4-triazol, jako například v antimykotiku

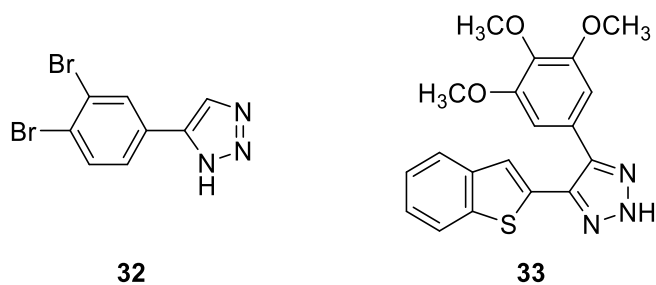
flukonazolu (**30**). Na druhou stranu, 1,2,4-triazoly lze nalézt v řadě fungicidů a herbicidů jako je například tebukonazol (**31**) (Obr. č. 12).



Obr. č. 12: *Struktura antimykotika flukonazolu (30) a fungicidu tebukonazolu (31)*

Do popředí zájmu se již dostávají také 1,2,3-triazoly,⁴⁰ u kterých byly zjištěny významné biologické aktivity. Byla připravena série 4-aryl-1,2,3-triazolů u kterých bylo zjištěno, že působí jako inhibitory lidské methionin aminopeptidázy typu 2. Nejaktivnější derivát z této série, sloučenina **32** (Obr. č. 13), byl také studován na myším modelu, kde byla prokázána jeho antiangiogenní aktivita.⁴¹

V jiné studii byly připraveny 4-heteroaryl-5-aryl-(2H)-1,2,3-triazoly, u kterých byla na panelu 60 buněčných liniích sledována jejich protinádorová aktivita. Nejúčinnější derivát **33** (Obr. č. 13) vykázal protinádorovou aktivitu v nanomolárních koncentracích proti 80 % buněčných linií.⁴²



Obr. č. 13: *Účinné 1,2,3-triazolové deriváty s antiangiogenní (32) a protinádorovou (33) aktivitou.*

Známé triazolové deriváty odvozené od triterpenů budou představeny v následující kapitole s důrazem na jejich syntézu a biologické účinky.

3.2.1 Deriváty s přikondenzovaným triazolovým kruhem ke kruhu A

Derivátů triterpenů obsahujících přikondenzovaný triazol ke kruhu A je známo minimum. V literatuře je popsána pouze příprava substituovaného derivátu odvozeného od kyseliny oleanolové (**21**). Výchozí kyselina oleanolová (**21**) byla nejprve oxidována pomocí Jonesova reagentu na kyselinu oleanonovou (**34**), která v dalším kroku reagovala s butylnitrátem za přítomnosti silné báze za vzniku hydroxyiminového derivátu **35**. Ten reakcí s hydrazinem poskytl triazolový derivát **36** (Schéma č. 1), který nicméně nevykázal žádné zajímavé biologické účinky.⁴³

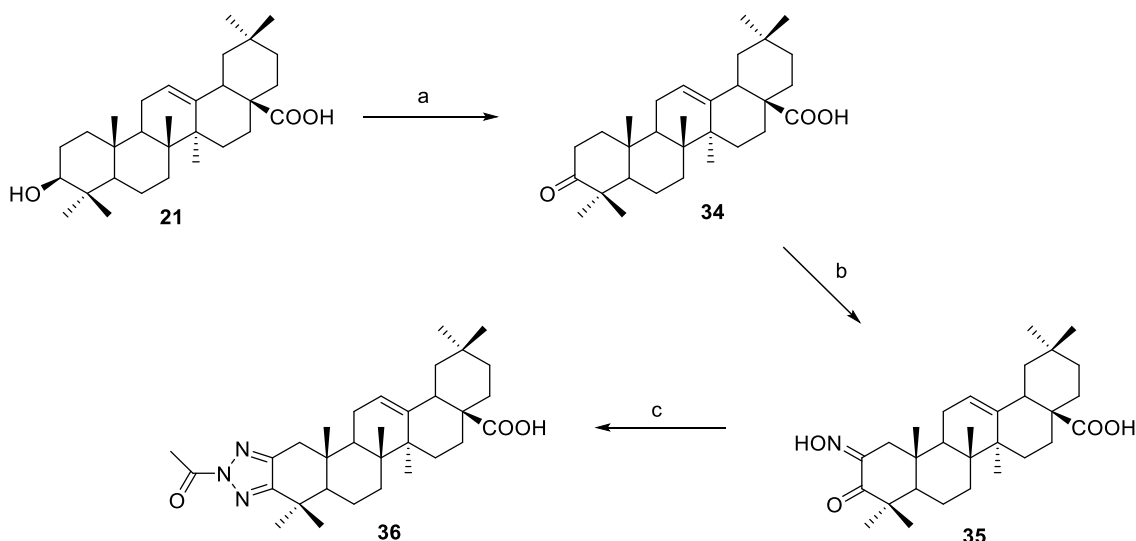


Schéma č. 1: Reakční schéma přípravy triazolového derivátu **36**. Podmínky: (a) Jonesův reagent, aceton, r.t., 94 %; (2) *t*-BuOK, BuONO, *t*-BuOH, r.t., 76 %; (3) N₂H₄·H₂O, AcOH, 50 °C, 9 h, 42 %.

3.2.2 Deriváty s triazolem v poloze C-2

Poloha C-2 na A-kruhu není obecně často využívána k derivatizaci, ale v poslední době i tato poloha získává na oblibě. V této poloze byly připraveny saponiny odvozené od kyseliny ursolové (**18**) a kyseliny betulinové (**15**) (Schéma č. 2). Syntéza vycházela z kyseliny ursolové (**18**), která byla nejprve oxidována na kyselinu ursonovou, ze které byl v následujícím kroku připraven methylester **37**. Ten byl alkylován propargyl bromidem za přítomnosti silné báze, kdy vznikal pouze jediný produkt **38**, na kterém byla následně zredukována keto skupina na C-3 pomocí borohydridu sodného za vzniku derivátu **39**. Reduktivní demethylací chránící skupiny jodidem lithným byl připraven derivát **40**, který byl výchozí látkou pro finální click reakci. V té reagoval propargylový

derivát **40** s azidem β -D-glukopyranosy za podmínek mědi katalyzované 1,3-dipolární cykloadice. Deriváty odvozené od kyseliny betulinové byly připraveny obdobně.⁴⁴

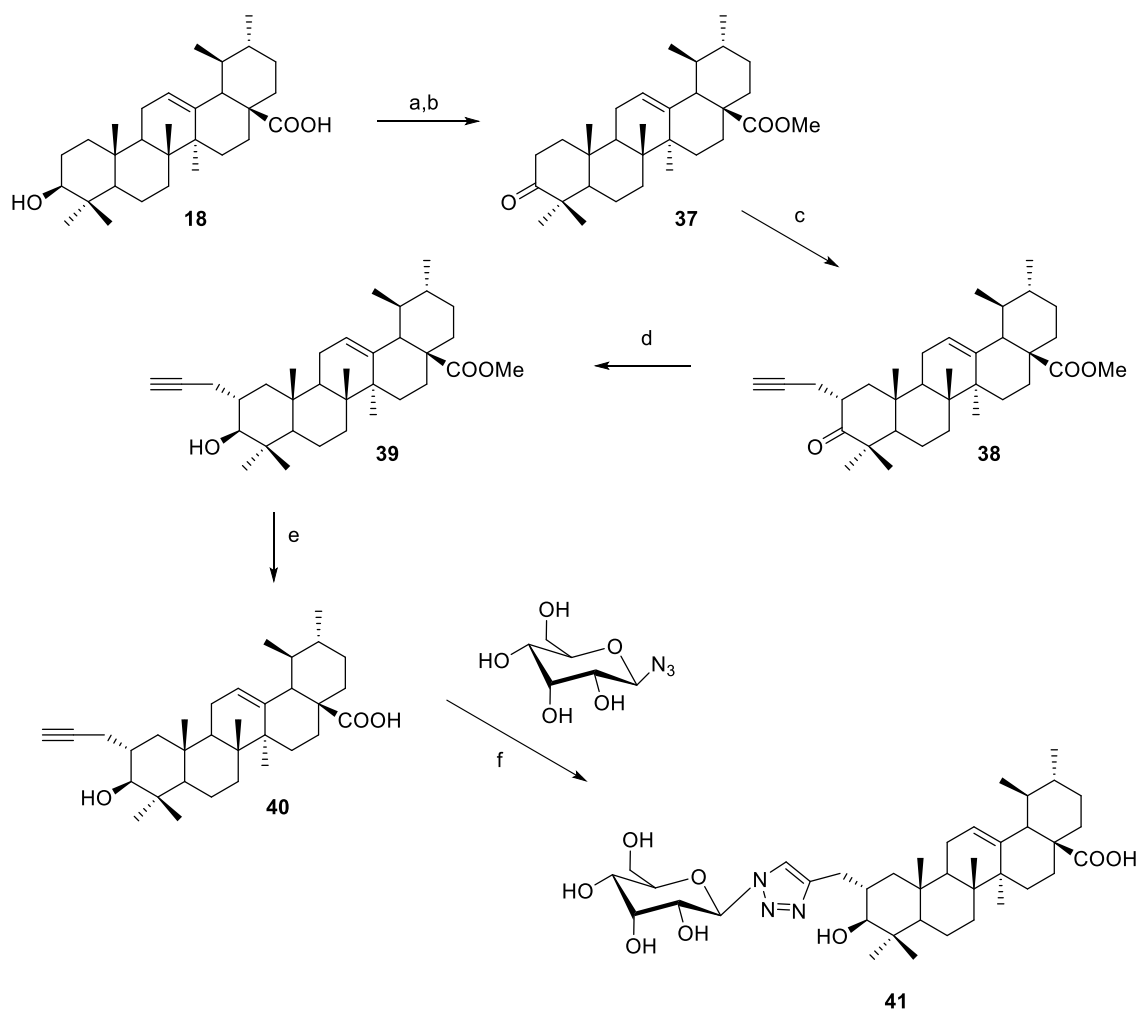
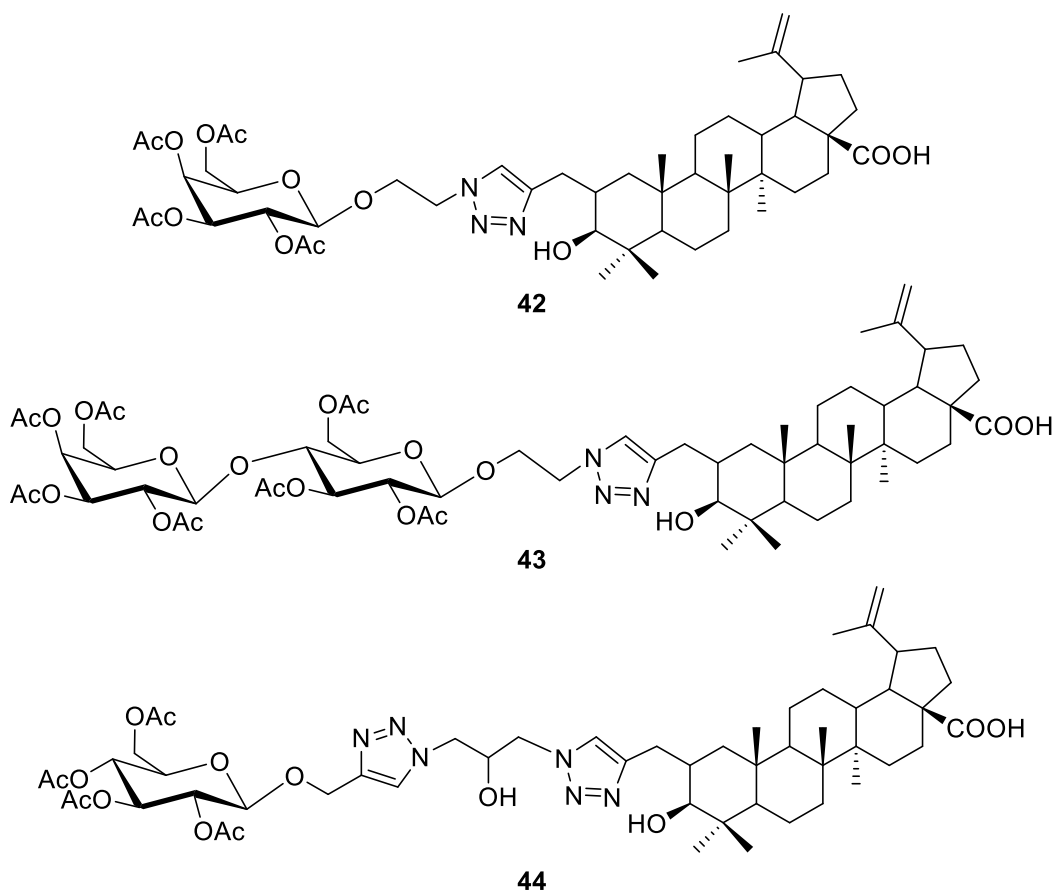


Schéma č. 2: Příprava triterpenoidních saponinů. Podmínky: (a) PCC, CH_2Cl_2 , $0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow 20\text{ }^\circ\text{C}$, 8 h; (b) CH_2N_2 , Et_2O , $0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow 20\text{ }^\circ\text{C}$, 2 h, po kroku a + b výtěžek 63 %; (c) $\text{KN}(\text{SiMe}_3)$, Et_3B , propargyl bromid, DME/THF (1:1), Ar, r.t., 1 h, 74 %; (d) NaBH_4 , $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, MeOH/THF , $-30\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow 20\text{ }^\circ\text{C}$, Ar, 2 h, 84 %; (e) LiI, DMF, reflux, Ar, 2 h, 74 %; (f) *t*-BuOH, Cu, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $40\text{ }^\circ\text{C}$, 79 %.

Spivak *et al* připravil o dva roky později pomocí obdobných reakcí deriváty kyseliny betulinové (**15**) s různými cukernými zbytky v poloze C-2 (například **42**, **43**, **44**; Obr. č. 14). Všechny připravené deriváty byly testovány na panelu 60 nádorových linií, nicméně vykázaly jen nízkou cytotoxickou aktivitu.⁴⁵



Obr. č. 14: Příklad triterpenoidních saponinů **42**, **43** a **44** odvozených od kyseliny betulinové (**15**).

3.2.3 Deriváty s triazolem v poloze C-3

Jak již bylo zmíněno výše, poloha C-3 je pro derivatizaci triterpenů často využívaná. V literatuře byla připravena série triterpenoidních esterů s terminální alkynovou skupinou **45a–d** reakcí kyseliny oleanolové (**21**) s různými alkyn kyselinami. Tyto estery byly připraveny jak od volné kyseliny oleanolové (**21**), tak od jejího methylesteru. Z esterů **45a–d** byla pomocí click reakce s příslušným aromatickým azidem připravena celá sada triazolových derivátů. Ve Schématu č. 3 je zobrazena pouze část těchto derivátů **46a–f**.

Všechny připravené sloučeniny byly otestovány na cytotoxickou aktivitu. Deriváty **45a** a **45c** byly aktivní na čtyřech nádorových liniích ($IC_{50} = 19\text{--}56\ \mu\text{M}$), ovšem bez selektivity vůči buňkám nenádorovým ($IC_{50} = 14\text{--}21\ \mu\text{M}$). Derivát **46a** vykázal vyšší cytotoxickou aktivitu s hodnotou $8,9\ \mu\text{M}$ na linii AGS, se selektivitou vůči zdravým fibroblastům. Jeho cytotoxicita proti dalším rakovinným buněčným liniím dosahovala pouze středních až vyšších hodnot ($IC_{50} = 35\text{--}50\ \mu\text{M}$). Dále bylo také prokázáno, že methylace karboxylové kyseliny na C-28 snižuje cytotoxický účinek sloučenin – deriváty

methylesteru kyseliny oleanolové (např. **46b**, **46d** či **46f**) byly ve všech případech neaktivní ($IC_{50} > 100 \mu M$). Deriváty obsahující *p*-toluensulfonylový substituent (**46c** a **46e**) taktéž vykázaly mírnou cytotoxickou aktivitu ($IC_{50} = 11\text{--}47 \mu M$), avšak bez selektivity vůči nenádorovým buňkám ($IC_{50} = 14\text{--}17 \mu M$).⁴⁶

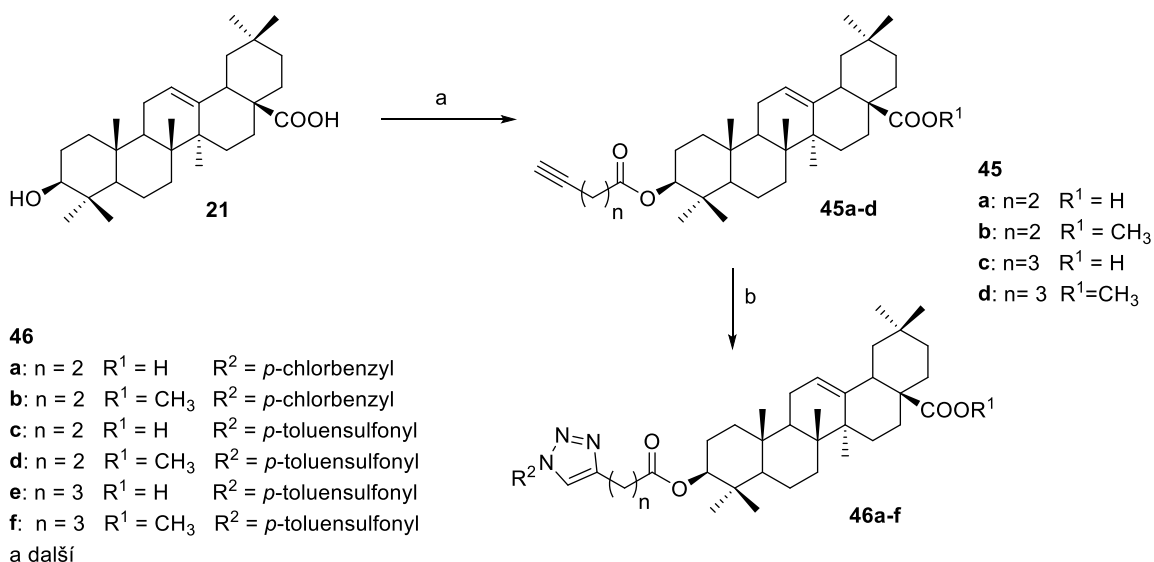


Schéma č. 3: Příprava triazolových derivátů odvozených od kyseliny oleanolové (**21**) s přehledem vybraných derivátů. Podmínky: (a) příslušná alkyne, DCC, DMAP, CH₂Cl₂, r.t., 2–4 h, 47–51 %; příprava methyl esterů: CH₂N₂, Et₂O, 92–93 %; (b) příslušný aromatický azid, CuSO₄ · 5 H₂O, askrorban sodný, CH₂Cl₂/H₂O 1:1, r.t., 24 h, 47–91 %.

Zavedení triazolového kruhu do polohy C-3 bylo také využito pro přípravu konjugátů triterpenů s peptidy. V literatuře⁴⁷ byla připravena série takových konjugátů za účelem validace jejich protizánětlivé aktivity. Výchozím triterpenem byla kyselina betulonová (**47**), která byla reakcí s ethenylmagnesium bromidem převedena na derivát **48**, který následně reagoval s azidopeptidy za podmínek Huisgenovy cykloadice za vzniku derivátů **49a–d** (Schéma č. 4). Tyto deriváty vykázaly významnou protizánětlivou aktivitu srovnatelnou s běžně užívaným léčivem indometacinem.

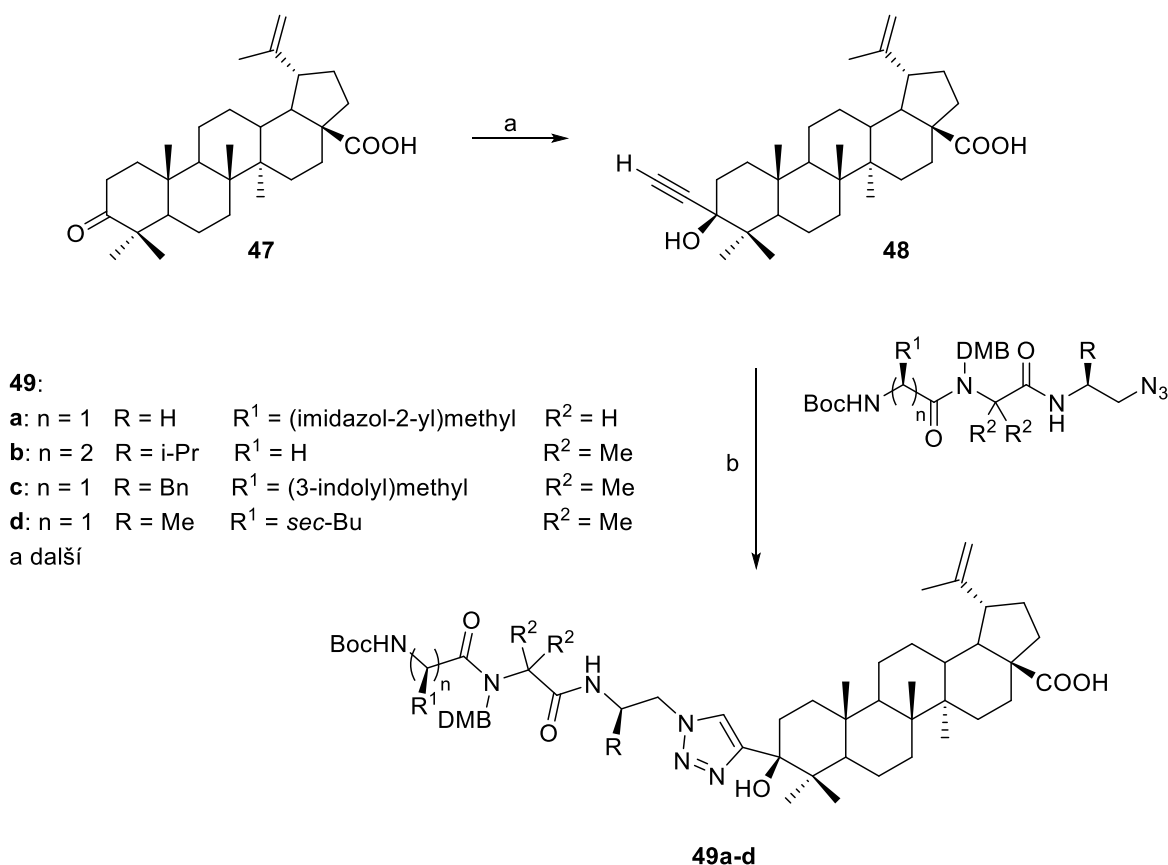


Schéma č. 4: Příprava konjugátů triterpenů s peptidy. Podmínky: (a) $\text{HC}\equiv\text{CMgBr}$, THF, r.t., 82 %; (b) pro **49a,c,d**: příslušný azidopeptid, CuCl, toluen, 9 – 13 h, r.t., 76–88 %; pro **49b**: příslušný azidopeptid, askorban sodný, $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O}$, 7 h, 40 °C, 65 %.

Jak lze pozorovat u reakcí výše, oblíbenější metodou přípravy výchozích látek pro Huisgenovu cykloadici je zavedení alkynové skupiny na triterpen, který následně reaguje s příslušným azidem. Ač je tento postup častější, existuje řada případů, kdy je tomu obráceně a na triterpen je zavedena azidová skupina. Tímto postupem byla připravena série derivátů odvozených od kyseliny betulinové (**15**), která nejprve reagovala s chloroacetylchloridem za vzniku derivátu **50**, který byl jednoduchou substitucí převeden na azid **51**. Následnou Huisgenovou cykloadicí azidu **51** a alkyl/aryl alkynu byly připraveny deriváty **52a–d** (Schéma č. 5). Připravené deriváty byly testovány na pěti nádorových buněčných liniích pro určení jejich cytotoxické aktivity. Derivát **52a** vykázal střední cytotoxickou aktivitu proti linii HT-29 ($\text{IC}_{50} = 14,9 \mu\text{M}$), ovšem proti dalším liniím vykazoval vyšší hodnoty ($\text{IC}_{50} > 40 \mu\text{M}$), stejně jako zbytek připravených derivátů.⁴⁸

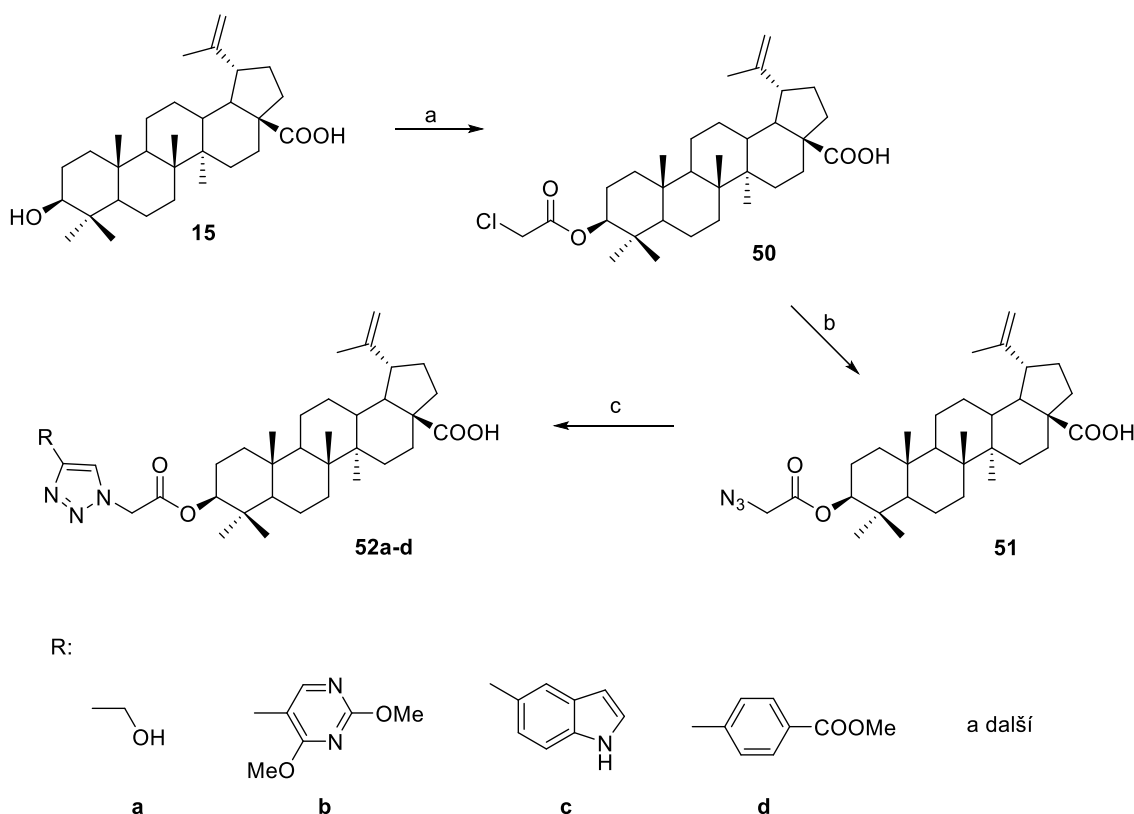
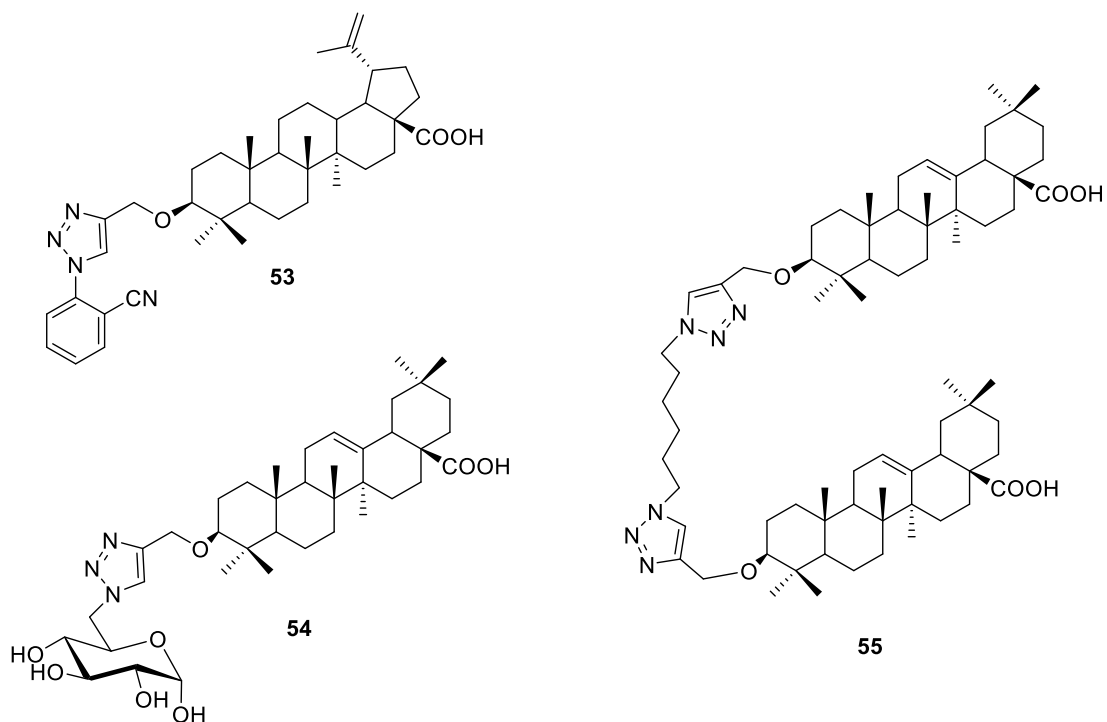


Schéma č. 5: Příprava derivátů vycházející z triterpenoidního azidu. Podmínky: (a) chloroacetylchlorid, DIPEA, DMAP, THF, r.t., 2 h, 86 %; (b) azid sodný, DMF, 70 °C, 4 h, 77 %; (c) alkyl/aryl acetylen, askorban sodný, $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, DMSO, 2–5 h, 70–91 %.

Triazolových derivátů odvozených od triterpenů s modifikací v poloze C-3 je nepřeborné množství. Další zajímavé, biologicky aktivní deriváty, jsou zobrazeny níže (Obr. č. 15). Derivát **53** je nejúčinnější derivát ze série aryl substituovaných triazolů, který vykázal cytotoxickou aktivitu 2,5 μM proti linii HL-60, spolu s výraznou aktivitou i proti dalším buněčným nádorovým liniím ($\text{IC}_{50} = 4,5\text{--}20 \mu\text{M}$).⁴⁹ Dále byly připraveny různé glykokonjugáty triterpenů jako sloučenina **54**, z jichž některé vykázaly inhibiční účinky proti glykogenfosforyláze. Tento typ inhibitorů by mohl najít využití jako antihyperglykemika při léčbě diabetu mellitu 2. typu.⁵⁰ Stejná výzkumná skupina později syntetizovala sérii dimerů jako je derivát **55**, které taktéž vykázaly inhibiční účinky proti glykogenfosforyláze.⁵¹



Obr. č. 15: Další triterpenické deriváty s triazolem v poloze C-3.

3.2.4 Deriváty s triazolem v poloze C-28

Derivátů triterpenů s triazolovým kruhem v poloze C-28 bylo připraveno nepřeborné množství^{32,52}, proto jsou zde vybrány pouze některé reprezentativní a zajímavé příklady. Stejně jako v předchozí kapitole, pojednávající o modifikaci triterpenů v poloze C-3, byla i zde připravena série derivátů aryl-substituovaných triazolů od kyseliny oleanolové (**21**). Výchozí kyselina **21** nejprve reagovala s propargylbromidem za vzniku alkynového derivátu **56**, který poté reagoval se substituovanými aryl azidy za podmínek Huisgenovy cykloadice za vzniku derivátů **57a–d** (Schéma č. 6). Výsledné deriváty byly testovány na cytotoxickou aktivitu proti pěti nádorovým buněčným liniím. Bylo zjištěno, že nejaktivnější byly ve většině případů *p*-substituované deriváty ve srovnání s *o*- či *m*- substituovanými. Nejaktivnějším derivátem v této sérii byl *p*-nitrofenyltriazol **57a**, který vykázal nejvyšší cytotoxickou aktivitu proti liniím melanomu A375-S2 a fibrosarkomu HT1080 ($IC_{50} = 4,97 \mu\text{M}$, respektive $3,51 \mu\text{M}$), a selektivitu proti buňkám nenádorovým.⁵³

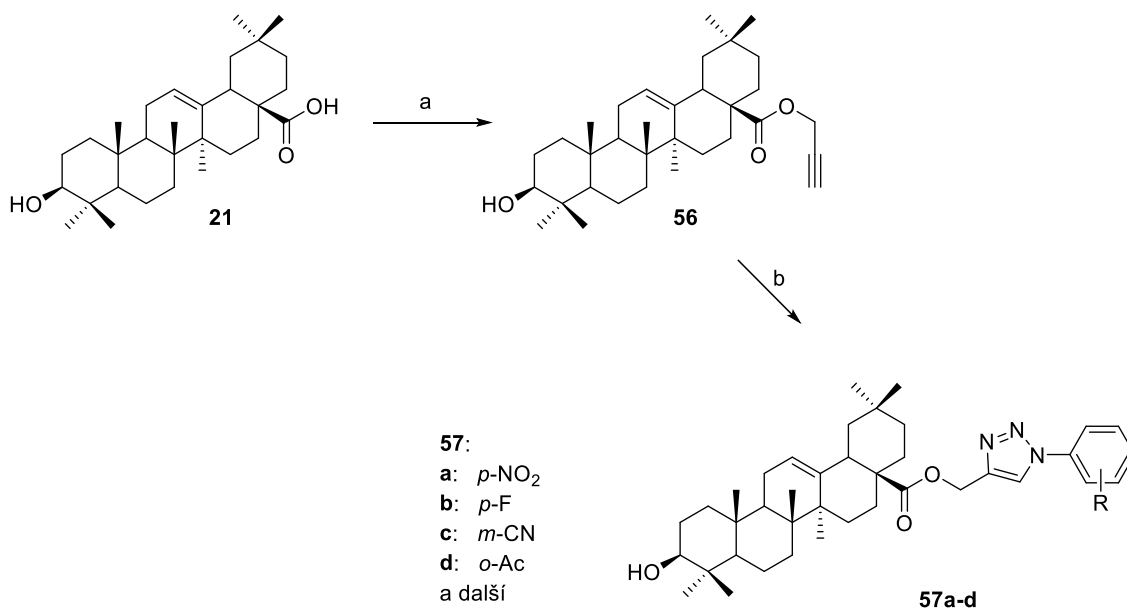


Schéma č. 6: Příprava aryl-substituovaných triazolů. Podmínky: (a) propargylbromid, K_2CO_3 , TBAB, H_2O , DCM, *r.t.*, 5 h, 89 %; (b) substituovaný aryl azid, askorban sodný, $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$, *t*-BuOH, H_2O , *r.t.* \rightarrow 60 °C, 67–89 %.

Další skupinou triterpenů modifikovaných triazolem v poloze C-28 jsou konjugáty s biologicky aktivními látkami. Konkrétně od čtyř triterpenických skeletů byly připraveny konjugáty s β -cyklodextriny. Příkladem je tříkroková syntéza vycházející z kyseliny ursolové (**18**), která reagovala s TBTU, kdy docházelo k aktivaci karboxylové kyseliny a vzniku derivátu **58**, který následně reagoval s propargylaminem za vzniku alkyneového derivátu **59**. Následnou click reakcí alkyne **59** vhodně substituovaným azido- β -cyklodextrinem vznikl konjugát **60** (Schéma č. 7).

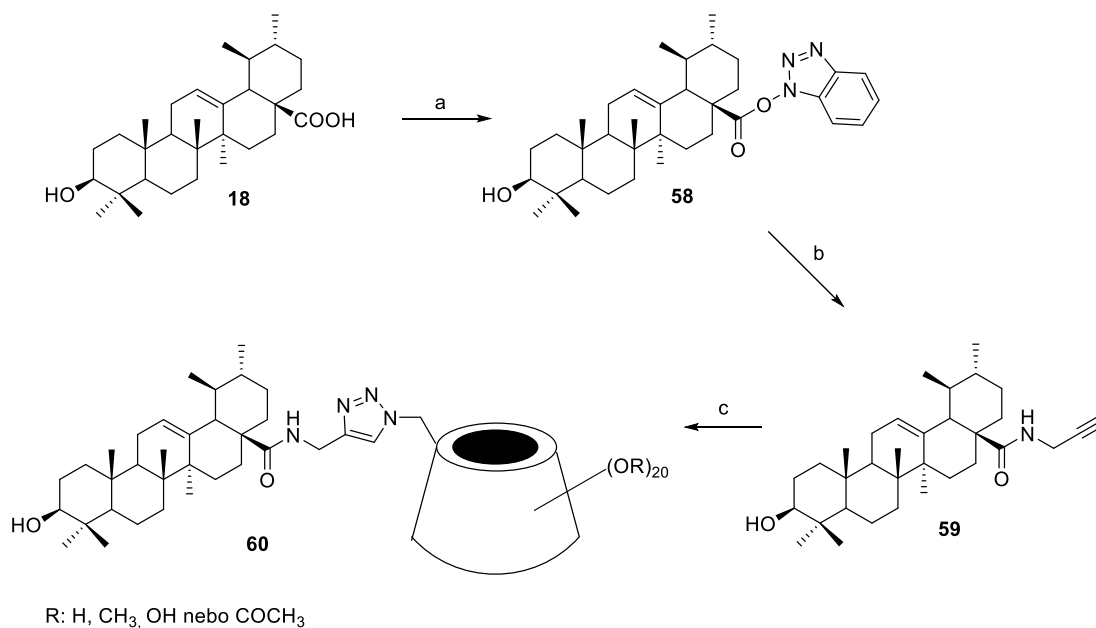
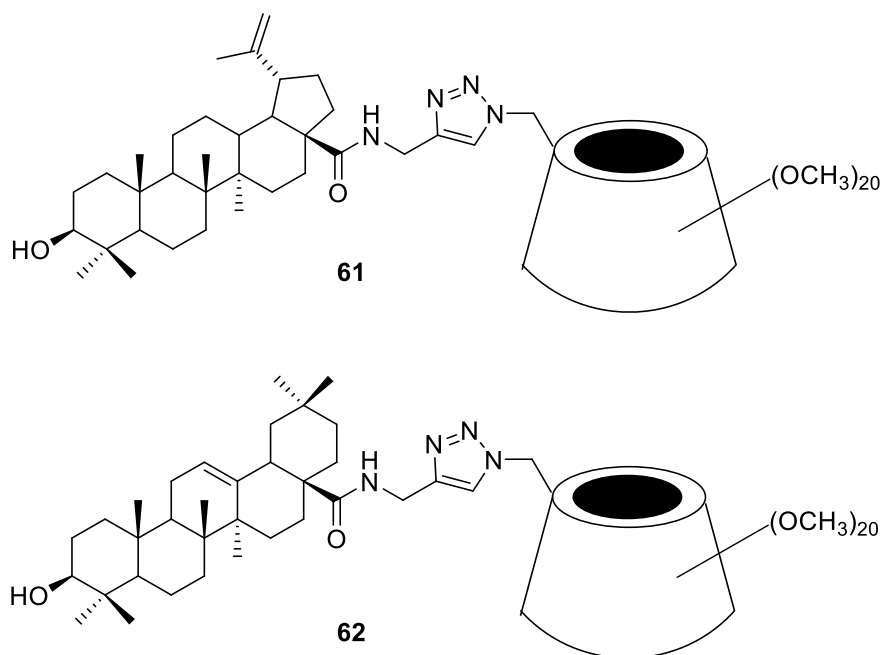


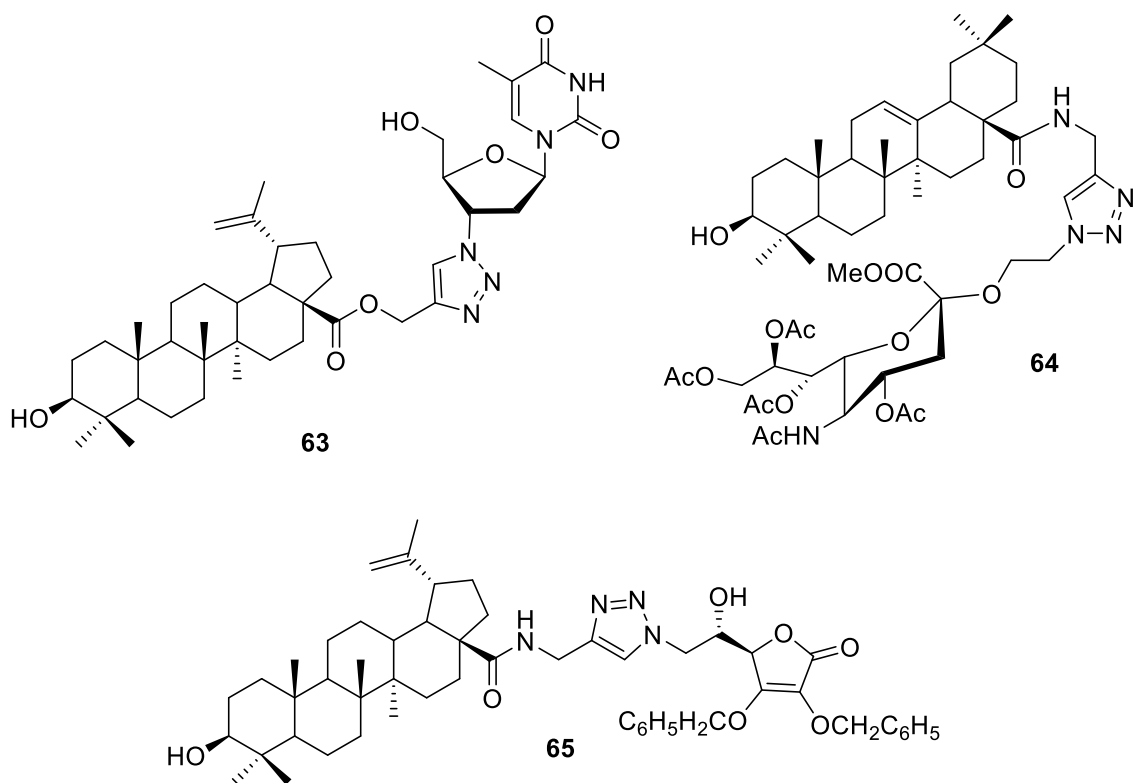
Schéma č. 7: Příprava konjugátů triterpenů s β -cyklodextriny. Podmínky: (a) TBTU, DIPEA, THF, N₂, r.t., 5 h; (b) propargylamin, K₂CO₃, DMF, r.t., 1 h; (c) azido- β -cyklodextrin, THF/H₂O, CuSO₄, askorban sodný, r.t., 12 h.

Podobných derivátů bylo připraveno 12 od čtyř triterpenických skeletů s úmyslem zvýšit rozpustnost triterpenů, což se podařilo. Všechny konjugáty vykázaly nižší hydrofobicitu než výchozí triterpeny. Hydrofobicitu, udávaná jako AlogP, byla u výchozích triterpenů v rozmezí 5,3–6,5, u připravených konjugátů dosahovala hodnot 2,4–5,9. Zároveň byla testována i jejich antivirová aktivita proti viru hepatitidy C, při které dva deriváty **61** a **62** (Obr. č. 16) vykázaly mírnou aktivitu, míra inhibice u těchto derivátů dosahovala hodnoty 98,2 %. V neposlední řadě tento tým také zkoumal hemolytický účinek daných konjugátů, přičemž prokázal, že nově připravené konjugáty, ve srovnání s výchozími triterpeny, hemolytický účinek nemají.⁵⁴



Obr. č. 16: Antivirálně aktivní konjugáty kyseliny betulínové **61** a kyseliny oleanolové **62** s β cyklodextriny

Připraveny byly také konjugáty s azidothymidinem, kyselinou sialovou či kyselinou askorbovou. Konjugáty s AZT byly připraveny od několika triterpenických kyselin a byla zkoumána jejich cytotoxická aktivita. Nejzajímavějším derivátem byl shledán konjugát kyseliny betulínové **63**, který vykázal nejvyšší cytotoxickou aktivitu proti dvěma nádorovým liniím (KB a HepG2) a to $5,9 \mu\text{M}$ a $7 \mu\text{M}$.⁵⁵ Konjugáty s kyselinou sialovou (např. derivát **64**) i kyselinou askorbovou (např. derivát **65**) byly připraveny jako potenciální antivirotika proti viru chřipky H1N1. Derivát **64**, vykázal mírnou antivirovou aktivitu, kdy koncentrace inhibující virální replikaci z 50 % byla $95 \mu\text{M}$, ve srovnání s oseltamivirem, u něhož je $\text{IC}_{50} = 47 \mu\text{M}$.⁵⁶ Konjugát s kyselinou askorbovou **65** oproti tomu vykázal významnou antivirovou aktivitu proti viru chřipky H1N1, $\text{EC}_{50} = 8,7 \mu\text{M}$, hodnota EC_{50} oseltamiviru byla rovna $12,5 \mu\text{M}$ (Obr. č. 17).⁵⁷



Obr. č. 17: Konjugát kyseliny betulínové a azidothymidinu **63**, konguját kyseliny oleanolové s kyselinou sialovou **64** a konjugát kyseliny betulínové s kyselinou askorbovou **65**.

3.2.5 Deriváty s triazolem v poloze C-30 lupanových skeletů

Dvojná vazba na lupanových skeletech je poměrně častým cílem derivatizací,^{58,59} avšak triterpenů modifikovaných triazolem v této poloze není známo mnoho.^{60,61} Právě polohu C-30 na kyselině betulínové (**15**) zvolili kolegové z naší výzkumné skupiny, kteří připravili malou knihovnu aryl-substituovaných triazolů kyseliny betulínové (**15**). Kvůli komplikacím v průběhu syntézy byla hydroxy-skupina na C-3 chráněna acetátem (derivát **66**) či trifenylsilylem (derivát **67**). Deriváty **66** a **67** byly nejprve radikálově bromovány pomocí NBS za vzniku bromderivátů **68** a **69**, ze kterých byly nukleofilní substitucí s azidem sodným připraveny azidy **70** a **71**. Deprotekcí azidu **71** byl také získán azid **72** s volnou C-3 hydroxy-skupinou. Finální deriváty byly připraveny Huisgenovou cykloadicí z azidů **70-72** a z příslušných alkynů (Schéma č. 8). Výsledkem tak jsou tři série aryl substituovaných azidů: acetáty **73a-h**, trifenylsilyly **74a-g** a hydroxyderiváty **75a-g**. Neaktivnějším derivátem z celé série byl benzaldehyd **73b**, jehož hodnota IC_{50} pro linii CCRF-CEM byla $3,3 \mu\text{M}$. Hodnoty IC_{50} na dalších 7 nádorových liniích byly podobně nízké, pohybovaly se v rozmezích $3,6-12,8 \mu\text{M}$.⁶²

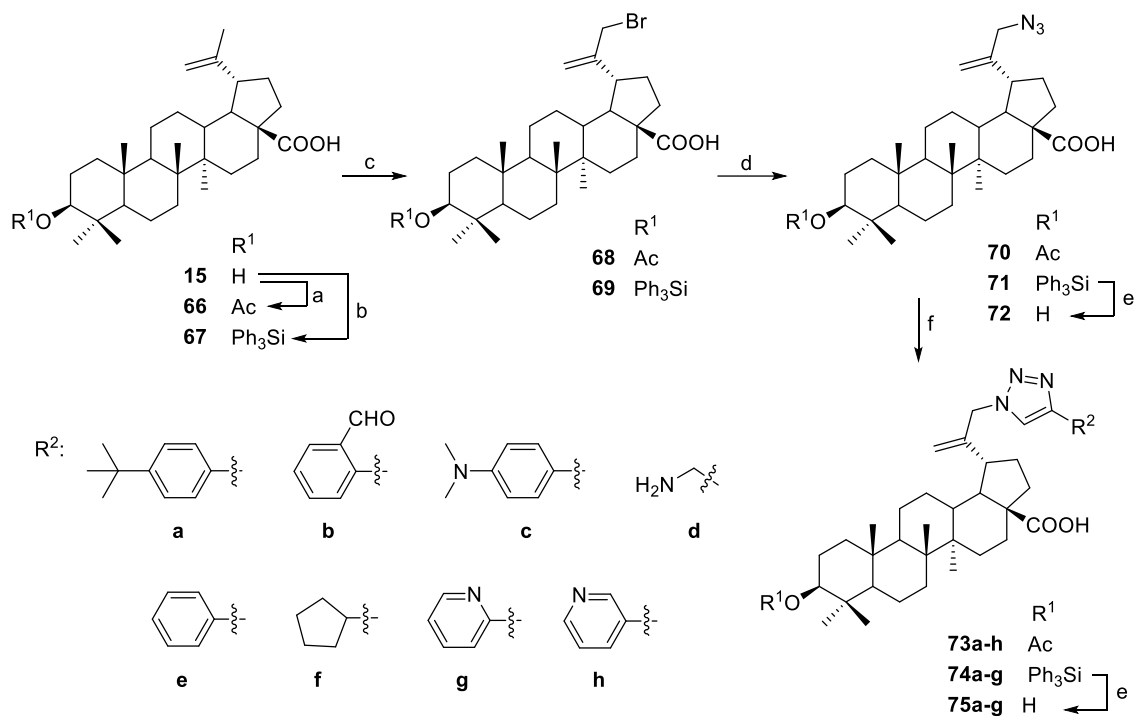


Schéma č. 8: Příprava triazolových derivátů v poloze C-30. Podmínky: (a) Ac_2O , pyridin, r.t., 16 h; (b) Ph_3SiCl , DMF, imidazol, r.t., 36 h; (c) NBS, AIBN, CCl_4 , 75 °C po 1 h, 50 °C po 3 h; (d) NaN_3 , DMSO, r.t., 36 h; (e) TBAF, THF, r.t., 18–32 h nebo HCl, CH_2Cl_2 , r.t., 5–11 h; (f) různé aryl alkyne, askorban sodný, $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$, r.t. nebo 50 °C, 16–20 h.

3.3 Triazolizační reakce

Obecně se triazoly nejčastěji připravují Huisgenovou cykloadicí, ve které reaguje azid s alkyne za využití měďnatých iontů, coby katalyzátoru. Z předchozí kapitoly je patrné, že tato metoda je pro přípravu triterpenoidních triazolů nejpoužívanější. Nicméně několika stupňová příprava výchozích látek a toxicita katalyzátorů tuto reakci znevýhodňují. Proto byly vyvinuty syntetické postupy bez nutnosti katalýzy těžkými kovy,⁶³ nicméně stále chyběla obecná a jednoduchá metodika, která by byla dostatečně robustní pro syntézu knihoven látek různého charakteru.

Triazolizační reakce je metoda přípravy 1,2,3-triazolů, která vychází ze snadno dostupných výchozích látek jako jsou primární aminy, enolizovatelné ketony a *p*-nitrofenylazid (Schéma. č. 9). Její využití v organické syntéze může výrazně zkrátit a ulehčit průběh syntézy ve srovnání se staršími metodami přípravy 1,2,3-triazolů.

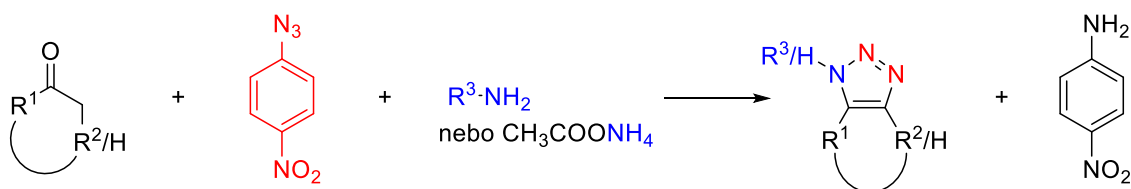


Schéma č. 9: Základní schéma Triazolizační reakce.

Tuto reakci představil tým profesora Dehaena v roce 2016,⁶⁴ nicméně první zmínky o ní sahají až do roku 1965, kdy Bianchetti *et al.* publikovali syntézu 1,2,3-triazolů reakcí izolovaných iminů/enaminů s *p*-nitrofenylazidem či tosylazidem.⁶⁵ Hlavním nedostatkem původní reakce byla reverzibilita tvorby iminu/enaminu, což ztěžovalo jeho izolaci. Tým profesora Dehaena se rozhodl vyřešit tento problém tím, že samotný imin vzniká *in situ* v reakční směsi. Vzniklý imin následně tautomerizuje na enamin, který poté ihned reaguje s *p*-nitrofenylazidem [3+2] cykloadiční reakcí za vzniku triazolinového intermediátu, který podléhá aromatizaci a vzniku příslušného 1,2,3-triazolu (Schéma č. 10). Současně se vylučuje *p*-nitroanilin jako vedlejší produkt reakce. Tato reakce se dá využít pro přípravu jak substituovaných, tak nesubstituovaných triazolů, a to záměnou primárního aminu za octan amonný.⁶⁶

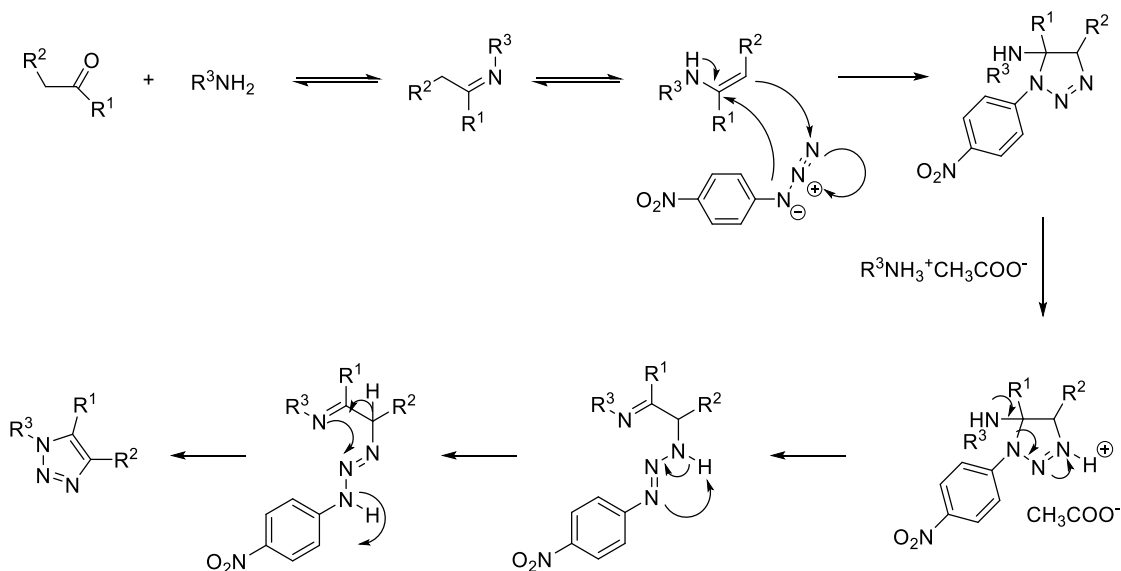


Schéma č. 10: Mechanismus Triazolizační reakce podle literatury.⁶⁶

Reakce se provádí za přítomnosti molekulových sít, kdy se pohlčováním vody posunuje rovnováha reakce keton + amin \rightleftharpoons imin + H₂O ve prospěch vzniku iminu. Reakce se také může provádět za kyselá katalýzy organickými kyselinami, nejlépe kyselinou octovou. Tato katalýza pravděpodobně ovlivňuje jak vznik iminu, tak i tautomerizaci

enaminu. Reakce probíhá i bez kyselá katalýzy bez výraznějšího ovlivnění výtěžku ovšem s delším reakčním časem.⁶⁴

Optimalizace této reakce byla prováděna na acetofenonu v reakci s 4-methoxybenzylaminem podle schématu níže (Schéma č. 11). Byly vyzkoušeny různé organické azidy, byla optimalizována katalýza organickými kyselinami jako např. kyselina octová, kyselina *p*-toluensulfonová či kyselina trifluoroctová v různých koncentracích (0-30 mol%), dále byla testována různá rozpouštědla, molární poměry reaktantů a další reakční podmínky. Nejlepšího výtěžku 93 % bylo dosaženo za použití 1,0 ekvivalentu ketonu, 1,4 ekvivalentu aminu a 1,0 ekvivalentu *p*-nitrofenylazidu za katalýzy kys. octovou (30 mol%) v toluenu při teplotě 100 °C.⁶⁴

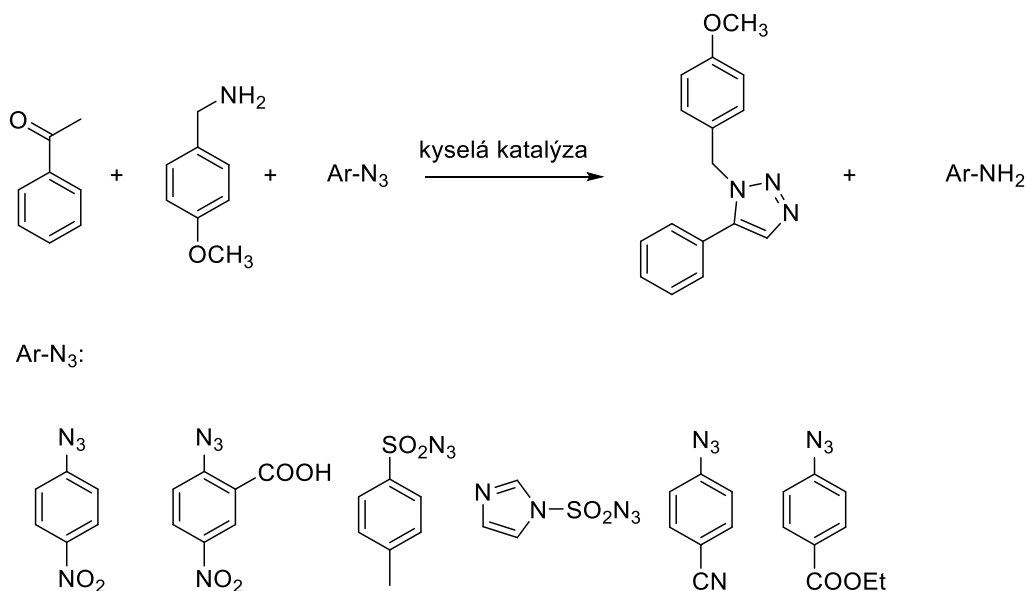
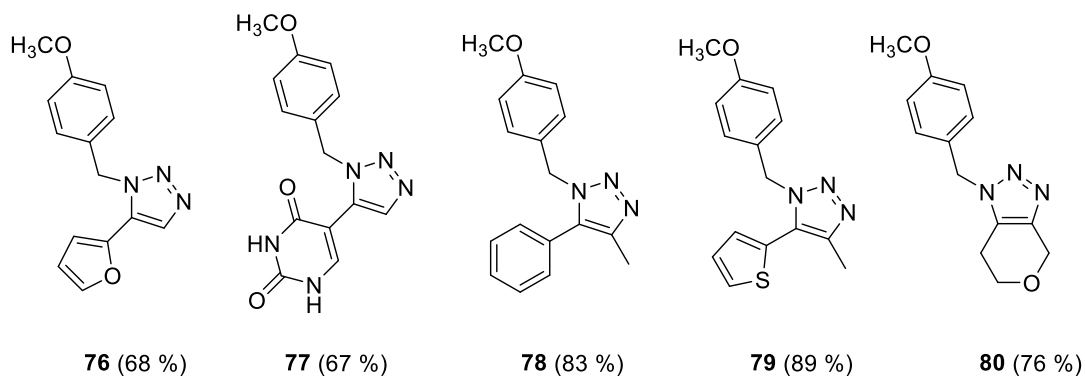


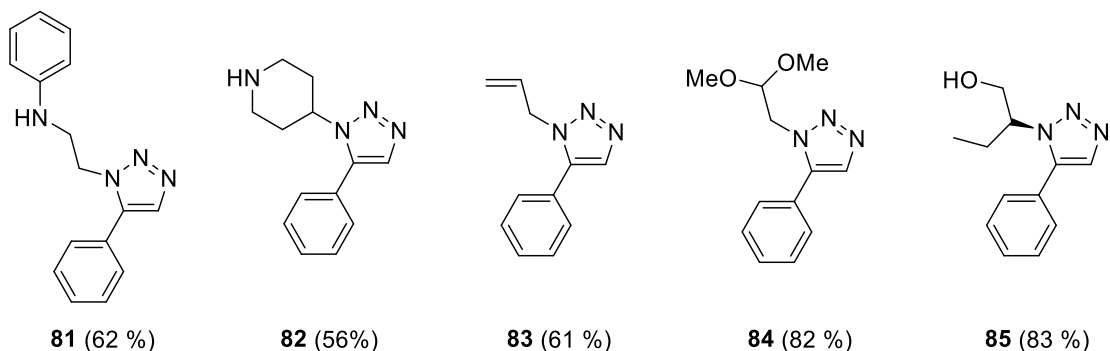
Schéma č. 11: Optimalizace Triazolizační reakce – volba azidu.

Multifunkčnost této reakce byla prokázána přípravou knihovny látek vycházející z rozličných ketonů a aminů.⁶⁴ Z enolizovatelných ketonů byly v reakci s *p*-methoxybenzylaminem připraveny jak 1,5-disubstituované 1,2,3-triazoly (**76** a **77**), tak i 1,4,5-trisubstituované 1,2,3-triazoly (**78** a **79**) či 4,5-fúzané 1,2,3-triazoly (**80**) (Obr. č. 18) ve vysokých výtěžcích.



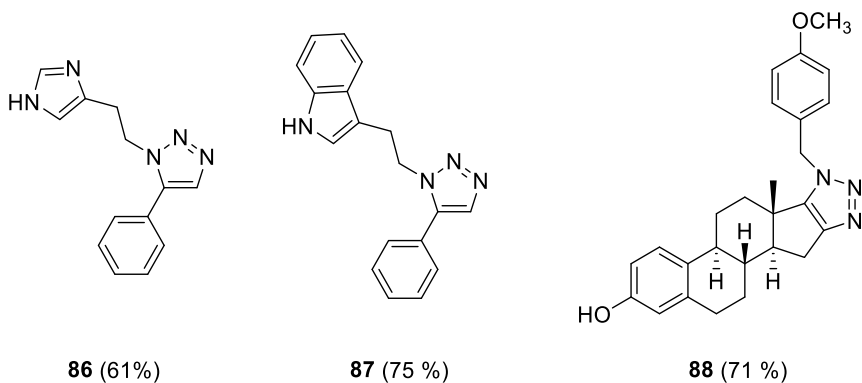
Obr. č. 18: *Připravené deriváty odvozené od rozličných ketonů.*

Co se týče různorodosti aminů, 1,2,3-triazolové deriváty byly připraveny jak ze substrátů nesoucích nechráněnou sekundární amino skupinu (**81** a **82**), tak z aminů s citlivými vedlejšími skupinami (**83**, **84**; reakce probíhala bez kyselé katalýzy) či z chirálních aminů (**85**) se středně vysokými až vysokými výtěžky (Obr. č. 19).⁶⁴



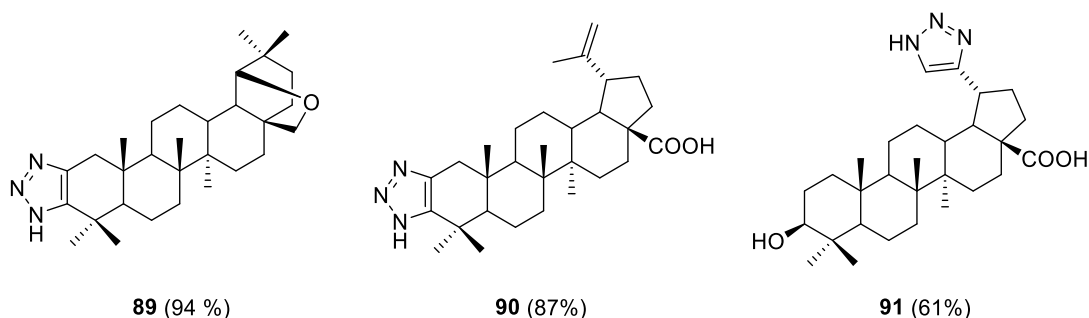
Obr. č. 19: *Připravené deriváty odvozené od rozličných aminů.*

Nakonec byly připraveny triazolové deriváty vycházející z přírodních látek jako je histamin (**86**), tryptamin (**87**), ale i ze složitějších struktur jako například estron (**88**) (Obrázek č. 20).⁶⁴



Obr. č. 20: *Triazoly odvozené od přírodních látek.*

Triazolizační reakce byla okrajově testována také na triterpenech. Byly připraveny nesubstituované 1,2,3-triazoly od allobetulonu **89**, kyseliny betulinové **90** a kyseliny platanové **91** se středně vysokými až vysokými výtěžky (Obr. č. 21).⁶⁶



Obr. č. 21: Připravené triterpenické 1,2,3-triazoly allobetulonu **89**, kyseliny betulinové **90** a kyseliny platanové **91**

Allobetulon (**92**), kyselina betulinová (**15**) a kyselina platanová (**16**) reagovaly s *p*-nitrofenylazidem (**93**) a octanem amonným v DMF. Reakce na allobetulonu (**92**) probíhala za podmínek uvedených níže a byla výchozím bodem pro tuto diplomovou práci (Schéma č. 12).⁶⁶

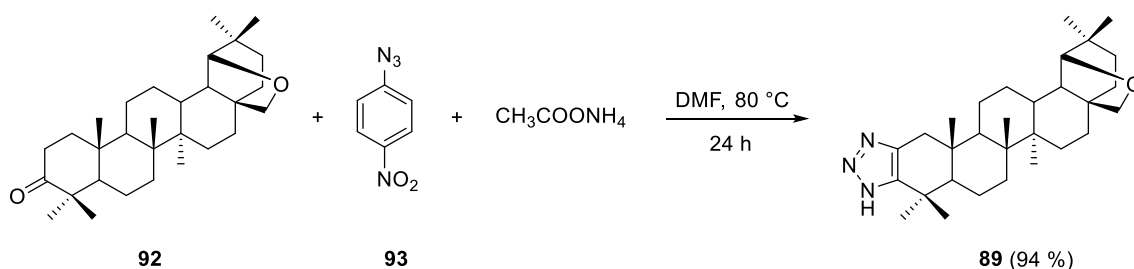
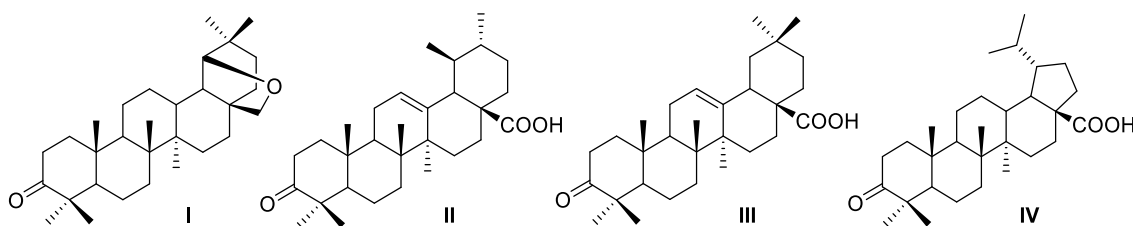


Schéma č. 12: Příprava nesubstituovaného 1,2,3-triazolu **89** odvozeného od allobetulonu (**92**).

4 Výsledky a diskuze

4.1 Příprava výchozích látek

Jako výchozí triterpenické sloučeniny byly pro tuto práci vybrány allobetulon (**I**), kyselina ursonová (**II**), kyselina oleanonová (**III**) a kyselina dihydrobetulonová (**IV**) (Obr. č. 22). Allobetulon (**I**) většinou nepodléhá vedlejším reakcím a velice dobře se s ním i jeho deriváty manipuluje, především co se týče izolace a purifikace produktů, nicméně jeho deriváty ve většině případů nevykazují výraznou biologickou aktivitu. Triterpenické kyseliny **II–IV** mnohem častěji podléhají vedlejším reakcím, také izolace a purifikace jejich produktů je problematictější, zato však mají vyšší potenciál v biologické aktivitě, což bylo popsáno např. v literatuře^{46,67}. Zdá se, že karboxylová kyselina na C-28 je pro biologickou aktivitu (např. cytotoxicitu) důležitá a v některých případech naprosto esenciální. Allobetulon (**I**) a kyselina dihydrobetulonová (**IV**) byly zakoupeny, kyseliny ursonová (**II**) a oleanonová (**III**) byly připraveny oxidací příslušných 3-hydroxykyselin.



Obr. č. 22: *Výchozí triterpeny: allobetulon (I), kyselina ursonová (II), kyselina oleanonová (III), kyselina dihydrobetulonová (IV).*

4.1.1 Kyselina ursonová (II)

Kyselina ursonová (**II**) byla připravena oxidací kyseliny ursolové (**V**) dichromanem draselným ve směsi rozpouštědel podle modifikovaného postupu v literatuře⁶⁸ (Schéma č. 13). Výtěžek reakce byl 80 % a H^1 NMR spektrum produktu se shodovalo s literaturou.⁶⁹

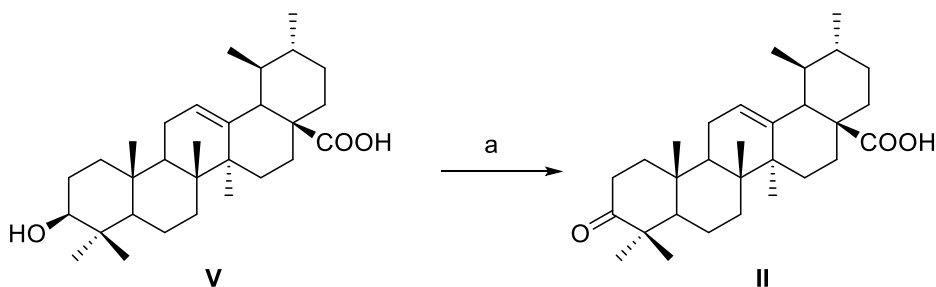


Schéma č. 13: Příprava kyseliny ursonové (**II**). Podmínky: (a) $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_4$, 1,4-dioxan, CH_3COOH , $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$, $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$, r.t., 19 h, 80 %.

4.1.2 Kyselina oleanonová (**III**)

Kyselina oleanonová (**III**) byla připravena obdobně jako kyselina **II**. Výchozí látkou byla kyselina oleanolová (**VI**), která byla oxidována dichromanem draselným ve výtěžku 74 % (Schéma č. 14).⁶⁸ Tato sloučenina byla již popsána a její H^1 NMR spektrum se shoduje s literaturou.⁷⁰

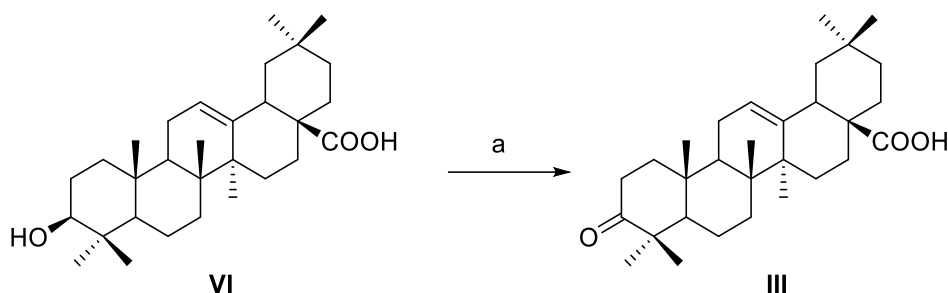


Schéma č. 14: Příprava kyseliny oleanonové (**III**). Podmínky: (a) $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 1,4-dioxan, CH_3COOH , $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$, CH_3COONa , r.t., 24 h, 74 %.

4.1.3 *p*-Nitrofenylazid (**IX**)

Poslední nezbytnou výchozí látkou, jež musela být čerstvě připravena, byl *p*-nitrofenylazid (**IX**). Ten byl připraven diazotací *p*-nitroanilinu (**VII**) a následnou reakcí vzniklé diazoniové soli **VIII** s azidem sodným dle literatury⁶⁴ ve výtěžku 86 % (Schéma č. 15). Tato sloučenina byla již popsána, H^1 NMR spektrum se shoduje s literaturou.⁷¹

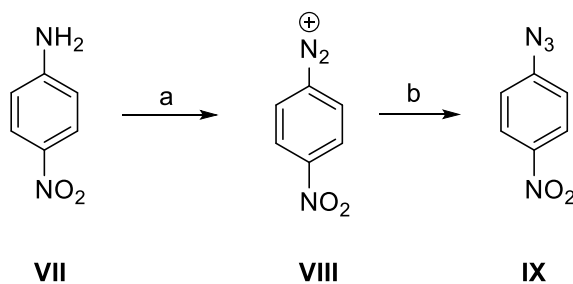


Schéma č. 15: Příprava *p*-nitrofenylazidu. Podmínky: (a) NaNO_2 , HCl , MeOH , 0°C , 0,5 h; (b) NaN_3 , $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{r.t.}$ 1 h.

4.2 Příprava nesubstituovaných 1,2,3-triazolů

Nejprve byla Triazolizační reakce využita pro přípravu nesubstituovaných triazolů. Tato reakce již byla na allobetulonu (**I**) provedena, a to s vysokým výtěžkem 94 %.⁶⁶ Proto byla tato reakce zvolena jako výchozí bod pro další optimalizace.

4.2.1 Nesubstituovaný 1,2,3-triazol allobetulonu **X**

Jak již bylo popsáno výše, nesubstituovaný 1,2,3-triazol allobetulonu **X** se obecně připraví reakcí allobetulonu (**I**) s *p*-nitrofenylazidem (**IX**) a octanem amonným v bezvodém prostředí a za použití molekulových sít (Schéma č. 16).

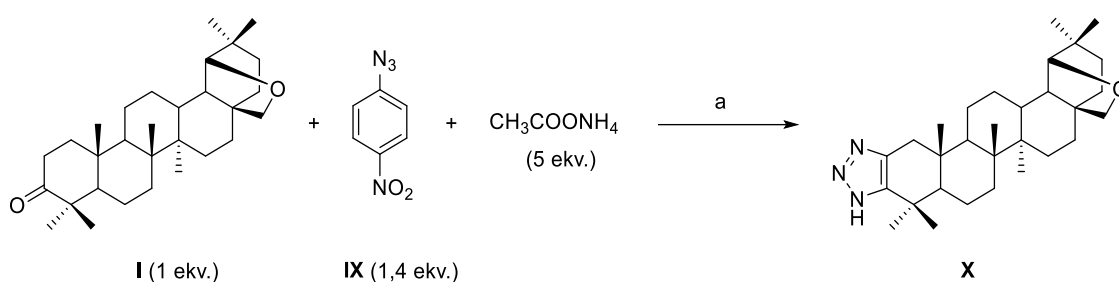


Schéma č. 16: Obecné schéma přípravy nesubstituovaného 1,2,3-triazolu allobetulonu **X**. Podmínky: (a) bezvodé rozpouštědlo, teplota 60–100 °C, molekulová síta, 24 h.

Prvním optimalizačním krokem byl výběr vhodného rozpouštědla. S ohledem na literaturu byla testována celkem čtyři bezvodá rozpouštědla: dimethylformamid, dichlormethan, toluen a tetrahydrofuran. Jako prvotní teplota bylo zvoleno 60 °C. Počet ekvivalentů reagentů byl převzat z literatury – bylo použito 1,0 ekvivalentu allobetulonu (**I**), 1,4 ekvivalentu *p*-nitrofenylazidu (**IX**) a 5,0 ekvivalentů octanu amonného.⁶⁶ Všechny reakce byly ponechány reagovat 24 hodin a jejich konverze byla sledována pomocí TLC. Bylo zjištěno, že reakce neprobíhá v dichlormethanu a toluenu, zato reakcí v DMF byl triazol **X** připraven ve výtěžku 34 % a za použití THF ve výtěžku 12 %. Jelikož se výtěžky zdaleka nepřibližovaly těm v literatuře, byla zvýšena teplota v reakční směsi za současného zachování ostatních parametrů.

Nadále bylo pracováno jak s DMF, tak THF. Reakce byla provedena při 80 °C, přičemž bylo dosaženo výtěžku 62 % v DMF a 37 % v THF. Nicméně výtěžek reakce v DMF nebyl stále tak vysoký jako publikovaných 94 % a to ani za použití stejných reakčních podmínek. Proto byla teplota zvýšena na 100 °C. V tomto případě byla reakce provedena pouze v DMF s výtěžkem 80 %, kdy také došlo, oproti předchozím reakcím, k úplnému zreagování výchozího allobetulonu (**I**). Vzhledem k obavám z vedlejších reakcí (jako je

formylace) při použití DMF při 100 °C bylo vyzkoušeno ještě další rozpouštědlo, zvolené po krátké selekci provedené u jiného derivátu (viz níže), a to *N*-methylpyrrolidon. Výtěžek této reakce byl nicméně, oproti reakci v DMF, pouze 69 % (Tab. č. 1). Triazol **X** byl již v literatuře popsán, jeho ¹H NMR spektrum se shoduje s literaturou.⁶⁶

Teplota	Rozpouštědlo	Reakční směs	Výtěžek
60 °C	DMF	P + VL	34 %
60 °C	THF	P + VL	12 %
60 °C	CH ₂ Cl ₂	VL	-
60 °C	Tol	VL	-
80 °C	DMF	P + stopy VL	62 %
80 °C	THF	P + VL	37 %
100 °C	DMF	P	80 %
100 °C	NMP	P	69 %

Tab. č. 1: Optimalizace reakčních podmínek vedoucích k triazolu **X**. Všechny reakce probíhaly 24 h.

4.2.2 Nesubstituovaný 1,2,3-triazol kyseliny ursonové **XI**

V případě kyselinových skeletů byl jako první připraven nesubstituovaný 1,2,3-triazol kyseliny ursonové **XI** reakcí kyseliny ursonové (**II**) s *p*-nitrofenylazidem (**IX**) a octanem amonným (Schéma č. 17).

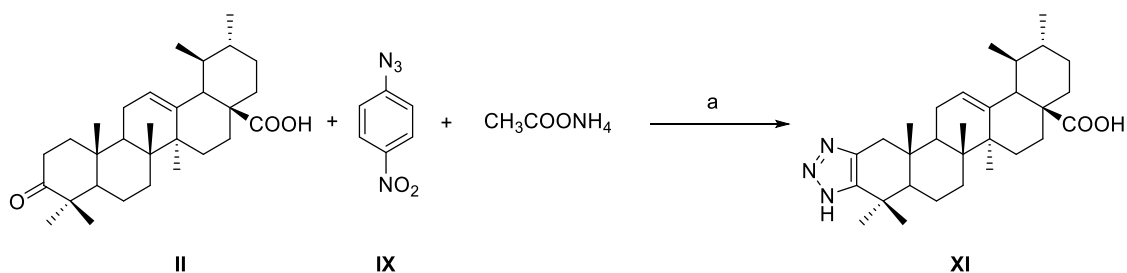


Schéma č. 17: Obecné schéma přípravy nesubstituovaného 1,2,3-triazolu kyseliny ursonové **XI**. Podmínky: (a) bezvodé rozpouštědlo, teplota 60–100 °C, molekulová síta, 24–48 h.

V případě Triazolizační reakce vedoucí ke vzniku triazolu **XI** byl použit stejný počet ekvivalentů jako u reakce vedoucí ke vzniku triazolu **X** – 1,0 ekvivalent kyseliny ursonové (**II**), 1,4 ekvivalentu *p*-nitrofenylazidu (**IX**) a 5,0 ekvivalentů octanu amonného. Zprvu byla použita pouze dvě rozpouštědla – dimethylformamid a tetrahydrofuran. Byl

také zkoumán vliv teploty na výtěžek reakce, po vzoru triazolu **X** byla reakce provedena při 60 °C, 80 °C a 100 °C. Dle očekávání reakce v THF při 60 °C poskytla triazol **XI** ve výtěžku 40 %, což je méně v porovnání s 60% výtěžkem, který poskytla reakce v DMF. V případě použití DMF již při 60 °C došlo k úplnému zreagování výchozí kyseliny ursonové (**II**), u THF ani po 48 hodinách k úplnému zreagování nedošlo.

Při navýšení teploty na 80 °C a 100 °C nedošlo k výraznému zvýšení výtěžku oproti reakci při 60 °C. Reakce v DMF při 80 °C poskytla triazol **XI** ve výtěžku 67 %, a při 100 °C se jednalo o výtěžek 68 %. Reakce byla provedena i v NMP při 100 °C. Touto reakcí byl připraven triazol **XI** ve výtěžku 65 %, což ukazuje na fakt, že reakce probíhá, v porovnání s předchozím derivátem, prakticky stejně dobře jak v dimethylformamidu, tak *N*-methylpyrrolidonu (Tab. č. 2).

Teplota	Rozpouštědlo	Reakční směs	Výtěžek
60 °C	DMF	P	60 %
60 °C	THF	P + VL	40 %
80 °C	DMF	P	67 %
100 °C	DMF	P	68 %
100 °C	NMP	P	65 %

Tab. č. 2: *Optimalizace reakčních podmínek vedoucích k triazolu XI. Všechny reakce, kromě reakce v THF, probíhaly 24 h, reakce v THF probíhala 48 h.*

Struktura triazolu **XI** byla potvrzena ¹H NMR spektrem, ve kterém byly nalezeny dva charakteristické dublety v oblasti 2,68–2,13 ppm, každý s integrálem jedna, odpovídající vodíkům uhlíku H-1a a H-1b, jejichž vyšší hodnoty chemického posunu svědčí o blízkosti triazolového kruhu. Ve spektru derivátu **XI** byl rozpoznatelný pouze jeden dublet při 2,68 ppm, druhý dublet se skrývá v multipletu 2,20–2,13 ppm s integrálem dva, kde druhým vodíkem je skeletální H-18. Signál při 11,93 ppm s integrálem jedna náleží vodíku na triazolovém kruhu.

4.2.3 Nesubstituovaný 1,2,3-triazol kyseliny oleanonové **XII**

Triazol **XII** byl připraven reakcí kyseliny oleanonové (**III**) s *p*-nitrofenylazidem (**IX**) a octanem amonným (Schéma č. 18).

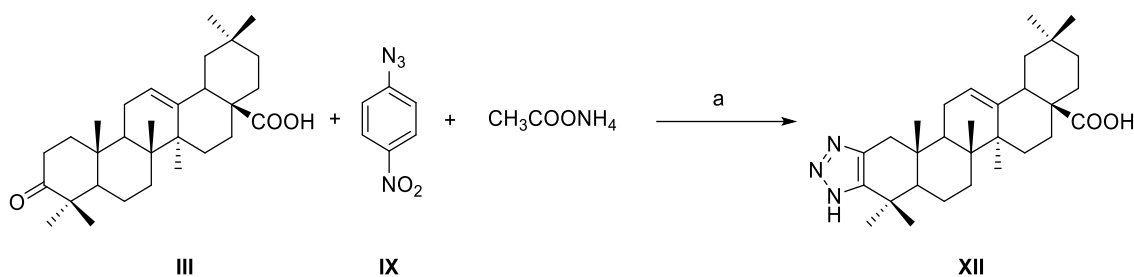


Schéma č. 18: *Obecné schéma přípravy nesubstituovaného 1,2,3-triazolu kyseliny oleanonové **XII**. Podmínky: (a) bezvodé rozpouštědlo, teplota 60 °C nebo 100 °C, molekulová síta, 24–48 h.*

Prvotní reakce při 60 °C byly prováděny současně u všech triterpenických kyselin **II–IV** a podrobnější optimalizace podmínek byla prováděna především na triazolu **XI**, protože předpokládáme, že chování všech těchto kyselin v reakci je velice podobné.

Reakcí při 60 °C v DMF, za zachování počtu ekvivalentů jako v předchozích případech (1,0 ekvivalentu kyseliny **III**, 5,0 ekvivalentů octanu amonného a 1,4 ekvivalentu *p*-nitrofenylazidu (**IX**)), byl po 24 hodinách získán triazol **XII** ve výtěžku 61 %. Reakcí v THF nedošlo ani po 48 hodinách k úplnému zreagování výchozí kyseliny **III** a produkt byl získán pouze ve výtěžku 37 %. Jelikož se tyto výsledky prakticky shodují s výtěžky získanými u triazolu **XI**, byla reakce po přípravu triazolu **XII** provedena ještě při 100 °C, což je teplota, při které byl triazol **XI** připraven v nejvyšším výtěžku. Reakce byla provedena jak DMF, tak v NMP. Výtěžky jednotlivých reakcí nejsou moc rozdílné, reakce v DMF poskytla triazol **XII** ve výtěžku 66 %, reakce v NMP pak ve výtěžku 70 % (Tab. č. 3).

Teplota	Rozpouštědlo	Reakční směs	Výtěžek
60 °C	DMF	P	61 %
60 °C	THF	P + VL	37 %
100 °C	DMF	P	66 %
100 °C	NMP	P	70 %

Tab. č. 3: *Optimalizace reakčních podmínek vedoucích k triazolu **XII**. Reakce v DMF a NMP probíhala 24 h, reakce v THF probíhala 48 h.*

Struktura triazolu **XII** byla potvrzena ^1H NMR spektrem, ve kterém byly nalezeny dva charakteristické dublety, každý s integrálem jedna, při 2,64 ppm a 2,16 ppm odpovídající

vodíkům H-1a a H-1b kyseliny oleanonové (**III**). Signál vodíku na triazolovém kruhu nebyl ve spektru pozorován.

4.2.4 Nesubstituovaný 1,2,3-triazol kyseliny dihydrobetulonové **XIII**

Triazol **XIII** byl připraven reakcí kyseliny dihydrobetulonové (**IV**) s *p*-nitrofenylazidem (**IX**) a octanem amonným (Schéma č. 18).

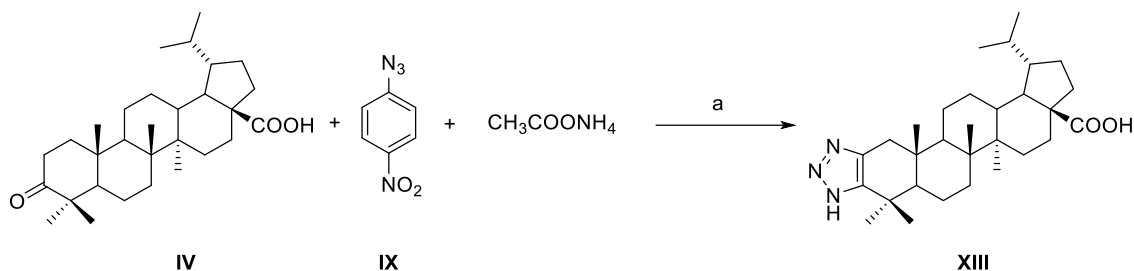


Schéma č. 18: *Obecné schéma přípravy nesubstituovaného 1,2,3-triazolu kyseliny dihydrobetulonové **XIII**. Podmínky: (a) bezvodé rozpouštědlo, teplota 60–100 °C, molekulová síta, 24–48 h.*

Jako první byly provedeny reakce v DMF a v THF, obě při 60 °C, počet ekvivalentů reaktantů byl převzat z literatury.⁶⁴ V případě reakce v DMF byl získán triazol **XIII** ve výtěžku 60 %. V reakční směsi s THF byla i pro 48 hodinách stále patrná nezreagovaná výchozí kyselina **IV**, stejně tak, jako tomu bylo u triazolů **X–XII**, výtěžek reakce pak činil 25 %. Reakce byla také provedena při 100 °C v DMF a NMP, kdy stejně jako u triazolů **XI–XII** nebyl rozdíl ve výtěžku nijak markantní. Reakce v DMF poskytla triazol **XIII** ve výtěžku 65 %, reakce v NMP pak ve výtěžku 67 % (Tab. č. 4).

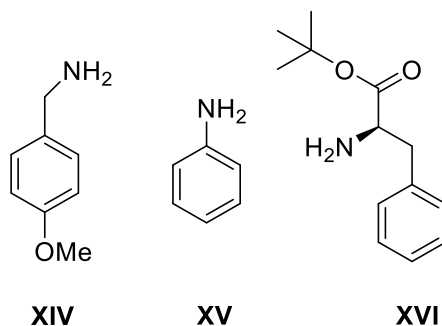
Teplota	Rozpouštědlo	Reakční směs	Výtěžek
60 °C	DMF	P	60 %
60 °C	THF	P + VL	25 %
100 °C	DMF	P	65 %
100 °C	NMP	P	67 %

Tab. č. 4: *Optimalizace reakčních podmínek vedoucích k triazolu **XIII**. Reakce v DMF a NMP probíhaly 24 h, reakce v THF probíhala 48 h.*

Struktura triazolu **XIII** byla potvrzena ¹H NMR spektrem, které obsahovalo dva charakteristické dublety při 2,84 ppm a 2,16 ppm, každý s integrálem 1, odpovídající vodíkům H-1a a H-1b kyseliny dihydrobetulonové (**IV**). Signál vodíku na triazolovém kruhu nebyl ve spektru patrný.

4.3 Příprava substituovaných 1,2,3-triazolů

Přípravou série nesubstituovaných triazolů **X–XIII** bylo potvrzeno, že Triazolizační reakci lze využít i pro přípravu nových terpenických sloučenin, a to v dobrých výtěžcích. Následně byla reakce aplikována také na přípravu triterpenů se substituovaným triazolem, u kterých se předpokládalo, že nebudou vznikat tak ochotně, především ze sterických důvodů. Po vzoru literatury⁶⁴ byl jako první substituent zvolen *p*-methoxybenzyl, čímž došlo k nahrazení octanu amonného, používaného v předešlé kapitole, *p*-methoxybenzylaminem (**XIV**). Jako další substituent byl zvolen fenyl pocházející z anilinu (**XV**). Cílem výběru těchto substituentů bylo zjistit, jaký vliv bude mít tvar a délka substituentu na výtěžnost reakce s ohledem na stericky objemné metyly C-23 a C-24 na A-kruhu triterpenu. Posledním zařazeným substituentem byl zbytek *tert*-butyl esteru 3-fenylpropionové kyseliny pocházející z fenylalaninu, u něhož byla karboxylová skupina ochráněna formou *tert*-butyl esteru (**XVI**) (Obr. č. 23). Záměrně byla zvolena aromatická aminokyselina, aby se zjistilo, zda-li má další funkční skupina vliv na průběh reakce a také, zda-li triazolizace v tomto případě nepovede ke tvorbě dvou diastereoisomerů.



Obr. č. 23: Výchozí aminy pro přípravu substituovaných triazolů – *p*-methoxybenzylamin (**XIV**), anilin (**XV**) a *L*-fenylalanin *tert*-butyl ester (**XVI**).

4.3.1 *p*-Methoxybenzyl-1,2,3-triazolové deriváty

4.3.1.1 *p*-Methoxybenzyl-1,2,3-triazolový derivát allobetulonu **XVII**

Stejně jako v případě nesubstituovaných triazolů byla i zde první reakce provedena na allobetulonu (**I**). Derivát **XVII** byl připraven reakcí allobetulonu (**I**) s *p*-nitrofenylazidem (**IX**) a *p*-methoxybenzylaminem (**XIV**) (Schéma č. 19).

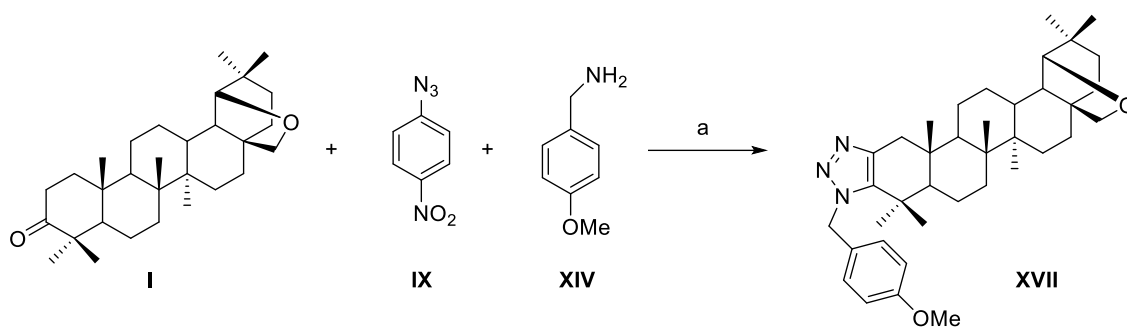


Schéma č. 19: Obecné schéma přípravy *p*-methoxybenzylem substituovaného 1,2,3-triazolu allobetulonů **XVII**. Podmínky: (a) bezvodé rozpouštědlo, 100 °C, molekulová síta, 48–72 h.

V případě první reakce byl počet ekvivalentů převzat z literatury⁶⁴: 1,0 ekvivalentu allobetulonů (**I**), 1,4 ekvivalentu *p*-methoxybenzylaminu (**XIV**) a 1,0 ekvivalentu *p*-nitrofenylazidu (**IX**). Reakce byla provedena, po vzoru předchozích reakcí, v DMF při 100 °C, ale ani po 48 hodinách nedošlo k úplnému zreagování výchozího allobetulonů (**I**) a derivát **XVII** byl získán pouze ve výtěžku 13 %. Jelikož se teplota 100 °C a rozpouštědlo DMF v minulých případech osvědčily, přešly jsme ke změně počtu ekvivalentů jednotlivých reagentů. Po vzoru nesubstituovaných derivátů byl zvýšen počet ekvivalentů *p*-methoxybenzylaminu (**XIV**) na 5,0 ekvivalentů, ostatní parametry zůstaly nezměněny. Ani v tomto případě nicméně nedošlo k úplnému zreagování výchozího allobetulonů (**I**), ale výtěžek reakce stoupl na 46 %. V dalších dvou reakcích bylo použito opět 5,0 ekvivalentů *p*-methoxybenzylaminu (**XIV**) a 2,0 nebo 3,5 ekvivalentu *p*-nitrofenylazidu (**IX**). V obou případech již došlo k úplnému zreagování výchozího allobetulonů (**I**). Výtěžek reakce s 2,0 ekvivalenty *p*-nitrofenylazidu (**IX**) byl 57 % a reakce se 3,0 ekvivalenty **IX** byl výtěžek 43 %. Nižší výtěžek u reakce s větším počtem ekvivalentů azidu **IX** je pravděpodobně způsoben vyšší koncentrací vedlejších produktů, jak bylo pozorováno na TLC (Tab. č. 5).

Ekv. aminu (XIV)	Ekv. azidu (IX)	Reakční směs	Výtěžek
1,4	1,0	P + VL	13 %
5,0	1,0	P + VL	46 %
5,0	2,0	P	57 %
5,0	3,5	P + VP	43 %

Tab. č. 5: Optimalizace počtu ekvivalentů reaktantů pro reakci vedoucí k derivátu **XVII**. Všechny reakce probíhaly v DMF, při 100 °C po dobu 48 h.

Byla také vyzkoušena kyselá katalýza reakce, popsaná v literatuře.⁶⁴ Bylo použito 30 mol% kyseliny octové v kombinaci s 5,0 ekvivalenty *p*-methoxybenzylaminu (**XIV**) a 2,0 ekvivalenty *p*-nitrofenylazidu (**IX**) v DMF, nicméně ani kyselá katalýza nevedla ke zvýšení výtěžku – ten byl 47 % (Tab. č. 6).

Posléze byla kvůli obavám z vedlejších reakcí při použití DMF za vysokých teplot, vyzkoušena další rozpouštědla, charakterem podobná DMF. Vedle NMP byly dále testovány ještě dimethylsulfoxid a dimethylacetamid, za již optimalizovaných podmínek z předchozích experimentů (5,0 ekvivalentů *p*-methoxybenzylaminu (**XIV**) a 2,0 ekvivalentu *p*-nitrofenylazidu (**IX**)). U reakce v DMSO nedošlo ani po 72 hodinách k úplnému zreagování výchozího allobetulonu (**I**) a byl získán derivát **XVII** ve výtěžku 52 %. Reakce v DMA také nevedla k úplnému zreagování výchozího allobetulonu (**I**), výtěžek reakce byl po 48 hodinách 53 %. Oproti tomu reakce v NMP vedla k úplnému zreagování výchozí látky a po 48 hodinách byl získán derivát **XVII** ve výtěžku 65 % (Tab. č. 6). V případě tohoto derivátu poskytla nejvyšší výtěžek reakce v NMP, zatímco u nesubstituovaného derivátu allobetulonu **X** reakce probíhala nejlépe v DMF.

Rozpouštědlo	Reakční směs	Čas	Výtěžek
DMF + kat. AcOH	P + VP	48 h	47 %
DMSO	P + stopy VL	72 h	52 %
DMA	P + stopy VL	48 h	53 %
NMP	P	48 h	65 %

Tab. č. 6: *Optimalizace rozpouštědla pro reakci vedoucí k derivátu XVII. Všechny výše uvedené reakce probíhaly při 100 °C za použití 5 ekv. aminu XIV a 2 ekv. azidu IX.*

Struktura derivátu **XVII** byla potvrzena pomocí ¹H NMR spektra, ve kterém byly nalezeny signály charakteristické pro *p*-methoxybenzylový substituent: dva multiplety, každý s integrálem dva, při 7,01 ppm a 6,83 ppm odpovídající signálům aromatického jádra, singlet při 5,57 ppm s integrálem dva odpovídající dvěma benzylovým vodíkům a singlet při 3,78 ppm s integrálem tři odpovídající signálům vodíkům aromatické methoxy-skupiny. Dále lze ve spektru nalézt charakteristické dublety při 2,99 ppm a 2,20 ppm každý s integrálem jedna odpovídající vodíkům H-1a a H-1b allobetulonu (**I**).

4.3.1.2 *p*-Methoxybenzyl-1,2,3-triazolový derivát kyseliny ursonové XVIII

Derivát XVIII byl připraven reakcí kyseliny ursonové (II) s *p*-nitrofenylazidem (IX) a *p*-methoxybenzylaminem (XIV) (Schéma č. 20).

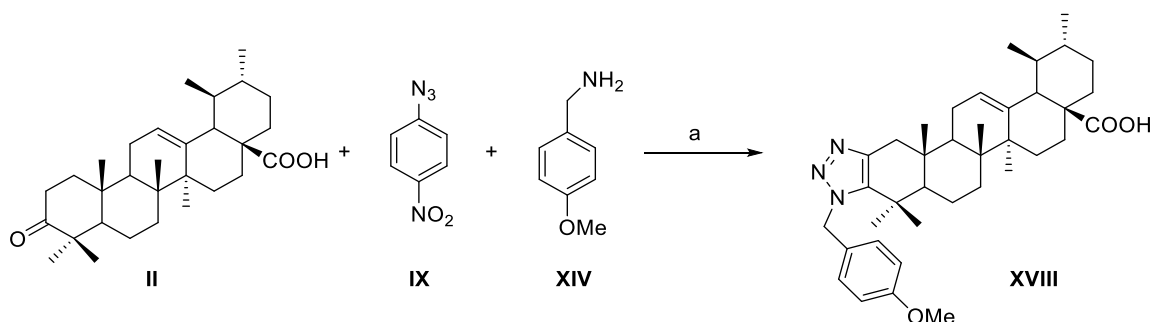


Schéma č. 20: Obecné schéma přípravy *p*-methoxybenzylem substituovaného 1,2,3-triazolu kyseliny ursonové XVIII. Podmínky: (a) bezvodé rozpouštědlo, 60–100 °C, molekulová síta, 24–48 h.

První reakce byla provedena podle podmínek z literatury⁶⁴: 1,4 ekvivalenty *p*-methoxybenzylaminu (XIV) a 1,0 ekvivalentu *p*-nitrofenylazidu (IX). Po zkušenostech s přípravou nesubstituovaných triazolů XI–XIII, u kterých nebyl vliv teploty reakce na výtěžek nijak výrazný, byla nejprve reakce provedena při 60 °C. Po 24 hodinách byl reakcí v DMF získán derivát XVIII ve výtěžku 32 %, avšak nedocházelo k úplnému zreagování výchozí kyseliny ursonové (II). Zvýšení teploty reakce na 100 °C mělo sice malý, ale negativní vliv na výtěžek reakce, který činil 26 %.

Při dalších dvou reakcích byly aplikovány optimalizované podmínky vzešlé z předchozího bádání u derivátu XVII – 5,0 ekvivalentů *p*-methoxybenzylaminu (XIV) a 2,0 ekvivalenty *p*-nitrofenylazidu (IX). Pro porovnání vlivu rozpouštědla byla reakce provedena jak v DMF, tak i v NMP. Obě reakce byly provedeny při 60 °C. Již za 24 hodin došlo v obou případech k úplnému zreagování výchozí látky a byl získán derivát XVIII ve výtěžku 49 %, pro reakci v NMP, a 61 % pro reakci v DMF (Tab. č. 7). Stejně jako v případě nesubstituovaného triazolu kyseliny ursonové XI i v tomto případě byl výtěžek reakce v DMF vyšší než v NMP.

Ekv. XIV	Ekv. IX	Teplota	Rozpouštědlo	Reakční s.	Výtěžek
1,4	1,0	60 °C	DMF	P + VL	32 %
1,4	1,0	100 °C	DMF	P + VL	26 %
5,0	2,0	60 °C	NMP	P	49 %
5,0	2,0	60 °C	DMF	P	61 %

Tab. č. 7: Přehled reakcí vedoucích k derivátu **XVIII**. Všechny reakce běžely 24 h.

Struktura derivátu **XVIII** byla potvrzena pomocí H^1 NMR spektra, ve kterém byly nalezeny signály charakteristické pro *p*-methoxybenzylový substituent: dva multiplety, každý s integrálem dva, při 6,99 ppm a 6,83 ppm odpovídající signálům aromatického jádra, multiplet při 5,56 ppm s integrálem dva odpovídající dvěma benzylovým vodíkům a singlet při 3,77 ppm s integrálem tři odpovídající signálům vodíkům aromatické methoxy-skupiny. Dále lze ve spektru nalézt charakteristické dublety odpovídající H-1 vodíkům kyseliny ursonové (**II**), první dublet při 2,91 ppm s integrálem jedna, druhý dublet není rozpoznatelný, jeho signál je spojený se signálem skeletálního vodíku H-18 v multiplet při 2,24 ppm s integrálem dva.

4.3.1.3 *p*-Methoxybenzyl-1,2,3-triazolový derivát kyseliny oleanonové **XIX**

Derivát **XIX** byl připraven reakcí kyseliny oleanonové (**III**), *p*-nitrofenylazidu (**IX**) a *p*-methoxybenzylaminu (**XIV**) (Schéma č. 21).

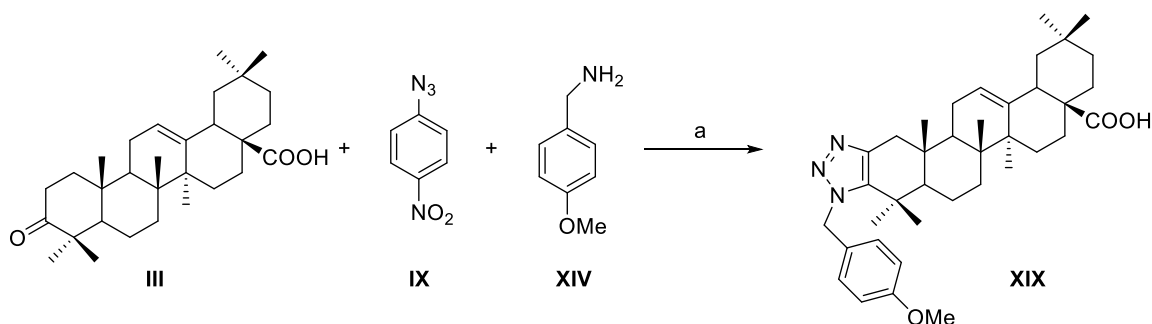


Schéma č. 21: Obecné schéma přípravy *p*-methoxybenzylem substituovaného 1,2,3-triazolu kyseliny oleanonové **XIX**. Podmínky: (a) bezvodé rozpouštědlo, 60 °C, molekulová síta, 24 h.

Nejdříve byly použity, jako v případě derivátu **XVIII**, podmínky z literatury⁶⁴: 1,4 ekvivalentu *p*-methoxybenzylaminu (**XIV**) a 1,0 ekvivalentu *p*-nitrofenylazidu (**IX**). Reakce byla provedena v DMF při 60 °C a, stejně jako v předchozím případě, nedošlo po 24 hodinách k úplnému zreagování výchozí kyseliny **III**. Derivát **XIX** byl z této reakce

získán ve výtěžku 36 %. Posléze byly aplikovány nově nalezené podmínky – 5,0 ekvivalentů *p*-methoxybenzylaminu (**XIV**), 2,0 ekvivalentů *p*-nitrofenylazidu (**IX**) při 60 °C, reakce byla provedena jak v DMF, tak NMP. Tyto podmínky vedly k úplnému zreagování výchozí kyseliny oleanonové (**III**), čímž byl získán derivát **XIX** ve výtěžku 58 % v NMP a ve výtěžku 39 % v DMF (Tab. č. 8). Nižší výtěžek reakce v DMF je dán vyšší koncentrací vedlejších produktů, jak bylo pozorována na TLC. Obdobně jako u nesubstituovaného triazolu téže kyseliny **XII** byla reakce provedena s vyšším výtěžkem v NMP.

Ekv. XIV	Ekv. IX	Rozpouštědlo	Reakční s.	Výtěžek
1,4	1,0	DMF	P + VL	36 %
5,0	2,0	NMP	P	58 %
5,0	2,0	DMF	P + VP	39 %

Tab. č. 8: Přehled reakcí vedoucích k derivátu **XIX**. Všechny reakce probíhaly 24 h při 60 °C.

Struktura triazolu **XIX** byla potvrzena pomocí H^1 NMR spektra, ve kterém byly nalezeny signály charakteristické pro *p*-methoxybenzylový substituent: dva multiplety, každý s integrálem dva, při 6,99 ppm a 6,83 ppm odpovídající signálům aromatického jádra, multiplet při 5,56 ppm s integrálem dva odpovídající dvěma benzylovým vodíkům a singlet při 3,77 ppm s integrálem tři odpovídající signálům vodíkům aromatické methoxy-skupiny. Dále lze ve spektru nalézt charakteristické dublety odpovídající H-1 vodíkům kyseliny oleanonové (**III**), první dublet není rozpoznatelný a jeho signál je spojený se signálem skeletálního vodíku H-18 v multiplet při 2,87 ppm s integrálem dva, signál druhého vodíku H-1 je již rozeznatelný dublet při 2,22 ppm s integrálem jedna.

4.3.1.4 *p*-Methoxybenzyl-1,2,3-triazolový derivát kyseliny dihydrobetulonové **XX**

Derivát **XX** byl připraven reakcí kyseliny dihydrobetulonové (**IV**) s *p*-nitrofenylazidem (**IX**) a *p*-methoxybenzylaminem (**XIV**) (Schéma č. 22).

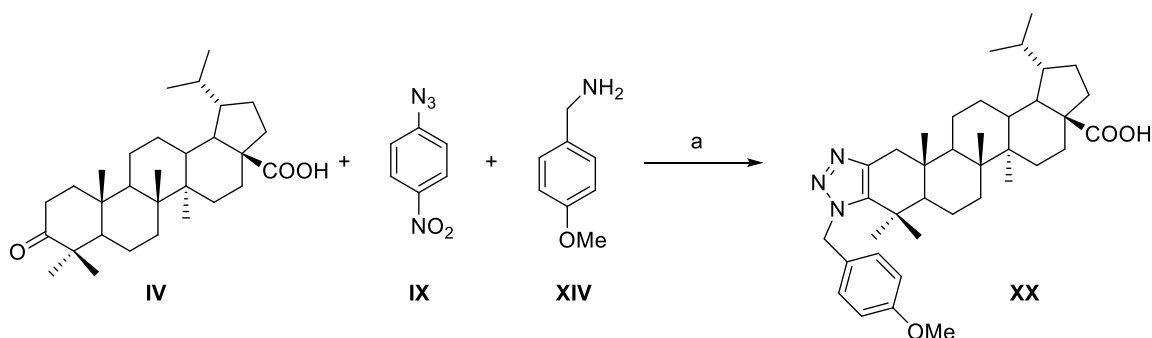


Schéma č. 22: *Obecné schéma přípravy p-methoxybenzylem substituovaného 1,2,3-triazolu kyseliny dihydrobetulonové XX. Podmínky: (a) bezvodé rozpouštědlo, 60 °C, molekulová síta, 24 h.*

Reakce pro získání derivátu **XX** byly provedeny již pouze dvě, obě za použití optimalizovaných podmínek – 5,0 ekvivalentů *p*-methoxybenzylaminu (**XIV**) a 2,0 ekvivalentů *p*-nitrofenylazidu (**IX**) a to jak v DMF, tak NMP, při 60 °C. Po 24 hodinách byl získán derivát **XX** ve výtěžku 54 % pro reakci v NMP a ve výtěžku 65 % pro reakci v DMF. Reakce pro přípravu *p*-methoxybenzyltriazolového derivátu kyseliny dihydrobetulonové (**XX**) tedy nejlépe probíhala v DMF, oproti reakci pro získání nesubstituovaného triazolu téže kyseliny **XIII**, který nejlépe probíhal v NMP.

Ekv. XIV	Ekv. IX	Rozpouštědlo	Reakční s.	Výtěžek
5,0	2,0	NMP	P	54 %
5,0	2,0	DMF	P	65 %

Tab. č. 9: *Přehled reakcí vedoucích k derivátu XX. Všechny reakce probíhaly 24 h při 60 °C.*

Struktura triazolu **XX** byla potvrzena pomocí H^1 NMR spektra, ve kterém byly nalezeny signály charakteristické pro *p*-methoxybenzylový substituent: dva multiplety, každý s integrálem dva, při 7,00 ppm a 6,82 ppm odpovídající signálům aromatického jádra, multiplet při 5,57 ppm s integrálem dva odpovídající dvěma benzylovým vodíkům a singlet při 3,77 ppm s integrálem tři odpovídající signálům vodíkům aromatické methoxy-skupiny. Dále lze ve spektru nalézt charakteristické dublety odpovídající $H-1$ vodíkům kyseliny dihydrobetulonové (**IV**) při 2,97 ppm a 2,18 ppm, oba s integrálem jedna.

4.3.2 Fenyl-1,2,3-triazolové deriváty

Dalším aminem využitým v této reakci byl hydrochlorid anilinu (**XV**), který měl poskytovat fenyl-1,2,3-triazolové deriváty příslušných triterpenických kyselin. Jak již bylo zmíněno výše, očekávaly jsme, že tvorba těchto derivátů nebude probíhat tak snáze jako příprava předchozích *p*-methoxybenzyltriazolových derivátů **XVII–XX**, kvůli přítomnosti objemných methylů C-23 a C-24 na A-kruhu terpenu a stericky blíže položenému fenylowému substituentu. První reakce byla provedena na kyselině ursonové (**II**) za použití 1,0 ekvivalentu kyseliny ursonové (**II**), 1,4 ekvivalentu hydrochloridu anilinu (**XV**) a 1,0 ekvivalentu *p*-nitrofenylazidu (**IX**), dle lit.⁶⁴ (Schéma č. 23).

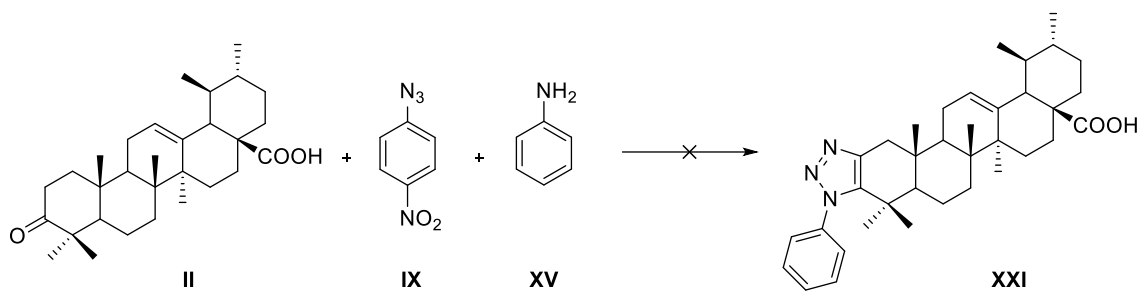


Schéma č. 23: Navržené schéma přípravy fenyl-1,2,3-triazolového derivátu **XXI** odvozeného od kyseliny ursonové (**II**).

Reakce byla prováděna pouze v analytickém množství ze 20 mg výchozí kyseliny **II**. Po 24 hodinách byl pomocí TLC detekován produkt, který měl hodnotu retardačního faktoru velice podobnou výchozí kyselině **II**, nicméně byl od ní velmi dobře rozpoznatelný díky tmavě modrému zbarvení a emisi záření pod UV lampou (výchozí kyselina **II** se na TLC po vizualizaci barví hnědě a pod UV neemituje žádné světlo). Jelikož na TLC destičce nebyla patrná žádná jiná výrazná skvrna a také díky přítomnosti skvrny *p*-nitroanilinu (**VII**), který se, coby vedlejší produkt reakce, nachází na TLC destičce vždy po provedení triazolizace, byla tato skvrna považována za produkt **XXI**. Kvůli blízkému retardačnímu faktoru, a tudíž předpokládanému obtížnému dělení této směsi, jsme se pokusily zvýšit konverzi navýšením počtu ekvivalentů anilinu (**XV**) na 5,0 a navýšením počtu ekvivalentů *p*-nitrofenylazidu (**IX**) na 1,4, což jsou poměry reaktantů používané pro přípravu nesubstituovaných derivátů. Reakce byla za upravených podmínek ponechána reagovat dalších 48 hodin, ovšem bez výrazné změny konverze, která ve výsledku činila zhruba 40 %.

Další optimalizační reakce s anilinem (**XV**) byly v analytickém měřítku prováděny na allobetulon (I) (Schéma č. 24).

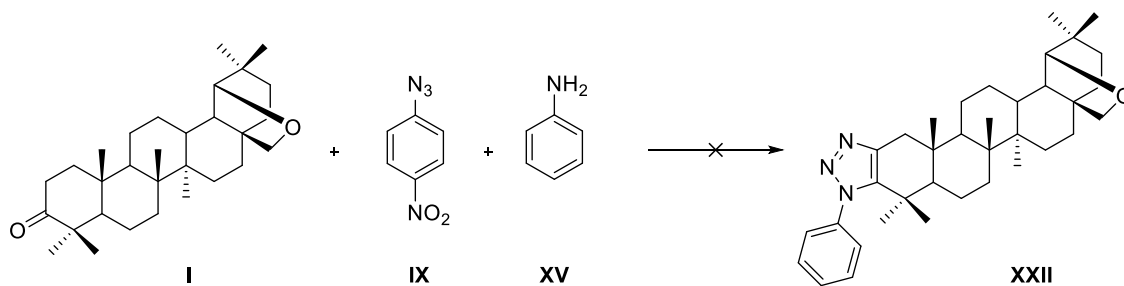


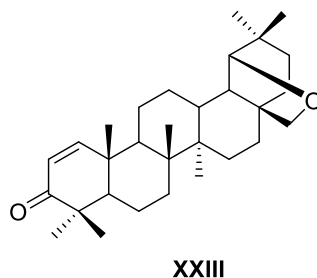
Schéma č. 24: Navržené schéma přípravy fenyl-1,2,3-triazolového derivátu **XXII** odvozeného od allobetulon (I).

Při použití 5,0 ekvivalentů anilinu (**XV**) a 1,4 ekvivalentů *p*-nitrofenylazidu (**IX**), již nedocházelo po 48 hodinách ke změně konverze, která se pohybovala kolem 40 %. Proto byl v dalších reakcích zvýšen počet ekvivalentů anilinu (**XV**) nejprve na 10,0 a posléze až na 20,0 ekvivalentů za zachování 1,4 ekvivalentů azidu **IX**, nicméně ani v těchto případech nedošlo po 48 hodinách ke zvýšení konverze. Ke zlepšení situace nepřispěla ani kyselá katalýza kyselinou octovou (30 mol%) v kombinaci s 5,0 ekvivalenty anilinu (**XV**) a 1,4 ekvivalenty azidu **IX** (Tab. č. 10)

Ekv. anilinu (XV)	Ekv. azidu IX	Konverze	Poznámky
5,0	1,4	40 %	-
5,0	1,4	40 %	kys. katalýza
10,0	1,4	40 %	-
20,0	1,4	40 %	-

Tab. č. 10: Sumarizace neúspěšných optimalizačních reakcí na allobetulonů (**I**). Všechny reakce probíhaly v DMF při 100 °C, 48 hodin.

Po sérii neúspěšných reakcí byly další experimenty s anilinem (**XV**) odloženy do doby, než byly nalezeny optimalizované podmínky pro přípravu *p*-methoxybenzyltriazolových derivátů **XVII–XX**. Tyto podmínky pak byly aplikovány na reakci s allobetulonem (**I**) v analytickém měřítku. Při použití 1,0 ekvivalentu allobetulonů (**I**), 5,0 ekvivalentu anilinu (**XV**) a 2,0 ekvivalentů *p*-nitrofenylazidu (**IX**) v DMF či NMP reakce poskytly vyšší konverzi, a to zhruba 70 %. Pro srovnání byly ještě testovány podmínky za použití dvojnásobného množství reaktantů: 10,0 ekvivalentů anilinu (**XV**) a 4,0 ekvivalentů azidu **IX** již pouze v NMP. V tomto případě došlo dle TLC k více než 90% konverzi výchozí látky, reakční směs jí v tomto případě obsahovala jen stopy. Reakce byla za těchto podmínek nasazena ve větším množství, což vedlo k izolaci domnělého produktu. Jeho následná analýza pomocí ¹H NMR a HRMS ovšem prokázala, že se nejedná o triazol **XXII** nýbrž o allobetulon-1-en (**XXIII**) (Obr. č. 24).



Obr. č. 24: *Hlavní produkt reakce allobetulon-1-en (XXIII).*

Tento derivát byl již dříve popsán, jeho ^1H NMR spektrum se shoduje s literaturou⁷² a jeho vznik byl potvrzen i pomocí HRMS. Příprava allobetulon-1-enu (XXIII) byla doposud popsána buď eliminační reakcí z 2-bromallobetulon^{73,74} nebo oxidací allobetulinu kyselinou 2-jodoxybenzoovou⁷², jedná se tudíž o další metodu přípravy této sloučeniny. Allobetulon-1-en (XXIII) byl touto reakcí připraven ve výtěžku 80 %. Obdobný produkt reakce byl dle TLC pozorován také v případě kyseliny ursonové (II) a kyseliny oleanonové (III).

Přítomnost *p*-nitroanilinu (VII) na TLC destičce vzbuzovala dojem, že by fenylnitroderivát XXII mohl v reakci vznikat alespoň minoritně, ovšem separací reakční směsi pomocí sloupcové chromatografie a následnou NMR analýzou nebyla přítomnost produktu XXII potvrzena.

Použití derivátů anilinu v Triazolizační reakci může být limitou této reakce, minimálně v kombinaci se sloučeninami triterpenického charakteru. V původní literatuře⁶⁴ byl připraven pouze jediný triazolový derivát odvozený od derivátu anilinu, jež byl syntetizován reakcí acetofenonu (XXIV) a *p*-methoxyanilinu (XXV) (Schéma č. 25). Triazol XXVI byl získán po 48 hodinách ve výtěžku 25 %.

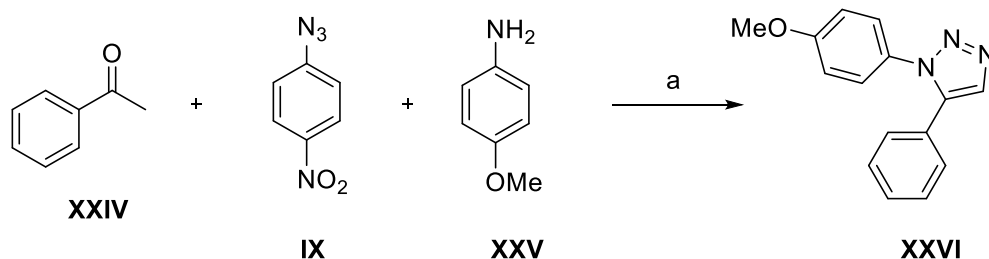


Schéma č. 25: *Jediný připravený triazolový derivát odvozený od derivátu anilinu. Podmínky: (a) 30 mol% CH_3COOH , bezvodý toluen, 100 °C, molekulová síta, 48 hodin, 25 %.⁶⁴*

Tak nízký výtěžek reakce na jednoduchých substrátech vzbuzuje pochyby, zda bude možné kvůli sterickému bránění triterpenických methylů C-23 a C-24 připravit fenyltriazoly také na triterpenických skeletech. Problematice přípravy fenyltriazolů se budeme v budoucnu dále věnovat.

4.3.3 Triazoly odvozené od aminokyselin

Posledním aminem, zařazeným do studia využitelnosti Triazolizační reakce na triterpenech, byl L-fenylalanin *tert*-butyl ester (**XVI**). Triazolizační reakcí již byla připravena celá řada 1,2,3-triazolů odvozených od chráněných aminokyselin, zároveň ve všech případech docházelo k zachování konfigurace na chirálním centru.⁷⁵

Kvůli nedostatku výchozího chráněného fenylalaninu byly provedeny pouze reakce na allobetulonů (**I**), a poté na kyselině dihydrobetulonové (**IV**). Kyselina dihydrobetulonová (**IV**) byla vybrána proto, že na této kyselině bylo dosaženo nejvyšších výtěžků u *p*-methoxybenzyltriazolových derivátů.

4.3.3.1 *Tert*-butyl-3-fenylpropionát-2-yl 1,2,3-triazol allobetulonů **XXVII**

Triazol **XXVII** byl připraven reakcí allobetulonů (**I**) s hydrochloridem L-fenylalanin *tert*-butyl esteru (**XVI**) a *p*-nitrofenylazidu (**IX**) (Schéma č. 26).

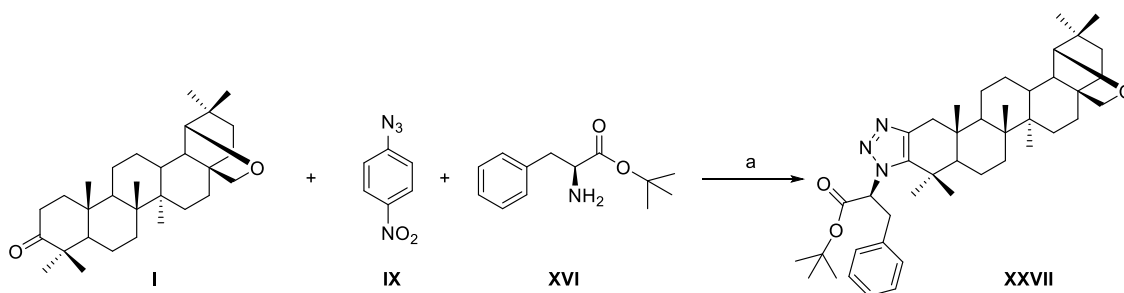


Schéma č. 26: *Obecné schéma přípravy triazolu **XXVII**. Podmínky: (a) bezvodé rozpouštědlo, 100 °C, molekulová síta, 24–48 h.*

Byly provedeny dvě optimalizační reakce. V prvním případě byly převzaty počty ekvivalentů z literatury⁶⁴: byl použit 1,0 ekvivalent allobetulonů (**I**), 1,4 ekvivalent L-fenylalanin *tert*-butyl esteru (**XVI**) a 1,0 ekvivalent *p*-nitrofenylazidu (**IX**). Reakce byla prováděna v DMF rovnou při 100 °C, ovšem ani za 48 hodin nedošlo k úplnému zreagování výchozího allobetulonů. Triazol **XXVII** byl touto reakcí připraven ve výtěžku 24 %. Druhá reakce byla provedena již za optimalizovaných podmínek: 1,0 ekvivalentu allobetulonů (**I**), 5,0 ekvivalentu L-fenylalanin *tert*-butyl esteru (**XVI**) a 2,0 ekvivalentu *p*-nitrofenylazidu (**IX**) při 100 °C. Reakce byla prováděna v NMP, protože v právě

v tomto rozpouštědle probíhala nejlépe reakce za vzniku *p*-methoxybenzyltriazolového derivátu **XXVII**. Zavedení optimalizovaných podmínek vedlo jen k nepatrnému zvýšení konverze oproti předchozí reakci, avšak i přesto byl triazol **XXVII** po 24 hodinách připraven ve výtěžku 40 % (Tab. č. 11).

Ekv. XVI	Ekv. IX	Rozpouštědlo	Reakční s.	Výtěžek
1,4	1,0	DMF	P + VL	24 %
5,0	2,0	NMP	P + VL	40 %

Tab. č. 11: Přehled reakcí vedoucích k derivátu **XXVII**. Všechny reakce probíhaly při 100 °C, reakce v DMF probíhala 48 hodin, reakce v NMP probíhala 24 hodin.

Struktura triazolu **XXVII** byla potvrzena ¹H NMR spektrem, ve kterém byly nalezeny signály charakteristické pro *tert*-butyl 3-fenylpropionátový substituent: dva multiplety, jeden s integrálem tři při 7,11 ppm a druhý s integrálem dva při 6,89 ppm, odpovídající signálům fenylu, dublet dubletu s integrálem jedna při 5,04 odpovídající vodíku na C-2 substituentu, dva dublety dubletů odpovídající dvěma benzylovým vodíkům, první s integrálem jedna při 3,86 ppm, signál druhého vodíku splývá se signálem skeletálního vodíku H-19 v multiplet s integrálem dva při 3,57 ppm a nakonec singlet s integrálem devět při 1,41 ppm odpovídající chránící *tert*-butylové skupině. Dále lze ve spektru nalézt charakteristické dublety odpovídající H-1 vodíkům allobetulonů (**I**) při 2,93 ppm a 2,15 ppm, oba s integrálem jedna. Dle předpokladů byl v ¹H NMR spektru pozorován pouze jediný signál vodíku chirálního centra substituentu, z čehož usuzujeme, že vznikl pouze jeden diastereoizomer se zachovalou konfigurací chirálního centra výchozího L-fenylalaninu, jako bylo popsáno v literatuře.⁷⁵

4.3.3.2 *Terc-butyl-3-fenylpropionát-2-yl 1,2,3-triazol kyseliny dihydrobetulonové XXVIII*

Derivát **XXVIII** byl připraven reakcí kyseliny dihydrobetulonové (**IV**) s L-fenylalanin *tert*-butyl esterem (**XVI**) a *p*-nitrofenylazidem (**IX**) (Schéma č. 27).

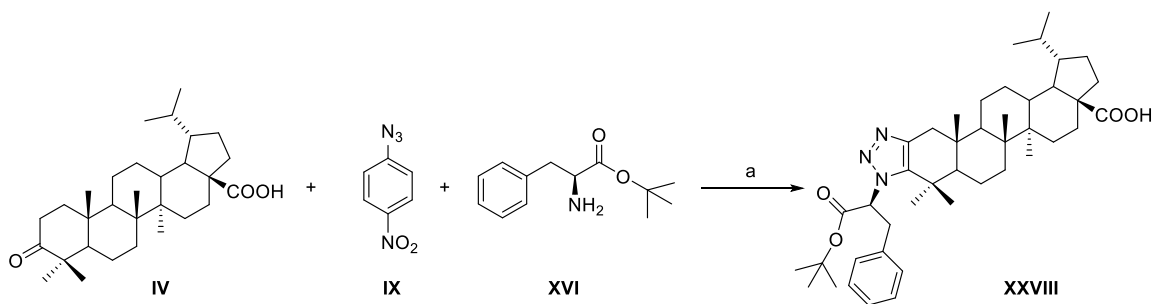


Schéma č. 27: Obecné schéma přípravy triazolu **XXVIII**. Podmínky: (a) bezvodé DMF, 60–100 °C, molekulová síta, 48 h.

Reakce za účelem získání derivátu **XXVIII** byla provedena pouze jedna, a to za optimalizovaných podmínek převzatých z reakce vedoucí k *p*-methoxybenzyltriazolovému derivátu **XX**. Bylo použito 1,0 ekvivalentu kyseliny dihydrobetulonové (**IV**), 5,0 ekvivalentu L-fenylalanin *tert*-butyl esteru (**XVI**) a 2,0 ekvivalentu *p*-nitrofenylazidu (**IX**). Reakce probíhala v DMF při 60 °C, nicméně ani po 24 hodinách nedocházelo dle TLC ke konverzi výchozího terpenu **IV**. Současně nedocházelo k úplnému rozpuštění výchozích látek ani k charakteristickému ztmavnutí reakční směsi, a proto byla teplota reakce zvýšena na 100 °C. Již po 30 minutách došlo k rozpuštění všech výchozích komponent a k charakteristickému ztmavnutí reakční směsi. Reakce byla ponechána reagovat při 100 °C dalších 24 hodin. Dle TLC bylo patrné, že za těchto podmínek již ke konverzi dochází, i když nedošlo k úplnému zreagování výchozího triterpenu **IV**. Triazol **XXVIII** byl po 48 hodinách připraven ve výtěžku 29 %.

Struktura triazolu **XXVIII** byla potvrzena ¹H NMR spektrem, ve kterém byly nalezeny signály charakteristické pro *tert*-butyl 3-fenylpropionátový substituent: dva multiplety, jeden s integrálem tři při 7,11 ppm a druhý s integrálem dva při 6,90 ppm, odpovídající signálům fenylu, dublet dubletu s integrálem jedna při 5,05 odpovídající vodíku na C-2 substituentu, dva dublety dubletů odpovídající dvěma benzylovým vodíkům, každý s integrálem jedna při 3,87 ppm a 3,57 ppm a nakonec singlet s integrálem devět při 1,42 ppm odpovídající chránící *tert*-butylové skupině. Dále lze ve spektru nalézt charakteristické dublety odpovídající H-1 vodíkům allobetulonů (**I**) při 2,92 ppm a 2,13 ppm, oba s integrálem jedna. Dle předpokladů byl v ¹H NMR spektru pozorován pouze jediný signál vodíku chirálního centra substituentu, z čehož usuzujeme, že vznikl pouze jeden diastereoizomer se zachovalou konfigurací chirálního centra výchozího L-fenylalaninu, jako bylo popsáno v literatuře.⁷⁵

4.3.3.3 Experimenty s nechráněným L-fenylalaninem

Při provádění experimentů s chráněnou aminokyselinou vyvstala otázka, zda objemná *tert*-butylová chránicí skupina nebude komplikovat již tak stericky náročnou reakci. Experimenty popsané v literatuře⁶⁴ ukázaly, že reakce je kompatibilní s řadou funkčních skupin nacházející se na reakčním bloku aminu, nicméně vliv karboxylové funkce ještě prozkoumán nebyl. Proto byla provedena triazolizace s nechráněným L-fenylalaninem **XXIX** na allobetulonu (**I**) (Schéma č. 28).

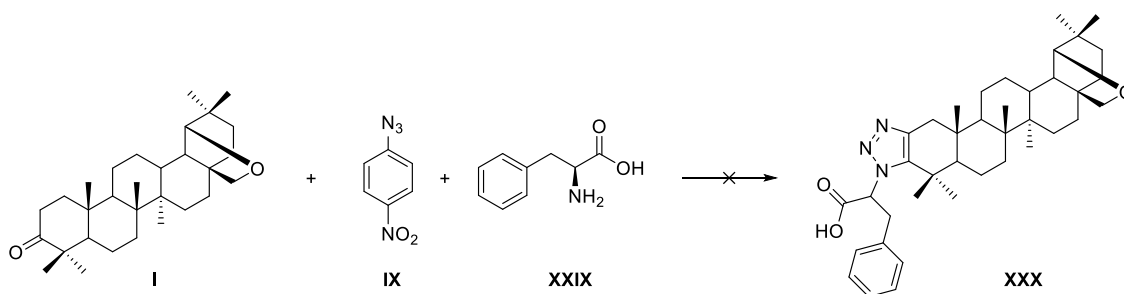


Schéma č. 28: Předpokládané schéma přípravy triazolu **XXX**.

Reakce byla provedena za optimalizovaných podmínek, tedy za použití 1,0 ekvivalentu allobetulonu (**I**), 5,0 ekvivalentu L-fenylalaninu (**XXIX**) a 2,0 ekvivalentu *p*-nitrofenylazidu (**IX**) v NMP. Na TLC nebyl po 24 hodinách patrný žádný produkt, pouze výchozí látky a skvrna *p*-nitroanilinu (**VII**). Ani po rozdělení složité reakční směsi pomocí sloupcové chromatografie a analýzou jednotlivých frakcí nebyl produkt **XXX** detekován.

Triazolizační reakcí lze připravit 1,2,3-triazolové deriváty triterpenů odvozené od chráněných aminokyselin. Podařilo se připravit *tert*-butyl-3-fenylpropionát-2-yl 1,2,3-triazoly od allobetulonu (**XXVII**) a kyseliny dihydrobetulonové (**XXVIII**), avšak zatím s nižšími výtěžky. Reakce s nechráněným L-fenylalaninem nebyla za použitých podmínek pozorována, nicméně se této problematice budeme v budoucnu dále věnovat.

5 Cytotoxická aktivita připravených derivátů

Všechny připravené látky byly nebo právě jsou testovány na cytotoxickou aktivitu na osmi nádorových buněčných liniích různého histogenetického původu a na dvou liniích nenádorových fibroblastů (BJ a MCR-5). Prozatím jsou výsledky známy pouze pro sérii nesubstituovaných triazolů **X–XIII** a pro dva *p*-methoxybenzyltriazolové deriváty **XVII** a **XVIII**.

Výsledky jsou sumarizovány v tabulce (Tab. č. 1). Cytotoxická aktivita je zde udávána jako IC₅₀ v μM. Jedná se o nejnižší koncentraci, která usmrtí 50 % testovaných buněk. Pokud některá látka vykázala aktivitu > 50 μM, je považována na dané linii za neaktivní (NA). Výsledky jsou u všech derivátů pouze předběžné a zatím pro většinu z nich nebyla stanovena přesná hodnota IC₅₀.

	CCRF-CEM	CEM-DNR	HCT116	HTC116 p53-	K562	K562-TAX	U2OS	A549	MRC-5	BJ
X	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
XI	20,5	27,7	35,0	44,8	NA	24,5	44,6	44,6	NA	NA
XII	<50	NA	<50	<50	NA	<50	<50	NA	NA	NA
XIII	<50	NA	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	NA
XVII	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
XVIII	<50	NA	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50	<50

Tab. č. 12: Výsledky testování cytotoxické aktivity *in vitro*. Standardní odchylka při měření cytotoxické aktivity je 10 % z průměrné hodnoty.

Deriváty odvozené od allobetulonu (jak nesubstituovaný 1,2,3-triazolový derivát **X**, tak *p*-methoxybenzyltriazolový derivát **XVII**) jsou nepřekvapivě na všech liniích neaktivní. Naopak nesubstituovaný 1,2,3-triazol kyseliny ursonové **XI** vykazuje nevyšší hodnoty cytotoxické aktivity na leukemických liniích (CCRF-CEM, CEM-DNR a K562-TAX) v rozsahu 20,5–27,7 μM a současně je neaktivní na obou liniích nenádorových fibroblastů. Výsledky cytotoxicity pro další nesubstituované deriváty kyselin **XII** a **XIII** nejsou kompletní, nicméně je zřejmé, že na řadě nádorových liniích aktivní jsou. *p*-Methoxybenzyltriazolový derivát kyseliny ursonové **XVIII** vykazuje cytotoxickou aktivitu <50 μM na téměř všech nádorových liniích, ale zároveň také na obou liniích nenádorových fibroblastů.

6 Závěr

Cílem této práce bylo optimalizovat podmínky Triazolizační reakce pro její aplikaci v chemii triterpenů a následně připravit několik nových triterpenoidních 1,2,3-triazolů, plně je charakterizovat spektrálními daty (NMR, HRMS, IR spektroskopie) a nechat tyto deriváty otestovat na cytotoxickou aktivitu.

Nejprve byly připraveny nezbytné výchozí látky: kyselina ursonová (**II**), kyselina oleanonová (**III**) a *p*-nitrofenylazid (**IX**).

V dalším kroku byly připraveny celkem čtyři nesubstituované 1,2,3-triazolové deriváty **X–XIII** od čtyřech různých triterpenických skeletů, reakcí těchto triterpenů s *p*-nitrofenylazidem (**IX**) a octanem amonným. Počet ekvivalentů reaktantů vedoucí k těmto triazolům byl převzat z literatury a bylo zjištěno, že reakce vedoucí k těmto derivátům probíhají nejlépe při 100 °C ve výtěžku, který se pohyboval mezi 67–80 %, a to buď v bezvodém dimethylformamidu či *N*-methylpyrrolidonu. Z výsledků vyplývá, že obě rozpouštědla jsou vhodná pro přípravu tohoto typu triazolových derivátů.

Dále byly optimalizovány podmínky pro přípravu substituovaných triazolových derivátů. Nejprve byly připraveny čtyři *p*-methoxybenzyltriazolové deriváty **XVII–XX**. Bylo provedeno několik reakcí, ve kterých byly optimalizovány počty ekvivalentů reagentů, teplota či použitá rozpouštědla. Jako nejlepší poměr reagentů se ukázalo býti použití 1,0 ekvivalentu výchozího triterpenu **I–IV**, 5,0 ekvivalentů *p*-methoxybenzylaminu (**XIV**) a 2,0 ekvivalentů *p*-nitrofenylazidu (**IX**). Co se týče vlivu teploty, reakce na allobetulon (**I**) běžela nejlépe při 100 °C, zatímco reakce na kyselinových skeletech **II–IV** při 60 °C. Vliv rozpouštědla je opět diskutabilní, v některých případech reakce probíhala lépe v dimethylformamidu, v jiných v *N*-methylpyrrolidonu, nicméně obě tato rozpouštědla jsou pro reakci vhodná. Deriváty **XVII–XX** se podařilo připravit ve výtěžcích 58–65 %.

Dále měly být připraveny také fenyiltriazolové deriváty odvozené od anilinu, nicméně v tomto případě reakce neprobíhala ve smyslu Triazolizační reakce a hlavním produktem na allobetulon (**I**) byl allobetullon-1-en (**XXIII**). Stejná reakce byla pozorována také v případě kyseliny ursonové (**II**) a kyseliny oleanonové (**III**), z čehož vyplývá, že použití derivátů anilinu je pravděpodobně limitem této reakce minimálně v kombinaci se sloučeninami triterpenického charakteru.

Optimalizované podmínky z přípravy *p*-methoxybenzyltriazolových derivátů **XVII–XX** byly aplikovány pro přípravu *tert*-butyl-3-fenylpropionát-2-yl triazolových derivátů odvozených od allobetulonu (**I**) a kyseliny dihydrobetulonové (**IV**). Substituovaný 1,2,3-triazol allobetulonu **XXVII** byl připraven ve výtěžku 40 % a derivát odvozený od kyseliny dihydrobetulonové **XXVIII** pak ve výtěžku 29 %. Oba dva deriváty se podařilo připravit jako jeden diastereoizomer se zachovalou konfigurací na chirálním centru aminokyseliny. Dále nutno podotknout, že v obou případech nedocházelo k úplnému zreagování výchozí látky, čímž vzniká prostor pro další optimalizaci podmínek vedoucích k propionát-1,2,3-triazolovým derivátům triterpenů.

Závěrem lze tedy konstatovat, že se podařilo optimalizovat Triazolizační reakci pro přípravu nesubstituovaných a substituovaných 1,2,3-triazolů na triterpenech. Byly připraveny čtyři nesubstituované 1,2,3-triazoly **X–XIII**, čtyři *p*-methoxybenzyltriazolové deriváty **XVII–XX** a dva *tert*-butyl-3-fenylpropionát-2-yl triazolové deriváty **XXVII** a **XXVIII**. Plánované fenyltriazolové deriváty se připravit nepodařilo, stejně tak triazoly odvozené od nechráněného L-fenylalaninu. Tyto reakce budou v budoucnu dále optimalizovány a bude zkoumáno, zda-li je opravdu použití derivátů anilinu limitem této reakce na triterpenech.

7 Experimentální část

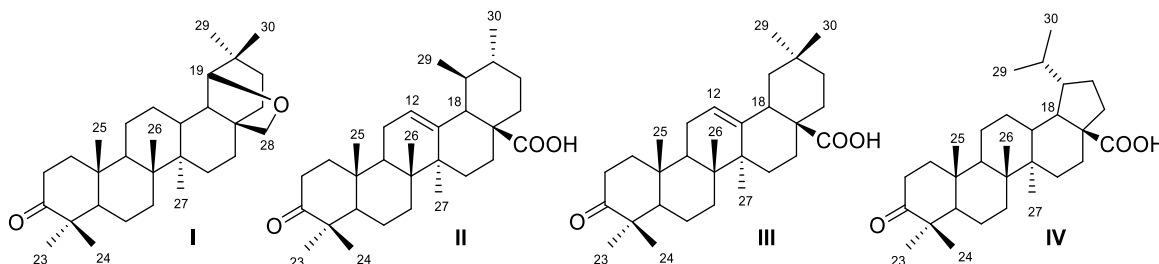
7.1 Obecné poznámky k experimentální části

1. Teploty tání byly měřeny na bodotávku Stuart Melting Point Apparatus SMP30.
2. Infračervená spektra byla měřena na FTIR spektrometru Nicolet iZ10 se střední oblastí v rozmezí 400–4000 cm^{-1} . Spektra byla zpracována v programu OMNIC 8.3.
3. ^1H a ^{13}C NMR spektra byla měřena na přístroji JEOL (500 MHz) za laboratorní teploty a za použití CDCl_3 , CD_3OD nebo $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ jako rozpouštědla. Chemické posuny ^1H a ^{13}C NMR spekter byly referencovány vůči signálu reziduálního CHCl_3 v CDCl_3 při 7,26 ppm a 77,16 ppm či vůči signálu reziduálního CH_3OH v CD_3OD při 3,31 ppm a 49,00 ppm nebo vůči signálu reziduálního DMSO v $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ při 2,50 ppm a 39,52 ppm. Chemické posuny (v ppm) a interakční konstanty (v Hz) byly určovány analýzou prvního řádu. Hodnoty pro chemický posun byly zaokrouhleny na dvě desetinná místa, zatímco hodnoty interakčních konstant na jedno desetinné místo. Všechna spektra byla vyhodnocována pomocí programu MestReNova.
4. HRMS spektra byla změřena pomocí kapalinového chromatografu Dionex UltiMate 3000, Thermo Fisher Scientific a hmotnostního spektrometru Exactive Plus Orbitrap high-resolution Thermo Fischer Scientific s ionizačním zdrojem elektrosprejem či APCI. Chromatografická separace byla provedena za použití kolony Phenomenex Gemini (C18, 50 x 2 mm, 3 μm částice), eluce izokratická, MF 95% MeOH + 5% voda + 0.1% HCOOH.
5. Průběh reakcí byl sledován pomocí TLC foliích Kieslelgel 60 G254. Detekce probíhala dvojí kontrolou – nejprve pod UV zářením (254 nm) a následně ponořením TLC fólie do roztoku 10% kyseliny sírové a jejím zahřátím na 150–200 $^\circ\text{C}$.
6. Eluční soustavy používané pro vyvíjení TLC folií:
 - A. Tol/Et₂O 1:1
 - B. Tol/Et₂O 5:1 + 0,1 % AcOH

C. Hex/EtOAc 5:1

7. Sloupcové chromatografie byly provedeny za použití Kieselgelu 60. Použité mobilní fáze jsou uvedeny u jednotlivých experimentů.
8. Odpařování rozpouštědel probíhalo na RVO značky Büchi Rotavapor R-200.
9. Reakce byly prováděny opakovaně, a to se změnou teploty, rozpouštědla či počtu ekvivalentů azidu a aminu, což je detailně popsáno v kapitole Výsledky a diskuze. V experimentální části jsou popsány optimalizované reakční postupy, při kterých bylo dosaženo nejvyšších výtěžků.
10. Všechny připravené deriváty byly nebo v blízké době budou podrobeny testování na cytotoxickou aktivitu na pracovišti doc. MUDr. M. Hajdúcha, Ph.D. pomocí MTS testu.

7.2 Charakteristické signály skeletálních vodíků triterpenů v ^1H NMR spektrech



Obr. č. 25: *Výchozí látky s očíslovanými atomy, které jsou pro ně v ^1H NMR spektru charakteristické.*

Allobetulon (**I**) je charakteristický dvěma dublety s integrály jedna kolem 3,80 ppm pro H-28a a kolem 3,46 ppm pro H-28b. Dalším charakteristickým signálem je singlet s integrálem jedna kolem 3,55 ppm odpovídající H-19, a poté sedm singletů s integrálem tři v rozmezí 1,25–0,80 ppm odpovídající sedmi methylovým skupinám (H-23, H-24, H-25, H-26, H-27, H-29, H-30).

Kyselina ursonová (**II**) má charakteristický signál kolem 5,27 ppm, kterým je multiplet s integrálem jedna odpovídající H-12 a další multiplet s integrálem jedna kolem 2,22 ppm odpovídající vodíku H-18. Sedm singletů či dubletů, každý s integrálem tři, v rozmezí 1,29–0,78 ppm odpovídá sedmi methylovým skupinám (H-23, H-24, H-25, H-26, H-27, H-29, H-30).

Kyselina oleanonová (**III**) má charakteristický signál kolem 5,30 ppm, kterým je multiplet s integrálem jedna odpovídající H-12 a další multiplet či dublet dubletu s integrálem jedna kolem 2,85 ppm odpovídající vodíku H-18. Sedm singletů, každý s integrálem tři, v rozmezí 1,28–0,78 ppm odpovídá sedmi methylovým skupinám (H-23, H-24, H-25, H-26, H-27, H-29, H-30).

Kyselina dihydrobetulonová (**IV**) je charakteristická svým multipletem s integrálem jedna kolem 2,30 ppm, který odpovídá vodíku H-18 a sedmi singlety/dublety, každý s integrálem tři, v rozmezí 1,24–0,76 ppm, patří sedmi methylovým skupinám (H-23, H-24, H-25, H-26, H-27, H-29, H-30).

Další signály charakteristické pro skeletální vodíky triterpenů se nachází v oblasti kolem 2,0–1,30 ppm, kdy tyto signály nejsou obvykle v odborné literatuře procesovány.

7.3 Obecný postup zpracování reakčních směsí

- A. Reakční směs byla nalita do desetinásobného množství destilované vody a produkt reakce byl 3× extrahován ethylacetátem. Organické frakce byly následně spojeny, promyty destilovanou vodou (v případě kyselin **II** a **III** nasyceným roztokem NaHCO₃), vysušeny MgSO₄ a rozpouštědlo bylo odpařeno na RVO.
- B. Vodná reakční směs byla 3× extrahována ethylacetátem, spojené organické frakce byly promyty nasyceným roztokem NaHCO₃ a solankou, vysušeny MgSO₄ a rozpouštědlo bylo odpařeno na RVO.
- C. Reakční směs byla nalita do desetinásobného množství solanky a produkt reakce byl 3× extrahován ethylacetátem. Organické frakce byly spojeny, promyty solankou, vysušeny MgSO₄ a rozpouštědlo bylo odpařeno na RVO.

7.4 Příprava výchozích látek

7.4.1 Příprava kyseliny ursonové (**II**)

Kyselina ursolová **V** (10,0 g, 0,02 mol), dichroman draselný (10,3 g, 0,04 mol) a octan sodný trihydrát (2,7 g, 0,02 mol) byly rozpuštěny ve směsi dioxanu (250 ml), kyseliny octové (80 ml) a acetanhydridu (34 ml). Vzniklý roztok se poté míchal za r.t. 19 hodin, postupně docházelo k černání reakční směsi. Průběh reakce byla monitorován pomocí TLC (mobilní fáze B). Po ukončení reakce byla reakční směs zpracována podle obecného

postupu A. Byly získány nazelenalé krystaly, které byly čištěny sloupcovou chromatografií na silikagelu (500 ml) za použití mobilní fáze Hex/EtOAc 7:1 + 0,1 % AcOH. Po purifikaci byly získány bílé krystaly kyseliny ursonové (**II**) (8,0 g, 80 %). ¹H NMR spektrum se shodovalo s literaturou.⁶⁹

7.4.2 Příprava kyseliny oleanonové (**III**)

Kyselina oleanolová **VI** (20,0 g, 0,04 mol), dichroman draselný dihydrát (18,3 g, 0,06 mol) a octan sodný (7,2 g, 0,09 mol) byly rozpuštěny ve směsi dioxanu (320 ml), kyseliny octové (102 ml) a acetanhydridu (38 ml). Vzniklý roztok se poté míchal za r.t. 24 hodin, postupně docházelo k černání reakční směsi. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC (mobilní fáze C). Po ukončení reakce byla reakční směs zpracována podle obecného postupu A. Byly získány nazelenalé krystaly, které byly čištěny sloupcovou chromatografií na silikagelu (600 ml) za použití mobilní fáze Hex/EtOAc 5:1. Po purifikaci byly získány bílé krystaly kyseliny oleanonové (**III**) (14,7 g, 74 %). ¹H NMR spektrum se shoduje s literaturou.⁷⁰

7.4.3 Příprava *p*-nitrofenylazidu (**IX**)

p-Nitroanilin **VII** (10 g, 0,07 mol) byl rozpuštěn v roztoku kyseliny chlorovodíkové (21 ml 35% HCl v 86 ml destilované vody) a methanolu (21 ml). Vzniklý žlutý roztok byl ochlazen pomocí ledové lázně se solí na 0 °C a následně byl po kapkách přidáván roztok NaNO₂ (5,9 g (0,09 mol) ve 14,3 ml vody). Po ukončení přikapávání byla reakční směs ještě 30 minut ponechána míchat při 0 °C. Poté byl do reakční směsi pomalu po kapkách (docházelo k silnému pění roztoku) přidán roztok azidu sodného (5,7 g (0,09 mol) ve 21,4 ml vody). Vzniklá reakční směs byla poté hodinu míchána za pokojové teploty, průběh reakce byl monitorována pomocí TLC (mobilní fáze B). Po spotřebování výchozí látky **VII** byla reakční směs zpracována podle obecného postupu B. Získané oranžové krystaly byly poté čištěny pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu (300 ml), jako mobilní fáze byla použita směs Hex/EtOAc 5:1. Po odpaření rozpouštědel byly získány světle oranžové krystaly *p*-nitrofenylazidu (**IX**) (10,5 g, 86 %). ¹H NMR spektrum se shoduje s literaturou.⁷¹

7.5 Příprava nesubstituovaných 1,2,3-triazolových derivátů

7.5.1 Obecný postup přípravy nesubstituovaných 1,2,3-triazolových derivátů

Skleněná reakční vialka (nebo slzová baňka) byla spolu s míchadlem a čtyřmi kuličkami molekulových sít (3–4 Å) vyžihána, a poté proudem dusíku ochlazena na r.t. a uzavřena

septem. Poté byly do reakční nádoby rychle přidány všechny výchozí látky – příslušný 3-oxotriterpenoid **I–IV** (100–105mg, 0,23 mmol), *p*-nitrofenylazid (**IX**) (49 mg, 0,29 mmol) a octan amonný (87 mg, 1,12 mmol), baňka byla opatrně naplněna dusíkem a uzavřena. Přes septum bylo následně přidáno vhodné bezvodé rozpouštědlo (1 ml) a baňka byla umístěna do kovového hnízda/olejové lázně. Reakční směs byla 24 hodin zahřívána na 100 °C, kdy se postupně měnila barva reakční směsi ze světle oranžové na temně rudou. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC (mobilní fáze A). Po ukončení reakce byla tato reakční směs zpracována pomocí obecného postupu A. Surové nažloutlé produkty byly čištěny pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu, a poté krystalizovány ze směsi Hex/EtOAc. Mobilní fáze jsou uvedeny u jednotlivých experimentů.

7.5.2 1*H*-1,2,3-triazolo[2,3-*d*]allobetulon **X**

Triazol **X** byl připraven podle obecného postupu přípravy nesubstituovaných 1,2,3-triazolových derivátů reakcí allobetulonu (**I**), *p*-nitrofenylazidu (**IX**) a octanu amonného v dimethylformamidu. Surový produkt byl čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu (50 ml) za použití gradientu mobilní fáze Tol/Et₂O 5:1–1:1. Poté byl produkt krystalizován ze směsi Hex/EtOAc za zisku bílých krystalů triazolu **X** (84 mg, 80 %), t.t. 330–332 °C. ¹H NMR spektrum bylo shodné s literaturou.⁶⁶

IR spektrum: 3209 (NH), 2925, 2866 (C-H), 1454, 1384, 1141, 987 (C-O), 767 (NH) cm⁻¹. **HRMS:** ESI+ *m/z* vypočteno pro C₃₀H₄₈N₃O [M + H⁺] 466,3792, nalezeno 466,3794.

7.5.3 1*H*-1,2,3-triazolo[2,3-*d*] kyselina ursonová **XI**

Triazol **XI** byl připraven podle obecného postupu přípravy nesubstituovaných triazolových derivátů reakcí kyseliny ursonové (**II**), *p*-nitrofenylazidu (**IX**) a octanu amonného v dimethylformamidu. Surový produkt byl čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu (50 ml), kdy byl nejprve pomocí DCM vymyt *p*-nitroanilin (**VII**) a nezreagovaný azid **IX**, poté následovala gradientová eluce Tol/Et₂O 5:1–1:1. Produkt byl následně krystalizován ze směsi Hex/EtOAc za zisku bílých krystalů triazolu **XI** (75 mg, 68 %), t.t. 275–280 °C.

IR spektrum: 3600–2500 (OH), 3165 (NH), 2949, 2921 (C-H), 1703 (C=O) cm⁻¹. **HRMS:** ESI+ *m/z* vypočteno pro C₃₀H₄₆N₃O₂ [M + H⁺] 480,3585, nalezeno 480,3587. ¹H NMR (500 MHz, (CD₃)₂SO) δ 11.93 (s, 1H, N-H), 5.22–5.19 (m, 1H, H-12), 2.68 (d,

$J = 15.2$ Hz, 1H, H-1a), 2.20–2.13 (m, 2H, H1-b + H-18), 1.23 (s, 3H), 1.13 (s, 3H), 1.08 (s, 3H), 0.92 (s, 3H), 0.85 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H), 0.82 (s, 3H), 0.79 (s, 3H, $7 \times \text{CH}_3$). ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{CD}_3\text{OD} + \text{CDCl}_3$) δ 181.20, 139.07, 125.96, 54.17, 53.78, 48.58, 46.85, 42.95, 40.31, 39.92, 39.72, 39.48, 37.52, 33.68, 33.08, 31.36, 31.15, 30.88, 28.75, 24.89, 23.93, 23.87, 21.44, 19.81, 17.45, 17.22, 16.12.

7.5.4 1*H*-1,2,3-triazolo[2,3-*d*] kyselina oleanonová XII

Triazol XII byl připraven podle obecného postupu přípravy nesubstituovaných 1,2,3-triazolových derivátů reakcí kyseliny oleanonové (III), *p*-nitrofenylazidu (IX) a octanu amonného v *N*-methylpyrrolidonu. Surový produkt byl čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu (70 ml), kdy byl nejprve pomocí DCM vymyt *p*-nitroanilin (VII) a nezreagovaný azid IX, poté následovala gradientová eluce Tol/Et₂O 5:1–1:1. Produkt byl poté krystalizován ze směsi Hex/EtOAc za zisku bílých krystalů triazolu XII (77 mg, 70 %), t.t. 339–341 °C.

IR spektrum: 3600–2600 (OH), 3159 (NH), 2941 (C-H), 1691 (C=O), 1180 (C=O), 753 (NH) cm^{-1} . **HRMS:** ESI+ m/z vypočteno pro $\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{N}_3\text{O}_2$ [$\text{M} + \text{H}^+$] 480,3585, nalezeno 480,3588. ^1H NMR (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 5.26–5.22 (m, 1H, H-12), 2.82–2.75 (m, 1H, H-18), 2.64 (d, $J = 15.3$ Hz, 1H, H-1a), 2.16 (d, $J = 15.4$ Hz, 1H, H-1b), 1.23 (s, 3H), 1.14 (s, 3H), 1.13 (s, 3H), 0.89 (s, 6H), 0.79 (s, 3H), 0.78 (s, 3H, $7 \times \text{CH}_3$). ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{CD}_3\text{OD} + \text{CDCl}_3$) δ 181.70, 144.99, 123.18, 54.54, 47.50, 47.30, 47.05, 42.92, 42.58, 40.46, 39.87, 34.81, 34.01, 33.59, 33.54, 33.10, 31.50, 31.21, 28.72, 26.20, 24.28, 23.96, 20.15, 17.28, 16.03.

7.5.5 1*H*-1,2,3-triazolo[2,3-*d*] kyselina dihydrobetulonová XIII

Triazol XIII byl připraven podle obecného postupu přípravy nesubstituovaných 1,2,3-triazolových derivátů reakcí kyseliny dihydrobetulonové (IV), *p*-nitrofenylazidu (IX) a octanu amonného v *N*-methylpyrrolidonu. Surový produkt byl čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu (70 ml), kdy byl nejprve pomocí DCM vymyt *p*-nitroanilin (VII) a nezreagovaný azid IX, poté následovala gradientová eluce Tol/Et₂O 5:1–1:1. Produkt byl poté krystalizován ze směsi Hex/EtOAc za zisku bílých krystalů triazolu XIII (74 mg, 67 %), t.t. 335–337 °C.

IR spektrum: 3700–2500 (OH), 3120 (NH), 2947, 2867 (C-H), 1684 (C=O), 1206 (C=O), 749 (NH) cm^{-1} . **HRMS:** ESI+ m/z vypočteno pro $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{N}_3\text{O}_2$ [$\text{M} + \text{H}^+$] 482,3741, nalezeno 482,3742. ^1H NMR (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD} + \text{CDCl}_3$) δ 2.84 (d, $J = 15.4$ Hz, 1H,

H-1a), 2.42–2.34 (m, 1H, H-18), 2.16 (d, $J = 15.3$ Hz, 1H, H-1b), 1.30 (s, 3H), 1.19 (s, 3H), 1.02 (s, 3H), 1.01 (s, 3H), 0.87 (d, 3H), 0.80 (s, 3H), 0.78 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, $7 \times \text{CH}_3$). ^{13}C NMR (126 MHz, $\text{CD}_3\text{OD} + \text{CDCl}_3$) δ 180.15, 57.70, 54.50, 49.98, 49.67, 45.28, 43.58, 41.74, 40.02, 39.26, 38.34, 34.40, 33.99, 33.00, 31.07, 30.78, 30.70, 28.00, 23.56, 23.36, 22.48, 19.97, 16.77, 16.23, 15.05, 15.01.

7.6 Příprava *p*-methoxybenzyl-1,2,3-triazolových derivátů

7.6.1 Obecný postup přípravy *p*-methoxybenzyl-1,2,3-triazolových derivátů

Slzová baňka byla spolu s míchadlem a čtyřmi kuličkami molekulových sít (4 Å) vyžihána, a poté proudem dusíku ochlazena na r.t. a uzavřena septem. Poté byly do reakční nádoby rychle přidány výchozí 3-oxotriterpenoidy **I–IV** a *p*-nitrofenylazid (**IX**), baňka byla opatrně naplněna dusíkem a uzavřena. Přes septum bylo následně přidáno vhodné bezvodé rozpouštědlo (1–2 ml) a *p*-methoxybenzylamin **XIV** a baňka byla umístěna do olejové lázně. Reakční směs byla 24 hodin zahřívána na 60–100 °C, kdy se postupně měnila barva reakční směsi z oranžové na temně rudou. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC (mobilní fáze A). Po ukončení reakce byla tato reakční směs zpracována pomocí obecného postupu C. Surové oranžové produkty byly čištěny pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu. Mobilní fáze jsou uvedeny u jednotlivých experimentů.

7.6.2 1-(4-methoxybenzyl)-1,2,3-triazolo[2,3-d]allobetulon **XVII**

Triazol **XVII** byl připraven podle obecného postupu přípravy *p*-methoxybenzyl-1,2,3-triazolových derivátů reakcí allobetulonu (**I**) (100 mg, 0,23 mmol), *p*-nitrofenylazidu (**IX**) (77 mg, 0,46 mmol) a *p*-methoxybenzylaminu (**XIV**) (148 μl , 1,16 mmol) v 1 ml *N*-methylpyrrolidonu při 100 °C. Surový produkt byl čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu (60 ml), kdy byl nejprve pomocí DCM vymyt *p*-nitroanilin (**VII**) a nezreagovaný azid **IX**, poté následovala gradientová eluce Tol/Et₂O 5:1–1:1. Produkt byl poté krystalizován ze směsi Hex/EtOAc za zisku naoranžovělých krystalů triazolu **XVII** (87 mg, 65 %), t.t. 257–259 °C.

IR spektrum: 2925, 2856 (C-H), 1514 (C-C aromát), 1245, 1031 (C-O) cm^{-1} . **HRMS:** ESI+ m/z vypočteno pro $\text{C}_{38}\text{H}_{56}\text{N}_3\text{O}_2$ [$\text{M} + \text{H}^+$] 586,4367, nalezeno 586,4367. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.03–6.99 (m, 2H, Ar-H), 6.85–6.81 (m, 2H, Ar-H), 5.57 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ar}$), 3.81–3.79 (m, 1H, H-28a), 3.78 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3.56 (s, 1H, H-19), 3.45 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H, H-28b), 2.99 (d, $J = 15.3$ Hz, 1H, H-1a), 2.20 (d, $J = 15.3$ Hz, 1H, H-1b),

1.20 (s, 3H), 1.08 (s, 3H), 1.01 (s, 3H), 0.94 (s, 3H), 0.93 (s, 3H), 0.81 (s, 3H), 0.80 (s, 3H, 7 × CH₃). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 159.35, 141.94, 138.01, 128.59, 128.03, 114.26, 88.08, 71.42, 55.40, 54.97, 52.57, 50.04, 46.91, 41.64, 40.87, 40.63, 39.16, 38.83, 36.89, 36.43, 34.44, 33.89, 33.12, 32.87, 28.95, 28.91, 26.68, 26.61, 26.37, 24.69, 21.63, 21.49, 19.02, 16.53, 15.55, 13.61.

7.6.3 1-(4-methoxybenzyl)-1,2,3-triazolo[2,3-d] kyselina ursonová XVIII

Triazol XVIII byl připraven podle obecného postupu přípravy *p*-methoxybenzyl-1,2,3-triazolových derivátů reakcí kyseliny ursonové (II) (100 mg, 0,22 mmol), *p*-nitrofenylazidu (IX) (75 mg, 0,44 mmol) a *p*-methoxybenzylaminu (XIV) (143 μl, 1,11 mmol) v 1 ml dimethylformamidu při 60 °C. Surový produkt byl čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu (60 ml), kdy byl nejprve pomocí DCM vymyt *p*-nitroanilin (VII) a nezreagovaný azid IX, poté následovala gradientová eluce Tol/Et₂O 5:1–1:1 za zisku nažloutlého pevného triazolu XVIII (81 mg, 61 %), t.t. 179–182 °C.

IR spektrum: 3600–2700 (OH), 2924 (C-H), 1692 (C=O), 1513 (C-C, aromát), 1247 (C-O), 750 (C-H, aromát) cm⁻¹. **HRMS:** ESI+ *m/z* vypočteno pro C₃₈H₅₄N₃O₃ [M + H⁺] 600,4160, nalezeno 600, 4162. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.02–6.97 (m, 2H, Ar-H), 6.85–6.80 (m, 2H, Ar-H), 5.60–5.52 (m, 2H, CH₂-Ar), 5.33–5.30 (m, 1H, H-12), 3.77 (s, 3H, OCH₃), 2.91 (d, *J* = 15.3 Hz, 1H, H-1a), 2.27–2.20 (m, 2H, H-1b + H-18), 1.18 (s, 3H), 1.09 (s, 3H), 0.99 (s, 3H), 0.95 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H), 0.89 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H), 0.84 (s, 3H), 0.81 (s, 3H, 7 × CH₃). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 183.25, 159.32, 141.76, 137.96, 128.67, 127.98, 125.89, 114.26, 55.43, 54.76, 52.83, 52.56, 48.20, 46.44, 42.24, 39.59, 39.29, 38.97, 38.81, 38.30, 36.88, 33.75, 32.48, 30.78, 29.84, 29.02, 28.18, 24.21, 23.58, 23.36, 21.60, 21.30, 19.13, 17.18, 17.04, 15.68.

7.6.4 1-(4-methoxybenzyl)-1,2,3-triazolo[2,3-d] kyselina oleanonová XIX

Triazol XIX byl připraven podle obecného postupu přípravy *p*-methoxybenzyl-1,2,3-triazolových derivátů reakcí kyseliny oleanonové (III) (100 mg, 0,22 mmol), *p*-nitrofenylazidu (IX) (75 mg, 0,44 mmol) a *p*-methoxybenzylaminu (XIV) (143 μl, 1,11 mmol) v 1 ml *N*-methylpyrrolidonu při 60 °C. Surový produkt byl čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu (60 ml), kdy byl nejprve pomocí DCM vymyt *p*-nitroanilin (VII) a nezreagovaný azid IX, poté následovala gradientová eluce Tol/Et₂O 5:1–1:1 za zisku světle oranžového pevného triazolu XVIII (76 mg, 58 %), t.t. 187–190 °C.

IR spektrum: 3600–2600 (OH), 2937 (C-H), 1689 (C=O), 1514 (C-C, aromát), 1248, 1177 (C-O), 751,98 (C-H, aromát) cm^{-1} . **HRMS:** ESI+ m/z vypočteno pro $\text{C}_{38}\text{H}_{56}\text{N}_3\text{O}_3$ [$\text{M} + \text{H}^+$] 600,4160, nalezeno 600,4160. **^1H NMR** (500 MHz, CDCl_3) δ 7.02–6.97 (m, 2H, Ar-H), 6.85–6.80 (m, 2H, Ar-H), 5.60–5.52 (m, 2H, CH_2 -Ar), 5.37–5.33 (m, 1H, H-12), 3.77 (s, 3H, O- CH_3), 2.91–2.84 (m, 2H, H-1a + H18), 2.22 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H, H-1b), 1.17 (s, 3H), 1.14 (s, 3H), 1.00 (s, 3H), 0.93 (s, 3H), 0.90 (s, 3H), 0.84 (s, 3H), 0.79 (s, 3H, $7 \times \text{CH}_3$). **^{13}C NMR** (126 MHz, CDCl_3) δ 183.78, 159.32, 143.48, 141.70, 137.97, 128.62, 127.97, 122.71, 114.25, 55.41, 54.70, 52.56, 46.75, 46.54, 45.94, 41.90, 41.26, 39.38, 38.85, 38.07, 33.98, 33.75, 33.20, 32.61, 32.17, 30.83, 28.99, 27.86, 25.80, 23.68, 23.39, 23.02, 21.60, 19.14, 16.91, 15.49.

7.6.5 1-(4-methoxybenzyl)-1,2,3-triazolo[2,3-d] kyselina dihydrobetulonová **XX**

Triazol **XX** byl připraven podle obecného postupu přípravy *p*-methoxybenzyl-1,2,3-triazolových derivátů reakcí kyseliny dihydrobetulonové (**IV**) (200 mg, 0,44 mmol), *p*-nitrofenylazidu (**IX**) (150 mg, 0,89 mmol) a *p*-methoxybenzylaminu (**XIV**) (286 μl , 2,19 mmol) ve 2 ml dimethylformamidu při 60 °C. Surový produkt byl čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu (150 ml), kdy byl nejprve pomocí DCM vymyt *p*-nitroanilin (**VII**) a nezreagovaný azid **IX**, poté následovala gradientová eluce Tol/Et₂O 5:1–1:1 za zisku světle oranžového pevného triazolu **XX** (170 mg, 65 %), t.t. 158–160 °C.

IR spektrum: 3500–2400 (OH), 2950, 2867 (C-H), 1693 (C=O), 1514 (C-C, aromát), 1248, 1176 (C-O), 751 (C-H, aromát) cm^{-1} . **HRMS:** ESI+ m/z vypočteno pro $\text{C}_{38}\text{H}_{56}\text{N}_3\text{O}_3$ [$\text{M} + \text{H}^+$] 602,4316, nalezeno 602,4316. **^1H NMR** (500 MHz, CDCl_3) δ 7.02–6.98 (m, 2H, Ar-H), 6.84–6.80 (m, 2H, Ar-H), 5.60–5.53 (m, 2H, CH_2 -Ar), 3.77 (s, 3H, OCH₃), 2.97 (d, $J = 15.3$ Hz, 1H, H-1a), 2.18 (d, $J = 15.4$ Hz, 1H, H-1b), 1.18 (s, 3H), 1.03 (s, 3H), 0.97 (s, 3H), 0.96 (s, 3H), 0.87 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H), 0.79–0.75 (m, 6H, $7 \times \text{CH}_3$). **^{13}C NMR** (126 MHz, CDCl_3) δ 181.80, 159.27, 141.86, 137.96, 128.53, 127.93, 114.19, 56.93, 55.34, 54.67, 52.50, 49.16, 48.80, 44.25, 42.67, 40.65, 39.00, 38.47, 37.47, 33.80, 33.51, 32.07, 32.00, 30.98, 29.89, 29.79, 28.82, 26.96, 23.07, 22.83, 21.48, 21.38, 18.99, 16.12, 15.88, 14.77, 14.65, 14.18.

7.7 Příprava *terc*-butyl-3-fenylpropionát-1,2,3-triazolových derivátů

7.7.1 Obecný postup přípravy *terc*-butyl-3-fenylpropionát-1,2,3-triazolových derivátů

Slzová baňka byla spolu s míchadlem a čtyřmi kuličkami molekulových sít (4 Å) vyžihána, a poté proudem dusíku ochlazena na r.t. a uzavřena septem. Poté byly do reakční nádoby rychle přidány výchozí 3-oxotriterpenoidy **I** nebo **IV**, *p*-nitrofenylazid (**IX**) a hydrochlorid L-fenylalanin *terc*-butyl esteru (**XVI**), baňka byla opatrně naplněna dusíkem a uzavřena. Přes septum byl následně přidán 1 ml vhodného bezvodého rozpouštědla a baňka byla umístěna do olejové lázně. Reakční směs byla 24–48 hodin zahřívána na 60–100 °C, kdy se postupně měnila barva reakční směsi z oranžové na tmavě hnědou. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC (mobilní fáze A). Po ukončení reakce byla tato reakční směs zpracována pomocí obecného postupu C. Surové žluté produkty byly čištěny pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu. Mobilní fáze jsou uvedeny u jednotlivých experimentů.

7.7.2 1-((*S*)-*terc*-butyl-3-fenylpropionát-2-yl)-1,2,3-triazolo[2,3-*d*] allobetulon **XXVII**

Triazol **XXVIII** byl připraven podle obecného postupu přípravy *terc*-butyl-3-fenylpropionát-1,2,3-triazolových derivátů reakcí allobetulonů (**I**) (100 mg, 0,23 mmol), *p*-nitrofenylazidu (**IX**) (77 mg, 0,46 mmol) a hydrochloridu L-fenylalanin *terc*-butyl esteru (**XVI**) (292 mg, 1,13 mmol) v 1 ml *N*-methylpyrrolidonu při 100 °C za 24 hodin. Surový produkt byl čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu (100 ml), kdy byl nejprve pomocí DCM vymyt *p*-nitroanilin (**VII**) a nezreagovaný azid **IX**, poté následovala mobilní fáze Tol/Et₂O 5:1, purifikace však nebyla dostatečná, a proto byla opakována za použití stejných podmínek (70 ml silikagelu), čímž byl získán pevný žlutý triazol **XXVIII** (60 mg, 40 %), t.t. 205–207 °C.

IR spektrum: 2927, 2863, 1738 (C=O), 1150 (C-O), 755 (C-H, aromát) cm⁻¹. **HRMS:** ESI+ *m/z* vypočteno pro C₄₃H₆₄N₃O₃ [M + H⁺] 670,4942, nalezeno 670,4943. **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃) δ 7.13–7.09 (m, 3H, Ar-H), 6.91–6.87 (m, 2H, Ar-H), 5.04 (dd, *J* = 11.2, 4.0 Hz, 1H, N-C-H), 3.86 (dd, *J* = 13.8, 11.3 Hz, 1H, CH₂-Ar), 3.77 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-28a), 3.59–3.54 (m, 2H, H-19 + CH₂-Ar), 3.44 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-28b), 2.93 (d, *J* = 15.2 Hz, 1H, H-1a), 2.15 (d, *J* = 15.2 Hz, 1H, H-1b), 1.41 (s, 9H, -OtBu), 1.16 (s, 3H), 0.95 (s, 3H), 0.93 (s, 3H), 0.91 (s, 3H), 0.80 (s, 3H), 0.56 (s,

3H), 0.39 (s, 3H, 7 × CH₃). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 167.39, 140.89, 138.95, 136.91, 129.58, 128.55, 127.05, 88.09, 83.16, 71.40, 64.12, 54.98, 49.92, 46.89, 41.63, 40.84, 40.56, 38.91, 38.69, 38.29, 36.88, 36.43, 34.44, 33.51, 33.02, 32.86, 28.94, 28.83, 27.98, 26.65, 26.61, 26.36, 24.70, 21.61, 20.52, 18.94, 16.09, 15.47, 13.60.

7.7.3 1-((*S*)-*tert*-butyl-3-fenylpropionát-2-yl)-1,2,3-triazolo[2,3-d] kyselina dihydrobetulonová XXVIII

Triazol **XXVIII** byl připraven podle obecného postupu přípravy *tert*-butyl-3-fenylpropionát-1,2,3-triazolových derivátů reakcí kyseliny dihydrobetulonové (**IV**) (100 mg, 0,22 mmol), *p*-nitrofenylazidu (**IX**) (74 mg, 0,44 mmol) a hydrochloridu L-fenylalanin *tert*-butyl esteru (**XVI**) (283 mg, 1,10 mmol) v 1 ml dimethylformamidu, nejprve 24 hodin při 60 °C, poté při 100 °C dalších 24 hodin. Surový produkt byl čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu (100 ml), kdy byl nejprve pomocí DCM vymyt *p*-nitroanilin (**VII**) a nezreagovaný azid **IX**, poté následovala mobilní fáze Tol/Et₂O 5:1. Purifikace však nebyla dostatečná, a proto byla opakována za použití stejných podmínek (60 ml silikagelu), čímž byl získán pevný žlutý triazol **XXVIII** (44 mg, 29 %), t.t. 129–133 °C.

IR spektrum: 3600–2500 (OH), 2946, 2867, 1738 (C=O), 1150 (C-O), 754 (C-H, aromát) cm⁻¹. **HRMS:** ESI+ *m/z* vypočteno pro C₄₃H₆₄N₃O₄ [M + H⁺] 686,4891, nalezeno 686,4891. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.13–7.09 (m, 3H, Ar-H), 6.92–6.88 (m, 2H, Ar-H), 5.05 (dd, *J* = 11.2, 4.1 Hz, 1H, N-C-H), 3.87 (dd, *J* = 13.8, 11.2 Hz, 1H, CH₂-Ar), 3.57 (dd, *J* = 13.8, 4.0 Hz, 1H, CH₂-Ar), 2.92 (d, *J* = 15.3 Hz, 1H, H-1a), 2.13 (d, *J* = 15.3 Hz, 1H, H-1b), 1.42 (s, 9H, -OtBu), 1.17 (s, 3H), 0.96 (s, 3H), 0.91 (s, 3H), 0.87 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H), 0.77 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 0.55 (s, 3H), 0.39 (s, 3H, 7 × CH₃). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 181.37, 167.41, 140.90, 138.91, 136.96, 129.60, 128.55, 127.03, 83.22, 64.17, 56.97, 54.78, 49.18, 48.78, 44.24, 42.74, 40.69, 38.83, 38.44, 38.27, 37.56, 33.55, 33.50, 32.10, 31.06, 29.92, 29.86, 28.78, 27.98, 27.08, 23.13, 22.88, 21.55, 20.57, 19.01, 15.77, 15.73, 14.84, 14.70.

8 Seznam literatury

- (1) Vitaku, E.; Smith, D. T.; Njardarson, J. T. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (24), 10257–10274.
- (2) Serra, S. In *Studies in Natural Products Chemistry*; Elsevier, 2015; Vol. 46, pp 201–226.
- (3) Schmidt-Dannert, C. In *Biotechnology of Isoprenoids*; Schrader, J., Bohlmann, J., Eds.; Springer International Publishing: Cham, 2015; pp 19–61.
- (4) Pattanaik, B.; Lindberg, P. *Life (Basel, Switzerland)* **2015**, *5* (1), 269–293.
- (5) Soriente, A.; De Rosa, M. M.; Scettri, A.; Sodano, G.; Terencio, M. C.; Paya, M.; Alcaraz, M. J. *Curr. Med. Chem.* **1999**, *6* (5), 415–431.
- (6) Hajduch, M.; Dzubak, P.; Sarek, J. *Klin. Farmakol. a Farm.* **2004**, *18* (1), 14–21.
- (7) Krasutsky, P. A. *Nat. Prod. Rep.* **2006**, *23* (6), 919–942.
- (8) Trumbull, E. R.; Bianchi, E.; Eckert, D. J.; Wiedhopf, R. M.; Cole, J. R. *J. Pharm. Sci.* **1976**, *65* (9), 1407–1408.
- (9) Yasukawa, K.; Takido, M.; Matsumoto, T.; Takeuchi, M.; Nakagawa, S. *Oncology* **1991**, *48* (1), 72–76.
- (10) Pisha, E.; Chai, H.; Lee, I.-S.; Chagwedera, T. E.; Farnsworth, N. R.; Cordell, G. A.; Beecher, C. W. W.; Fong, H. H. S.; Kinghorn, A. D.; Brown, D. M.; Wani, M. C.; Wall, M. E.; Hieken, T. J.; Das Gupta, T. K.; Pezzuto, J. M. *Nat. Med.* **1995**, *1* (10), 1046–1051.
- (11) Fujioka, T.; Kashiwada, Y.; Kilkuskie, R. E.; Cosentino, L. M.; Ballas, L. M.; Jiang, J. B.; Janzen, W. P.; Chen, I.-S.; Lee, K.-H. *J. Nat. Prod.* **1994**, *57* (2), 243–247.
- (12) Quéré, L.; Wenger, T.; Schramm, H. J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, *227* (2), 484–488.
- (13) Holz-Smith, S. L.; Sun, I. C.; Jin, L.; Matthews, T. J.; Lee, K. H.; Chen, C. H. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, *45* (1), 60–66.

- (14) Akihisa, T.; Ogihara, J.; Kato, J.; Yasukawa, K.; Ukiya, M.; Yamanouchi, S.; Oishi, K. *Lipids* **2001**, *36* (5), 507–512.
- (15) Kanamoto, T.; Kashiwada, Y.; Kanbara, K.; Gotoh, K.; Yoshimori, M.; Goto, T.; Sano, K.; Nakashima, H. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, *45* (4), 1225–1230.
- (16) Razboršek, M. I.; Vončina, D. B.; Doleček, V.; Vončina, E. *Chromatographia* **2008**, *67* (5), 433–440.
- (17) Kim, D. K.; Baek, J. H.; Kang, C. M.; Yoo, M. A.; Sung, J. W.; Chung, H. Y.; Kim, N. D.; Choi, Y. H.; Lee, S. H.; Kim, K. W. *Int. J. cancer* **2000**, *87* (5), 629–636.
- (18) Lauthier, F.; Taillet, L.; Trouillas, P.; Delage, C.; Simon, A. *Anticancer. Drugs* **2000**, *11* (9), 737–745.
- (19) Li, J.; Guo, W.-J.; Yang, Q.-Y. *World J. Gastroenterol.* **2002**, *8* (3), 493–495.
- (20) Jedinák, A.; Mučkova, M.; Košťalova, D.; Maliar, T.; Mašterova, I. Z. *Naturforsch. C.* **2006**, *61* (11–12), 777–782.
- (21) Kanjoormana, M.; Kuttan, G. *Integr. Cancer Ther.* **2010**, *9* (2), 224–235.
- (22) do Nascimento, P. G. G.; Lemos, T. L. G.; Bizerra, A. M. C.; Arriaga, A. M. C.; Ferreira, D. A.; Santiago, G. M. P.; Braz-Filho, R.; Costa, J. G. M. *Molecules* **2014**, *19* (1), 1317–1327.
- (23) Ahmad, S. F.; Khan, B.; Bani, S.; Suri, K. A.; Satti, N. K.; Qazi, G. N. *Pharmacol. Res.* **2006**, *53* (3), 233–240.
- (24) Lu, J.; Wu, D.; Zheng, Y.; Hu, B.; Zhang, Z.; Ye, Q.; Liu, C.; Shan, Q.; Wang, Y. *Cereb. Cortex* **2010**, *20* (11), 2540–2548.
- (25) Saravanan, R.; Viswanathan, P.; Pugalendi, K. V. *Life Sci.* **2006**, *78* (7), 713–718.
- (26) Guinda, A.; Rada, M.; Delgado, T.; Gutierrez-Adanez, P.; Castellano, J. M. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58* (17), 9685–9691.
- (27) Kim, Y. K.; Yoon, S. K.; Ryu, S. Y. *Planta Med.* **2000**, *66* (5), 485–486.
- (28) Ringbom, T.; Segura, L.; Noreen, Y.; Perera, P.; Bohlin, L. *J. Nat. Prod.* **1998**, *61* (10), 1212–1215.

- (29) Liu, J.; Liu, Y.; Madhu, C.; Klaassen, C. D. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1993**, 266 (3), 1607–1613.
- (30) Liu, J.; Lu, Y.-F.; Zhang, Y.; Wu, K. C.; Fan, F.; Klaassen, C. D. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2013**, 272 (3), 816–824.
- (31) Liu, J.; Liu, Y.; Parkinson, A.; Klaassen, C. D. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1995**, 275 (2), 768–774.
- (32) Pokorný, J.; Borkova, L.; Urban, M. *Curr. Med. Chem.* **2017**, 24.
- (33) Kvasnica, M.; Urban, M.; Dickinson, N. J.; Sarek, J. *Nat. Prod. Rep.* **2015**, 32 (9), 1303–1330.
- (34) Kumar, V.; Rani, N.; Aggarwal, P.; Sanna, V. K.; Singh, A. T.; Jaggi, M.; Joshi, N.; Sharma, P. K.; Irchhaiya, R.; Burman, A. C. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2008**, 18 (18), 5058–5062.
- (35) Qiu, W.-W.; Shen, Q.; Wang, B.; Zou, H.; Li, J.-Y.; Li, J.; Tang, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 19, 6618–6622.
- (36) Chen, J.; Gong, Y.; Liu, J.; Hua, W.; Zhang, L.; Sun, H. *Chem. Biodivers.* **2008**, 5 (7), 1304–1312.
- (37) Urban, M.; Vlk, M.; Dzubak, P.; Hajduch, M.; Sarek, J. *Bioorganic Med. Chem.* **2012**, 20 (11), 3666–3674.
- (38) Xu, J.; Li, Z.; Luo, J.; Yang, F.; Liu, T.; Liu, M.; Qiu, W.-W.; Tang, J. *J. Med. Chem.* **2012**, 55 (7), 3122–3134.
- (39) Amer, H.; Mereiter, K.; Stanetty, C.; Hofinger, A.; Czollner, L.; Beseda, I.; Jordis, U.; Kueenburg, B.; Claßen-Houben, D.; Kosma, P. *Tetrahedron* **2010**, 66 (24), 4390–4402.
- (40) Dheer, D.; Singh, V.; Shankar, R. *Bioorganic Chemistry*. Academic Press April 1, 2017, pp 30–54.
- (41) Kallander, L. S.; Lu, Q.; Chen, W.; Tomaszek, T.; Yang, G.; Tew, D.; Meek, T. D.; Hofmann, G. A.; Schulz-Pritchard, C. K.; Smith, W. W.; Janson, C. A.; Ryan, M. D.; Zhang, G.-F.; Johanson, K. O.; Kirkpatrick, R. B.; Ho, T. F.; Fisher, P. W.; Mattern, M. R.; Johnson, R. K.; Hansbury, M. J.; Winkler, J. D.; Ward, K. W.;

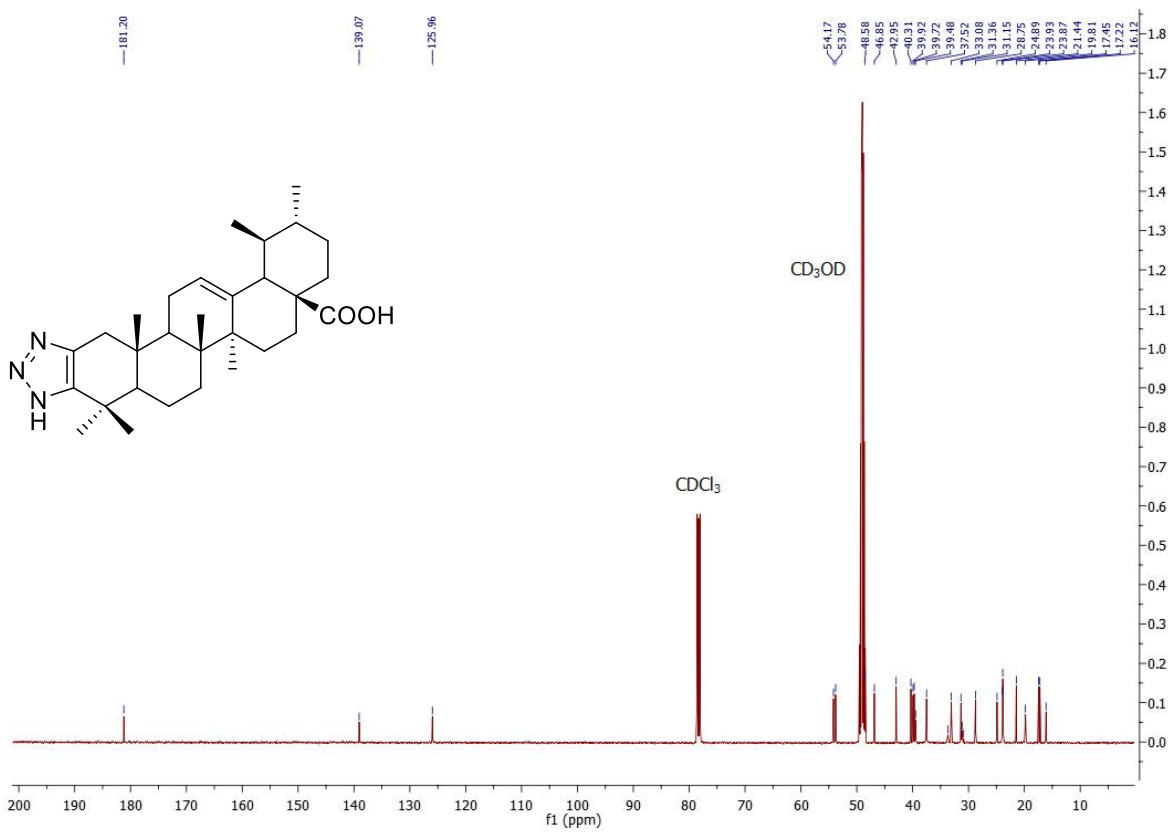
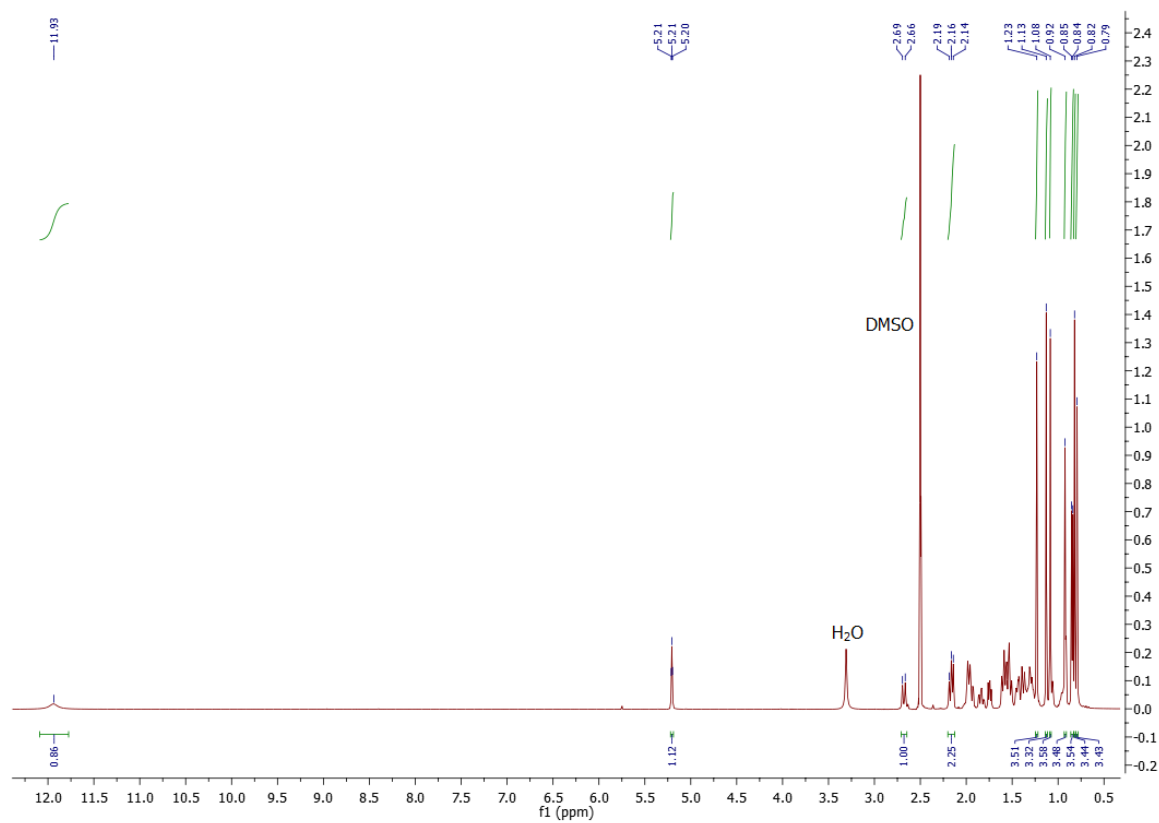
- Veber, D. F.; Thompson, S. K. *J. Med. Chem.* **2005**, *48* (18), 5644–5647.
- (42) Penthala, N. R.; Madhukuri, L.; Thakkar, S.; Madadi, N. R.; Lamture, G.; Eoff, R. L.; Crooks, P. A. *Med. Chem. Commun.* **2015**, *6* (8), 1535–1543.
- (43) Kang, X.; Hu, J.; Gao, Z.; Ju, Y.; Xu, C. *Med. Chem. Commun.* **2012**, *3* (10), 1245–1249.
- (44) Spivak, A. Y.; Gubaidullin, R. R.; Galimshina, Z. R.; Nedopekina, D. A.; Odinkov, V. N. *Tetrahedron* **2016**, *72* (9), 1249–1256.
- (45) Spivak, A.; Galimshina, Z.; Nedopekina, D.; Odinkov, V. *Chem. Nat. Compd.* **2018**, *54*.
- (46)ertino, M.; Lopez, C.; Theoduloz, C.; Schmeda-Hirschmann, G. *Molecules* **2013**, *18* (7), 7661–7674.
- (47) Govdi, A. I.; Sokolova, N. V.; Sorokina, I. V.; Baev, D. S.; Tolstikova, T. G.; Mamatyuk, V. I.; Fadeev, D. S.; Vasilevsky, S. F.; Nenajdenko, V. G. *Medchemcomm* **2015**, *6* (1), 230–238.
- (48) Chakraborty, B.; Dutta, D.; Mukherjee, S.; Das, S.; Maiti, N.; Das, P.; Chowdhury, C. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *102*, 93–105.
- (49) Majeed, R.; Sangwan, P. L.; Chinthakindi, P. K.; Khan, I.; Dangroo, N. A.; Thota, N.; Hamid, A.; Sharma, P. R.; Saxena, A. K.; Koul, S. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *63*, 782–792.
- (50) Cheng, K.; Liu, J.; Liu, X.; Li, H.; Sun, H.; Xie, J. *Carbohydr. Res.* **2009**, *344* (7), 841–850.
- (51) Cheng, K.; Liu, J.; Sun, H.; Xie, J. *Chem. Biodivers.* **2010**, *7* (3), 690–697.
- (52) Csuk, R.; Deigner, H. P. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. Pergamon April 15, 2019, pp 949–958.
- (53) Wei, G.; Luan, W.; Wang, S.; Cui, S.; Li, F.; Liu, Y.; Liu, Y.; Cheng, M. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13* (5), 1507–1514.
- (54) Xiao, S.; Wang, Q.; Si, L.; Shi, Y.; Wang, H.; Yu, F.; Zhang, Y.; Li, Y.; Zheng, Y.; Zhang, C.; Wang, C.; Zhang, L.; Zhou, D. *ChemMedChem* **2014**, *9* (5), 1060–1070.

- (55) Dang Thi, T. A.; Kim Tuyet, N. T.; Pham The, C.; Thanh Nguyen, H.; Ba Thi, C.; Doan Duy, T.; D'hooghe, M.; Van Nguyen, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24* (22), 5190–5194.
- (56) Han, X.; Shi, Y.; Si, L.; Fan, Z.; Wang, H.; Xu, R.; Jiao, P.; Meng, K.; Tian, Z.; Zhou, X.; Jin, H.; Wu, X.; Chen, H.; Zhang, Y.; Zhang, L.; Xiao, S.; Zhou, D. *Med. Chem. Commun.* **2016**, *7* (10), 1932–1945.
- (57) Wang, H.; Xu, R.; Shi, Y.; Si, L.; Jiao, P.; Fan, Z.; Han, X.; Wu, X.; Zhou, X.; Yu, F.; Zhang, Y.; Zhang, L.; Zhang, L.; Zhou, D.; Xiao, S. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *110*, 376–388.
- (58) Pokorny, J.; Krajcovicova, S.; Hajduch, M.; Holoubek, M.; Gurska, S.; Dzubak, P.; Volna, T.; Popa, I.; Urban, M. *Future Med. Chem.* **2018**, *10* (5), 483–491.
- (59) Spivak, A. Y.; Nedopekina, D. A.; Khalitova, R. R.; Gubaidullin, R. R.; Odinokov, V. N.; Bel'skii, Y. P.; Bel'skaya, N. V.; Khazanov, V. A. *Med. Chem. Res.* **2017**, *26* (3), 518–531.
- (60) Antimonova, A.; Petrenko, N.; Shakirov, M.; Rybalova, T.; Frolova, T.; Shul'ts, E.; Kukina, T.; Sinitsyna, O.; Tolstikov, G. *Chem. Nat. Compd.* **2013**, *49*, 657–664.
- (61) Shi, W.; Tang, N.; Yan, W.-D. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2015**, *17* (2), 159–169.
- (62) Sidova, V.; Zoufaly, P.; Pokorny, J.; Dzubak, P.; Hajduch, M.; Popa, I.; Urban, M. *PLoS One* **2017**, *12*, e0171621.
- (63) van Berkel, S. S.; Brauch, S.; Gabriel, L.; Henze, M.; Stark, S.; Vasilev, D.; Wessjohann, L. A.; Abbas, M.; Westermann, B. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2012**, *51* (22), 5343–5346.
- (64) Thomas, J.; Jana, S.; John, J.; Liekens, S.; Dehaen, W. *Chem. Commun.* **2016**, *52* (14), 2885–2888.
- (65) Bianchetti, G.; Dalla Croce, P.; Pocar, D. *Tetrahedron Lett.* **1965**, *25*, 2043–2045.
- (66) Thomas, J.; Jana, S.; Liekens, S.; Dehaen, W. *Chem. Commun.* **2016**, *52* (59), 9236–9239.
- (67) Borkova, L.; Adamek, R.; Kalina, P.; Drašar, P.; Dzubak, P.; Gurska, S.; Rehulka,

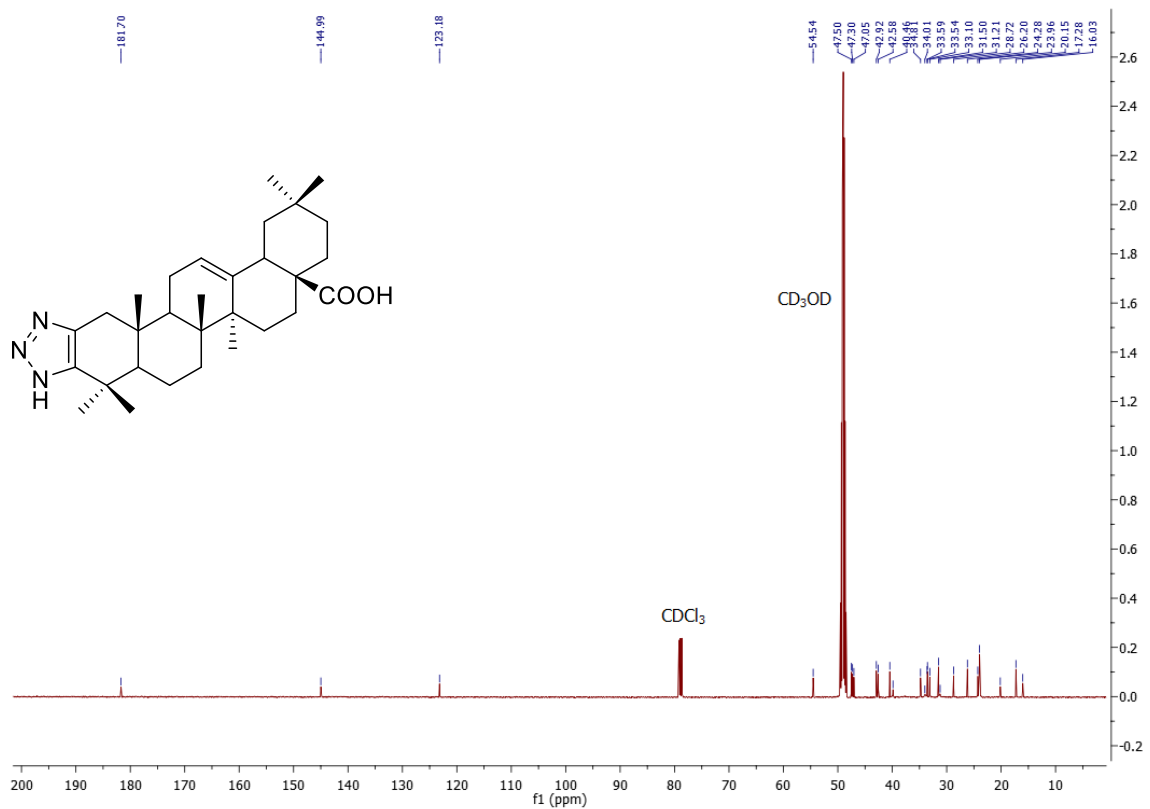
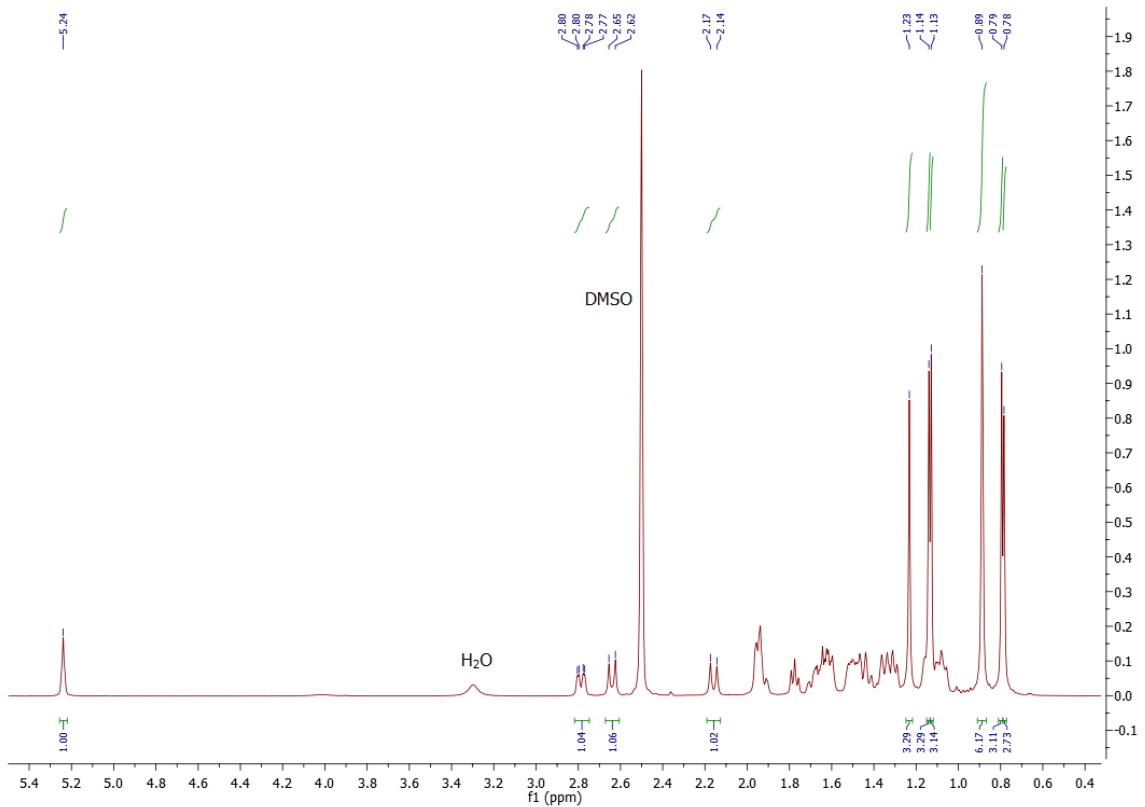
- J.; Hajduch, M.; Urban, M.; Sarek, J. *ChemMedChem* **2017**, *12* (5), 390–398.
- (68) Vlk, M.; Urban, M.; Elbert, T.; Sarek, J. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **2013**, *298* (2), 1149–1157.
- (69) Leal, A. S.; Wang, R.; Salvador, J. A. R.; Jing, Y. *Bioorganic Med. Chem.* **2012**, *20* (19), 5774–5786.
- (70) Li, J. F.; Zhao, Y.; Cai, M. M.; Li, X. F.; Li, J. X. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44* (7), 2796–2806.
- (71) Faucher, N.; Ambroise, Y.; Cintrat, J.-C.; Doris, E.; Pillon, F.; Rousseau, B. *J. Org. Chem.* **2002**, *67* (3), 932–934.
- (72) Shakhmaev, R.; Sunagatullina, A.; Abdullina, E.; Zorin, V. *Russ. J. Org. Chem.* **2017**, *53*, 1705–1709.
- (73) Klinot, J.; Vystrčil, A. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1966**, *31* (3), 1079–1092.
- (74) Borkova, L.; Gurska, S.; Dzubak, P.; Buriánová, R.; Hajduch, M.; Sarek, J.; Popa, I.; Urban, M. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *121*.
- (75) Silveira-Dorta, G.; Jana, S.; Borkova, L.; Thomas, J.; Dehaen, W. *Org. Biomol. Chem.* **2018**, *16* (17), 3168–3176.

9 Příloha č. 1: ^1H a ^{13}C NMR spektra nově připravených sloučenin

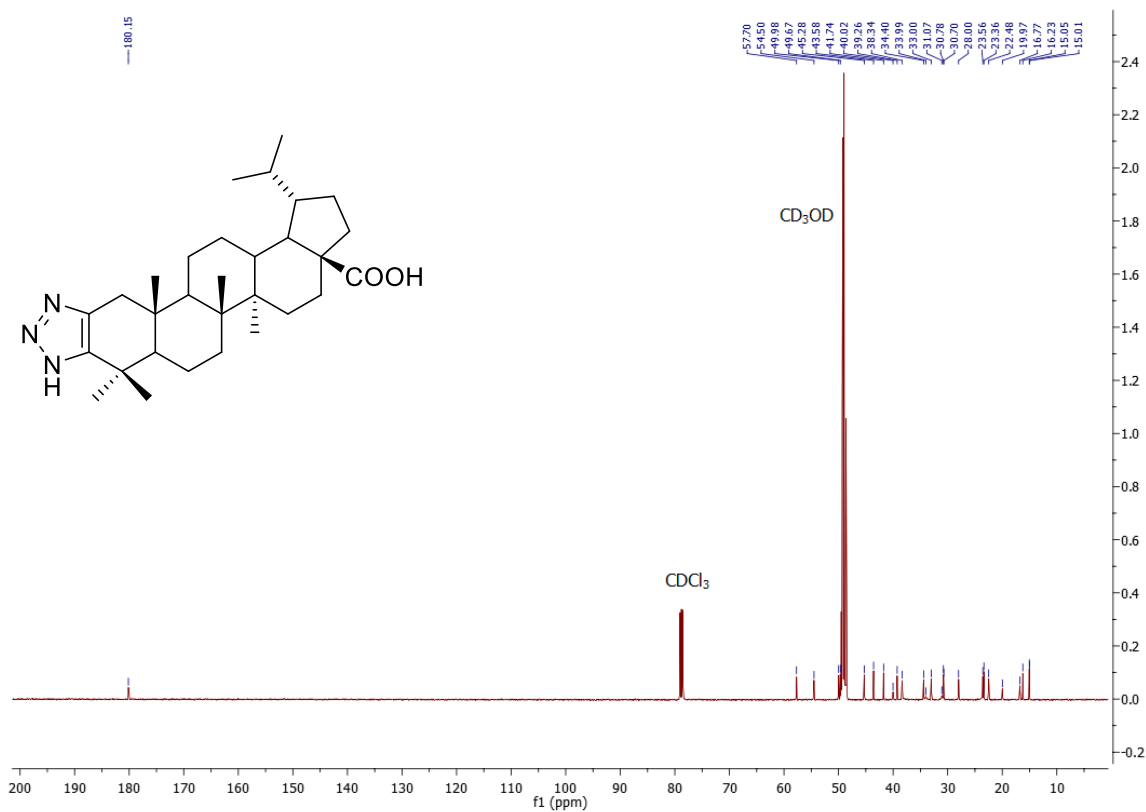
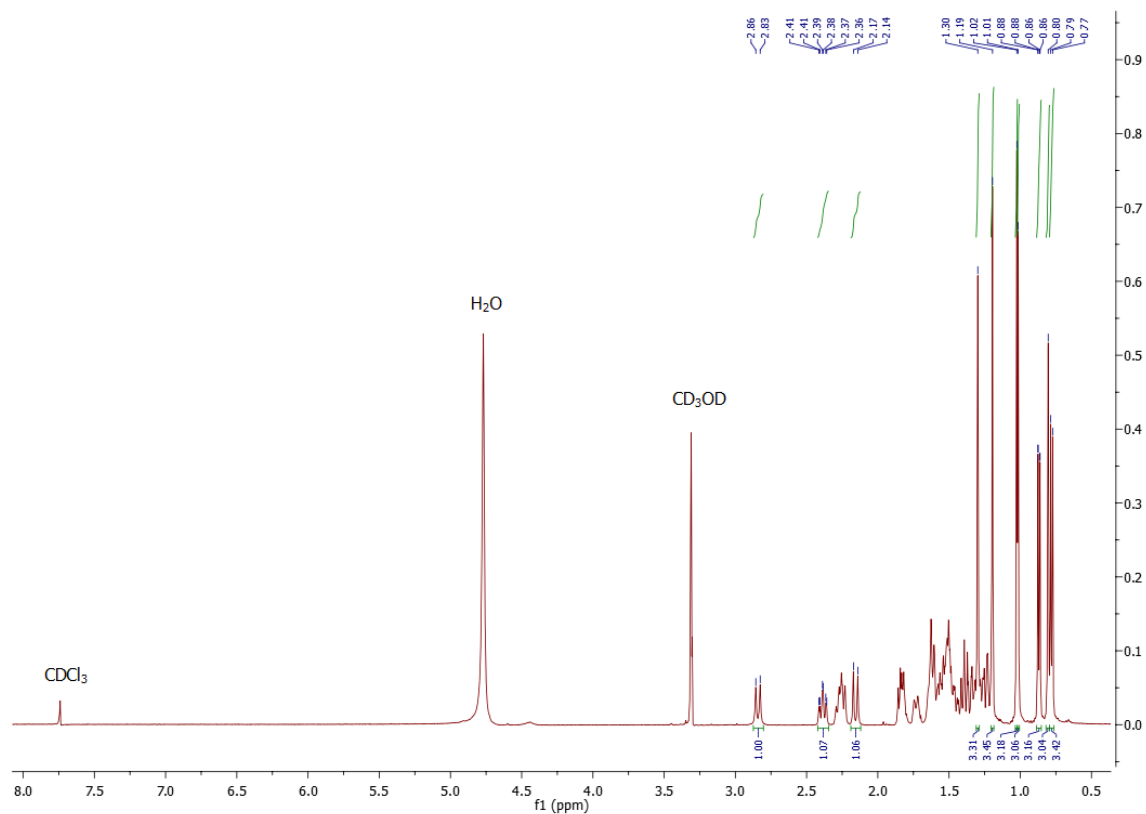
1H-1,2,3-triazolo[2,3-d] kyselina ursonová XI



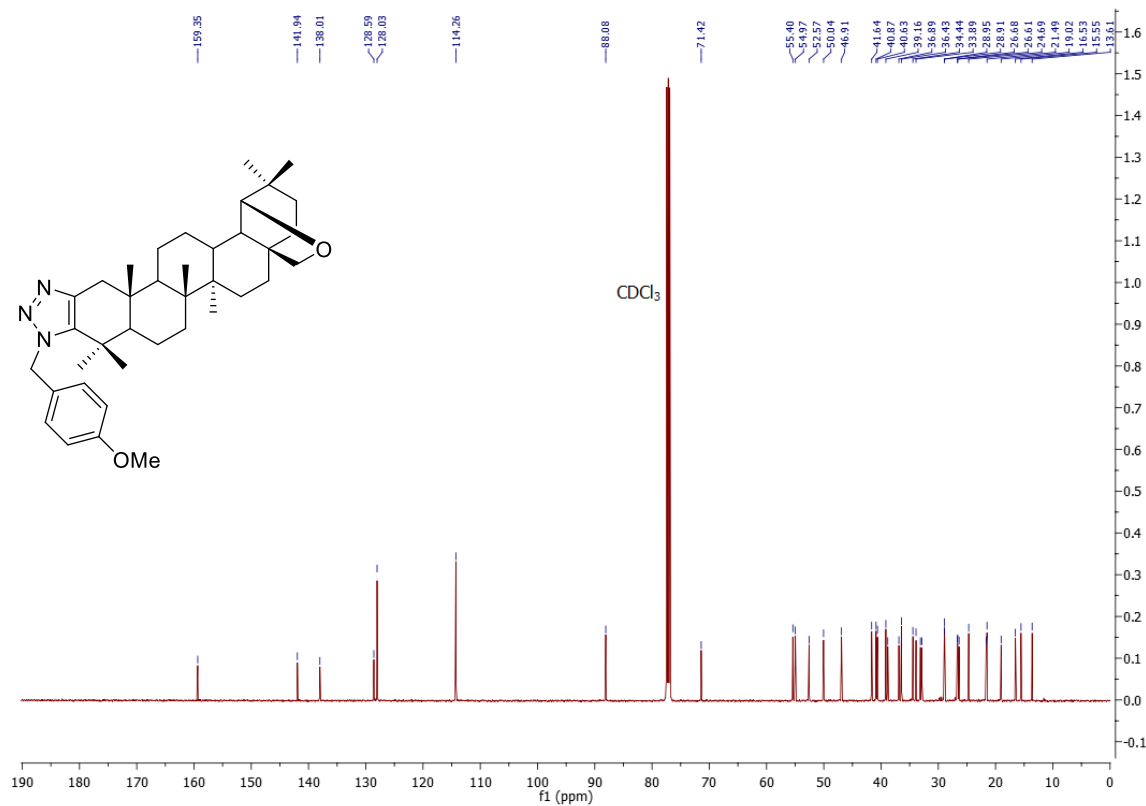
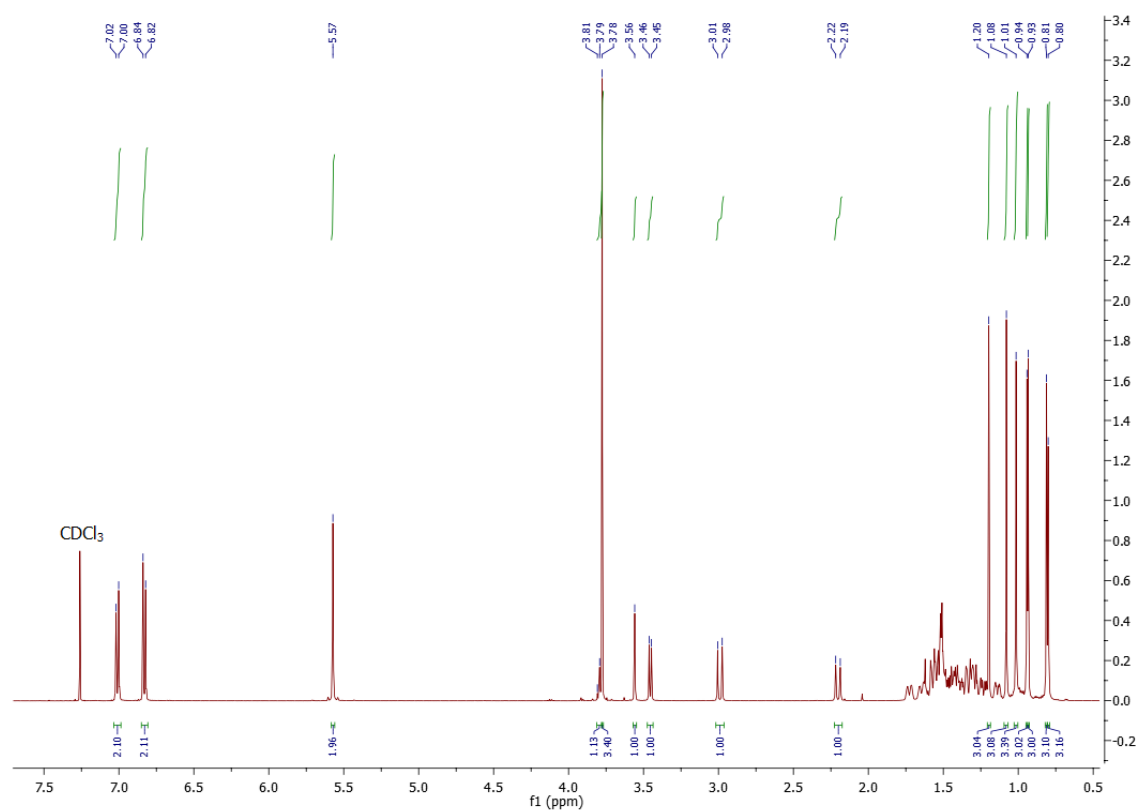
1H-1,2,3-triazolo[2,3-d] kyselina oleanonová XII



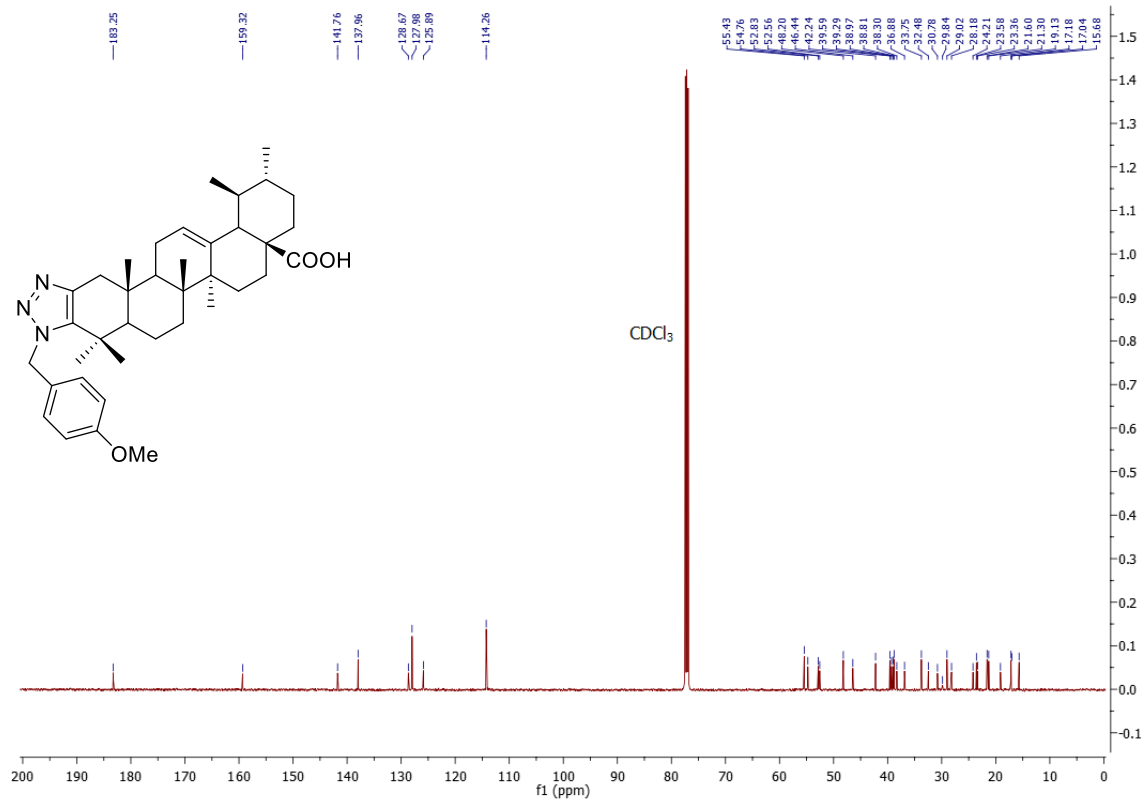
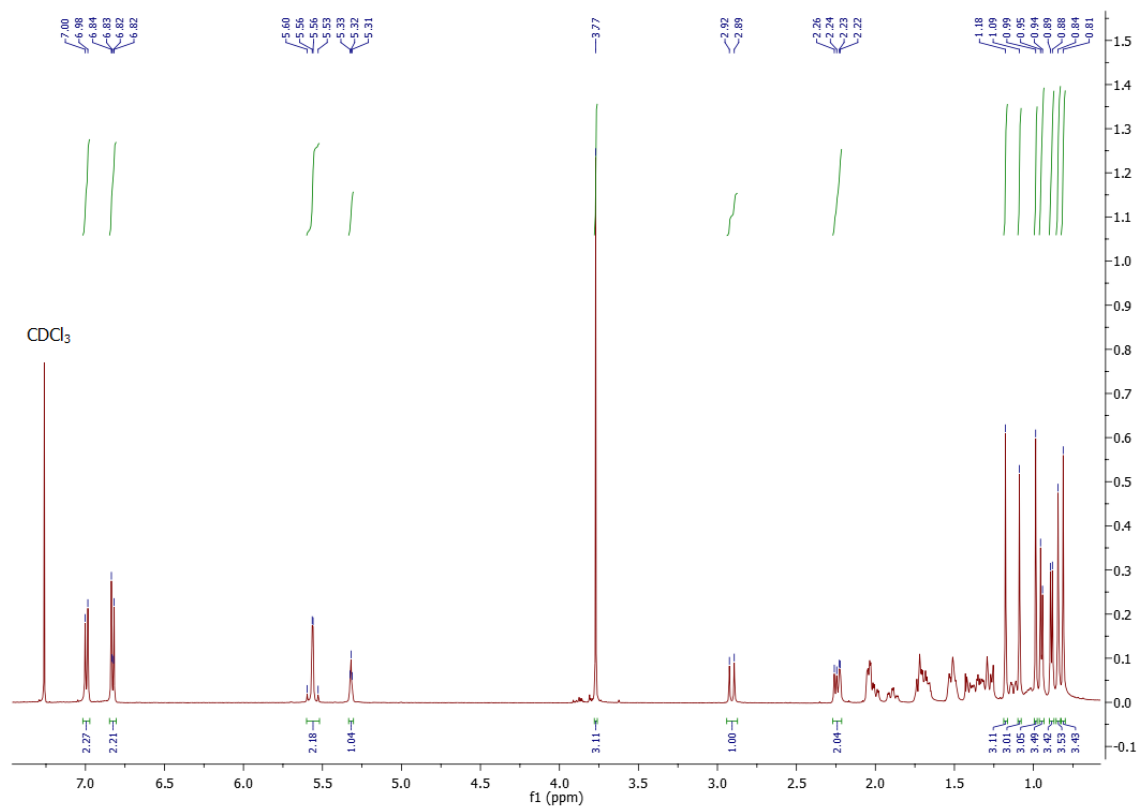
1H-1,2,3-triazolo[2,3-d] kyselina dihydrobetulonová XIII



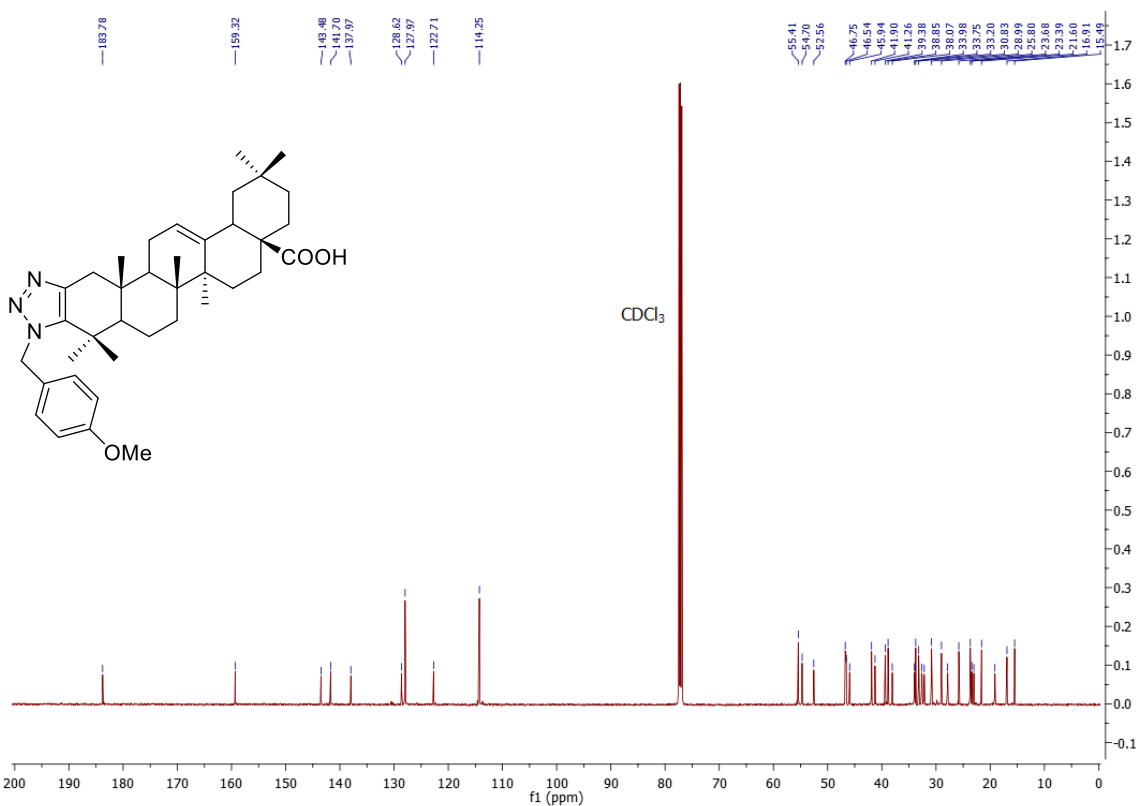
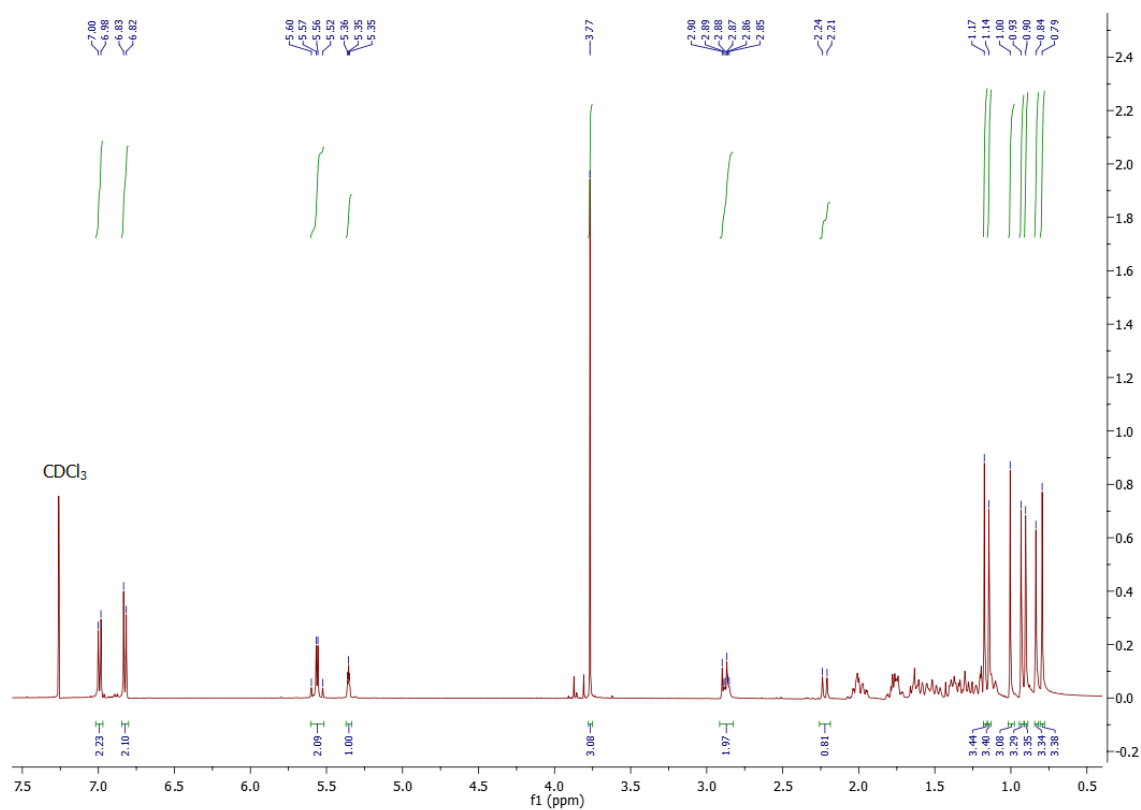
1-(4-methoxybenzyl)-1,2,3-triazolo[2,3-d] allobetulon XVII



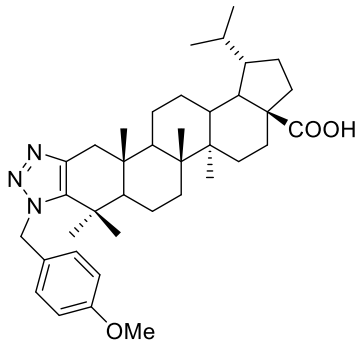
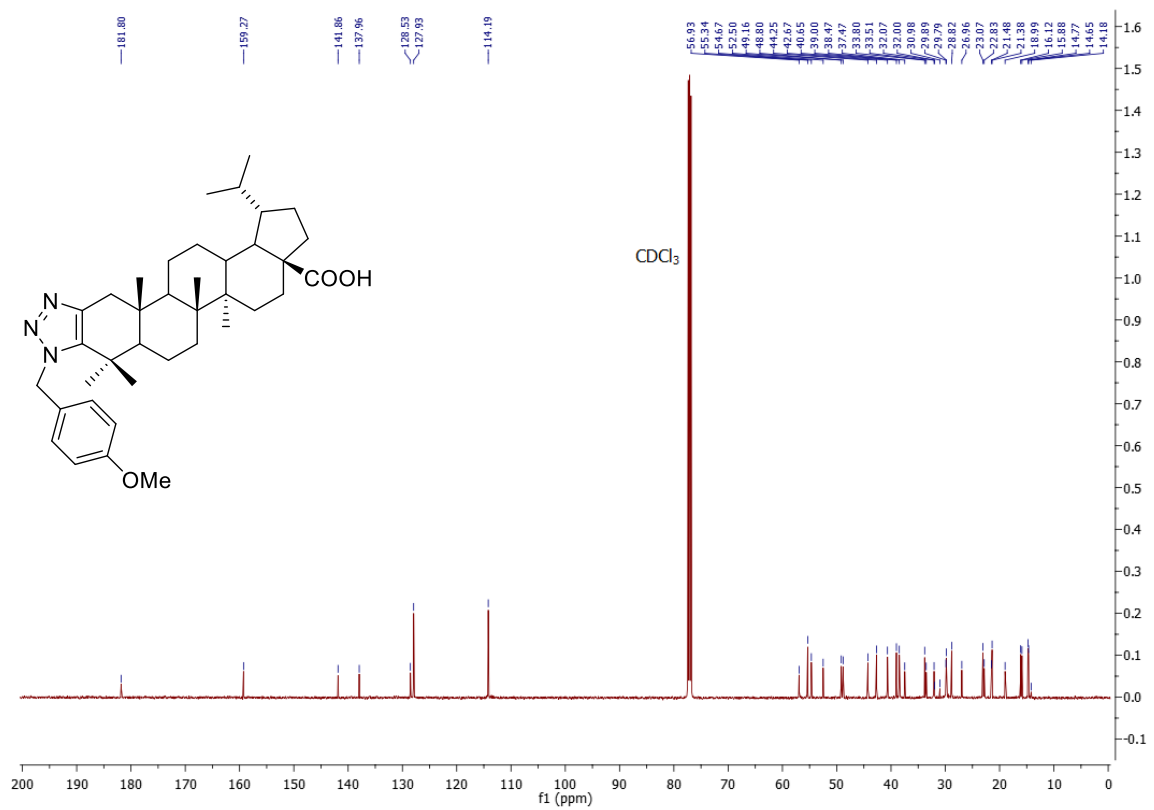
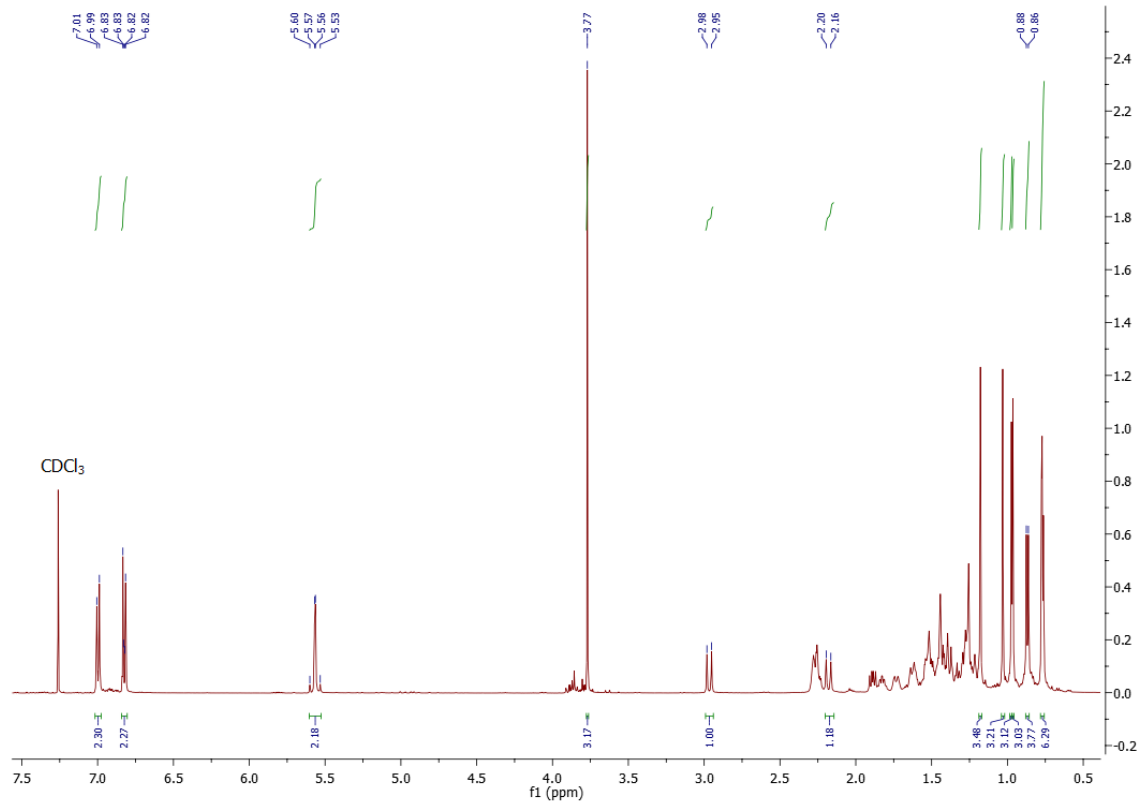
1-(4-methoxybenzyl)-1,2,3-triazolo[2,3-d] kyselina ursonová XVIII



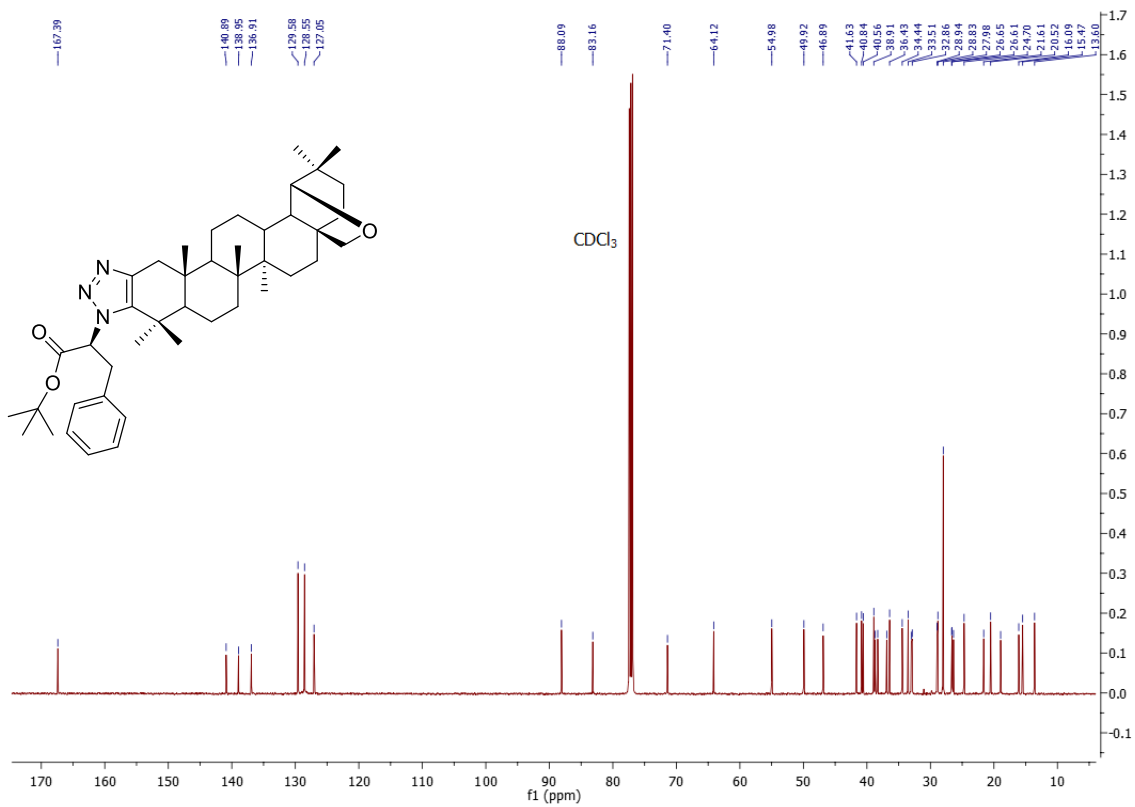
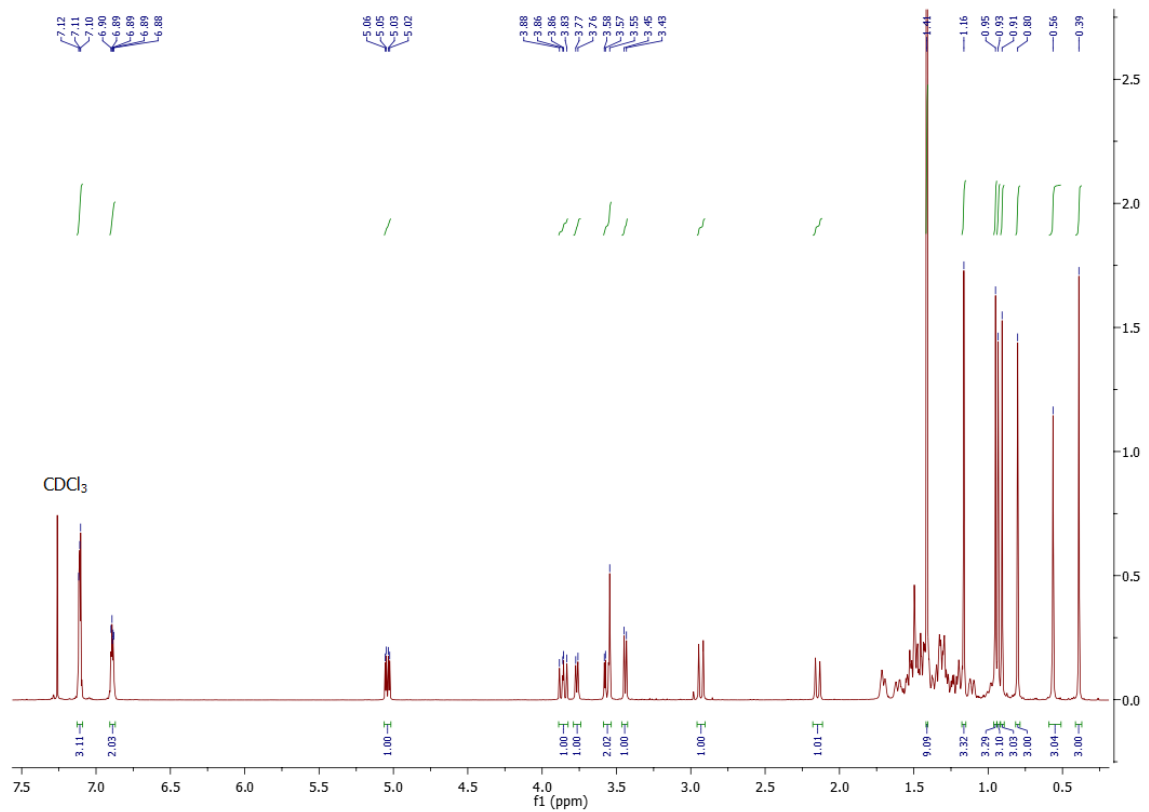
1-(4-methoxybenzyl)-1,2,3-triazolo[2,3-d] kyselina oleanonová XIX



1-(4-methoxybenzyl)-1,2,3-triazolo[2,3-d] kyselina dihydrobetulonová XX



1-((S)-*tert*-butyl-3-phenylpropionát-2-yl)-1,2,3-triazolo[2,3-d] allobetulon XXVII



1-((*S*)-*tert*-butyl-3-fenylpropionát-2-yl)-1,2,3-triazolo[2,3-d] kyselina
dihydrobetulinová XXVIII

