

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA
V HRADCI KRÁLOVÉ**

Hradec Králové 2007

Hana Divišová

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA
V HRADCI KRÁLOVÉ**

Katedra anorganické a organické chemie



**4'-alkylsalicylanilidy s rozvětveným alkylovým
řetězcem a jim odpovídající deriváty
benzoxazindionů**

Diplomová práce

Hradec Králové 2007

Hana Divišová

| | |
|---|-----------|
| 1. ÚVOD | 1 |
| 2. CÍL PRÁCE | 5 |
| 3. TEORETICKÁ ČÁST | 7 |
| 4. METODICKÁ ČÁST | 12 |
| 4.1. MOŽNOSTI PŘÍPRAVY | |
| <i>N</i> -(4-ALKYLFENYL)-HALOGENSALICYLAMIDŮ | 13 |
| 4.2. MOŽNOSTI PŘÍPRAVY | |
| 3-(4-ALKYLFENYL)-BENZOXAZIN-2,4-(3H)-DIONŮ | 14 |
| 5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 18 |
| 5.1. POSTUP PŘÍPRAVY | |
| <i>N</i> -(4-ALKYLFENYL)-HALOGENSALICYLAMIDŮ | 19 |
| 5.2. POSTUP PŘÍPRAVY | |
| 3-(4-ALKYLFENYL)-1,3-BENZOXAZIN-2,4-(3H)-DIONŮ | 19 |
| 5.3. FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÉ VLASTNOSTI LÁTEK | 19 |
| 5.4. HODNOCENÍ ANTIMYKOBAKTERIÁLNÍ AKTIVITY | 20 |
| 5.5. SYNTÉZA ROZVĚTVENÝCH DERIVÁTŮ | |
| <i>N</i> -(4-ALKYLFENYL)-HALOGENSALICYLAMIDŮ | 21 |
| 5.5.1. <i>N</i> -(4-isopropylfenyl)-4-chlorsalicylamid. (T 5721) | 21 |
| 5.5.2. <i>N</i> -(4-isopropylfenyl)-5-chlorsalicylamid (T 5722) | 21 |
| 5.5.3. <i>N</i> -(4-isopropylfenyl)-5-bromsalicylamid (T 5723) | 22 |
| 5.5.4. <i>N</i> -(4- <i>sek</i> -butylfenyl)-4-chlorsalicylamid (T 5728) | 22 |
| 5.5.5. <i>N</i> -(4- <i>sek</i> -butylfenyl)-5-chlorsalicylamid (T5729) | 23 |
| 5.5.6. <i>N</i> -(4- <i>sek</i> -butylfenyl)-5-bromsalicylamid (T 5730) | 23 |
| 5.5.7. <i>N</i> -(4- <i>terc</i> -butylfenyl)-4-chlorsalicylamid (T 5508) | 24 |
| 5.5.8. <i>N</i> -(4- <i>terc</i> -butylfenyl)-5-chlorsalicylamid (T 5512) | 24 |
| 5.6. SYNTÉZA ROZVĚTVENÝCH DERIVÁTŮ | |
| 3-(4-ALKYLFENYL)-BENZOXAZIN-2,4-(3H)-DIONŮ | 25 |
| 5.6.1. 6-chlor-3-(4- <i>sek</i> -butylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (T 5739) . | 25 |
| 5.6.2. 7-chlor-3-(4- <i>sek</i> -butylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (T 5740) | 25 |
| 5.6.3. 6-brom-3-(4- <i>sek</i> -butylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (T 5741) . | 26 |
| 5.6.4. 7-chlor-3-(4-isopropylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (T 5742) . | 26 |
| 5.6.5. 6-chlor-3-(4-isopropylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (T 5743) . | 27 |
| 5.6.6. 6-chlor-3-(4- <i>terc</i> -butylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (T 5573) | 27 |
| 5.6.7. 7-chlor-3-(4- <i>terc</i> -butylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (T 5561) | 28 |

| | |
|---|-----------|
| 6. VÝSLEDKY | 29 |
| 6.1. PŘEHLED PŘIPRAVENÝCH LÁTEK | 30 |
| 6.2. TEPLOTA TÁNÍ..... | 31 |
| 6.3. INFRAČERVENÁ SPEKTRA | 32 |
| 6.4. UHLÍKOVÁ SPEKTRA ¹³ C NUKLEÁRNÍ MAGNETICKÉ REZONANCE | 33 |
| 6.5. VODÍKOVÁ SPEKTRA ¹ H NUKLEÁRNÍ MAGNETICKÉ REZONANCE | 35 |
| 6.6. ELEMENTÁRNÍ ANALÝZA | 39 |
| 6.7. ANTIMYKOBACTERIÁLNÍ AKTIVITA | 40 |
| 7. DISKUZE | 41 |
| 8. ZÁVĚR | 43 |
| 9. POUŽITÁ LITERATURA | 45 |
| 10. PŘÍLOHY | 48 |

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod odborným vedením prof. RNDr. Karla Waissera DrSc., a že řádně cituji všechna převzatá data a skutečnosti.

V Hradci Králové dne 30.1.2007

.....
Hana Divišová

Za odborné vedení a poskytnutí cenných rad děkuji prof. RNDr. Karlu Waisserovi DrSc. a Mgr. Josefu Matykovi. Za měření NMR spekter jsem zavázána doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. Za měření IČ spekter děkuji paní Ivě Venkovské. Za měření antimykobakteriální aktivity vděčím MUDr. Jarmile Kaustové ze Zdravotního ústavu se sídlem v Ostravě. Za elementární analýzy jsem zavázána Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR.

1. ÚVOD

Tuberkulóza provází lidstvo po dobu jeho existence. Vyskytovala se již v Egyptě v době faraónů, ve starém Řecku i v Římě. Ve středověku patřila k častým příčinám smrti.

Termín tuberkulóza byl poprvé použit v roce 1834 Schönleinem, etiologii objasnil Dr. Robert Koch až v roce 1882.¹ Za původce tohoto onemocnění je považované nejen *Mycobacterium tuberculosis*, nýbrž i *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum* a *Mycobacterium microti*.

M. tuberculosis jsou obligatorní patogeny. Jejich tvar připomíná rovné nebo zahnuté tyčky. Buňky mykobakterii obsahují velké množství lipofilních látek ve formě lipoproteinů a lipopolysacharidů. Lipidy obsahují netypicky větvené kyseliny (např. mykolové kyseliny).

V klinických vzorcích se mykobakterie vyskytují jako izolované buňky nebo ve shlucích. Rostou v tekutých půdách v provazovitých koloniích. V diagnostice se používá Löwenstein-Jensenova půda. Připravuje se z vajec glycerolu, asparaginu, minerálních solí a obsahuje také malachitovou zeleň. Z dalších půd se používají agarové půdy nebo agar, obohacený hovězím sérovým albuminem.² V České republice je nejčastěji požívána Šulova půda. Je to kapalná půda s přídavkem bílkovin.

Tuberkulóza je velice závažné infekční onemocnění, byla chorobou nižších společenských tříd, ale postihovala i bohaté.

Nejrozšířenější je plicní forma tuberkulózy, ale tato nemoc může napadnout i tkáň mimoplicní např. klouby, kosti, urogenitální trakt, kůži. Přenos nákazy je respirační a alimentární cestou.

V 18. a 19. století byla tuberkulóza rozšířena v Evropě. V současné době jsou podle Světové zdravotnické organizace infikovány tuberkulózou dvě miliardy lidí.¹ Celoročně na ni umírají asi tři milióny lidí. Většina nemocných je v rozvojových zemích. Nejhorší situace je v Africe a jihovýchodní Asii.

Předpovědi eliminace této choroby v rozvojově vyspělých částech světa do roku 2000 byly nereálné. K jejímu nárůstu dochází v důsledku omezení programů kontroly tuberkulózy. Na zhoršení epidemiologické situace se podílí také zvyšující se počty lidí infikovaných virem HIV.

V České republice počet nemocných neklesal, od roku 1989 do roku 1999 bylo hlášeno asi dva tisíce nových onemocnění ročně.¹ V roce 2000-2002 byl zaznamenán mírný pokles incidence, avšak stoupá incidence u cizinců, rizikových skupin jako jsou bezdomovci, vězňové a další. Virus HIV nemá zatím v České republice vliv na výskyt tuberkulózy.¹

Od čtyřicátých let minulého století byla nacházena účinná léčiva, nazývaná antituberkulotika. V průmyslově vyspělých zemích docházelo k omezení výskytu tuberkulózy. Vývoj antituberkulorik vzbudil naději, že tuberkulóza jako nemoc již nebude v 21. století známa v průmyslově vyspělých zemích světa.

V roce 1940 byla do praxe zavedena látka, která je považována za první antituberkulotikum, diafenylsulfon. Pak bylo v Evropě objeveno další antituberkulotikum, thiacetazon. V roce 1944 v USA došlo k objevu streptomycinu, ale k jeho většímu uplatnění došlo po 2 světové válce. Dalším antituberkulotikem použitým v roce 1944 byla PAS. Dosažené výsledky byly výzvou k hledání dalších antituberkulotik. V roce 1952 byly nalezeny isoniazid a pyrazinamid, v roce 1955 cykloserin. V roce 1958 byly syntetizovány ethionamid a prothioamid, v roce 1961 etambutol a v roce 1965 rifampicin.³ U všech uvedených látek omezila Světová zdravotnická organizace jejich použití pouze na léčbu tuberkulózy.

Období od roku 1985 se považuje za čas návratu tuberkulózy do průmyslově vyspělých částí světa. V letech 1990-1999 na tuberkulózu zemřelo 30 miliónů lidí, z toho 22 000 v Severní Americe a 72 000 v západní Evropě.⁴ Tato situace byla způsobena, částečně díky poklesu přirozené imunity nové generace léčené antibiotiky od narození a vznikem kmenů mykobakterií

rezistentních ke známým antituberkulotikům. K mutacím, které mají za následek rezistenci, dochází jednou za 10^8 buněčných dělení.² Aby měla terapie požadovaný účinek a zabránilo se vzniku mutantů podávají se dvě antituberkulotika současně.

Současné léčebné kůry jsou založené na dvouměsíčním podávání rifampicinu a isoniazidu, kombinovaný s etambutolem nebo pyrazinamidem. Pak následuje léčba rifampicinem a isoniazidem po dobu 6-9 měsíců. Reakce na léčbu probíhá ve třech fázích. První fáze proběhne 1-2 týden léčby, kdy jsou mykobakterie inaktivány. Pacient není infekční a není potřeba ho izolovat. Pak následuje druhá fáze, rifampicin a pyrazinamid usmrtí méně aktivní mykobakterie uvnitř makrofágů. Ve třetí fázi usmrcuje rifampicin všechny bakterie. Pacienti tento léčebný proces většinou snáší.

Antituberkulotika používaná pro léčbu v současnosti mají mnoho nežádoucích účinků. Isoniazid, rifampicin a pyrazinamid jsou potencionálně hepatotoxické. Rifampicin antagonizuje účinek perorálních antikoncepčních látek. Isoniazid může způsobit mírné psychické poruchy a periferní neuropatie. Etambutol může způsobit toxické poruchy vidění. Streptomycin může ohrozit sluch. Současná chemoterapie využívá kombinaci léčiv, čímž se sníží jejich podávaná koncentrace a toxické účinky se tolik neprojeví.

Tuberkulóza je v současné době jedním z největších celosvětových problémů, proto by měly být vynaloženy finanční prostředky na prevenci tuberkulózy a vývoj nových antituberkulotik, které mají jiný mechanismus účinku než dosud známá léčiva a nižší počet nežádoucích účinků.

2. CÍL PRÁCE

Práce je zaměřena na vývoj nových potenciálních antituberkulotik ze skupiny *N*-(4-alkylfenyl)-halogensalicylamidů a 3-(4-alkylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4-(3H)-dionů. Z mozaiky sloučenin mi byly svěřeny látky s rozvětveným alkylem. Jedná se o sloučeniny s mechanismem účinku odlišným od v praxi používaných antituberkulotik.

Cílem mé práce bylo připravit rozvětvené deriváty

N-(4-alkylfenyl)-halogensalicylamidů

a 3-(4-alkylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4-(3H)-dionů. Zjistit fyzikálně-chemické vlastnosti, potvrdit jejich totožnost a odeslat je na hodnocení

antimykobakteriální aktivity. Práce má doplnit údaje o dalších látkách ze

skupiny *N*-(4-alkylfenyl)-halogensalicylamidů

a 3-(4-alkylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4-(3H)-dionů, která patří mezi potenciální antituberkulotika.

3. TEORETICKÁ ČÁST

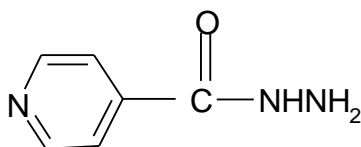
MECHANISMUS ÚČINKU DOSUD ZNÁMÝCH ANTITUBERKULOTIK

Do skupiny antituberkulotik patří antibiotika rifampicin, streptomycin, kapreomycin, cykloserin, dále chemoterapeutika isoniaziad, pyrazinamid, etambutol, ethionamid a kyselina para-aminosalicylová (PAS).

Isoniazid

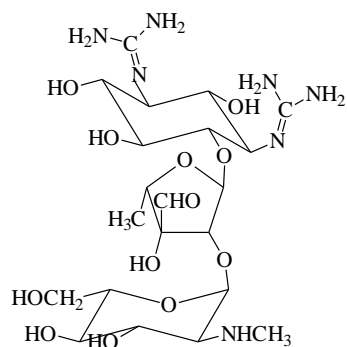
Je to hydrazid kyseliny isonikotinové. Spolu s rifampicinem je považován za nejúčinnější antituberkulotikum. Působí selektivně baktericidně na extra- i intra-celulární aktivně rostoucí *M. tuberculosis*, u neaktivních forem působí bakteriostaticky.⁵ Při léčbě tuberkulózy se používá v kombinaci s ostatními antituberkulotiky, protože k samotnému je většina mykobakterii rezistentní.

Jeho mechanismus účinku spočívá v inhibici syntézy mykolových kyselin. Mykolové kyseliny jsou obsaženy v buněčných stěnách mykobakterií, jsou to 2-alkyl-3-alkyl-3-hydroxypropionové kyseliny. Mykolové kyseliny jsou zpravidla poutány na lipopolysacharidy vázané na peptidoglykan.⁶



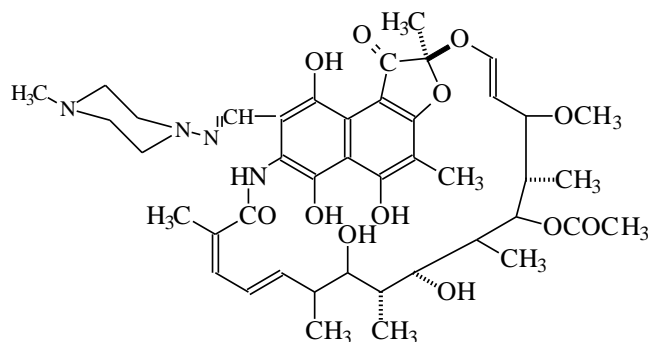
Streptomycin

Patří do skupiny aminoglykosidových antibiotik. Jeho mechanismus účinku spočívá v inhibici syntézy proteinů vazbou na ribozomální podjednotku 30S.



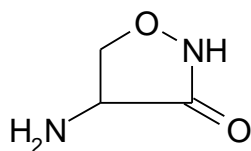
Rifampicin

Mechanismus účinku je inhibice syntézy bakteriální RNA-polymerázy, tím brání transkripci RNA.



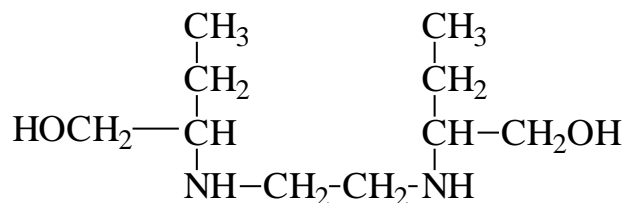
Cykloserin

Je to širokospektré antibiotikum. Inhibuje syntézu alaninracemázy, a tím brání vzniku D-alaninu (nezbytného pro syntézu peptidoglykanu). Po určitou dobu byl používán jako antituberkulotikum. Dnes je již z používání vyřazen pro nežádoucí vedlejší účinky.⁷



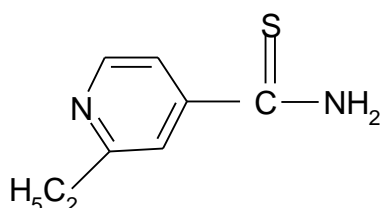
Etambutol

Jeho mechanismus účinku je založen na inhibici syntézy nukleových kyselin v *M. tuberculosis*.



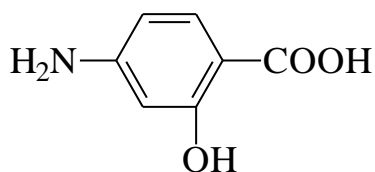
Ethionamid

Je to antituberkulotikum, které se v současné době nepoužívá. Jeho mechanismus účinku je podobný isoniazidu.

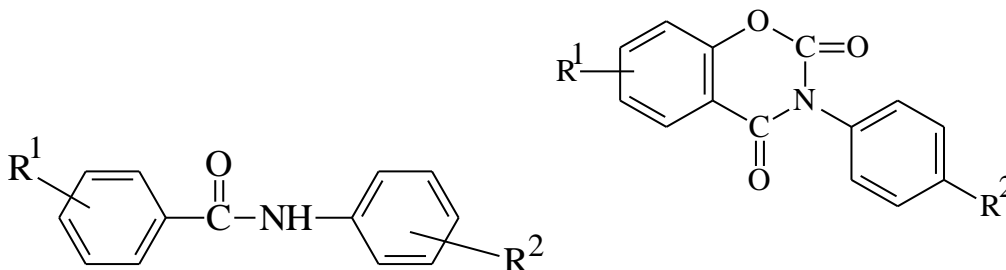


Kyselina para-aminosalicylová (PAS)

V současné době se pro léčbu tuberkulózy také nepoužívá. Její mechanismus účinku spočívá v inhibici syntézy listové kyseliny, která je důležitá pro růst bakterií.



N-(4-alkylfenyl)-halogensalicylamidy, 3-(4-alkylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4-(3H)-diony

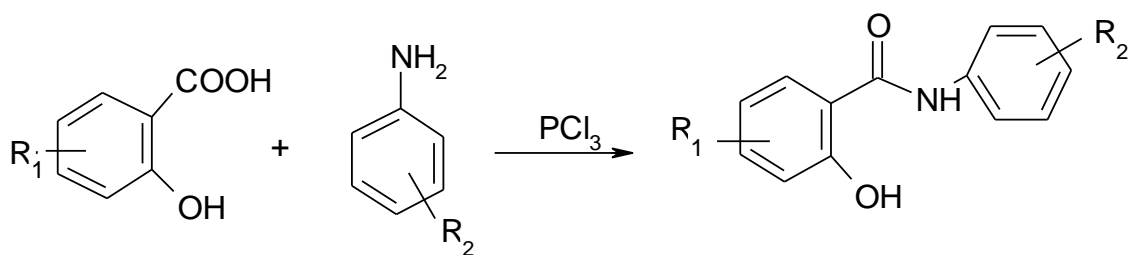


Jsou inhibitory dvou-komponentového systému bakterií. Tyto systémy, skládající se z histidin-proteinkinázy a regulátoru odpovědi, jsou signální transindukční systémy, umožňující bakteriím vnímat změny v jejich životním prostředí a rychle na ně odpovídat aktivací nebo represí genů. Vyskytují se u všech bakteriálních kmenů (včetně mykobaktérií) a u některých hub, ale ne u dalších eukaryontních organismů. Látky, které tyto systémy inhibují, jsou tedy schopny blokovat důležité bakteriální komunikační cesty, což nakonec může vést k odumření bakteriální buňky.⁸ Dosud nejsou používány jako antituberkulotika. Jejich výzkumu se věnuje pracovní skupina prof.RNDr. Waissera , DrSc. na Farmaceutické fakultě Karlovi univerzity v Hradci Králové. Proto jejich studiu je věnována tato diplomová práce.

4. METODICKÁ ČÁST

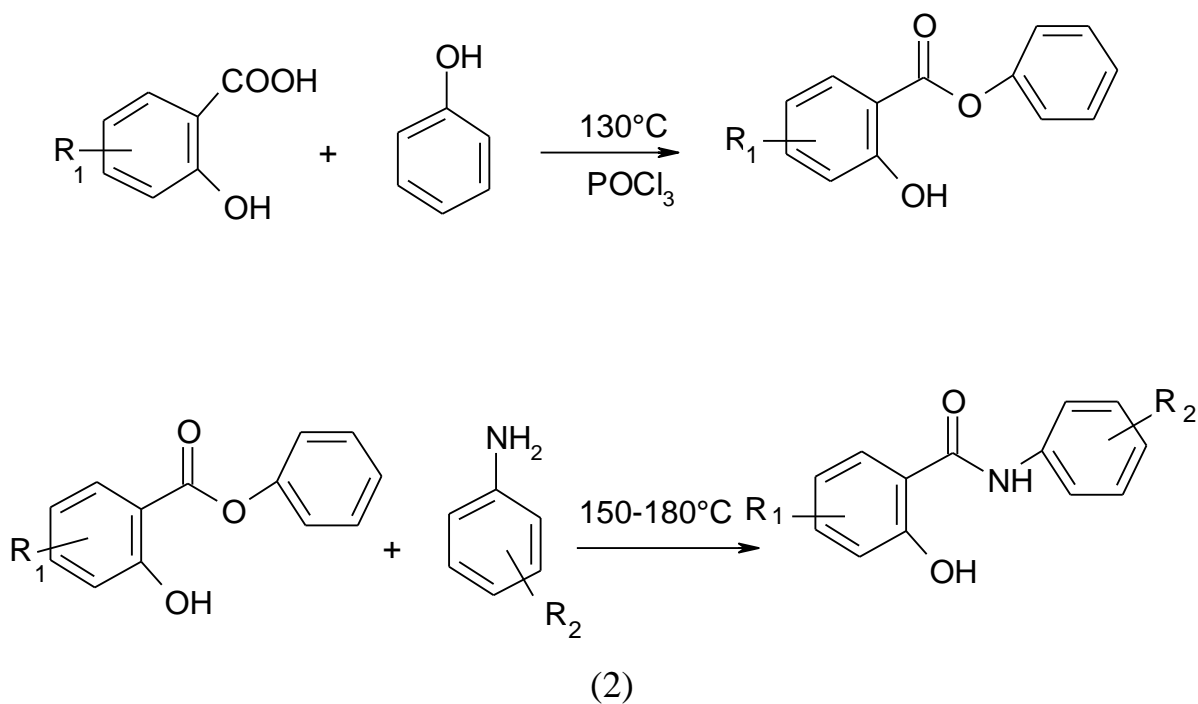
4.1. Možnosti přípravy *N*-(4-alkylfenyl)-halogensalicylamidů

Příslušně substituovaná kyselina salicylová reaguje s příslušně substituovaným anilinem v chlorbenzenu (toluenu) za přítomnosti chloridu fosforitého za vzniku *N*-(4-alkylfenyl)-halogensalicylamidu^{9,10}



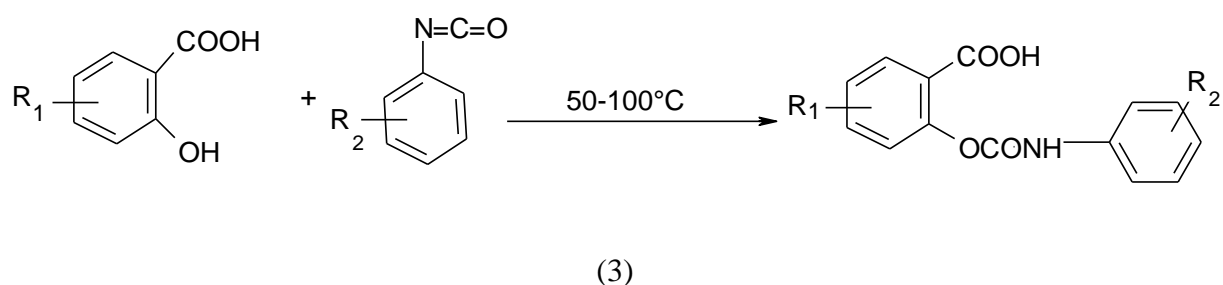
Reakce substituované kyseliny salicylové s příslušným anilínem proběhne i v pyridinu za přítomnosti chloridu fosforitého za vzniku *N*-(4-alkylfenyl)-halogensalicylamidu.¹⁰

Další možností přípravy *N*-(4-alkylfenyl)-halogensalicylamidu je tavení fenylesteru substituované kyseliny salicylové a odpovídajícím anilínem za teploty 150-180°C.¹¹ Při reakci se uvolňuje fenol, který se musí při dalším postupu odstranit vodou.^{12,13}

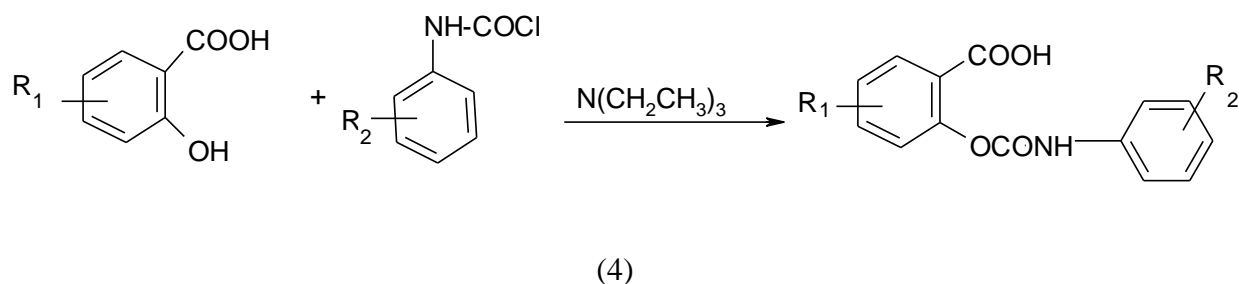


4.2. Možnosti přípravy 3-(4-alkylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4-(3H)-dionů.

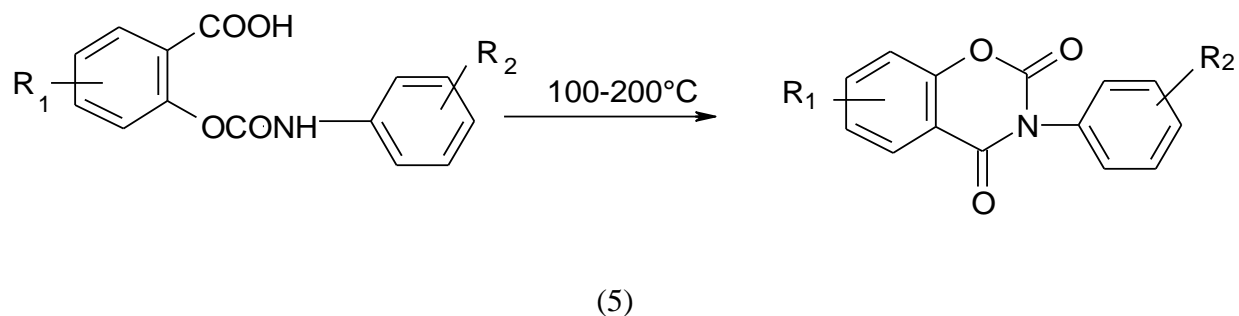
Jako výchozí látku pro přípravu 3-(4-alkylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4-(3H)-dionů lze použít kyselinu salicylovou, která reaguje s příslušným fenyloksianátem v poměru 1:1 při teplotě 50-100 °C v organickém rozpouštědle (toluen, chloroform, benzen)¹⁴



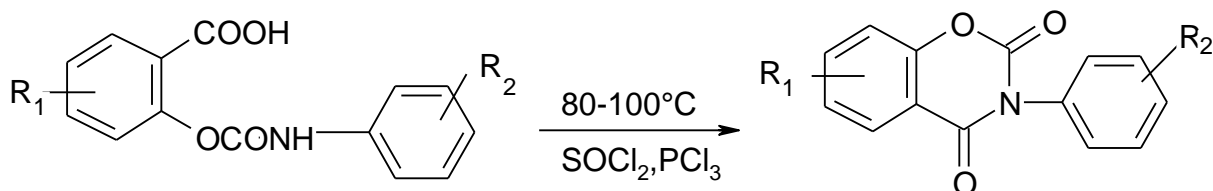
Pokud se použije místo fenyloksianátu *N*- fenylokarbamoyl-chlorid, musí se neutralizovat vznikající chlorovodík přidávkem triethylaminu (popř. pyridinu)¹⁴



Produktem těchto dvou reakcí je 2- fenylokarbamoyloxy-benzoová kyselina. K cyklizaci této kyseliny za vzniku 3-(4-alkylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4-(3H)-dionů dochází při teplotě 100-200 °C. Jako rozpouštědlo se používá tetralin (dekalin)¹⁴

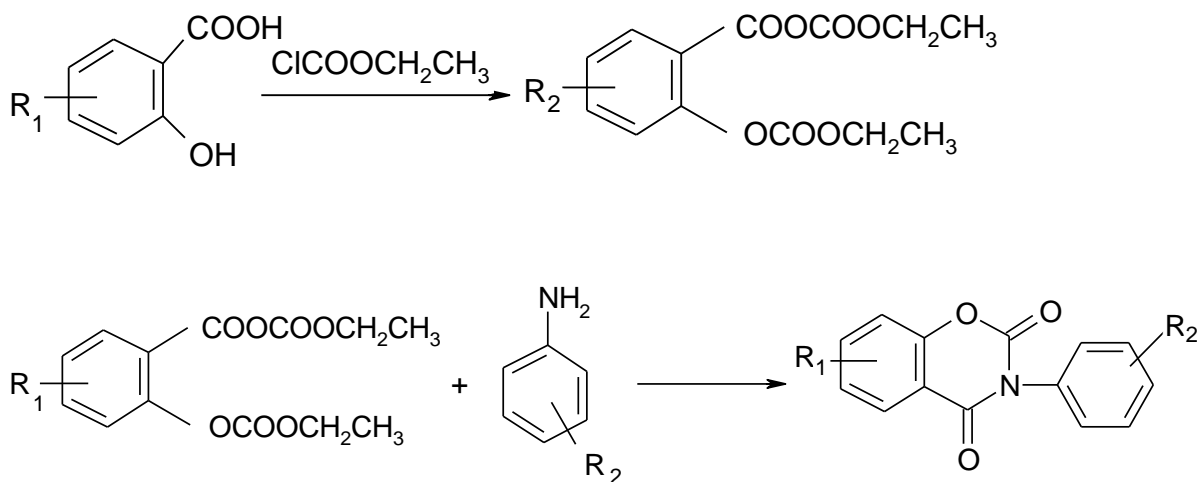


Zahřívání 2-fenylkarbamoyloxy-benzoové kyseliny s chloridem fosforitým, nebo chloridem thionylu. Lze provést uzavření cyklu v teplotním rozmezí 80-100 °C.¹⁴



(6)

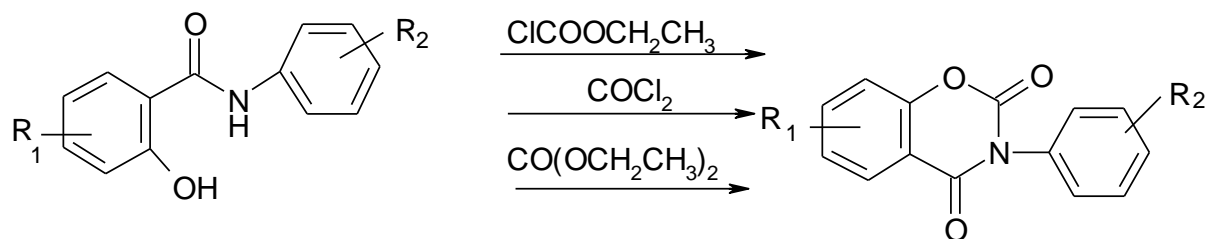
Za vzniku 3-(4-alkylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4-(3H)-dionů může také reagovat příslušně substituovaná kyselina salicylová za chlazení v tetrahydrofuranu za přítomnosti triethylaminu s ethylchloroformiátem v dvoumolárním nadbytku za vzniku 2-ethoxykarbonylfenyl-etyl-karbonátu. Do této reakční směsi se po 20 minutách přidá příslušně substituovaný anilín.¹⁴



(7)

Další možností přípravy 3-(4-alkylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4-(3H)-dionů je cyklizační reakce, kde výchozí látkou je příslušně substituovaný *N*-(4-alkylfenyl)-halogensalicylamid. Ten reaguje za varu v přítomnosti pyridinu

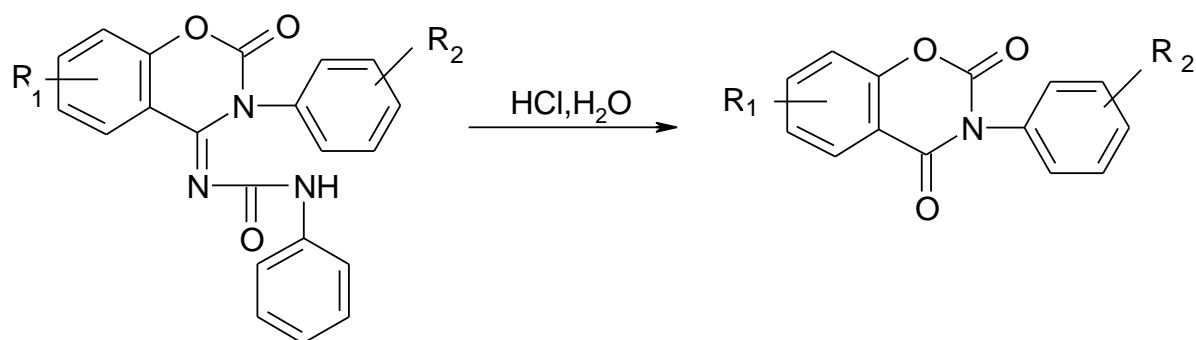
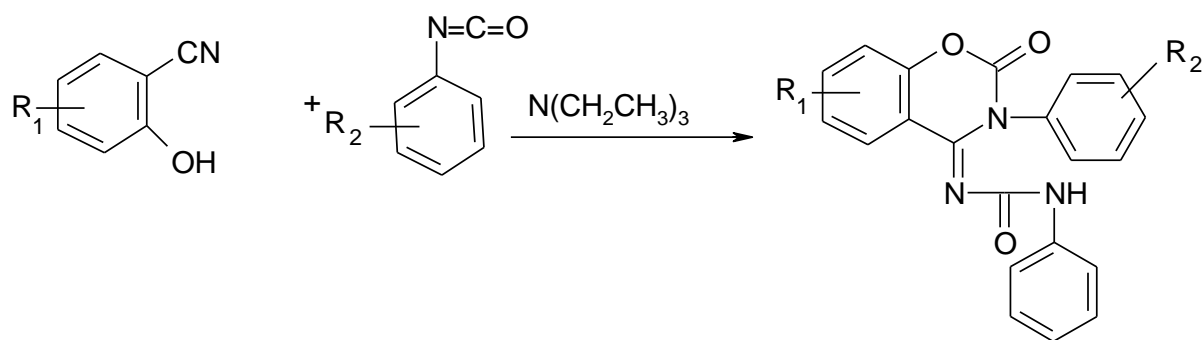
s nadbytkem etylchloroformiátu, fosgenu, nebo dietylkarbonátu za vzniku *N*-(4-alkylfenyl)-halogensalicylamidů¹⁵



(8)

Reakcí příslušně substituovaného 2- hydroxybenzonitrilu s odpovídajícím fenyloisokyanátem v toluenu za přítomnosti triethylaminu a následné hydrolyzy produktu lze využít k přípravě

3-(4-alkylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4-(3H)-dionů.¹⁶



(9)

Pro přípravu *N*-(4-alkylfenyl)-halogensalicylamidů byla zvolena metoda využívající reakci substituované kyseliny salicylové s příslušně substituovaným anilínem (kapitola 4.1. schéma (1)), jako rozpouštědlo byl použit toluen, protože s touto metodou byly na pracovišti zkušenosti. Pro přípravu

3-(4-alkylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4-(3H)-dionů byla zvolena metoda, která využívá reakce *N*-(4-alkylfenyl)-halogensalicylamidů s nadbytkem etylchlorformiátu v prostředí pyridinu (kapitola 4.2. schéma (8)). I s touto metodou byly na pracovišti zkušenosti.

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1.POSTUP PŘÍPRAVY

***N*-(4-ALKYLFENYL)-HALOGENSALICYLAMIDŮ**

Výchozí látkou byla substituovaná kyselina salicylová (0,02 mol) a příslušně substituovaný anilín (0,02 mol). Kyselina byla rozpuštěna ve 100 ml toluenu, pak byl přidán anilín a chlorid fosforitý (0,01 mol). Směs byla zahřívána pod zpětným chladičem k varu 3 hodiny. Poté byl toluen oddestilován na rotační vakuové odparce. Na závěr byla provedena rekrystalizace v etanolu, výtěžek reakce 52-79%.

5.2.POSTUP PŘÍPRAVY

3-(4-ALKYLFENYL)-1,3-BENZOXAZIN-2,4-(3H)-DIONŮ

Výchozí látkou byl příslušný *N*-(4-alkylfenyl)-halogensalicylamid (40 mmol), ten byl rozpuštěn v 20 ml pyridin. Tato směs byla umístěna do ledové lázně. Pak bylo opatrně za míchání přikapáván metylchloroformiát (48 mmol). Po 10 minutách byla odstraněna ledová lázeň a směs byla zahřívána pod zpětným chladičem 1 hodinu. Po ukončení zahřívání byla směs nechána stát 20 hodin. Pak byla převedena do 50 ml roztoku 5% kyseliny chlorovodíkové. Došlo k vysrážení surového produktu. Sraženina byla odfiltrována a převedena do 40 ml roztoku 5% hydroxidu sodného a byla opět odfiltrována. Vzniklý produkt byl rekrystalizován v 96% ním roztoku etanolu, výtěžek reakce 55-65%.

5.3. FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÉ VLASTNOSTI LÁTEK

Připravené produkty byly sušeny v sušící pistolí nad oxidem fosforečným při teplotě 78,4 °C a tlaku 142 mBar. Jejich teploty tání byly měřeny na Kofflerově bloku.

Dále byly látky předány k dalším strukturním hodnocením. Byla měřena

uhlíková a vodíková spektra nukleární magnetické rezonance. Pro měření byl použit přístroj VARIAN MERCURI-VX BB 300. Uhlíková spektra byla měřena při frekvenci 75 MHz a vodíková při frekvenci 300 MHz. Jako rozpouštědlo byl použit dimetylsulfoxid. Hodnoty chemických posunů byly vztaženy k nepřímému standardu tetrametylsilanu, jehož signál má hodnotu 2,49 ppm pro ^1H spektra a 39,7 ppm pro ^{13}C spektra. Infračervená spektra byla měřena na přístroji NICORET IMPACT 400. Ve formě tablet bromidu draselného (0,7 g látky, 400 mg KBr). Elementární analýza byla provedena na Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR v Praze.

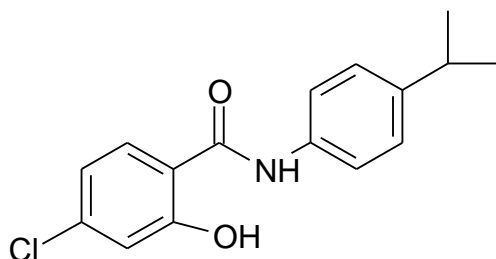
5.4.HODNOCENÍ ANTIMYKOBAKTERIÁLNÍ AKTIVITY

Hodnocení antimykobakteriální aktivity bylo prováděno Krajskou hygienickou stanicí v Ostravě MUDr. Jarmilou Kaustovou. K hodnocení byly použity kmeny z České sbírky mikroorganismů *M. tuberculosis* My 331/88, *M. kansasii* My 235/80, *M.avium* My 331/88 a jeden kmen *M. kansasii* 6 509/96 byl izolován od pacienta. Jako kontrolní testovací preparát byl použit izoniazid.

5.5. SYNTÉZA ROZVĚTVENÝCH DERIVÁTŮ *N*-(4-ALKYLFENYL)-HALOGENSALICYLAMIDŮ

Bylo syntetizováno osm derivátů *N*-(4-alkylfenyl)-halogensalicylamidů.

5.5.1. *N*-(4-isopropylfenyl)-4-chlorsalicylamid (T 5721)



$M_r=289,76$

Sumární vzorec: $C_{16}H_{16}ClNO_2$, teplota tání: 218-219°C

Použité chemikálie: kyselina 4-chlorsalicylová

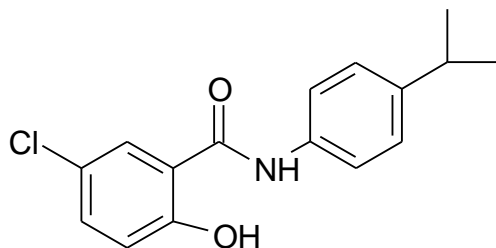
4-isopropylanilín

chlorid fosforitý

toluen

etanol 96%ní

5.5.2 *N*-(4-isopropylfenyl)-5-chlorsalicylamid (T 5722)



$M_r=289,76$

Sumární vzorec: $C_{16}H_{16}ClNO_2$, teplota tání: 181-185°C

Použité chemikálie: kyselina 5-chlorsalicylová

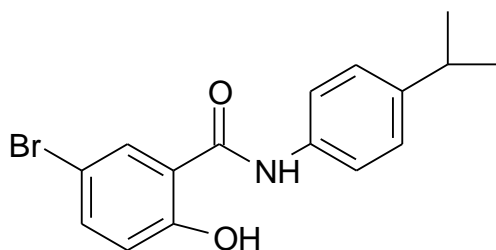
4-isopropylanilín

chlorid fosforitý

toluen

etanol 96%ní

5.5.3. *N*-(4-isopropylfenyl)-5-bromsalicylamid (T 5723)



$M_r=334,22$

Sumární vzorec: $C_{16}H_{16}BrNO_2$, teplota tání: 197-198°C

Použité chemikálie: kyselina 5-bromsalicylová

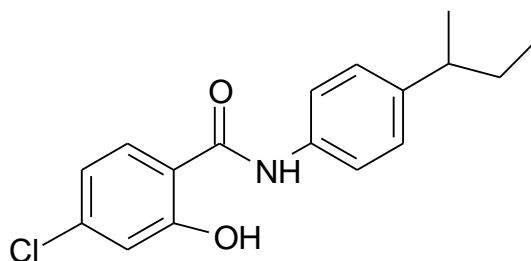
4-isopropylanilín

chlorid fosforitý

toluen

etanol 96%ní

5.5.4. *N*-(4-*sek*-butylfenyl)-4-chlorsalicylamid (T 5728)



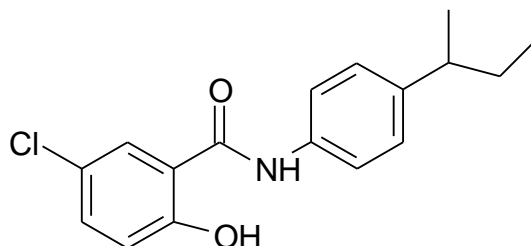
$M_r=303,79$

Sumární vzorec: $C_{17}H_{18}ClNO_2$, teplota tání: 200-205°C

Použité chemikálie: kyselina 4-chlorsalicylová

4-*sek*-butylanilín
chlorid fosforitý
toluen
etanol 96%ní

5.5.5. *N*-(4-*sek*-butylfenyl)-5-chlorsalicylamid (T5729)



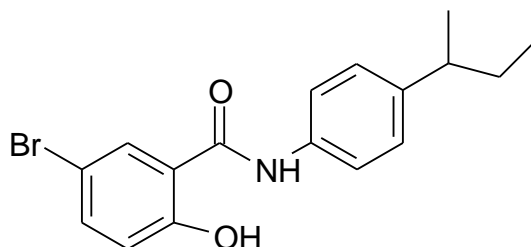
$M_r=303,29$

Sumární vzorec: $C_{17}H_{18}ClNO_2$, teplota tání: 157-159°C

Použité chemikálie: kyselina 5-chlorsalicylová

4-*sek*-butylanilín
chlorid fosforitý
toluen
etanol 96%ní

5.5.6. *N*-(4-*sek*-butylfenyl)-5-bromsalicylamid (T 5730)



$M_r=348,29$

Sumární vzorec: $C_{17}H_{18}BrNO_2$, teplota tání: 163-165°C

Použité chemikálie: kyselina 5-bromsalicylová

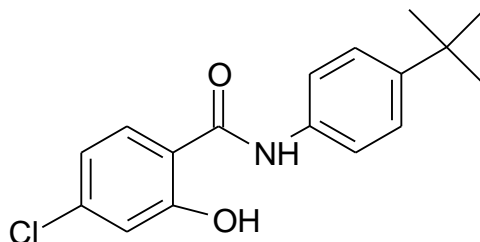
4-*sek*-butylanilín

chlorid fosforitý

toluen

etanol 96%ní

5.5.7 *N*-(4-*terc*-butylfenyl)-4-chlorsalicylamid (T 5508)



$M_r=303,79$

Sumární vzorec: $C_{17}H_{18}ClNO_2$, teplota tání: 232-233°C

Použité chemikálie: kyselina 4-chlorsalicylová

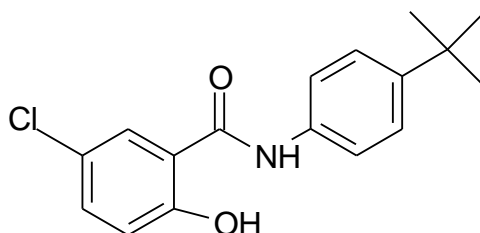
4-*terc*-butylanilín

chlorid fosforitý

toluen

etanol 96%ní

5.5.8 *N*-(4-*terc*-butylfenyl)-5-chlorsalicylamid (T 5512)



$M_r=303,79$

Sumární vzorec: $C_{17}H_{18}ClNO_2$, teplota tání: 221-222°C

Použité chemikálie: kyselina 5-chlorsalicylová

4-*terc*-butylanilín

chlorid fosforitý

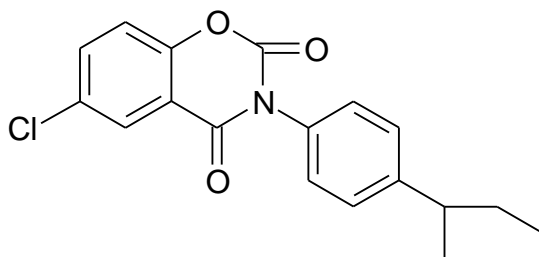
toluen

etanol 96%ní

5.6. SYNTÉZA ROZVĚTVENÝCH DERIVÁTŮ 3-(4-ALKYLFENYL)-1,3-BENZOXAZIN-2,4-(3H)-DIONŮ

Bylo syntetizováno sedm derivátů 3-(4-alkylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4-(3H)-dionů

5.6.1. 6-chlor-3-(4-*sek*-butylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (T 5739)



$M_r=329,79$

Sumární vzorec: $C_{18}H_{16}ClNO_3$, teplota tání: 192-199°C

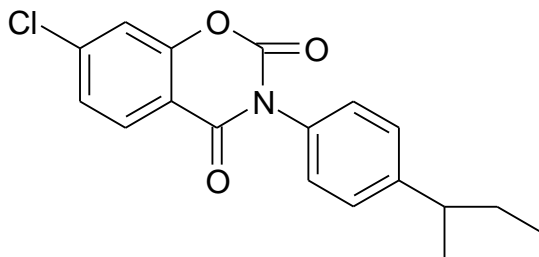
Použité chemikálie: *N*-(4-*sek*-butylfenyl)-5-chlorsalicylamid

metylester kyseliny chlormravenčí

bezvodý pyridin

etanol 96%ní

5.6.2. 7-chlor-3-(4-*sek*-butylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (T 5740)



$M_r=329,79$

Sumární vzorec: $C_{18}H_{16}ClNO_3$, teplota tání: 136-137°C

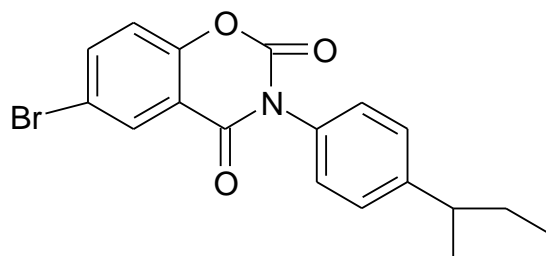
Použité chemikálie: *N*-(4-*sek*-butylfenyl)-4-chlorsalicylamid

metylester kyseliny chlormravenčí

bezvodý pyridin

etanol 96%ní

5.6.3. 6-brom-3-(4-*sek*-butylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (T 5741)



$M_r=374,24$

Sumární vzorec: $C_{18}H_{16}BrNO_3$, teplota tání: 208-209°C

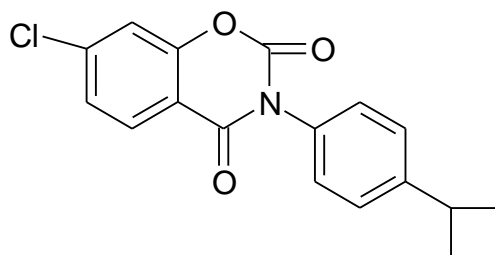
Použité chemikálie: *N*-(4-*sek*-butylfenyl)-5-bromsalicylamid

metylester kyseliny chlormravenčí

bezvodý pyridin

etanol 96%ní

5.6.4. 7-chlor-3-(4-isopropylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (T 5742)



$M_r=315,76$

Sumární vzorec: $C_{17}H_{14}ClNO_3$, teplota tání: 180-183°C

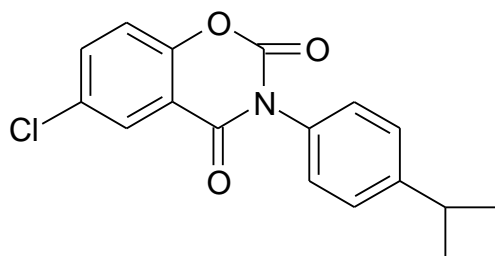
Použité chemikálie: *N*-(4-isopropylfenyl)-4-chlorsalicylamid

metylester kyseliny chlormravenčí

bezvodý pyridin

etanol 96%ní

5.6.5. 6-chlor-3-(4-isopropylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (T 5743)



$M_r=315,76$

Sumární vzorec: $C_{17}H_{14}ClNO_3$, teplota tání: 258-260°C

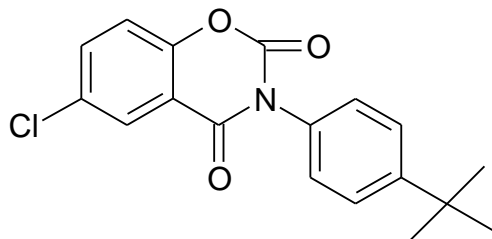
Použité chemikálie: *N*-(4-isopropylfenyl)-5-chlorsalicylamid

metylester kyseliny chlormravenčí

bezvodý pyridin

etanol 96%ní

5.6.6. 6-chlor-3-(4-*tert*-butylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (T 5573)



$M_r=329,79$

Sumární vzorec: $C_{18}H_{16}ClNO_3$, teplota tání : 213-215°C

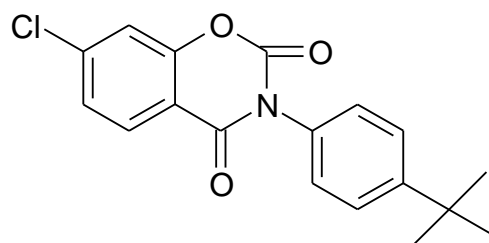
Použité chemikálie: *N*-(4-*tert*-butylfenyl)-5-chlorsalicylamid

metylester kyseliny chlormravenčí

bezvodý pyridin

etanol 96%ní

5.6.7. 7-chlor-3-(4-*tert*-butylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (T 5561)



$M_r=329,79$

Sumární vzorec: $C_{18}H_{16}ClNO_3$, teplota tání: 214-215°C

Použité chemikálie: *N*-(4-*tert*-butylfenyl)-4-chlorsalicylamid

metylester kyseliny chlormravenčí

bezvodý pyridin

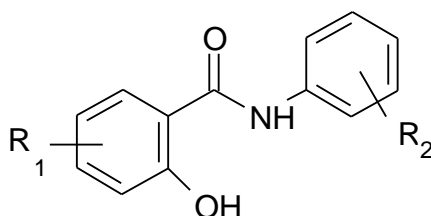
etanol 96%ní

6. VÝSLEDKY

6.1. PŘEHLED PŘIPRAVENÝCH LÁTEK

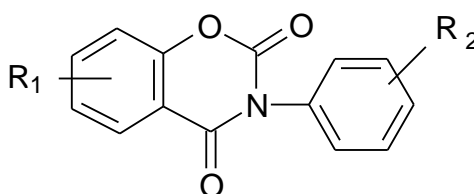
V následujících tabulkách je uveden přehled připravených látek, jejich kódové označení T čísla, substituenty a sumární vzorce.

Tabulka připravených derivátů *N*-(4-alkylfenyl)-halogensalicylamidů



| Kód látky | R ₁ | R ₂ | Sumární vzorec |
|-----------|----------------|---------------------|---|
| 5721 | 4-Cl- | Isopropyl- | C ₁₆ H ₁₆ ClNO ₂ |
| 5722 | 5-Cl- | Isopropyl- | C ₁₆ H ₁₆ ClNO ₂ |
| 5723 | 5-Br- | Isopropyl- | C ₁₆ H ₁₆ BrNO ₂ |
| 5728 | 4-Cl- | <i>Sek</i> -butyl- | C ₁₇ H ₁₈ ClNO ₂ |
| 5729 | 5-Cl- | <i>Sek</i> -butyl- | C ₁₇ H ₁₈ ClNO ₂ |
| 5730 | 5-Br- | <i>Sek</i> -butyl- | C ₁₇ H ₁₈ BrNO ₂ |
| 5508 | 4-Cl- | <i>Terc</i> -butyl- | C ₁₇ H ₁₈ ClNO ₂ |
| 5512 | 5-Cl- | <i>Terc</i> -butyl- | C ₁₇ H ₁₈ ClNO ₂ |

**Tabulka připravených derivátů
3-(4-alkylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4-(3H)-dionů**



| Kód látky | R ₁ | R ₂ | Sumární vzorec |
|-----------|----------------|---------------------|---|
| T 5739 | 6-Cl- | <i>Sek</i> -butyl- | C ₁₈ H ₁₆ ClNO ₃ |
| T5740 | 7-Cl- | <i>Sek</i> -butyl- | C ₁₈ H ₁₆ ClNO ₃ |
| T5741 | 6-Br- | <i>Sek</i> -butyl- | C ₁₈ H ₁₆ BrNO ₃ |
| T5742 | 7-Cl- | Isopropyl- | C ₁₇ H ₁₄ ClNO ₃ |
| T5743 | 6-Cl- | Isopropyl- | C ₁₇ H ₁₄ ClNO ₃ |
| T5573 | 6-Cl- | <i>Terc</i> -butyl- | C ₁₈ H ₁₆ ClNO ₃ |
| T5561 | 7-Cl- | <i>Terc</i> -butyl- | C ₁₈ H ₁₆ ClNO ₃ |

6.2. TEPLOTA TÁNÍ

Teploty tání jednotlivých látek jsou uvedeny v následujících tabulkách.

Teplota tání připravených derivátů *N*-(4-alkylfenyl)-halogensalicylamidů

| | | | | | | | | |
|-------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Kód látky | T5721 | T5722 | T5723 | T5728 | T5729 | T5730 | T5508 | T5512 |
| Teplota tání (°C) | 218-219 | 181-185 | 197-198 | 200-205 | 157-159 | 163-165 | 232-233 | 221-222 |

Teplota tání připravených derivátů

3-(4-alkylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4-(3H)-dionů:

| | | | | | | | |
|-------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Kód látka | T5739 | T5740 | T5741 | T5742 | T5743 | T5573 | T5561 |
| Teplota tání (°C) | 192-199 | 136-137 | 208-209 | 180-183 | 258-260 | 213-215 | 214-215 |

6.3. Infračervená spektra

Hodnoty vybraných absorpčních maxim ν (C=O) zjištěných z infračervených spekter jsou uvedeny v následujících tabulkách.

Tabulka absorpčních maxim ν (C=O) infračervených spekter derivátů N-(4-alkylfenyl)-halogensalicylamidů

| | | | | |
|--|-------|-------|-------|-------|
| Kód látky | T5721 | T5722 | T5723 | T5728 |
| Hodnota absorpčního maxima (cm ⁻¹) | 1616 | 1620 | 1621 | 1621 |

| | | | | |
|--|-------|-------|-------|-------|
| Kód látky | T5729 | T5730 | T5508 | T5512 |
| Hodnota absorpčního maxima (cm ⁻¹) | 1621 | 1621 | 1623 | 1627 |

Tabulka absorpčních maxim ν (C=O) infračervených spekter 3-(4-alkylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4-(3H)-dionů

| | | | | |
|---|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Kód látky | T5739 | T5740 | T5741 | T5742 |
| Hodnota absorpčních maxim (cm ⁻¹) | 1773,1704 | 1776,1696 | 1770,1703 | 1770,1704 |

| | | | | |
|---|-----------|-----------|-----------|------------|
| Kód látky | T5742 | T5743 | T5573 | T5561 |
| Hodnota absorpčních maxim (cm ⁻¹) | 1770,1704 | 1777,1698 | 1770,1709 | 1767, 1716 |

6.4. Uhlíková spektra ^{13}C nukleární magnetické rezonance

Hodnoty signálů chemicky ekvivalentních uhlíků z interpretovaných NMR spekter připravených látek ve formě chemických posunů δ (ppm) jsou uvedena v následujících tabulkách.

Uhlíková spektra byla měřena při frekvenci 75 MHz.

| Kód látky | Hodnoty chemických posunů signálů uhlíku δ (ppm) |
|--------------|---|
| T5721 | ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 165.7, 159.5, 144.7, 137.6, 135.9, 130.9, 126.7, 121.2, 119.4, 117.0, 33.1, 24.1 |
| T5722 | ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 165.2, 157.4, 144.8, 135.8, 133.3, 128.4, 126.7, 122.9, 121.2, 119.3, 33.1, 24.1 |
| T5723 | ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 165.2, 157.8, 144.7, 136.1, 135.8, 131.3, 126.7, 121.2, 119.9, 119.8, 110.3, 33.1, 24.1 |
| T5728 | ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 165.7, 159.5, 143.4, 137.6, 135.9, 130.9, 127.3, 121.2, 119.3, 117.1, 117.0, 40.6, 30.8, 22.0, 12.3 |
| T5729 | ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 165.2, 157.3, 143.5, 135.9, 133.3, 128.5, 127.3, 122.9, 121.2, 119.4, 119.3, 40.6, 30.8, 22.0, 12.3 |
| T5730 | ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 165.1, 157.8, 143.4, 136.1, 135.9, 131.3, 127.3, 121.2, 120.0, 119.7, 110.3, 40.6, 30.8, 22.0, 12.3 |
| T5508 | ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 165.7, 159.5, 146.9, 137.6, 135.6, 130.9, 125.6, 120.9, 119.4, 117.1, 34.3, 31.4. |
| T5512 | ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 165.2, 157.4, 147.0, 135.6, 133.3, 128.5, 125.6, 122.9, 120.9, 119.4, 34.3, 31.4. |

| Kód látky | Hodnoty chemických posunů signálů uhlíku δ (ppm) |
|--------------|--|
| T5739 | ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 160.0, 151.5, 148.0, 147.5, 136.1, 132.8, 129.4, 128.4, 127.7, 126.5, 118.9, 116.7, 40.8, 30.7, 21.8, 12.3 |
| T5740 | ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 160.3, 153.3, 148.0, 147.6, 140.5, 132.8, 129.2, 128.4, 127.7, 125.8, 116.8, 114.2, 40.8, 30.7, 21.8, 12.3 |
| T5741 | ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 159.9, 151.9, 148.0, 147.5, 138.9, 132.8, 129.4, 128.4, 127.7, 119.2, 117.1, 117.0, 40.8, 30.7, 21.8, 12.3 |
| T5742 | ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 160.3, 153.3, 149.2, 147.6, 140.5, 132.8, 129.3, 128.5, 127.1, 125.8, 116.8, 114.2, 33.4, 24.0 |
| T5743 | ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 160.1, 151.5, 149.2, 147.6, 136.4, 132.8, 129.4, 128.4, 127.2, 126.5, 118.9, 116.7, 33.4, 24.0 |
| T5573 | ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 160.1, 151.5, 151.4, 147.6, 136.1, 132.6, 129.4, 128.1, 126.5, 126.1, 118.9, 116.7, 34.7, 31.3. |
| T5561 | ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 160.4, 153.3, 151.5, 147.7, 140.6, 132.6, 129.3, 128.2, 126.2, 125.9, 125.7, 120.9, 116.9, 114.2, 34.7, 31.4 |

6.5. Vodíková spektra ^1H nukleární magnetické rezonance

V následujících tabulkách jsou uvedeny hodnoty signálů chemicky ekvivalentních vodíků z interpretovaných NMR spekter připravených látek ve formě posunů δ (ppm). Je uveden typ signálu (bs-široký singlet, s-singlet, d-duplet, m-multiplied, dd-dublet dubletu). Je uveden počet vodíků, kterým přísluší daný signál a poloha vodíku v molekule. U štěpených signálů je uvedena interakční konstanta v Hz. Vodíková spektra byla měřena při 300 MHz.

| Kód látky | Hodnoty chemických posunů signálů vodíků δ (ppm) |
|--------------|--|
| T5721 | ^1H NMR (300 MHz) δ 12.21 (1H, bs, NH), 10.32 (1H, bs, OH), 7.96 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H6), 7.64-7.54 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.28-7.18 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 7.08-6.98 (2H, m, H3, H5), 2.94-2.78 (1H, m, CH), 1.18 (6H, t, $J=6.9$ Hz, CH ₃) |
| T5722 | ^1H NMR (300 MHz) δ 11.96 (1H, bs, NH), 10.35 (1H, bs, OH), 7.98 (1H, d, $J=2.6$ Hz, H6), 7.64-7.55 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.46 (1H, dd, $J=8.8$ Hz, $J=2.6$ Hz, H4), 7.27-7.19 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 7.00 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H3), 2.94-2.78 (1H, m, CH), 1.19 (6H, d, $J=6.9$ Hz, CH ₃) |
| T5723 | ^1H NMR (300 MHz) δ 11.98 (1H, bs, NH), 10.35 (1H, bs, OH), 8.10 (1H, d, $J=2.5$ Hz, H6), 7.63-7.56 (2H, m, AA', BB', overlapped, H2', H6'), 7.57 (1H, dd, overlapped, $J=8.8$ Hz, $J=2.5$ Hz, H4), 7.28-7.18 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 6.94 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H3), 2.94-2.78 (1H, m, CH), 1.19 (6H, d, $J=6.9$ Hz, CH ₃) |
| T5728 | ^1H NMR (300 MHz) δ 10.32 (1H, bs, OH), 7.96 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H6), 7.64-7.54 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.23-7.13 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 7.05-6.99 (2H, m, H3, H5), 2.64-2.50 (1H, m, CH), 1.60-1.46 (2H, m, CH ₂), 1.17 (3H, d, $J=7.1$ Hz, CH ₃), 0.75 (3H, t, $J=7.1$ Hz, CH ₃) |

| | |
|--------------|--|
| T5729 | ¹ H NMR (300 MHz) δ 11.87 (1H, bs, NH), 10.35 (1H, bs, OH), 7.98 (1H, d, <i>J</i> =2.6 Hz, H6), 7.63-7.56 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.45 (1H, dd, <i>J</i> =8.8 Hz, <i>J</i> =2.6 Hz, H4), 7.22-7.14 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 7.00 (1H, d, <i>J</i> =8.8 Hz, H3), 2.64-2.51 (1H, m, CH), 1.61-1.46 (2H, m, CH ₂), 1.17 (3H, d, <i>J</i> =7.1 Hz, CH ₃), 0.75 (3H, t, <i>J</i> =7.1 Hz, CH ₃) |
| T5730 | ¹ H NMR (300 MHz) δ 11.97 (1H, bs, NH), 10.35 (1H, bs, OH), 8.10 (1H, d, <i>J</i> =2.5 Hz, H6), 7.64-7.56 (2H, m, AA', BB', overlapped, H2', H6'), 7.57 (1H, dd, overlapped, <i>J</i> =8.8 Hz, <i>J</i> =2.5 Hz, H4), 7.22-7.15 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 6.95 (1H, d, <i>J</i> =8.8 Hz, H3), 2.63-2.51 (1H, m, CH), 1.60-1.46 (2H, m, CH ₂), 1.17 (3H, d, <i>J</i> =7.1 Hz, CH ₃), 0.75 (3H, t, <i>J</i> =7.1 Hz, CH ₃) |
| T5508 | ¹ H NMR (300 MHz, DMSO) δ 12.21 (1H, bs, NH), 10.33 (1H, s, OH), 7.96 (1H, d, <i>J</i> =9.1 Hz, H6), 7.63-7.56 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.41-7.33 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 7.05-7.00 (2H, m, H3, H5), 1.27 (9H, s, CH ₃). |
| T5512 | ¹ H NMR (300 MHz, DMSO) δ 11.97 (1H, bs, NH), 10.37 (1H, s, OH), 7.98 (1H, d, <i>J</i> =2.6 Hz, H6), 7.64-7.56 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.46 (1H, dd, <i>J</i> =8.9 Hz, <i>J</i> =2.6 Hz, H4), 7.41-7.33 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 7.00 (1H, d, <i>J</i> =8.9 Hz, H3), 1.27 (9H, s, CH ₃). |

| Kód látky | Hodnoty chemických posunů signálů vodíků δ (ppm) |
|-----------|--|
| T5739 | ^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7.95-7.86 (2H, m, H5, H7), 7.56 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H8), 7.38-7.26 (4H, m, H2', H3', H5', H6'), 2.75-2.58 (1H, m, CH), 1.66-1.51 (2H, m, CH ₂), 1.23 (3H, d, $J=7.1$ Hz, CH ₃), 0.81 (3H, t, $J=7.1$ Hz, CH ₃) |
| T5740 | ^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7.98 (1H, d, $J=8.2$ Hz, H5), 7.75 (1H, d, $J=1.9$ Hz, H8), 7.52 (1H, dd, $J=8.2$ Hz, $J=1.9$ Hz, H6), 7.37-7.24 (4H, m, H2', H3', H5', H6'), 2.74-2.59 (1H, m, CH), 1.66-1.51 (2H, m, CH ₂), 1.22 (3H, d, $J=7.1$ Hz, CH ₃), 0.81 (3H, t, $J=7.1$ Hz, CH ₃) |
| T5741 | ^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.07-7.98 (2H, m, H5, H7), 7.49 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H8), 7.37-7.26 (4H, m, H2', H3', H5', H6'), 2.75-2.59 (1H, m, CH), 1.66-1.52 (2H, m, CH ₂), 1.22 (3H, d, $J=7.1$ Hz, CH ₃), 0.81 (3H, t, $J=7.1$ Hz, CH ₃) |
| T5742 | ^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7.98 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H5), 7.74 (1H, d, $J=1.8$ Hz, H8), 7.51 (1H, dd, $J=8.5$ Hz, $J=1.8$ Hz, H6), 7.41-7.27 (4H, m, H2', H3', H5', H6'), 3.04-2.88 (1H, m, CH), 1.25 (6H, d, $J=6.9$ Hz, CH ₃) |
| T5743 | ^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7.99-7.85 (2H, m, H5, H7), 7.56 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H8), 7.42-7.34 (2H, m, AA' BB', H2', H6'), 7.34-7.28 (2H, m, AA' BB', H3', H5'), 3.08-2.86 (1H, m, CH), 1.25 (6H, d, $J=7.03$ Hz, CH ₃) |
| T5573 | ^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7.94-7.88 (2H, m, H5, H7), 7.56 (1H, dd overlaped, $J=8.8$ Hz, $J=0.6$ Hz, H8), 7.55-7.49 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.35-7.28 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 1.33 (9H, s, CH ₃). |

| | |
|-------|--|
| T5561 | ¹ H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7.98 (1H, d, <i>J</i> =8.5 Hz, H5), 7.74 (1H, d, <i>J</i> =1.9 Hz, H8), 7.55-7.48 (3H, m, H6, H2', H6'), 7.35-7.27 (2H, m, AA', BB' H3', H5'), 1.39 (9H, s, CH ₃) |
|-------|--|

6.6. Elementární analýza

V následujících tabulkách je uvedeno procentuální zastoupení uhlíku, vodíku a dusíku v připravených látkách.

| Kód látky | C(%) vypočtené | H(%) vypočtené | N(%) vypočtené |
|-----------|----------------|----------------|----------------|
| | C(%) naměřené | H(%) naměřené | N(%) naměřené |
| T5721 | 66,32 | 5,57 | 4,83 |
| | 66,21 | 5,55 | 4,44 |
| T5722 | 66,32 | 5,57 | 4,83 |
| | 66,44 | 5,51 | 4,43 |
| T5723 | 57,50 | 4,83 | 4,19 |
| | 57,34 | 4,72 | 3,85 |
| T5728 | 67,21 | 5,97 | 4,61 |
| | 67,23 | 5,94 | 4,40 |
| T5729 | 67,21 | 5,97 | 4,61 |
| | 67,03 | 5,99 | 4,31 |
| T5730 | 58,63 | 5,21 | 4,02 |
| | 58,17 | 4,91 | 3,75 |
| T5508 | 67,21 | 5,97 | 5,97 |
| | 67,17 | 6,08 | 5,59 |
| T5512 | 67,21 | 5,97 | 5,97 |
| | 67,08 | 5,93 | 5,42 |

| Kód látky | C(%) vypočtené | H(%) vypočtené | N(%) vypočtené |
|-----------|----------------|----------------|----------------|
| | C(%) naměřené | H(%) naměřené | N(%) naměřené |
| T5739 | 65,56 | 4,89 | 4,25 |
| | 65,32 | 4,90 | 4,06 |
| T5740 | 65,56 | 4,89 | 4,25 |
| | 65,27 | 4,90 | 4,07 |
| T5741 | 57,77 | 4,31 | 3,74 |
| | 57,54 | 4,27 | 3,50 |
| T5742 | 64,67 | 4,47 | 4,44 |
| | 64,62 | 4,43 | 4,20 |
| T5743 | 64,67 | 4,47 | 4,44 |
| | 64,63 | 4,44 | 4,24 |
| T5573 | 65,42 | 4,70 | 4,12 |
| | 65,56 | 4,89 | 4,25 |
| T5561 | 65,29 | 4,74 | 3,97 |
| | 65,56 | 4,89 | 4,25 |

6.7. Antimykobakteriální aktivita

V následujících tabulkách jsou uvedeny výsledky testů antimykobakteriální aktivity připravených produktů. Hodnoty představují minimální inhibiční koncentrace v $\mu\text{mol/l}$ po 14 dnech inkubace a po 21 dnech inkubace.

Jako referenční látka byl použit isoniazid (INH).

| Kód látky | <i>M.tuberculosis</i> My 331/88 | <i>M.kansasii</i> My 235/80 | <i>M.kansasii</i> 6 509/96 | <i>M.avium</i> My 330/88 |
|-----------|------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| T5721 | 8/8 | 8/16 | 16/16 | 8/16 |
| T5722 | 8/8 | 16/16 | 16/16 | 16/32 |
| T5723 | 8/8 | 16/16 | 16/16 | 16/32 |
| T5728 | 8/8 | 16/16 | 16/16 | 8/8 |
| T5729 | 8/8 | 16/16 | 16/16 | 16/16 |
| T5730 | 4/8 | 16/16 | 16/16 | 16/16 |
| T5508 | 16/16 | 32/62,5 | 32/62,5 | - |
| T5512 | 8/16 | 16/16 | 16/16 | 16/32 |
| isoniazid | 1/2 | 250/250 | 8/8 | 250/250 |

| Kód látky | <i>M.tuberculosis</i> My 331/88 | <i>M.kansasii</i> My 235/80 | <i>M.kansasii</i> 6 509/96 | <i>M.avium</i> My 330/88 |
|-----------|------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| T5739 | 4/8 | 16/16 | 16/16 | 32/32 |
| T5740 | 4/4 | 8/8 | 8/8 | 8/8 |
| T5741 | 4/8 | 8/8 | 8/16 | 16/32 |
| T5742 | 4/4 | 8/8 | 8/16 | 8/16 |
| T5743 | 4/8 | 8/16 | 8/16 | 32/32 |
| T5573 | 8/16 | 8/16 | 8/8 | 16/32 |
| T5561 | 4/4 | 8/16 | 8/8 | 4/8 |
| isoniazid | 1/2 | 250/250 | 8/8 | 250/250 |

7. DISKUZE

Bylo připraveno celkem patnáct látek, osm derivátů *N*-(4-alkylfenyl)-halogensalicylamidů a sedm derivátů

3-(4-alkylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4-(3H)-dionů.

Připravené látky tály, až na dvě výjimky, v rozmezí 1-3 °C. Čistota látek byla ještě kontrolována chromatografií na tenkých vrstvách silufolu (Kavalier Vofice). Látka T 5739 tála v rozmezí 7 °C a látka T 5728 v rozmezí 5°C, avšak tenkovrstvá chromatografie, NMR spektrum, ani elementární analýza neprokázaly přítomnost nečistot.

Infračervená spektra připravených látek vykazovala absorpční pásy odpovídající karbonylovým skupinám. U *N*-(4-alkylfenyl)-halogensalicylamidů to byla valenční vibrace v pásmu od 1616 cm⁻¹ do 1627 cm⁻¹. U 3-(4-alkylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4-(3H)-dionů to byly dvě valenční vibrace v pásech od 1767 cm⁻¹ do 1776 cm⁻¹ a od 1696 cm⁻¹ do 1716 cm⁻¹.

Totožnost jednotlivých látek byla potvrzena NMR spektry.

Elementární analýza prokázala shodu nalezených a vypočtených hodnot procentuálního zastoupení vodíku, uhlíku a dusíku. Naměřené hodnoty byly v rozmezí ±0,4 % vypočtených teoretických hodnot.

Hodnocení antimykobakteriální účinnosti prokázalo, že připravené preparáty jsou na *M.tuberculosis* méně účinné než isoniazid. U *M. kansasii* My 235/80 a u *M. avium* My 330/88 byla prokázána vyšší aktivita námi připravených produktů než isoniazidu. U *M. kansasii* 6 509/96 byla prokázána nižší aktivita připravených látek než isoniazidu.

V naší poslední publikaci prof. Miko¹⁷ ze Slovenské technické univerzity v Bratislavě prokázal, že mechanismus účinku námi syntetizovaných látek je založen na inhibici tvorby ATP.

8. ZÁVĚR

Byly syntetizovány tyto látky:

N-(4-isopropylfenyl)-4-chlorsalicylamid. (T 5721)
N-(4-isopropylfenyl)-5-chlorsalicylamid (T 5722)
N-(4-isopropylfenyl)-5-bromsalicylamid (T 5723)
N-(4-*sek*-butylfenyl)-4-chlorsalicylamid (T 5728)
N-(4-*sek*-butylfenyl)-5-chlorsalicylamid (T5729)
N-(4-*sek*-butylfenyl)-5-bromsalicylamid (T 5730)
N-(4-*terc*-butylfenyl)-4-chlorsalicylamid (T 5508)
N-(4-*terc*-butylfenyl)-5-chlorsalicylamid (T 5512)
6-chlor-3-(4-*sek*-butylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (T 5739)
7-chlor-3-(4-*sek*-butylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (T 5740)
6-brom-3-(4-*sek*-butylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (T 5741)
7-chlor-3-(4-isopropylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (T 5742)
6-chlor-3-(4-isopropylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (T 5743)
6-chlor-3-(4-*terc*-butylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (T 5573)
7-chlor-3-(4-*terc*-butylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (T 5561)

Byly zjištěny jejich základní fyzikálně-chemické vlastnosti, a dále byly hodnoceny na antimykobakteriální aktivitu.

9. POUŽITÁ LITERATURA

-
- ¹ Netrval M., Homolka J., Křepelka K., Feyereisl J. a kolektiv: Mimoplicní tuberkulóza, str.13-17, str.43-45, Praha, Grada Puplishing, 2004
- ² Bednář M., a kol.: Lékařská mikrobiologie, str. 215-233, Praha, Marvil, 1996
- ³ Gartmann J.:Antitubercular agents. Ther.Umsch. 56,str.687-690 (1999)
- ⁴ Homola J., Votava V.: Tuberkulóza, Praha, Karolinum, 1996
- ⁵ Lincová D., Fagheli H.: Základní a aplikovaná farmakologie, str.461-463, Praha, Galén, 2002
- ⁶ Waisser K.: Úvod do biologické aktivity organických sloučenin, Hradec Králové, Gaudeamus, 2004
- ⁷ Waisser K. : Biologicky aktivní organické látky, Hradec Králové, Gaudeamus, 2006
- ⁸ Macielag M.J., Demers J. P., Fraga-Spano S. A., Halasta D.J., Johnson S. G., Kanojia R. M., Russel R.K., Sui Z., Weidner-Wells M. A., Werblood H., Foleno B. D., Goldschmidt R.M., Loeloff M.J., Webb G.C., Barrett J.: Substituted salicylanilides as inhibitors of two-component regulatory systems in bakteria. J.Med.Chem. 41, 2939-2945 (1998)
- ⁹ Lamaire H., Schramm C.H., Cahn A.: Synthesis and germicidal activity of halogenated salicylanilides and related compounds. J.Pharm.Sci.51, 831-837 (1961)
- ¹⁰ Waisser K., Kubicová L.: Biologické účinky látek podobných salicylanilidům 3-aryl-2h,4H-benz(e)(1,3)oxazin-2,4-diony a thiosalicylanilidy. Česk. Slov. Farm. 42, 218-222 (1993)
- ¹¹ Maug H., Bruice T.C.: The Role of intramolecular Bifunctional catalysis of ester hydrolysis in Water. J.Amer.Chem.Soc. 93, 3237-3248 (1971)

-
- ¹² Daidone G., Maggio B., Schillaci D.: Salicylanilide and its heterocyclic analogues. A comparative study of their antimicrobial activity. *Pharmazie* 45, 441-442 (1990)
- ¹³ Borovanský A., Medvecký R.: *Technológia syntetických liečiv*, 1. vydání, str.200-201, Bratislava, Univerzita Komenského, 1987
- ¹⁴ Haaspacher K: N-substituted 2H-1,3-benzoxazine-2,4-(3H) diones. U. S. pat 3 353454 (1967), citováno podle Chem.Abstr. 69, 19169h, (1968)
- ¹⁵ Wagner G., Singer D., Weuffen W.: Untersuchungen über 2-hydroxythiobenzamide und 2-hydroxythiobenzanilide. *Pharmazie* 21, 161-166, (1966)
- ¹⁶ Peridou-Fischer J., Papadopoulos E.P.: Reactions of 2-hydroxybenzoxazole with isocyanates. *J.Heterocycl.Chem.*20, 1159, (1983)
- ¹⁷ Waissner K., Matyk J., Divišová H., Husáková P., Kuneš J., Klimešová V., Kaustová J., Möllmann U., Dahse H.M., Miko M.: The Oriented Development of Antituberculotics: Salicylanilides. *Arch. Pharm. Chem. Life. Sci.* 330, 616-620, (2006)

10. PŘÍLOHY

Publikace Hany Divišové a Petry Husákové

Původní práce

1. WAISSER, K., MATYK, J., DIVIŠOVÁ, H., HUSÁKOVÁ, P., KUNEŠ, J., KLIMEŠOVÁ, V., MÖLLMANN, U., DAHSE, H. M., KIKO, M.: The oriented development of antituberculotics: In acyl moiety halogenated *N*-(4-alkylphenyl)salicylamides. Arch. Pharm. Přijato do tisku.

Předběžná sdělení uveřejněná v časopisech

1. MATYK, J., ADAMEC, J., DIVIŠOVÁ, H., HUSÁKOVÁ, P., WAISSER, K.: Příprava antimykobakteriálních salicylanilidů s předpokládaným výrazným účinkem. (Synthesis of salicylanilides with expected high activity) 32. konference Syntéza a analýza léčiv. Nitra 9. – 11. 9. 2004. Farm. Obzor 73, 2004, 248.
2. MATYK, J., DIVIŠOVÁ, H., HUSÁKOVÁ, P., WAISSER, K.: Vysoce účinné antimykobakteriální salicylanilidy. (High active antimycobacterial salicylanilides). Konference Pokroky v organické, bioorganické a farmaceutické chemii. Nymburk 26.-28. 11. 2004. Chem. Listy 98, 2004, 1041.

Abstrakty ve sbornících symposií

1. MATYK, J., DIVIŠOVÁ, H., HUSÁKOVÁ, P., WAISSER, K., KAUSTOVÁ, J.: Perspektiva dalšího vývoje antituberkulotik, inhibitorů dvoukomplementového systému bakterií. (Perspective of development antituberculotics, inhibitors of two-complenets system of bacterium.) 34. konference „Syntéza a analýza léčiv“, Brno 12.-14. 9. 2005. Sborník abstrakt, str. 92. [ISBN 80-7305-533-3].