

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA ANORGANICKÉ A ORGANICKÉ CHEMIE

**Syntéza antimikrobiálně aktivních anilidů
a jejich sirných analogů**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Hradec Králové 2008
vedoucí diplomové práce

Zbyněk Oktábec
Doc. RNDr. Jarmila Vinšová, CSc.

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracoval samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

Na tomto místě bych chtěl poděkovat své vedoucí diplomové práce Doc. RNDr. Jarmile Vinšové, CSc. za cenné rady a připomínky k práci. Dále bych chtěl poděkovat Ing. Alešovi Imramovskému, PhD., Mgr. Juaně Monreal-Férriz a Mgr. Evě Vavříkové za podnětné připomínky. Dále pak celému kolektivu Katedry anorganické a organické chemie za ochotu a příjemné jednání. Poděkování také náleží dr. Kaustové a jejím spolupracovnicím za laskavé změření biologických aktivit.

Obsah

Obsah	- 3 -
1. Úvod	- 6 -
2. Cíl práce	- 8 -
3. Biologická aktivita salicylanilidů	- 10 -
3.1. Salicylanilidy a jejich aktivita	- 11 -
4. Metodická část	- 14 -
4.1. Možnosti přípravy 2-amino-4,6-di- <i>terc</i> -butylfenolu	- 15 -
4.1.1. Různé způsoby přípravy 2-amino-4,6-di- <i>terc</i> -butylfenolu.....	- 16 -
4.2. Možnosti přípravy amidů a thioamidů	- 18 -
4.2.1. Obecné postupy syntézy amidů	- 18 -
4.2.2. Použité postupy syntézy anilidů.....	- 23 -
4.2.3. Použitý postup syntézy thioanilidů	- 25 -
5. Experimentální část	- 26 -
5.1. Materiál a pomůcky	- 27 -
5.1.1. Chemikálie	- 27 -
5.1.2. Přístroje	- 28 -
5.1.3. Chemické sklo, laboratorní potřeby	- 28 -
5.1.4. Ostatní laboratorní potřeby.....	- 29 -
5.1.5. Mobilní fáze pro TLC	- 29 -
5.2. Syntéza anilidů a thioanilidů	- 31 -
5.2.1. Příprava 2-amino-4,6-di- <i>terc</i> -butylfenolu	- 31 -
5.2.2. Příprava chloridů kyselin	- 33 -
5.2.3. Vlastní příprava anilidů – připravené látky	- 34 -
5.2.4. Vlastní příprava thioanilidů – připravené látky	- 53 -
6. Biologické hodnocení	- 62 -
6.1. Biologická aktivita připravených látek	- 63 -
6.1.1. Národní referenční laboratoř pro <i>Mycobacterium kansasii</i>	- 63 -
7. Diskuze a závěr	- 68 -
7.1. Diskuze	- 69 -
7.2. Závěr	- 70 -
8. Abstrakt	- 72 -
8.1. Abstrakt v českém jazyce	- 73 -

8.2. Abstract in English Language	- 74 -
9. Použitá literatura.....	- 75 -

1. Úvod

Když se farmaceutický průmysl na začátku 20. století začal zabývat výrobou a výzkumem antimikrobiálně aktivních látek, zdálo se, že se lidstvo patogenních mikroorganismů relativně „snadno“ zbaví. Avšak na konci století a na začátku nového zjišťujeme, že velké množství preparátů, které byly při léčbě úspěšné, již nejsou tak spolehlivé jako kdysi. Tento fakt je dán nejen zvyšující se rezistencí mikroorganismů, ale i nadužíváním a zneužíváním antimikrobiálních přípravků v praxi. Z toho plyne stále větší nutnost výzkumu nových potencionálně aktivních látek.

Jedna z nejletálnějších skupin bakterií – *Mycobacteria* – stále získává větší rezistenci na zaběhlé postupy léčby tuberkulózy (dále jen TBC). TBC byla vždy velmi závažnou chorobou a i nyní hovoří údaje Světové zdravotnické organizace (dále jen SZO nebo WHO) z roku 2003 o 8 810 000 nových onemocnění a 1 747 000 úmrtí na TBC za rok (28 úmrtí/ 100 000 lidí)¹. V roce 2006 již WHO eviduje 9 148 798 případů nákazy¹ a 1 654 805 úmrtí na TBC.

Dnešní terapie TBC spočívá v podávání kombinace izoniazidu, rifampicinu, pyrazinamidu, popř. navíc streptomycinu nebo ethambutolu². Také existují ještě „rezervní léčiva“ jako kys. *p*-aminosalicylová (PAS), protionamid, terizidon (obsahuje dvě jednotky cykloserinu) a některé tetracykliny (doxycyklin)². Mezi používaná antituberkulotika kromě výše zmíněných léčiv tedy patří: deriváty rifamicinu (rifabutin, rifapentin), aminoglykosidy (amikacin, kanamycin), polypeptidy (kapreomycin), makrolidy (erytromycin, klaritromycin), cefalosporiny (cefoxitin), potencované beta-laktamy (amoxicilin/kyselina klavulánová), fluorochinolony (ofloxacin, ciprofloxacin, pefloxacin, difloxacin), antileprotika (klofazimin, dapson) a potencované sulfonamidy (sulfametoxazol/trimetoprim)³.

Vzhledem k nežádoucím účinkům vyjmenovaných léčiv a zvyšujícímu se počtu rezistentních kmenů se výzkumu léčiv s antituberkulotickou, antibakteriální a antifungální aktivitou věnuje stále větší pozornost^{4,5,6}.

2. Cíl práce

Cílem této diplomové práce byla syntéza nové skupiny potenciálně antimikrobiálně aktivních substituovaných anilidů. Práce se zabývá především jejich optimální přípravou, biologickým hodnocením a syntézou jejich sirných analogů.

Podnětem syntézy se stala série 5,7-di-*terc*-butyl-benzoxazolů připravená na Katedře anorganické a organické chemie (KAOCH) Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, ve které několik látek vykazalo 100-90% aktivitu v koncentraci 6,25 µg/ml vůči *Mycobacterium tuberculosis H₃₇R_V*⁷. Pravděpodobným metabolizmem těchto sloučenin je otevření oxazolového cyklu, za vzniku derivátů s hydroxylovou skupinou vázanou na bazické části molekuly. Z této skupiny byly vybrány látky s nejvyšší aktivitou (5,7-di-*terc*-butyl-2-(3-bromfenyl)benzoxazol, 5,7-di-*terc*-butyl-2-(pyridin-2-yl)benzoxazol, 5,7-di-*terc*-butyl-2-(pyridin-3-yl)benzoxazol, 5,7-di-*terc*-butyl-2-(pyridin-4-yl)benzoxazol, 5,7-Di-*terc*-butyl-2-(3-chlorfenyl)benzoxazo)⁸ a podle nich syntetizovány jejich tzv. „otevřené analogy“. Můžeme je také považovat za tzv. „převrácené salicylanilidy“, které byly na KAOCH také syntetizovány, a které rovněž vykazují významnou antimikrobiální aktivitu⁹.

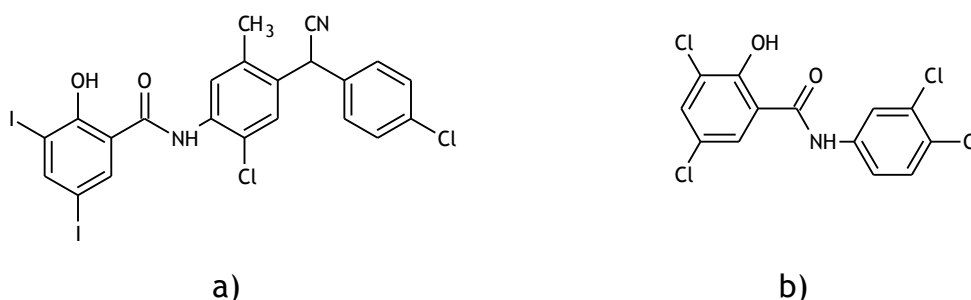
Připravené amidy byly dále převedeny na thioamidy, u kterých se předpokládá vyšší aktivita. Všechny sloučeniny byly popsány teplotou tání, IČ spektry, TLC ve dvou soustavách a NMR. Připravené látky byly jako ucelená série poslány na testování antimykobakteriální aktivity do USA (TAACF) a Ostravy (Národní referenční laboratoř pro *Mycobacterium kansasii* – pracoviště dr. Kaustové). Bohužel v současné době jsou výsledky TAACF stále nedostupné, proto tato práce zahrnuje pouze hodnoty změřené dr. Kaustovou. Výsledky z USA budou k práci přiřazeny, jakmile budou k dispozici.

3. Biologická aktivita salicylanilidů

3.1. Salicylanilidy a jejich aktivita

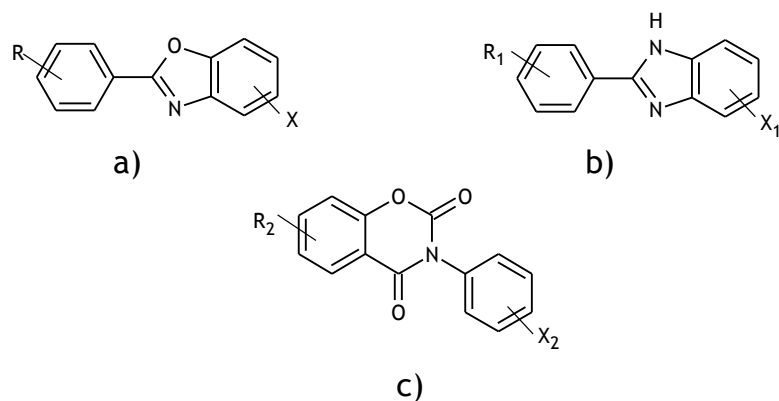
Látky, ve kterých se vyskytuje salicylanilidová struktura mají mnoho různých použití. Zde budou shrnuty látky, kde je aktivita známá, a které se používají.

Nejdůležitější skupinu tvoří látky s antibakteriální a antifungální aktivitou. Tato aktivita je již dlouhou dobu známa a proto se salicylanilidy stále zabývá mnoho pracovních skupin¹⁰. *In vitro* aktivní salicylanilidy vykazují zvýšenou aktivitu proti atypickým kmenům jako např. *Mycobacterium kansasii* a *M. avium*. Před 10i lety navržený nový mechanismus působení je založen na inhibici dvou komponentových regulačních systémů bakterií^{11,12}. Blokáda těchto systémů může způsobit úhyn bakterií. Tento účinek byl sledován u closantelu a tetrachlorsalicylanilidu (viz. obrázek 3.1.1.).



Obrázek 3.1.1. Closantel (a) a tetrachlorsalicylanilid (b)

Dalšími obměnami struktury salicylanilidů, zvláště pak halogenací, popř. acylací vznikají deriváty účinné antiperidontálně¹³. Jinou možností je začlenění amidové funkce do cyklu – benzoxazolu, benzimidazolu, popř. benzoxazindionu (viz. obrázek 3.1.2.).

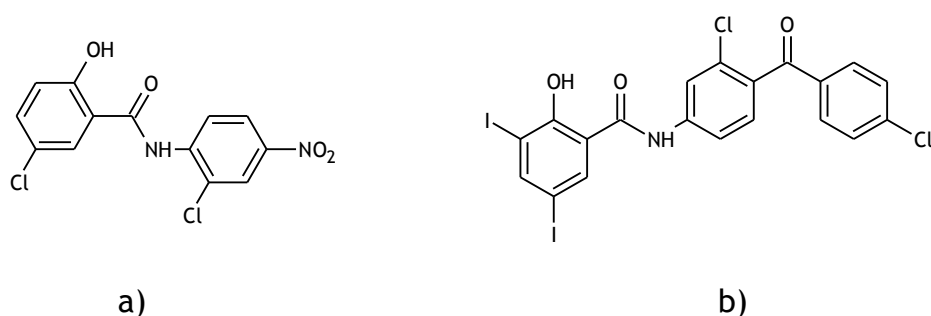


Obrázek 3.1.2. Benzoxazol (a), benzimidazol (b) a 1,3-benzoxazin-2,4-dion (c)

Tyto deriváty však jsou méně aktivní než jejich otevřené analogy¹⁴. Což v případě benzoxazidionů potvrdila i skupina prof. Waissera¹⁵.

Nabízí se také možnost využití volného hydroxyly k esterifikaci a tím ke vzniku tzv. „prodrugs“. Možná je jednak acetylace¹⁶, jednak esterifikace aminokyselinami, popř. krátkými peptidy¹⁷.

Další aktivní látky se strukturou salicylanilidů nalezneme v oblasti antiparazitik a herbicidů. Z těchto látek jsou pak používány zejména closantel (viz. obrázek 3.1.1.), niclosamid a salantel (viz. obrázek 3.1.3.).



Obrázek 3.1.3. Niclosamid (a) a salantel (b)

Obdobné látky se také používají jako pesticidy a mikrobicidy. Za zmínku také stojí japonská patentová ochrana niclosamidu pro použití jako herbicidu při pěstování rýže¹⁸. Další deriváty salicylanilidů jsou studovány pro možné

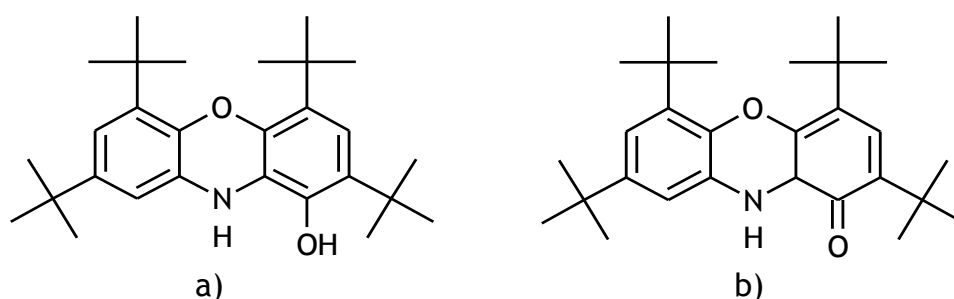
antiflogistické použití v dentální medicíně¹⁹. Patentováno bylo také jejich použití ve vývojkách barev v textilním průmyslu²⁰. [1]

[1] Částečně zpracováno z Vinšová J., Imramovský A.: Salicylanilidy – stále aktuální skupina s potenciální antibakteriální aktivitou, Čes. slov. Farm., 53294-299 (2004)

4. Metodická část

4.1. Možnosti přípravy 2-amino-4,6-di-*tert*-butylfenolu

Prvním krokem pro syntézu anilidů je příprava 2-amino-4,6-di-*tert*-butylfenolu (dále jen DTB-aminofenol), který není komerčně dostupný jako substance. Je však také velmi reaktivní a stáním na vzduchu i pod ochrannou atmosférou přechází na několik barevných produktů, z nichž byly vyizolovány především 2,4,6,8-tetra-*tert*-butyl-10*H*-fenoxazin-1-ol a 2,4,6,8-tetra-*tert*-butyl-10,10a-dihydro-1*H*-fenoxazin-1-on (viz. obrázek 3.1.1.).



Obrázek 4.1.1. Příklad barevných produktů stání DTB-aminofenolu:

a) 2,4,6,8-tetra-*tert*-butyl-10*H*-fenoxazin-1-ol,

b) 2,4,6,8-tetra-*tert*-butyl-10,10a-dihydro-1*H*-fenoxazin-1-on

Z této reaktivity vyplývá, že pro každou syntézu jednotlivého amidu musela vždy předcházet samostatná příprava DTB-aminofenolu. Tato příprava může probíhat několika způsoby – viz. níže.

4.1.1. RŮZNÉ ZPŮSOBY PŘÍPRAVY 2-AMINO-4,6-DI-*TERC*-BUTYLFENOLU

Některé syntézy vycházejí z 2,4-di-*terc*-butyl-6-nitrofenolu – jeho redukcí vodíkem za katalýzy Raneyova niklu²¹ se 75% výtěžkem nebo palladia²² v různých prostředích (viz. schéma 4.1.1.1.).

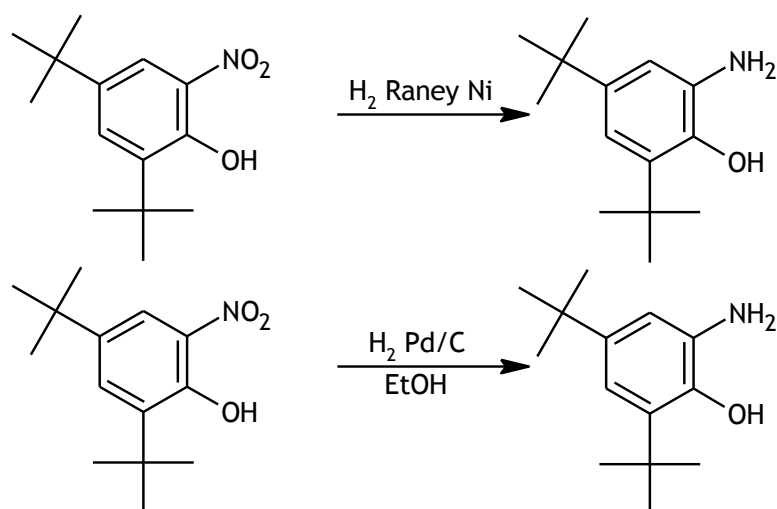


Schéma 4.1.1.1. Redukce vodíkem na DTB-aminofenol

Další možností je deaminační reakce 3,5-di-*terc*-butyl-[1,2]benzochinonu s ethylen-1,2-diaminem za varu v propan-2-olu po dobu 2 hodin²³ (viz. schéma 4.1.1.2.). Výtěžek reakce se opět pohybuje okolo 75 %.

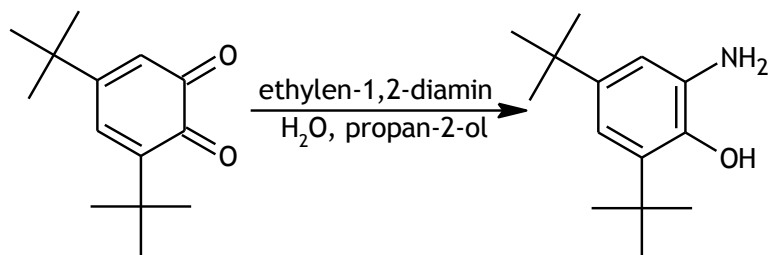


Schéma 4.1.1.2. Deaminační reakce

Dále pak redukce 3,5-Di-*tert*-butyl-[1,2]benzochinon-1-oximu za varu pomocí zinečnatého prachu v koncentrované kyselině chlorovodíkové v prostředí ethanolu také vede k zisku DTB-aminofenolu²⁴(viz. schéma 4.1.1.3.).

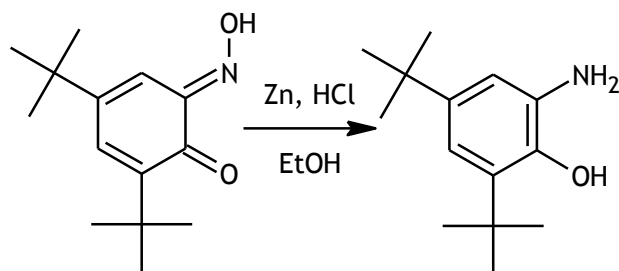


Schéma 4.1.1.3. Redukce pomocí zinku v konc. HCl

Nejoptimálnější se ukázal postup, který vychází z 3,5-di-*tert*-butyl-[1,2]benzochinonu, k němuž se přidá koncentrovaný amoniak a methanol⁷. Přístupnější oxo skupina přechází na imino-skupinu za vzniku 2,4-di-*tert*-butyl-6-iminocyclohexa-2,4-dien-1-onu. V dalším kroku redukuje hydrid sodnaboritý obě, oxo- i imino-skupinu, za vzniku DTB-aminofenolu (viz. schéma 4.1.1.4.). Výtěžek této reakce se pohybuje přes 90%, je časově méně náročný a zároveň nevyžaduje žádnou aparaturu.

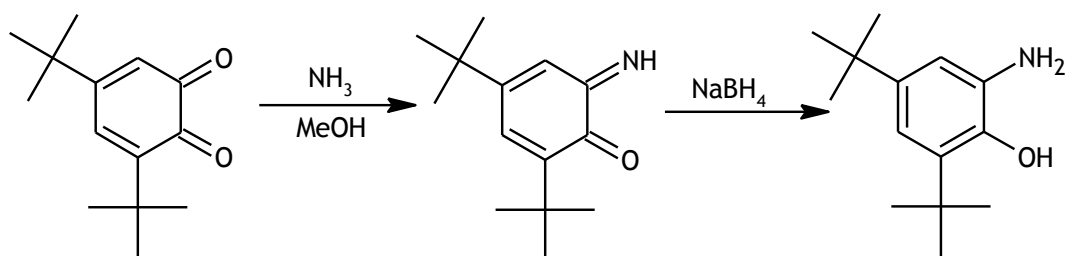


Schéma 4.1.1.4. Zvolená reakce vedoucí k DTB-aminofenolu

4.2. Možnosti přípravy amidů a thioamidů

4.2.1. OBECNÉ POSTUPY SYNTÉZY AMIDŮ

Obecné postupy syntézy amidů jsou dobře známy; amidy mohou být připraveny mnoha způsoby, z nichž každý má své opodstatnění a uplatnění. Zde budou uvedeny pouze postupy použitelné pro syntézu anilidů a složitějších struktur.

- 1) reakce reaktivnějšího derivátu karboxylové kyseliny než jsou amidy
- 2) aktivace karboxylové funkce
- 3) přesmyky a odbourávání

Ad 1)

Halogenidy kyselin

Podle reaktivity derivátů karboxylových kyselin je známo, že amidy lze připravit reakcemi halogenidů, anhydridů, resp. esterů kyselin. Samozřejmě jsou různé přípravy těchto derivátů, různé odstupující skupiny resp. vedlejší produkty.

Halogenidy vznikají reakcí kyseliny a halogenačního činidla jako je např. chlorid thionylu (viz. schéma 4.2.1.1.), chlorid fosforitý nebo fosforečný. Vedlejšími produkty reakce halogenidů je halogenvodíková kyselina, případně při použití vhodného činidla – např. pyridin, diethylamin, triethylamin – odpovídající sůl této báze.

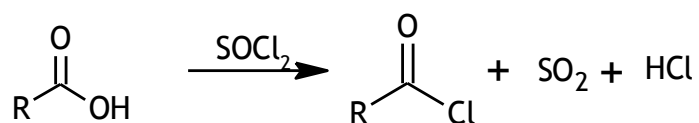


Schéma 4.2.1.1. Vznik chloridu kyseliny v reakci s chloridem thionylu

Anhydridy kyselin

V případě anhydridů je to poněkud složitější. Anhydridy jako takové můžeme rozdělit na smíšené (asymetrické) a symetrické. Symetrické anhydridy lze připravit zahříváním kyseliny, resp. reakcí kyseliny s dehydratačním činidlem, např. kyselinou sírovou (viz. schéma 4.2.1.2.).

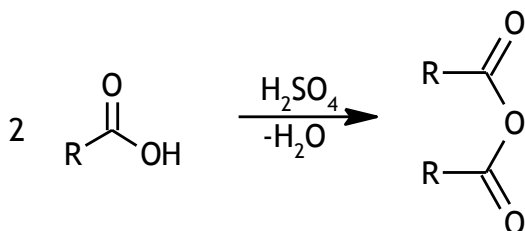


Schéma 4.2.1.2. Vznik symetrického anhydridu

Pokud by měl být požadovaný anhydrid asymetrický, lze připravit reakcí soli kyseliny a halogenidu druhé kyseliny (viz. schéma 4.2.1.3.). Jestliže je v reakci použitý anhydrid smíšený (asymetrický), vzniká směs produktů, tj. směs – v našem případě – amidů. Pokud by byl anhydrid symetrický, takováto situace nenastává.

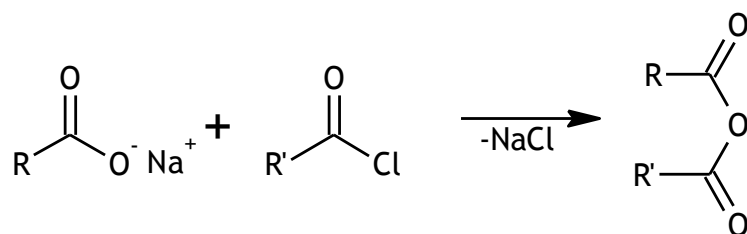


Schéma 4.2.1.3. Vznik asymetrického anhydridu

Estery kyselin

Estery vznikají esterifikací, kterou zahajuje protonizace karboxylového uhlíku silnou minerální kyselinou, např. kys. chlorovodíková nebo sírová (viz. schéma 4.2.1.4.) – platí pro primární a sekundární alkoholy²⁵. Mechanismus esterifikace s terciárním alkoholem je poněkud odlišný a pro úplnost ho zobrazuje schéma 4.2.1.5. Další způsoby přípravy esterů vycházejí z halogenidů kyseliny, popř. z anhydridu, a nebudou zde dále rozebírány.

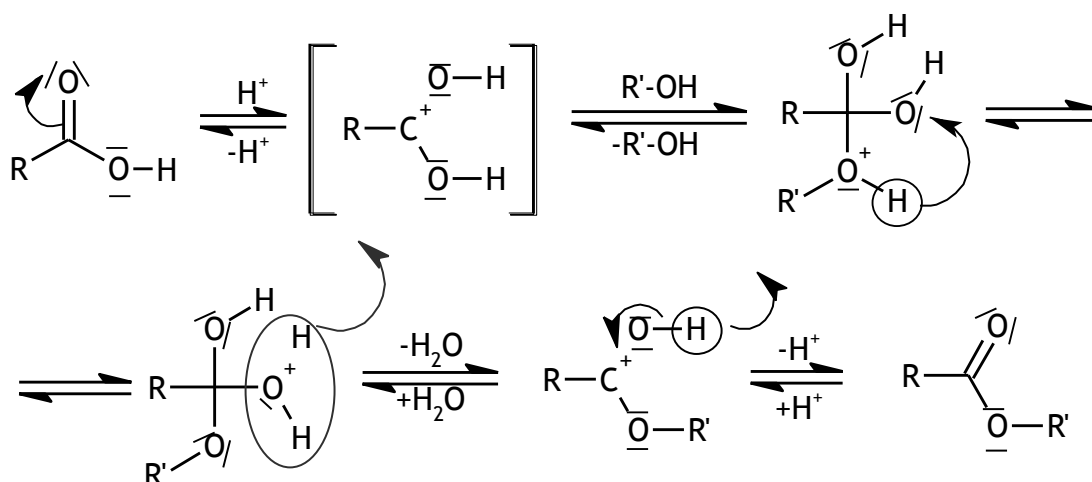


Schéma 4.2.1.4. Esterifikace s primárním a sekundárním alkoholem

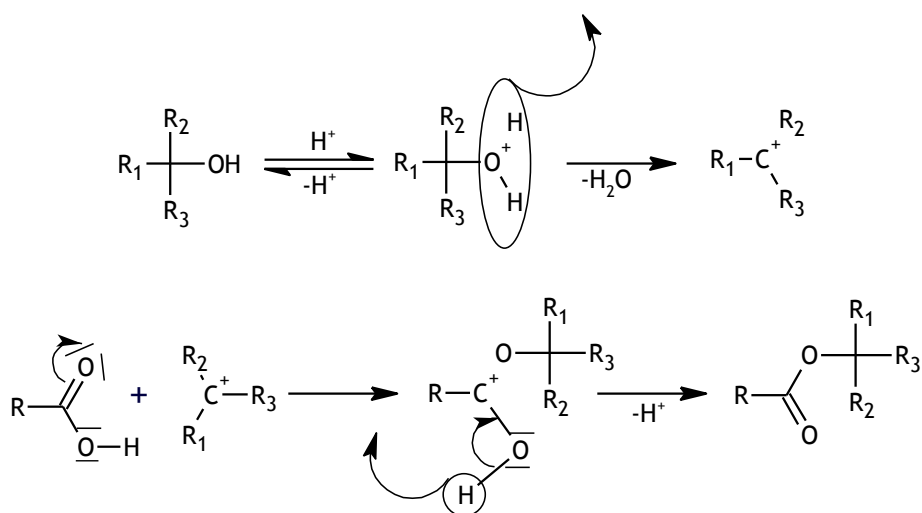


Schéma 4.2.1.5. Esterifikace s terciárním alkoholem

Ad 2)

Karboxylová skupina může být aktivována kondenzačními činidly např. karbodiimidy. Velmi běžné kondenzační činidlo je např. *N,N'*-dicyklohexylkarbodiimid (dále jen DCC). DCC reaguje s kyselinou, kde aktivuje karboxylovou část karboxylu a karboxylový uhlík se stává reaktivnějším. V tomto případě je vedlejším produktem *N,N'*-dicyklohexylmočovina (dále jen DCU) – viz. schéma 4.2.1.6.. Tato metoda, tedy aktivace karboxylové skupiny DCC, se využívá hlavně při syntéze krátkých peptidových řetězců.

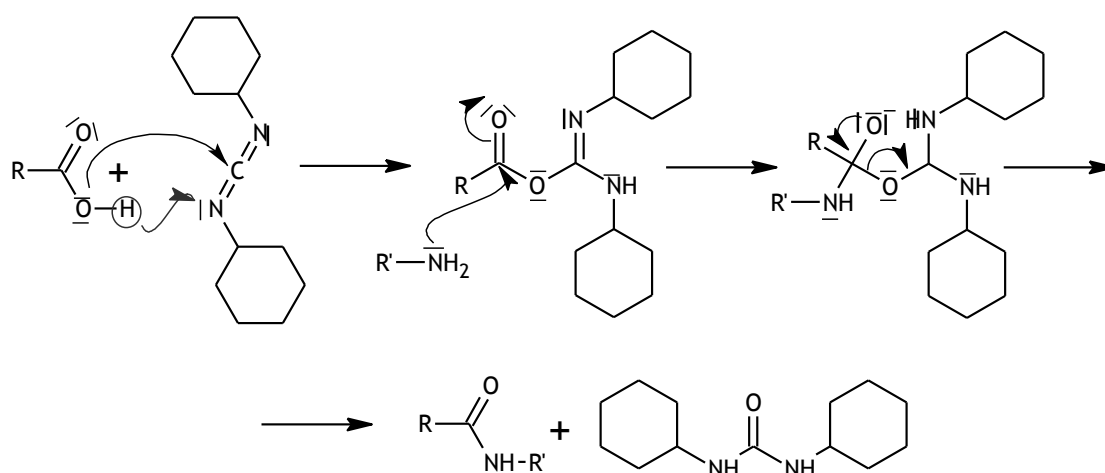


Schéma 4.2.1.6. Příprava amidu pomocí aktivace DCC

Ad 3)

Přesmyky a odbourávání patří ke speciálním technikám přípravy. Z nich při přípravě amidů přichází v úvahu hlavně Beckmannův přesmyk (viz. schéma 4.2.1.7.) a Schmidtova reakce (viz. schéma 4.2.1.8.). V případě této práce by byl spíše problém připravit výchozí látky těchto syntéz.

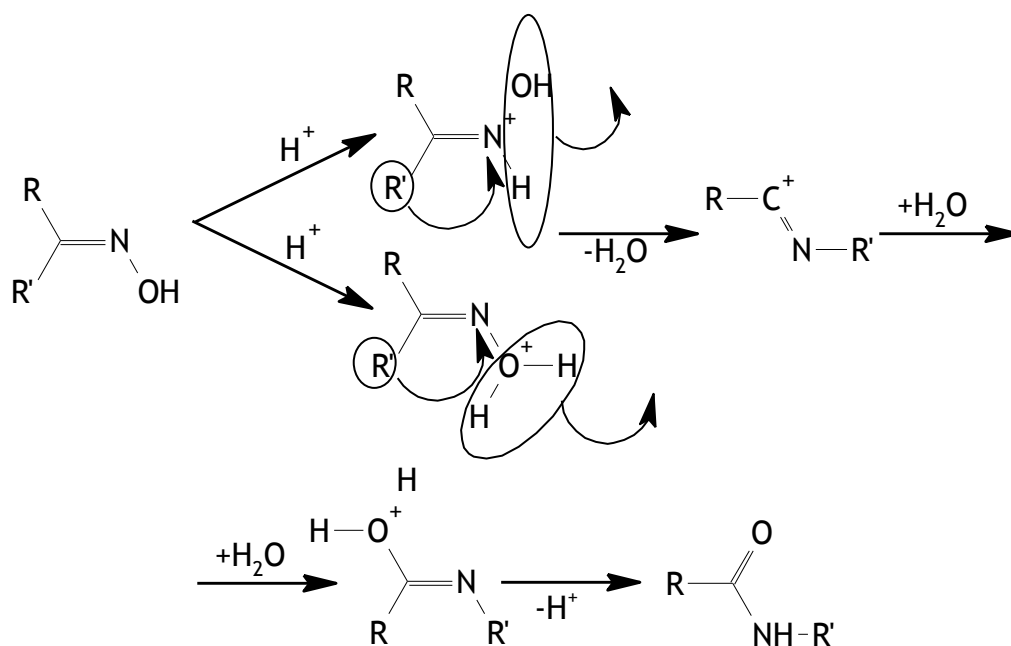


Schéma 4.2.1.7. Beckmannův přesmyk

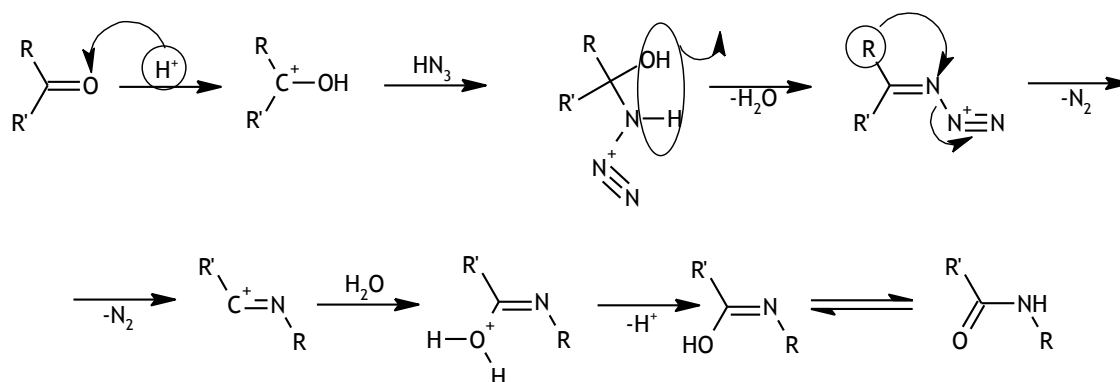


Schéma 4.2.1.8. Schmidtova reakce

4.2.2. POUŽITÉ POSTUPY SYNTÉZY ANILIDŮ

Při přípravě anilidů a thioanilidů bylo vyzkoušeno několik možných postupů.

Vznik chloridu kyseliny *in situ*, reakce v mikrovlnném reaktoru

Prvním z možných postupů byla zvolena jednoduchá reakce samotné kyseliny a DTB-aminofenolu, rozpuštěných ve vhodném rozpouštědle (chlorbenzen), po přidavku PCl_3 (viz. schéma 4.2.2.1.). Metoda je založena na tvorbě chloridu kyseliny *in situ*. Reakční směs se zahřívala 2 hod k varu pod zpětným chladičem. Tato reakce však nevedla k uspokojivým výtěžkům a ani prodloužení reakční doby nevedlo ke zvýšení výtěžnosti.

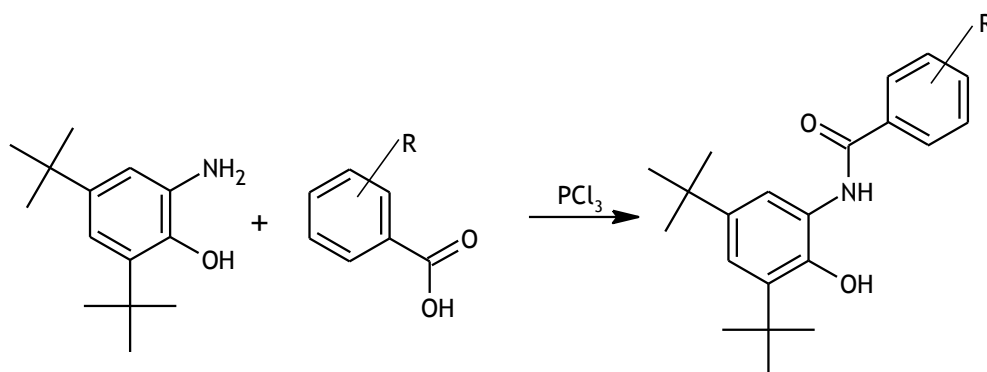


Schéma 4.2.2.1. Reakce DTB-aminofenolu a kyseliny s přidavkem PCl_3 ; X= fenylyl, pyridin

Podle stejného schématu probíhal i druhý postup, za použití mikrovlnného reaktoru. Délka reakce byla nastavena na dvakrát 12 min., při teplotě 140°C , a 800 W; první dvě minuty při 600 W, zbylých 10 min. při 800 W. Tato reakce nevedla ke zvýšení výtěžku, ani po opětovném přidavku PCl_3 a dalších 2x5 min (140°C , 800 W). Byl získán nový vedlejší produkt – příslušný benzoxazol (viz. kapitola 5.2.3.).

Aktivace karboxylové funkce pomocí DCC

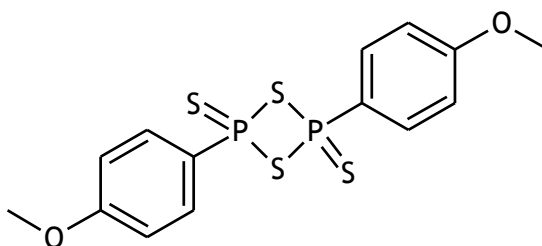
Třetím vyzkoušeným postupem byla reakce, kde se karboxylová skupina aktivovala pomocí DCC (viz. schéma 4.2.1.6.). Reakce byla prováděna v chloroformu s přídavkem DCC v poměru 1:1 ke kyselině. Reakční směs byla zahřívána 3 hodiny k varu²⁶. Bohužel tento postup nevedl k uspokojivému výsledku, neboť se v reakční směsi objevilo mnoho vedlejších barevných produktů vzniklých hlavně z DTB-aminofenolu.

Příprava chloridu kyseliny samostatně

Posledním, čtvrtým, postupem byla příprava chloridu kyseliny. Ten byl připravován pomocí chloridu thionylu podle schématu 4.2.1.1.. Podrobnější popis reakce je uveden v kapitole 5.2.2..

4.2.3. POUŽITÝ POSTUP SYNTÉZY THIOANILIDŮ

Na KAOCH se s úspěchem používá postup pro přípravu thio-derivátů pomocí polysulfidu fosforečného²⁷. Tento postup má však nevýhodu v dlouhé reakční době. Proto byla zvolena reakce s Lawessonovým činidlem^{28,29}, která není časově zatížena (viz. obrázek 4.2.3.1.). Reakční doba se zkrátila z několika hodin na pouhou hodinu. Výhodou tohoto činidla je jeho zvýšená rozpustnost v organických rozpouštědlech díky methoxyfenylovým substituentům.



Obrázek 4.2.3.1. Lawessonovo činidlo – 2,4-bis(4-methoxyfenyl)-1,3,2,4-dithiadifosfetan-2,4-disulfid

Lawessonovo činidlo se používá hlavně k thionacím karbonylové funkce¹⁴. Mechanismus thionace spočívá v tepelně podporovaném rozpadu čtyřčlenného kruhu tvořeného střídajícími se atomy fosforu a síry podle schématu 4.2.3.1. Vzniklé dithiofosfinové skupiny jsou velmi reaktivní a lze říci, že čím je karbonyl bohatší na elektrony, tím rychleji se převede na odpovídající thiokarbonyl³⁰.

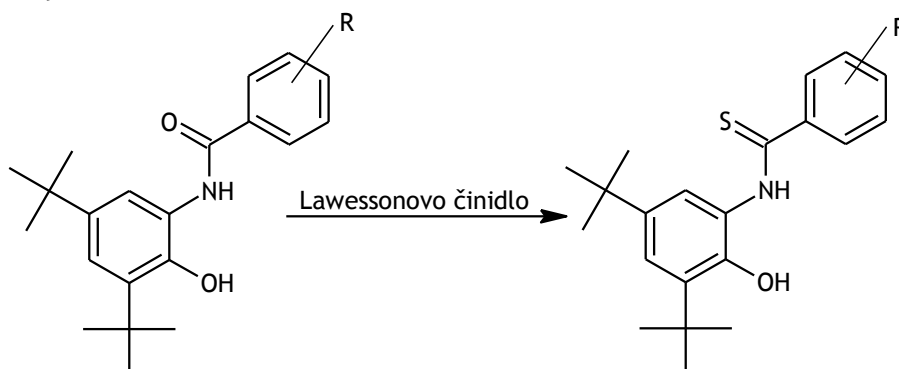


Schéma 4.2.3.2. Obecné schéma přípravy thioanilidu za pomoci Lawessonova činidla

5. Experimentální část

5.1. Materiál a pomůcky

5.1.1. CHEMIKÁLIE

Rozpouštědla

Diethylether — *Penta*, p.a., $C_4H_{10}O$, M_r 74,12

Ethanol — *Penta*, p.a., C_2H_5OH , M_r 46,1

Ethylacetát — *Penta*, p.a., $C_4H_8O_2$, M_r 88,11

Hexan

Chlorbenzen — *Lachmer*, pure., C_6H_5Cl , M_r 112,56

Chloroform — *Penta*, p.a. (99,8%), $CHCl_3$, M_r 119,38

Methanol — *Penta*, p.a. (99,8%), CH_3OH , M_r 32,04

Toluen — *Penta*, p.a. (99,0%), C_7H_8 , M_r 92,1

Reaktanty, ostatní činidla

3-Brombenzoová kyselina — připravená na KAOCH v praktikách z organické a biorganické chemie, čištěná krystalizací

3,5-Di-*terc*-butyl-1,2-benzochinon — *Aldrich*, 98,0%, $C_{14}H_{20}O_2$, M_r 220,3

4-Chlorsalicylová kyselina — *Aldrich*, 93,0%, $C_7H_5ClO_3$, M_r 172,6

5-Chlorsalicylová kyselina — *Aldrich*, 98,0%, $C_7H_5ClO_3$, M_r 172,6

5-Methoxysalicylová kyselina — *Aldrich*, 98,0%, $CH_3OC_6H_3CO_2H$, M_r 168,2

Amoniak 26% — *Lachema*, 26,0% vodný roztok, NH_4OH , M_r 35,1

Dicyklohexylkarbodiimid — *Sigma*, $C_{13}H_{22}N_2$, M_r 194,3

Hydrid sodnoboritý — *Ubichem Limited*, 99,0%, $NaBH_4$, M_r 92,1

Hydrogenuhličitan sodný — *Lachema*, 26,0% vodný roztok, NH_4OH , M_r 37,8

Chlorid fosforitý — *Aldrich*, 99,0%, PCl_3 , M_r 137,3

Chlorid thionylu — *Aldrich*, 99,0%, $SOCl_2$, M_r 119,0

Chlorid vápenatý — *Lachema*, 98,0%, $CaCl_2$, M_r 111,1

Lawessonovo činidlo — *Aldrich*, $\geq 98,0\%$, $C_{14}H_{14}O_2P_2S_4$, M_r 404,5

Pyridin-4-karboxylová kyselina — *Fluka*, 98,0-99,0%, $C_6H_5NO_2$, M_r 123,1

Pyridin-3-karboxylová kyselina — *Fluka*, 98,0-99,0%, $C_6H_5NO_2$, M_r 123,1

Pyridin-2-karboxylová kyselina — *Fluka*, 98,0-99,0%, $C_6H_5NO_2$, M_r 123,1

Síran sodný

5.1.2. PŘÍSTROJE

Infračervený spektrometr — *Nicolet Impact 400*

NMR — *Varian Mercury*, Vx BB 300

Chromatotron — *Harrison Research*, Model 7924T

Elektronické váhy — *Kern*, ABJ 220-4M

Bodotávek — Koflerův bodotávek

Laboratorní magnetické míchačky se zahříváním — *Heidolph*, MR 3001 K

Vakuová odparka — *Büchi*, Rotavapor R-114

Mikrovlňný reaktor — *Milestone*, Microsynth; LabTerminal 800

Ultrazvuková lázeň — *Bandelin*, Sonorex longlife

UV lampa s ochranným krytem — *Lamag*, 254 a 366 μm

Horkovzdušná pistole — *Bosch*, PHG 630DCE

Automatická sušárna — *Memmert*, Modell UNB 200

5.1.3. CHEMICKÉ SKLO, LABORATORNÍ POTŘEBY

Destilační nástavce

Dělené pipety

Dělicí nálevky

Dimrothovy chladiče

Erlenmayerovy baňky

Kádinky

Lékovky s uzávěrem

Liebigovy chladiče

Nálevky

Násypky

Odměrné válce

Odsávací baňky

Odsávací nálevky s fritou
Skleněné kolony
Skleněné stříkačky
Skleněné trubice
Stojatky se zábrusem (chromatografické vývojové cely)
Sušící rourky se zábrusem
Varné baňky
Vialky s uzávěrem
Zkumavky

Váženky

Držáky
Kopistky
Lžičky
Pinzety
Svorky

Stříčky

5.1.4. OSTATNÍ LABORATORNÍ POTŘEBY

Silikagel 60 – *Merck*
TLC desky – *Merck*, silikagel 60, 20x20 cm
Filturační papíry

5.1.5. MOBILNÍ FÁZE PRO TLC

Soustava 1 (dále jen S1) byla tvořena hexanem a ethylacetátem v poměru 9:1.
Soustava 2 (dále jen S2) byla tvořena toluenem a ethylacetátem v poměru 4:1.

Soustava 3 (dále jen S3) byla tvořena chloroformem a methanolem v poměru 9:1.

Soustava 4 (dále jen S4) byla tvořena hexanem a ethylacetátem v poměru 7:3.

5.2. Syntéza anilidů a thioanilidů

5.2.1. PŘÍPRAVA 2-AMINO-4,6-DI-*TERC*-BUTYLFENOLU

2-AMINO-4,6-DI-*TERC*-BUTYLFENOL

Sumární vzorec: $C_{14}H_{23}NO$

Molekulová hmotnost: 221,314

Reakční schéma:

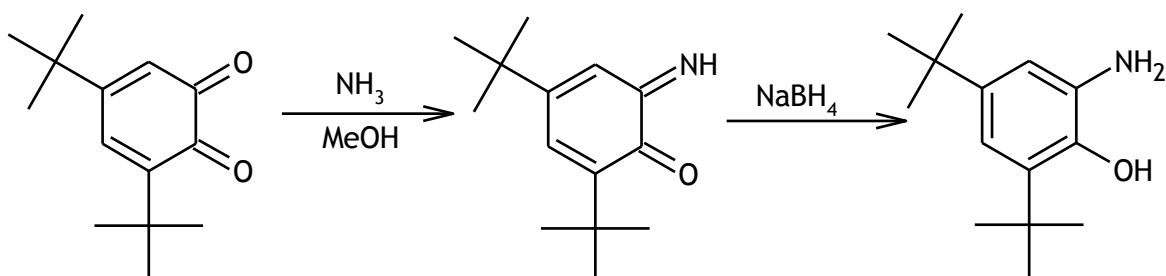


Schéma 5.2.1.1. Reakční schéma přípravy DTB-aminofenolu:

Pracovní postup:

2,2g (0,01mol) 3,5-di-*terc*-butyl-[1,2]benzochinonu bylo rozpuštěno v 60 ml methanolu a přikapáno 20 ml konc. amoniakálního roztoku 26,0%. Byla pozorována změna barvy z červené na zelenožlutou. Po 10 min. byl po malých dávkách přidáván práškový hydrid sodnoboritý (0,5 g), až se roztok odbarvil do žluta. Začaly vypadávat nažloutlé krystaly DTB-aminofenolu. Krystaly byly odfiltrovány, na filtru promyty směsí $MeOH:NH_3:H_2O$ (1:1:1).

Výtěžek: 2,07 g – 93,43%

Teplota tání: 165-167 °C, 170 °C³¹

TLC: R_f (S1) = 0,07; R_f (S2) = 0,35

IR/ cm^{-1} : 3367, 2961, 2947, 2904, 2863, 1595, 1491, 1421, 1360, 1315, 1236, 952, 860

^{13}C NMR: (75 MHz, CDCl_3): 144,2, 142,4, 135,5, 132,2, 116,0, 117,1, 34,7, 34,3,
31,7, 29,9,

5.2.2. PŘÍPRAVA CHLORIDŮ KYSELIN

V metodické části je pojednáno o metodice přípravy amidů a anilidů. Zvolenou metodou tedy byla příprava chloridů kyselin pomocí chloridu thionylu (viz. Schéma 5.2.2.1.). K navážce kyseliny rozpuštěné v chlorbenzenu byl přidán SOCl_2 v poměru 1:10. Směs byla zahřívána k varu 2,5 hodiny pod zpětným chladičem opatřeným kalciovým uzávěrem. Po uplynutí této doby byl produkt zahuštěn pomocí klasické vakuové destilace a bez dalšího čištění použit do další reakce.

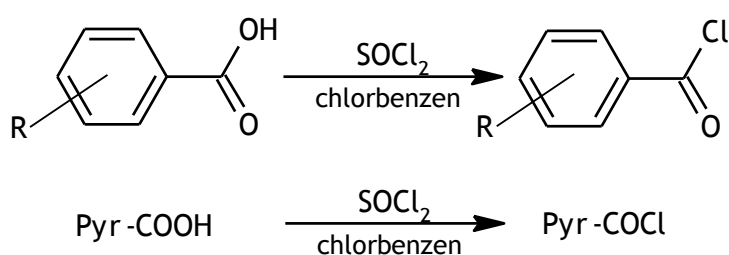


Schéma 5.2.2.1. Obecné schéma přípravy chloridu kyseliny

Touto cestou byly připraveny chloridy: 4-chlorsalicylové kyseliny, 5-methoxysalicylové kyseliny, pyridin-2-karboxylové kyseliny, pyridin-3-karboxylové kyseliny, pyridin-4-karboxylové kyseliny a 3-brombenzoové kyseliny.

5.2.3. VLASTNÍ PŘÍPRAVA ANILIDŮ – PŘIPRAVENÉ LÁTKY

V metodické části je pojednáno o různých námi vyzkoušených postupech přípravy anilidů. U jednotlivých anilidů jsou vždy uvedeny všechny postupy, které byly vyzkoušeny s odůvodněním, proč od nich bylo případně upuštěno.

N-(3,5-DI-TERC-BUTYL-2-HYDROXYFENYL)BENZAMID

Sumární vzorec: $C_{21}H_{27}NO_2$

Molekulová hmotnost: 325,445

Reakční schéma:

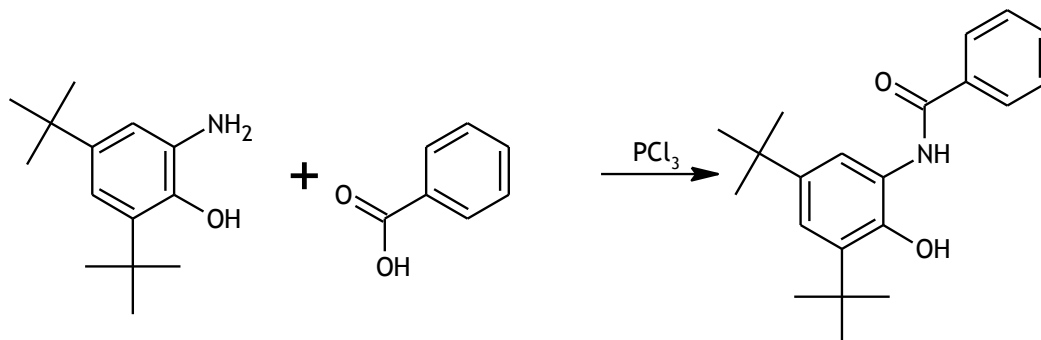


Schéma 5.2.3.1. Reakční schéma

Pracovní postup:

2,21 g (0,01 mol) DTB-aminofenolu bylo rozpuštěno v 50 ml chlorbenzenu a přidáno k 1,46 g (0,01 mol) benzylalkoholu. Mícháno za laboratorní teploty po 3 hodiny. Po té oddestilováno na vakuové odparce, přelito hexanem a vzniklé naružovělé krystaly odfiltrovány. Překrystalováno z EtOH:H₂O a následně z EtOH.

Výtěžek: 2,15 g – 66,15%

Teplota tání: 181° -182° C

TLC: $R_f(S1)= 0,20$; $R_f(S2)= 0,74$; $R_f(S3)= 0,60$

IR/cm⁻¹: 3548, 3284, 3153, 3108, 3081, 3062, 3025, 3003, 2957, 2905, 2866, 2773, 2740, 1661, 1633, 1608, 1578, 1541, 1535, 1479, 1459, 1445, 1421, 1391, 1360, 1342, 1310, 1274, 1255, 1224, 1202, 1180, 1166, 1133, 1075, 1027, 968, 926, 912, 872, 824, 804

¹³C NMR: (75 MHz, CDCl₃):167,3, 146,5, 142,6, 140,2, 133,2, 132,4, 128,9, 127,3, 125,7, 122,4, 117,8, 35,5, 34,3, 31,5, 29,8

4-CHLOR-N-(3,5-DI-*TERC*-BUTYL-2-HYDROXYFENYL)-2-HYDROXYBENZAMID

Sumární vzorec: $C_{21}H_{26}ClNO_3$

Molekulová hmotnost: 375,895

Reakční schéma 1. a 2.:

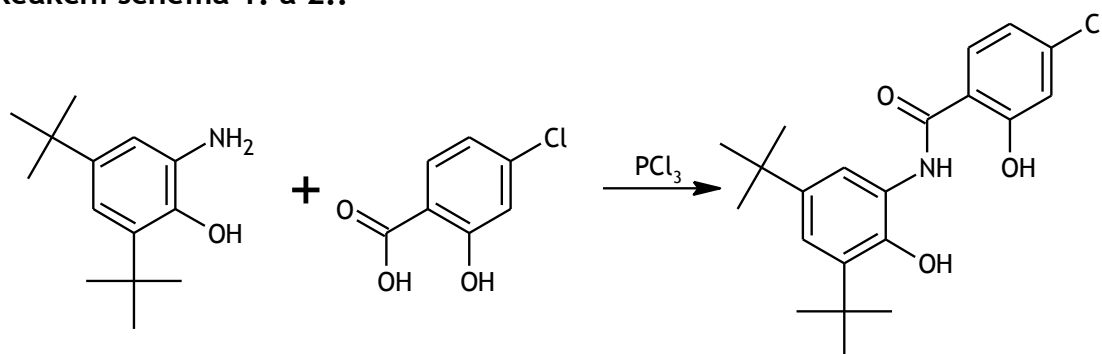


Schéma 5.2.3.2. Reakční schéma vzniku chloridu kyseliny in situ a reakce v mikrovlnném reaktoru

Pracovní postup 1.:

1,72g (0,01 mol) 4-chlorsalicylové kys. bylo rozpuštěno v 50 ml chlorbenzenu, přidáno 1,1g (0,005 mol) DTB-aminofenolu, zamícháno a přikapáno 0,22 ml PCl₃, pozorována změna barvy na fialově-hnědou. Za stálého míchání 2 hod zahříváno k varu. Přírůstek výtěžku byl sledován pomocí TLC. Znovu zahříváno ještě 3,5 hodiny.

Prodloužení reakční doby ze 2 hodin na 5,5 hodiny nevedlo ke zvýšení výtěžku, naopak vedlo ke zvýšení výskytu barevných produktů tvořených z DTB-aminofenolu. Proto bylo přistoupeno k reakci v mikrovlnném reaktoru.

Pracovní postup 2. (reakce v mikrovlnném reaktoru):

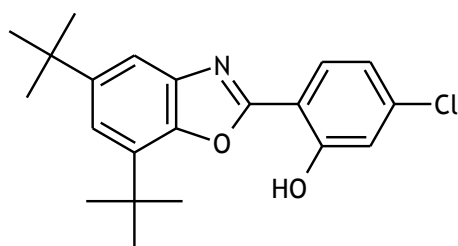
1,72g (0,01 mol) 4-chlorsalicylové kys. bylo rozpuštěno v 50 ml chlorbenzenu, přidáno 1,1g (0,005 mol) aminofenolu, zamícháno a přikapáno 0,22 ml PCl₃, pozorována změna barvy na fialově-hnědou. V reaktoru zahříváno 2x12 min.

při 140 °C (2 min na 600W, poté 10 min při 800W), po uplynutí doby přikapáno dalších 0,22 ml PCl₃. Zahříváno znovu na 140 °C, 800W po dobu 2x5 min. Kontinuálně prováděna kontrola TLC, látky lehce přibývalo. Po ochlazení byly odfiltrovány krystaly nezreagované 4-chlorsalicylové kyseliny (0,738g), filtrát zahuštěn na vakuové odparce do sucha. Odparek byl přelit hexanem, krystaly 4-chlorsalicylové kys. znovu odfiltrovány (0,143g) a znovu zahuštěno do sucha.

Bylo provedeno chromatografické dělení na sloupci silikagelu (70g, S1). Frakce 2-10 zahuštěny, látka označena jako prozatím neznámá, poslána na identifikaci hmotnostní spektroskopii, IR, NMR; R_f(S1)=0,72 (pod UV svítivá skvrna, časem zružověla), m=0,396g. Frakce 18-47 zahuštěny do sucha, m=0,420g surového, nerozpustné v hexanu. Překrystalovány z roztoku EtOH-H₂O. Produkt označen jako amid.

Vzhledem k poměrně velkému procentu výtěžku neznámé látky byl zvolen další postup - reakce chloridu kyseliny a DTB-aminofenolu.

Neznámá látka byla poslána na IR, NMR, MS. Podle těchto spekter byla spolehlivě určena jako příslušný benzoxazol (viz. obrázek 5.2.3.1.). Schéma pravděpodobných procesů probíhajících při tvorbě benzoxazolu je popsáno ve schématu 5.2.3.2.



Obrázek 5.2.3.1. 5-chloro-2-(5,7-di-*tert*-butyl-1,3-benzoxazol-2-yl)fenol

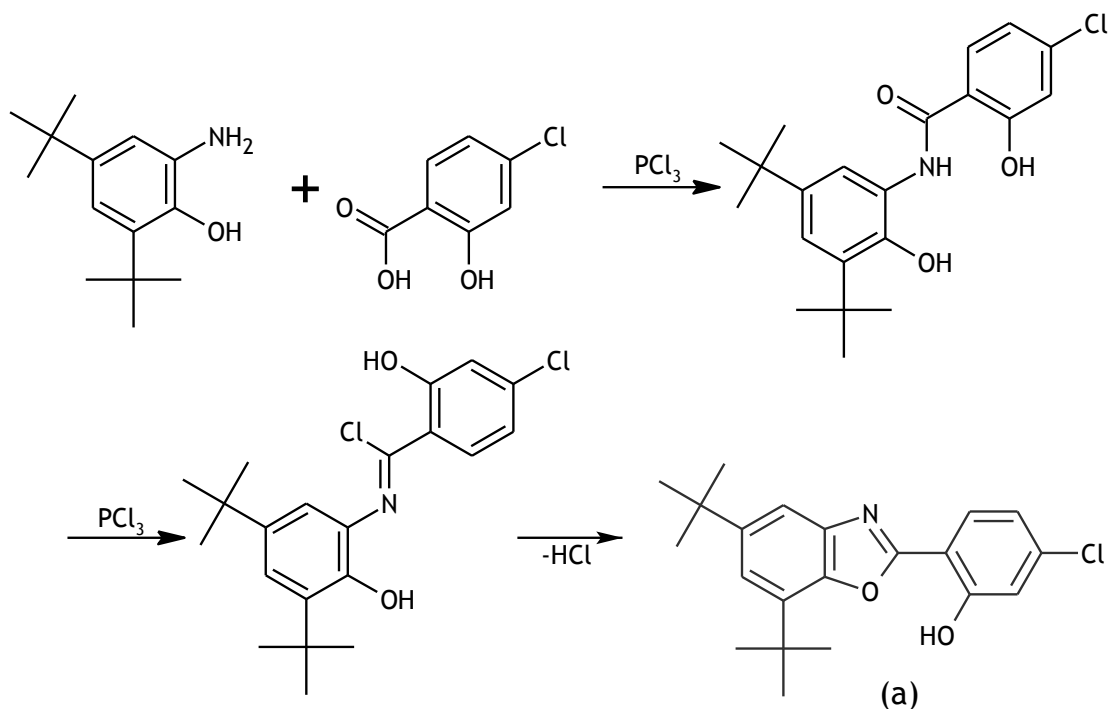


Schéma 5.2.3.3. Pravděpodobný průběh reakce při tvorbě benzoxazolu (a)

Reakční schéma 3.:

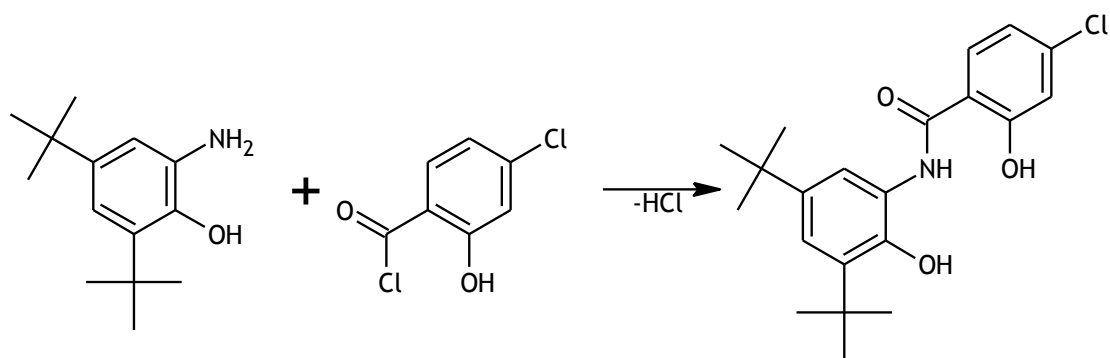


Schéma 5.2.3.4. Reakční schéma reakce chloridu kyseliny a DTB-aminofenolu

Pracovní postup 3. (reakce chloridu kyseliny):

0,995g (0,0049 mol) chloridu 4-chlorsalicylové kys. přelito chlorbenzenem, přikapáván DTB-aminofenol, také rozpuštěný v chlorbenzenem. Chvilí ponecháno reagovat, cca 15 minut. Zahuštěno na vakuové odparce, rozpuštěno v chloroformu, odsáty nezreagované krystaly (0,186g).

Chromatograficky rozděleno na sloupci silikagelu (35g, S1). Frakce 2-5 zahuštěny, charakterizovány, identifikováno jako benzoxazol. Frakce 13-31 zahuštěny charakterizovány, identifikace proběhla jako amid.

Výtěžek: reakce v mikrovlnném reaktoru: amid – 0,292g – 14,43%
benzoxazol – 0,396g
reakce chloridu kyseliny: amid – 0,426g – 24,00%
benzoxazol – 0,03g

Teplota tání: amid – 190° -193° C
benzoxazol – 135° -137° C

TLC: amid – $R_f(S1)= 0,45$; $R_f(S2)= 0,7$
benzoxazol – $R_f(S1)= 0,72$; $R_f(S2)= 0,8$

IR/cm⁻¹: amid: 3567, 3546, 3405, 3346, 3320, 3192, 3002, 2960, 2906, 2869, 2780, 2708, 1632, 1602, 1552, 1508, 1482, 1458, 1447, 1420, 1392, 1362, 1324, 1295, 1226, 1203, 1170, 1153, 1138, 1105, 1080, 926, 911, 882, 863, 823, 801
benzoxazol: 3422, 3173, 3138, 3080, 2969, 2955, 2907, 2870, 2805, 1635, 1619, 1601, 1587, 1559, 1545, 1482, 1463, 1454, 1403, 1398, 1381, 1344, 1309, 1293, 1281, 1263, 1253, 1242, 1228, 1209, 1203, 1175, 1134, 1079, 1060, 1003, 942, 915, 904, 863, 837, 811, 802

¹³C NMR: (75 MHz, CDCl₃):

amid: 168,1, 162,2, 146,0, 143,3, 140,9, 139,8, 127,0, 124,8, 122,8, 119,9, 119,2, 118,2, 112,3, 35,4, 34,4, 31,5, 29,8
benzoxazol: 161,5, 159,1, 148,5, 145,3, 140,0, 138,8, 133,9, 127,7, 120,1, 120,0, 117,6, 113,5, 109,6, 35,2, 34,5, 31,8, 30,0

5-CHLOR-N-(3,5-DI-*TERC*-BUTYL-2-HYDROXYFENYL)-2-HYDROXYBENZAMID

Sumární vzorec: $C_{21}H_{26}ClNO_3$

Molekulová hmotnost: 375,895

Reakční schéma 1.:

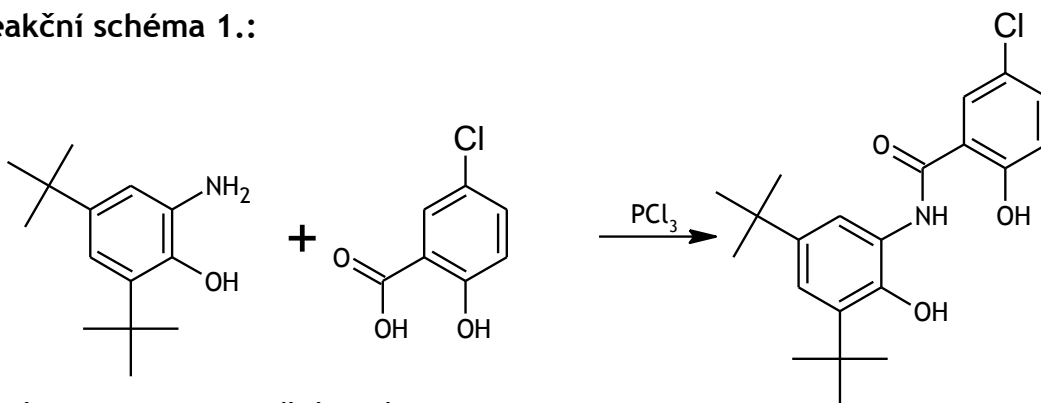


Schéma 5.2.3.5. Reakční schéma

Pracovní postup 1.:

0,862g (0,005 mol) 5-chlorsalicylové kys. bylo rozpuštěno v 60 ml chlorbenzenu, přidáno 1,1g (0,005 mol) DTB-aminofenolu, zamícháno a přikapáno 0,22 ml PCl_3 , pozorována změna barvy na světle fialovou. V reaktoru zahříváno 2x12 min. při $140^\circ C$ (2 min na 600W, poté 10 min při 800W), po uplynutí doby přikapáno dalších 0,22 ml PCl_3 . Zahříváno znovu na $140^\circ C$ 800W po dobu 5 min. Kontinuálně prováděna kontrola TLC, salicylanilidu ubylo ve prospěch tvorby benzoxazolu. Po ochlazení provedeno vakuové odpaření, přelito hexanem a znovu odpařeno, na zkoušku odpařeno i s diethyletherem.

Rozděleno na sloupci silikagelu (35g, S1). Frakce 2-13, svítivá skvrna, roztok žlutě zbarven. Oddestilováno na vakuové odparce, označeno jako příslušný benzoxazol, $m = 0,12$ g. Charakterizováno. $R_f(S2)=0,86$ (pod UV svítivá skvrna, časem zružověla až zhnědla). Frakce 19-28, pod UV lampou zhasí, zahuštěno do sucha na odparce, označeno jako amid, $m = 0,568$ g. Charakterizováno. $R_f(S1)=0,16$; $R_f(S2)=0,63$. Od frakce 29 změněn poměr soustavy na hexan 1:1 EtOAc, jímáno do baňky, zahuštěno, $m = 0,146$ g směsi. Přelito hexanem,

odfiltrováno a filtrát znovu zahuštěn na vakuové odparce a znovu zfiltrován. Teplota tání vzniklých krystalů orientačně stanovena na $T_t = 186^\circ - 193^\circ \text{C}$.

Reakční schéma 2.:

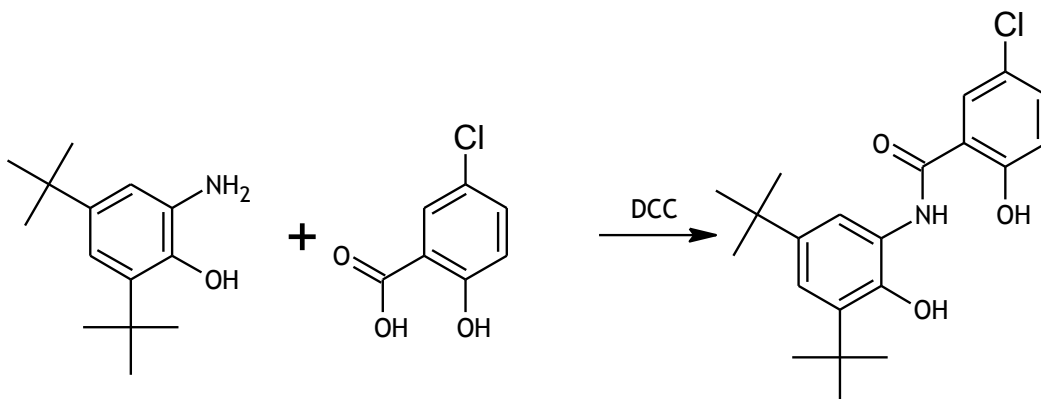


Schéma 5.2.3.6. Reakční schéma reakce s aktivací pomocí DCC

Pracovní postup 2.:

0,35 g (0,002 mol) 5-chlorsalicylové kys. bylo rozpuštěno v 25 ml chloroformu a přidáno 0,5 g (0,0022 mol) DCC. Za stálého míchání přidáno 0,0022 mol DTB-aminofenolu. Mícháno a zahříváno 3 hod pod zpětným chladičem k varu.

Prováděna kontinuální kontrola TLC R_f (S2)=0,27 (DTB-aminofenol); $R_f = 0,4$ (5-chlorsalicylová kys.). Reakcí vzniká mnoho produktů, na TLC $R_f = 0,76$ (skvrna se na vzduchu barví jako DTB-aminofenol); $R_f=0,73$ (svítivá skvrna); $R_f = 0,67$. Ve směsi ještě stále přetrvala nezreagovaná 5-chlorsalicylová kyselina i zbytky DTB-aminofenolu. Ochlazením reakční směs ztmavla a zakalila se. Z reakce postupně získána DCU $m = 0,404$ g.

Z 0,83 g směsi dělené na sloupci silikagelu (50 g, S1) získány frakce 3-15, fialově modré zbarvení, od frakce 22, slabě nažloutlá barva, směs byla dále jímána do baňky a poté zahuštěna na vakuové odparce. Kontrolou TLC zjištěno 6 skvrn, $m = 0,182$ g, jedna ze skvrn odpovídala standardu.

Reakce vede ke vzniku mnoha barevných produktů vzniklých z aminofenolu, tudíž malá výtěžnost a obtížnost dělení směsi negativně převažuje nad

výsledky, z čehož vyplývá, že tato reakce je nevýhodná pro syntézu těchto látek a nebyla dále prováděna.

Výtěžek: reakce v mikrovlnném reaktoru: amid – 0,485g – 25,81%
benzoxazol – 0,12g

Teplota tání: amid – 190° -193° C
benzoxazol – 135° -137° C

TLC: amid – $R_f(S1)= 0,16$; $R_f(S2)= 0,63$
benzoxazol – $R_f(S1)= 0,74$; $R_f(S2)= 0,84$

IR/cm⁻¹: amid: 3567, 3359, 3324, 3004, 2958, 2906, 2868, 2776, 2741,
2704, 1786, 1685, 1639, 1602, 1575, 1553, 1480, 1447,
1414, 1391, 1361, 1327, 1290, 1233, 1202, 1168, 1148,
1128, 1111, 1089, 1024, 962, 932, 908, 891, 873, 832, 821,
802

benzoxazol: 3423, 3178, 3100, 3074, 3049, 2965, 2908, 2869, 2809,
2748, 2718, 2608, 2561, 1753, 1633, 1617, 1600, 1587,
1543, 1512, 1487, 1478, 1426, 1400, 1395, 1378, 1344,
1308, 1280, 1267, 1253, 1234, 1202, 1173, 1133, 1100,
1090, 1059, 1034, 1006, 951, 936, 879, 863, 859, 832, 813

¹³C NMR: (75 MHz, CDCl₃):

amid: 167,6, 160,1, 146,0, 143,3, 135,0, 127,0, 125,6, 124,7,
124,0, 122,8, 120,7, 118,2, 114,8, 35,4, 34,4, 31,5, 29,9

benzoxazol: ¹³C NMR spektrum nešlo správně interpretovat, proto je zde uvedeno ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 11.59 (1H, bs, OH), 7.95 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H4), 7.60 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H6), 7.37 (1H, dd, overlapped, $J=8.8$ Hz, $J=2.3$ Hz, H4'), 7.36 (1H, d, overlapped, $J=2.3$ Hz, H6'), 7.07 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H3'), 1.55 (9H, s, CH₃), 1.40 (9H, s, CH₃)

N-(3,5-DI-*TERC*-BUTYL-2-HYDROXYFENYL)PYRIDIN-3-KARBOXAMID

Sumární vzorec: $C_{20}H_{26}N_2O_2$

Molekulová hmotnost: 326,433

Reakční schéma:

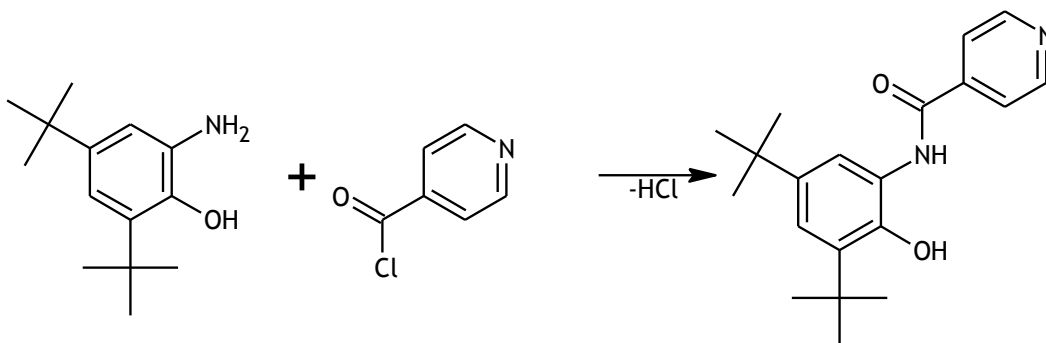


Schéma 5.2.3.7. Reakční schéma

Pracovní postup:

0,63 g (0,0045 mol) chloridu kyseliny bylo rozpuštěno v 15 ml chlorbenzenu přikapáváno 0,99 g DTB-aminofenol (0,0045 mol) také rozpuštěného v 15 ml chlorbenzenu. Reakční směs změnila barvu z béžové na tmavě oranžovou. 15 min. mícháno. Den ponecháno stát, zahuštěno na vakuové odparce. Rozpuštěno v chloroformu a vytřepáno $NaHCO_3$, odděleno, přidán Na_2SO_4 a vysušeno. Síran byl odfiltrován a filtrát zahuštěn na vakuové odparce. Překrystalováno z EtOH : H_2O .

Výtěžek: 0,598g – 43,62%

Teplota tání: 211° - $215^{\circ}C$

TLC: $R_f(S1)= 0,05$; $R_f(S2)= 0,67$; $R_f(S3)= 0,65$

IR/ cm^{-1} : 3588, 3567, 3504, 3447, 3405, 3324, 3307, 3207, 3054, 2994, 2958, 2907, 2869, 1684, 1653, 1647, 1636, 1605, 1600, 1576, 1569, 1546, 1508, 1480, 1458, 1447, 1412, 1393, 1362, 1347, 1319, 1238, 1216, 1202, 1137, 1153, 1137, 1067, 1004, 878, 844, 827, 802

^{13}C NMR: (75 MHz, CDCl_3): 165,0, 150,6, 146,1, 143,0, 140,7, 140,1, 125,4,
122,7, 121,2, 117,8, 35,4, 34,3, 31,4, 29,8

N-(3,5-DI-*TERC*-BUTYL-2-HYDROXYFENYL)PYRIDIN-2-KARBOXAMID

Sumární vzorec: $C_{20}H_{26}N_2O_2$

Molekulová hmotnost: 326,433

Reakční schéma:

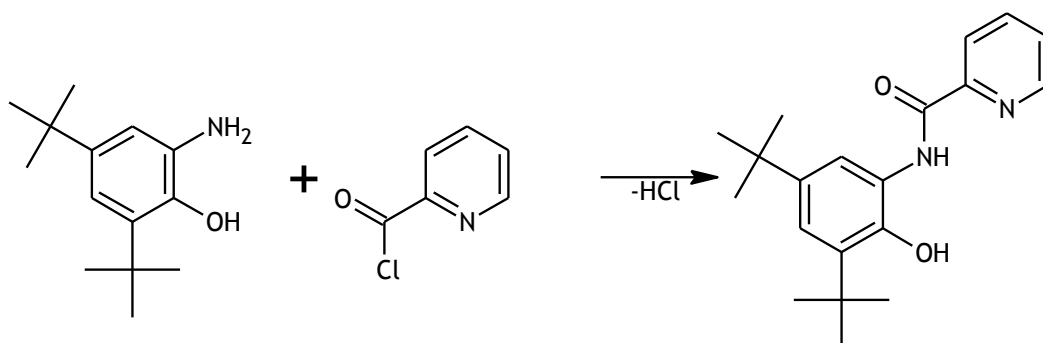


Schéma 5.2.3.8. Reakční schéma

Pracovní postup:

0,99 g (0,0045 mol) DTB-aminofenolu bylo přelito 15 ml chlorbenzenem a přidáno k 0,63 g (0,0045 mol) chloridu kys. rozpuštěného také v 15 ml chlorbenzen. Za míchání ponecháno 15 min reagovat. Směs změnila barvu z tmavě zelené, přes modrou, na fialovou. Den necháno stát. Odpařeno na vakuové odparce, přelito hexanem a znovu odpařeno, $R_f(S2) = 0,63$ (po postřiku ninhydrinem, se jeví jako sek. amin). Překrystalováno z EtOH:H₂O (velmi malé množství vody), odfiltrováno.

Výtěžek: 0,474g – 32,27%

Teplota tání: 171° -173°C

TLC: $R_f(S1) = 0,16$; $R_f(S2) = 0,63$; $R_f(S3) = 0,54$

IR/cm⁻¹: 3588, 3568, 3424, 3228, 3085, 3058, 2954, 2905, 2868, 1684, 1646, 1619, 1604, 1590, 1570, 1533, 1482, 1465, 1446, 1437, 1390, 1363, 1310, 1292, 1252, 1237, 1201, 1142, 999, 876

¹³C NMR: (75 MHz, CDCl₃): 163,2, 148,4, 148,2, 146,5, 142,4, 140,0, 138,0,
126,9, 125,3, 122,7, 122,3, 117,8, 35,5, 34,3,
31,5,29,8

N-(3,5-DI-*TERC*-BUTYL-2-HYDROXYFENYL)PYRIDIN-3-KARBOXAMID

Sumární vzorec: $C_{20}H_{26}N_2O_2$

Molekulová hmotnost: 326,433

Reakční schéma:

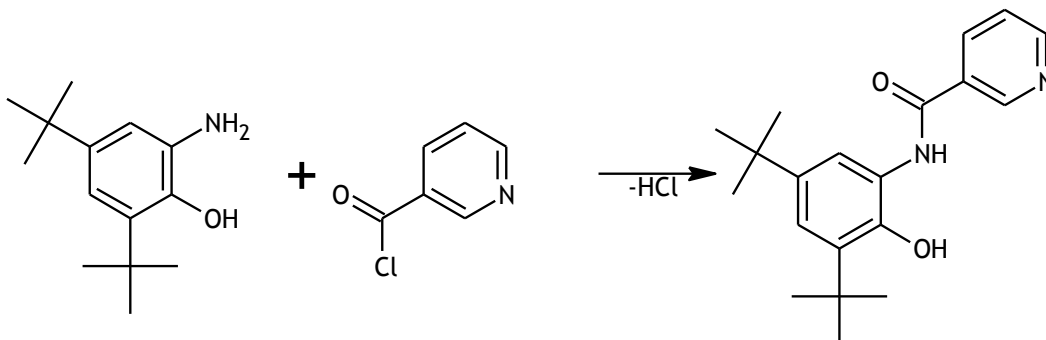


Schéma 5.2.3.9. Reakční schéma

Pracovní postup:

1,02 g (0,0046 mol) DTB-aminofenolu přelito 15 ml chlorbenzenu a přidáno k 0,63 g (0,0045 mol) chloridu kys. rozpuštěného také v 15 ml chlorbenzenu. Ponecháno 15 min reagovat, mícháno, den necháno stát. Směs změnila barvu ze smetanové na tmavě oranžovou. Odpařeno na vakuové odparce, přelito hexanem, zfiltrováno, filtrát zahuštěn. Překrystalováno z EtOH:H₂O, zfiltrováno – filtrát zahuštěn. Zahuštěný filtrát – našedlé krystaly, o m=0,079 g, jednalo se o nezreagovanou výchozí kyselinu.

Výtěžek: 0,488g – 32,49%

Teplota tání: 187° -188°C

TLC: $R_f(S1)= 0$; $R_f(S2)= 0,14$; $R_f(S3)= 0,49$

IR/cm⁻¹: 3608, 3588, 3567, 3509, 3424, 3273, 3054, 3003, 2955, 2907, 2868, 1684, 1641, 1617, 1597, 1552, 1535, 1481, 1458, 1447, 1421, 1391, 1362, 1341, 1322, 1238, 1200, 1170, 1140, 1029, 925, 881, 871, 823

¹³C NMR: (75 MHz, CDCl₃): 165,2, 152,6, 148,0, 146,2, 143,0, 140,2, 135,9,
129,5, 125,7, 123,9, 122,5, 118,0, 35,4, 34,3, 31,5,
29,8

5-METHOXY-N-(3,5-DI-*TERC*-BUTYL-2-HYDROXYFENYL)-2-HYDROXYBENZAMID

Sumární vzorec: $C_{22}H_{29}NO_4$

Molekulová hmotnost: 371,47

Reakční schéma:

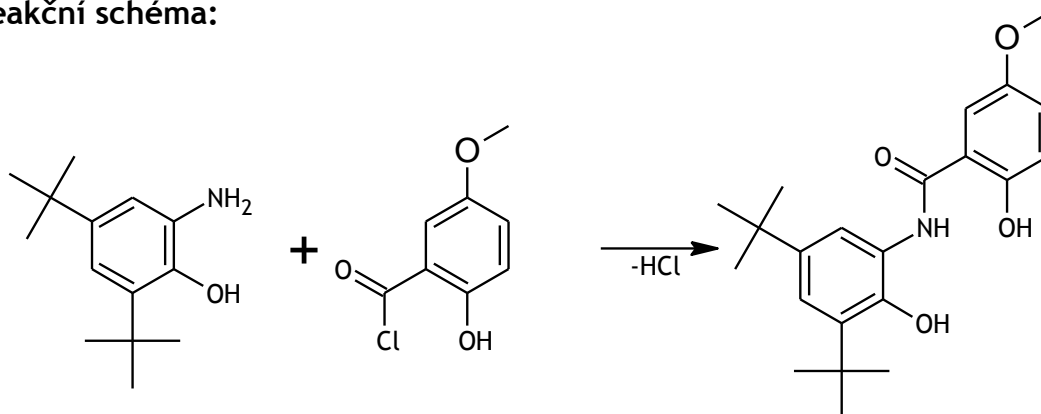
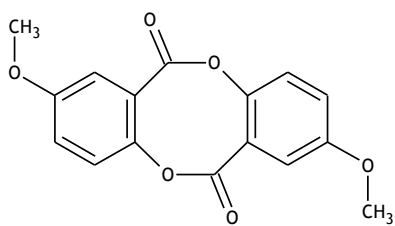


Schéma 5.2.3.10. Reakční schéma

Pracovní postup:

K 0,84 g (0,0045 mol) chloridu kyseliny rozpuštěného v 15 ml chlorbenzenu přikapáváno 0,99 g (0,0045 mol) DTB-aminofenolu rozpuštěného v 15 ml chlorbenzenu. Reakční směs změnila barvu na tmavě zelenou. 15 min. ponecháno reagovat. Směs byla zahuštěna, přelita hexanem, zfiltrována, krystaly promyty na filtru hexanem a filtrát zahuštěn. Krystaly znovu odfiltrovány.

Jednalo se o sloučeniny DTB-aminofenolu (potvrzené IR, viz. Obrázek 4.2.1.1.) i samotný DTB-aminofenol (IR). Nezreagovaná kyselina, resp. její chlorid ihned dimeruje za vzniku 2,8-dimethoxy-6*H*,12*H*-dibenzo[*b,f*][1,5]dioxocin-6,12-dionu (běžové krystaly, viz. obrázek 4.2.3.2.), jehož přítomnost byla potvrzena NMR spektry a IR.



Obrázek 5.2.3.2. 2,8-dimethoxy-6*H*,12*H*-dibenzo[*b,f*][1,5]dioxocin-6,12-dion
Tato reakce nebyla opakována. Dimer byl popsán NMR a IR, teplota tání
160° -163° C.

Výtěžek: 0,00g – 0,00%

3-BROM-N-(3,5-DI-*TERC*-BUTYL-2-HYDROXYFENYL)BENZAMID

Sumární vzorec: $C_{21}H_{26}BrNO_2$

Molekulová hmotnost: 404,341

Reakční schéma:

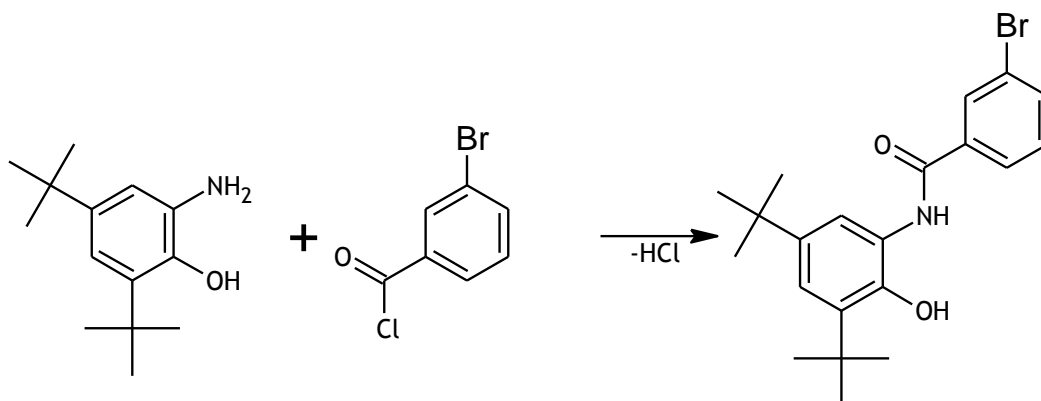


Schéma 5.2.3.11. Reakční schéma

Pracovní postup:

1,9 g (0,0086 mol) DTB-aminofenolu rozpuštěného v 15 ml chlorbenzenu bylo přikapáno k 1,89 g (0,0086 mol) chloridu kyseliny, rozpuštěn v 15 ml chlorbenzenu. 15 min ponecháno reagovat, mícháno. Reakční směs změnila barvu na růžovo-fialovou a zgelovatěla. Přelito hexanem, odfiltrováno, znovu přelito hexanem a přes noc ponecháno v lednici krystalovat. Vypadly krystaly, které byly odfiltrovány a označeny jako amid, $m=1,0772$ g (1. podíl), $R_f(S3)=0,75$. Provedena krystalizace z EtOH, krystaly odsáty ($m=0,663$ g). Filtrát přiřuštěn a přikapána voda a ponecháno krystalovat v lednici. Vypadlé krystaly odsáty ($m=0,253$ g, 2. podíl). První i druhý podíl krystalů promyty na filtru hexanem – byly odbarveny od vedlejších produktů z DTB-aminofenolu.

Výtěžek: 0,916g – 26,34%

Teplota tání: 210° - 212° C

TLC: $R_f(S1)=0,28$; $R_f(S2)=0,84$

IR/cm⁻¹: 3588, 3339, 3292, 3108, 3067, 3001, 2955, 2906, 2868, 1661,
1633, 1607, 1594, 1564, 1535, 1481, 1468, 1458, 1446, 1420,
1391, 1363, 1309, 1272, 1253, 1223, 1202, 1166, 1134, 1100,
1090, 1070, 964, 924, 880, 873, 824, 804

¹³C NMR: (75 MHz, CDCl₃):166,0, 146,6, 143,1, 140,5, 135,6, 135,5, 130,8,
126,1, 125,7, 123,3,122,8, 118,1, 35,7, 34,6, 31,7,
30,1

5.2.4. VLASTNÍ PŘÍPRAVA THIOANILIDŮ – PŘIPRAVENÉ LÁTKY

V metodické části je uveden zvolený přístup k syntéze těchto látek s odůvodněním proč k němu bylo přistoupeno.

N-(3,5-DI-*TERC*-BUTYL-2-HYDROXYFENYL)BENZENKARBOTHIOAMID

Sumární vzorec: $C_{21}H_{27}NOS$

Molekulová hmotnost: 341,511

Reakční schéma:

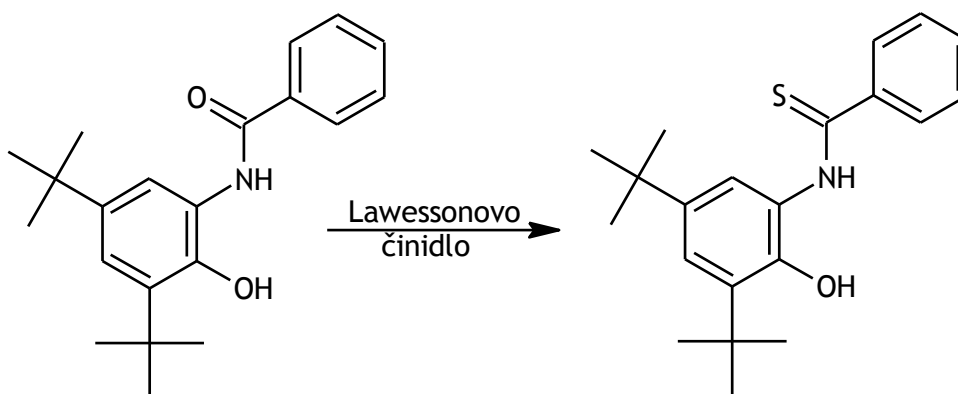
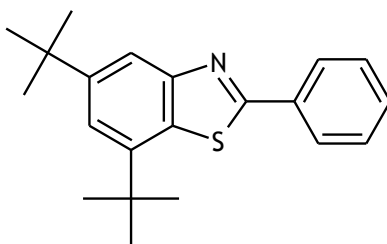


Schéma 5.2.4.1. Reakční schéma

Pracovní postup:

K suspenzi 0,16 g (0,0005 mol) benzamidu v 30 ml suchého toluenu bylo přidáno 0,1 g (0,00025 mol) Lawessonova činidla. Zahříváno k varu 1 hodinu pod zpětným chladičem s chlorkalciovým uzávěrem. V průběhu byla pozorována změna barvy na oranžovou a suspenze se změnila na roztok. Zahuštěno vakuovou destilací, překrystalováno EtOH:H₂O. Odfiltrované žluté krystaly (m=0,123 g) byly označeny za thioamid. Filtrát byl zahuštěn a krystaly označeny jako neznámá látka – bílé krystaly.

Neznámé krystaly byly podle IR a NMR identifikovány jako příslušný benzothiazol (viz. obrázek 5.2.4.1.).



Obrázek 5.2.4.1. 5,7-di-*terc*-butyl-2-fenyl-1,3-benzothiazol

Výtěžek: 0,123g – 72,03%

Teplota tání: thioamid – 86°-89° C

benzothiazol – 63°-66° C

TLC: thioamid – $R_f(S_2)=0,76$, $R_f(S_1)=0,18$

benzthiazol – $R_f(S_1)= 0,44$; $R_f(S_2)= 0,84$

IR/cm⁻¹: amid: 3588, 3568, 3427, 3063, 2961, 2906, 2869, 1655,1637,
1630,1618, 1594, 1571, 1501, 1480, 1461, 1445, 1414,
1393, 1363, 1336, 1307, 1299, 1288, 1259, 1219, 1203,
1180, 1153, 1116, 1077, 1063, 1024, 974, 916, 866, 832,
818, 805

benzothiazol: 3448, 3104, 3085, 3072, 3058,3034, 2955, 2927, 2867,
2743, 2713, 1557, 1488, 1482, 1463, 1449, 1403, 1390,
1361, 1333, 1306, 1283, 1262, 1243, 1208, 1202, 1178,
1071, 1060, 1030, 1025, 996, 931, 912, 863, 843

¹³C NMR: (75 MHz, CDCl₃):

thioamid: produkt se rozkládá

benzthiazol: 162,4, 147,9, 146,9, 142,0, 133,8, 131,3, 128,9, 127,5,
127,3, 119,6, 114,1, 35,1, 34,5, 31,8, 30,0

N-(3,5-DI-*TERC*-BUTYL-2-HYDROXYFENYL)PYRIDIN-3-KARBOTHIOAMID

Sumární vzorec: $C_{21}H_{27}NOS$

Molekulová hmotnost: 341,511

Reakční schéma:

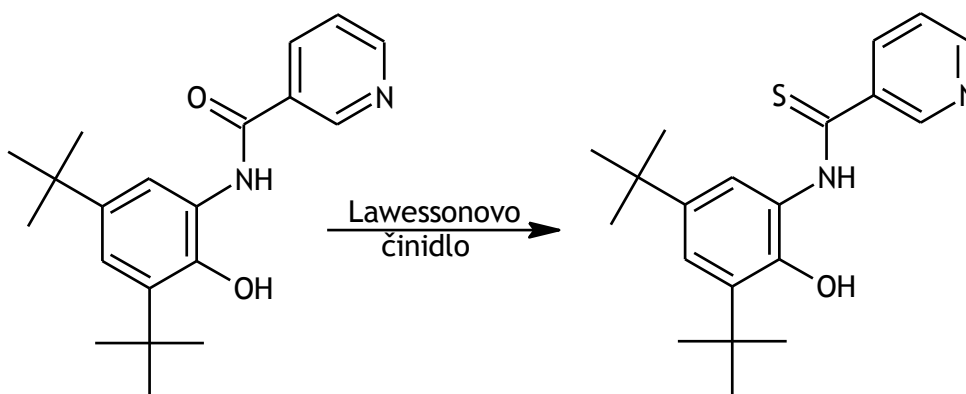


Schéma 5.2.4.2. Reakční schéma

Pracovní postup:

0,82 g (0,0025 mol) nikotinamidu bylo přelito 20 ml suchého toluenu, přidáno 0,5 g (0,00125 mol) Lawessonova činidla a pod zpětným chladičem s chlorkalciovým uzávěrem 1 hodinu zahříváno k varu. Suspenze se změnila v roztok a zežloutla až zoranžověla. Po odstavení se roztok začal kalit, ponecháno v lednici krystalovat. Přefiltrováno a filtrát přiřuštěn a byl přelit hexanem. Vypadly krystaly, odsáty, označeny jako surový produkt, m=0,500 g. Byla provedena chromatografie na sloupci silikagelu (35g, S4) – po odplavení první skvrny – frakce 5-19 (pravděpodobně nezreagovaný výchozí amid - později identifikován jako výchozí látka), byl změněn poměr na soustavy 1:1. Eluát byl zahuštěn a krystaly označeny jako thioamid.

Výtěžek: 0,230g – 26,86%

Teplota tání: 149° -150° C

TLC: $R_f(S1) = 0$; $R_f(S2) = 0$

IR/cm⁻¹: 3650, 3629, 3420, 3069, 3000, 2961, 2908, 2869, 2838, 1657,
1644, 1598, 1572, 1547, 1535, 1503, 1473, 1463, 1440, 1422,
1493, 1363, 1306, 1295, 1254, 1227, 1202, 1180, 1140, 1125,
1111, 1058, 1030, 917, 874, 829, 803

¹³C NMR: (75 MHz, CDCl₃): produkt se rozkládá

3-BROM-N-(3,5-DI-*TERC*-BUTYL-2-HYDROXYFENYL)BENZENKARBOTHIOAMID

Sumární vzorec: $C_{21}H_{26}BrNOS$

Molekulová hmotnost: 420,407

Reakční schéma:

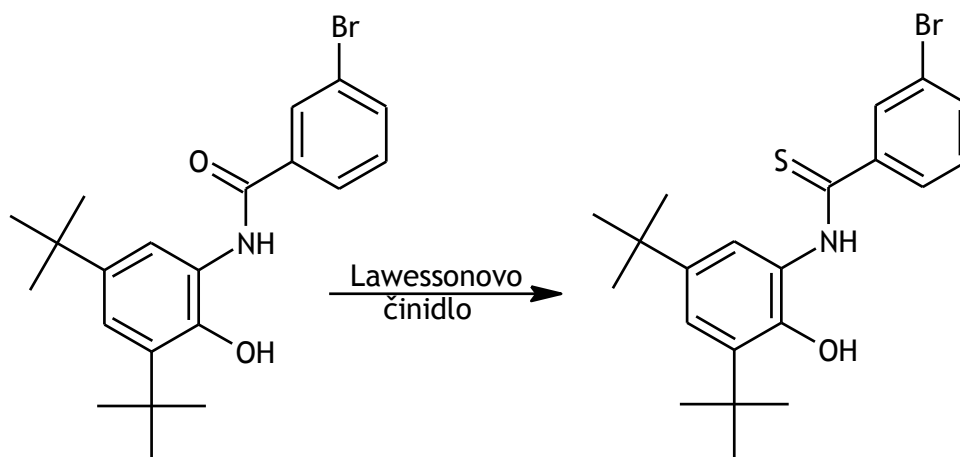


Schéma 5.2.4.3. Reakční schéma

Pracovní postup:

K 1,1 g 0,0025 mol amidu rozsuspendovaného v 20 ml suchého toluenu bylo přidáno 0,5 g (0,00125 mol) Lawessonova činidla a pod zpětným chladičem s kalciovým uzávěrem 1 hodinu zahříváno k varu. Suspenze se změnila na roztok, který se zbarvil do tmavě oranžova. Roztok oddestilován vakuovou destilací a surový produkt chromatograficky rozdělen na chromatotronu (S4). První frakce zahuštěny na vakuové odparce – benzothiazol, $m=0,125g$. Po odplavení této skvrny byl změněn poměr eluční soustavy na 1:1 a vyizolován thioamid, $m=0,346g$.

Při překrystalování byly krystaly rozpuštěny v ethanolu a vloženy na cca minutu do ultrazvukové lázně. Pomocí TLC bylo zjištěno zvyšující se množství benzothiazolu na úkor thioamidu. Později byl tento pokus zopakován ještě jednou s tímto derivátem a také s *N*-(3,5-di-*terc*-butyl-2-hydroxyfenyl)pyridin-3-karbothioamidem viz níže.

Výtěžek: thioamid: 0,346g – 32,92%

benzothiazol: 0,125g

Teplota tání: thioamid: 120° -125° C

benzothiazol: 100° -105° C

TLC: thioamid – $R_f(S1)=0,23$; $R_f(S2)=0,70$

benzthiazol – $R_f(S1)= 0,40$; $R_f(S2)= 0,84$

IR/cm⁻¹: thioamid: 3388, 3567, 3447, 2961, 2927, 2868, 1617, 1594,
1570, 1501, 1480, 1466, 1414, 1363,1339, 1308,
1295, 1263, 1219, 1202, 1181, 1153, 1116,
1026, 873, 832, 805

benzothiazolu: viz níže

¹³C NMR: (75 MHz, CDCl₃):

thioamid: produkt se rozkládá

benzthiazol: 160.9, 148.0, 147.0, 142.1, 134.1, 133.9, 130.4,
130.2, 129.5, 125.9, 123.0, 120.0, 114.3, 35.1,
34.5, 31.8, 30.0

2-(3-BROMFENYL)-5,7-DI-TERC-BUTYL-1,3-BENZOTHAZOL

Sumární vzorec: $C_{21}H_{24}BrNS$

Molekulová hmotnost: 402,392

Reakční schéma:

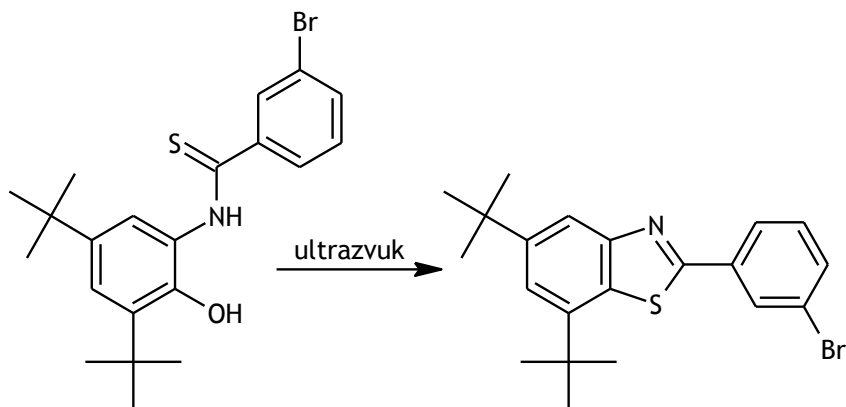


Schéma 5.2.4.4. Reakční schéma

Pracovní postup:

0,21 g (0,0005 mol) thioamidu rozpuštěného v 15 ml ethanolu bylo na 15 min vloženo do ultrazvukové lázně. Pomocí TLC byl sledován přírůstek koncentrace benzothiazolu. Poté bylo oddestilováno rozpouštědlo a krystaly překrystalovány z ethanol-voda, m=0,19g.

Výtěžek: 0,19g – 94,44%

Teplota tání: 100° -105° C

TLC: $R_f(S1) = 0,40$; $R_f(S2) = 0,84$

IR/ cm^{-1} : 3388, 3447, 3074, 2964, 2951, 2917, 2868, 1636, 1552, 1482, 1473, 1412, 1401, 1392, 1366, 1360, 1335, 1308, 1267, 1243, 1213, 1202, 1179, 1092, 1058, 997, 879, 864, 841

^{13}C NMR: (75 MHz, $CDCl_3$): 160,9, 148,0, 147,4, 142,1, 134,1, 133,9, 130,4, 130,2, 129,5, 125,9, 123,0, 120,0, 114,3, 35,1, 34,5, 31,8, 30,0

5,7-DI-*TERC*-BUTYL-2-PYRIDIN-3-YL-1,3-BENZOTHIAZOL

Sumární vzorec: $C_{20}H_{24}N_2S$

Molekulová hmotnost: 324,484

Reakční schéma:

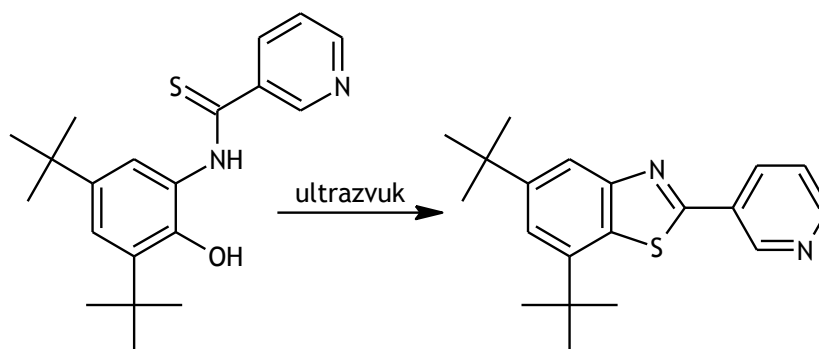


Schéma 5.2.4.4. Reakční schéma

Pracovní postup:

0,17 g (0,0005 mol) thioamidu rozpuštěného v 15 ml ethanolu bylo na 15 min vloženo do ultrazvukové lázně. Pomocí TLC byl sledován přírůstek koncentrace benzothiazolu, resp. žádná nová skvrna nepřibyla, tj. tento derivát tímto postupem necyklizuje na benzothiazol. IR potvrdila, že odpařením rozpouštědla vzniklé krystaly jsou výchozí thioamid. Vlastnosti viz. příslušný protokol.

Výtěžek: 0,00g – 0,00%

6. Biologické hodnocení

6.1. Biologická aktivita připravených látek

6.1.1. NÁRODNÍ REFERENČNÍ LABORATOŘ PRO *MYCOBACTERIUM KANSASII*

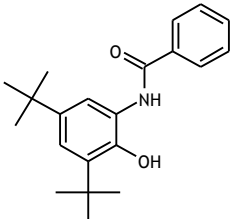
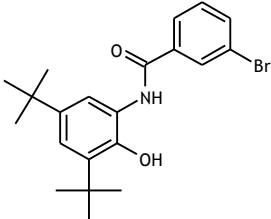
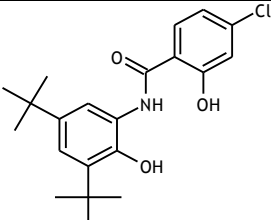
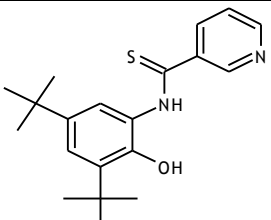
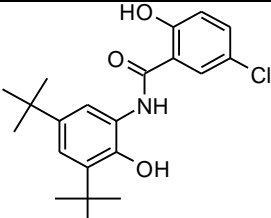
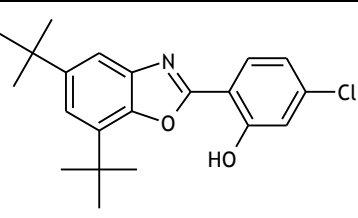
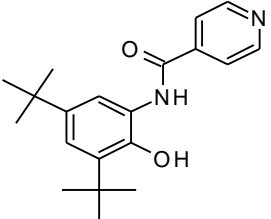
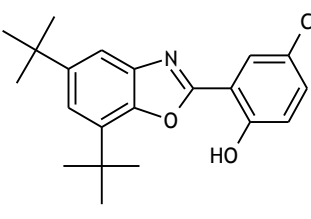
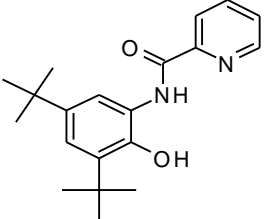
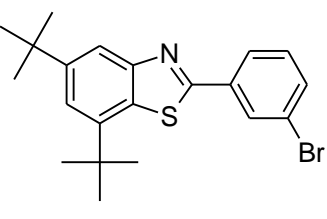
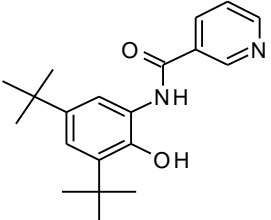
Toto pracoviště testuje biologickou aktivitu na několika kmenech bakterií:

- 1) *Mycobacterium tuberculosis* My 331/88
- 2) *Mycobacterium avium* My 330/88
- 3) *Mycobacterium kansasii* My 235/80
- 4) *Mycobacterium kansasii* 6 509/96 (kmen izolovaný od pacienta z okresu Karviná)

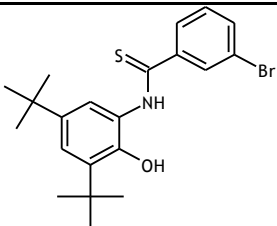
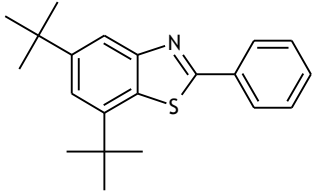
Preparáty byly ředěny v koncentracích 1 - 1000 $\mu\text{mol/l}$ pro skupinu A (viz. tabulka 6.1.1.1.), 1 - 500 $\mu\text{mol/l}$ pro skupinu B (viz. tabulka 6.1.1.2.) a 0,5 - 250 $\mu\text{mol/l}$ pro izoniazid (INH), který zde byl brán jako standard. Jako rozpouštědlo byl pro připravené látky použit dimethylsulfoxid a pro izoniazid byla použita sterilní destilovaná voda.

Vzorky byly inkubovány po dobu 7 dní, 14 dní a 21 dní; při teplotě 37°C. Jako metoda pro stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC/ $\mu\text{mol/l}$) byla použita mikrometoda stanovení MIC léků v šulově půdě v plastických P-destičkách.

Výsledné hodnoty jsou zobrazeny v tabulce 6.1.1.3..

Skupina A	
	
<i>N</i> -(3,5-di- <i>tert</i> -butyl-2-hydroxyfenyl)benzamid	3-brom- <i>N</i> -(3,5-di- <i>tert</i> -butyl-2-hydroxyfenyl)benzamid
	
4-chloro- <i>N</i> -(3,5-di- <i>tert</i> -butyl-2-hydroxyfenyl)-2-hydroxybenzamid	<i>N</i> -(3,5-di- <i>tert</i> -butyl-2-hydroxyfenyl)pyridin-3-karbothioamid
	
5-chloro- <i>N</i> -(3,5-di- <i>tert</i> -butyl-2-hydroxyfenyl)-2-hydroxybenzamid	5-chloro-2-(5,7-di- <i>tert</i> -butyl-1,3-benzoxazol-2-yl)fenol
	
<i>N</i> -(3,5-di- <i>tert</i> -butyl-2-hydroxyfenyl)izonikotinamid	4-chloro-2-(5,7-di- <i>tert</i> -butyl-1,3-benzoxazol-2-yl)fenol
	
<i>N</i> -(3,5-di- <i>tert</i> -butyl-2-hydroxyfenyl)pyridin-2-karboxamid	2-(3-bromfenyl)-5,7-di- <i>tert</i> -butyl-1,3-benzothiazol
	
<i>N</i> -(3,5-di- <i>tert</i> -butyl-2-hydroxyfenyl)nikotinamid	

Tabulka 6.1.1.1. Skupina A

Skupina B	
	
3-brom-N-(3,5-di- <i>terc</i> -butyl-2-hydroxyfenyl)benzothioamid	5,7-di- <i>terc</i> -butyl-2-phenyl-1,3-benzothiazole

Tabulka 6.1.1.2. Skupina B

Substituent	<i>M. tuberculosis</i> My 331/88			<i>M. avium</i> My 330/88			<i>M. kansasii</i> My 235/80			<i>M. kansasii</i> 6 509/96				
	Ředění kmene	MIC/μmol/l		Ředění kmene	MIC/μmol/l		Ředění kmene	MIC/μmol/l			Ředění kmene	MIC/μmol/l		
		14 dní	21 dní		14 dní	21 dní		7 dní	14 dní	21 dní		7 dní	14 dní	21 dní
Ar = fenyl, -	10 ⁻¹	250 nárůst	250 nárůst	10 ⁻⁵	250 nárůst	500 nárůst	10 ⁻²				10 ⁻⁴	62,5	125 nárůst	125 nárůst
Ar = fenyl, 3-Br	10 ⁻¹	125 nárůst	250 nárůst	10 ⁻⁵	250 nárůst	500 nárůst	10 ⁻²	125	250 nárůst	250 nárůst	10 ⁻⁴	62,5	62,5 nárůst	250 nárůst
Ar = fenyl, 4-Cl, 2-OH	10 ⁻¹	2	4	10 ⁻⁵	62,5	62,5	10 ⁻²	2	4	8	10 ⁻⁴	2	2	4
Ar = fenyl, 5-Cl, 2-OH	10 ⁻¹	4	4	10 ⁻⁵	32	32	10 ⁻²	4	4	4	10 ⁻⁴	4	4	8
isonikotinová	10 ⁻¹	32 nárůst	62,5 nárůst	10 ⁻⁵	62,5 nárůst	125 nárůst	10 ⁻²	62,5 nárůst	250 nárůst	250 nárůst	10 ⁻⁴	16 nárůst	32 nárůst	62,5 nárůst
pikolinová	10 ⁻¹	62,5 nárůst	125 nárůst	10 ⁻⁵	125 nárůst	250 nárůst	10 ⁻²	62,5 nárůst	250 nárůst	250 nárůst	10 ⁻⁴	62,5 nárůst	250 nárůst	500 nárůst
nikotinová	10 ⁻¹	32	32	10 ⁻⁵	250 nárůst	250 nárůst	10 ⁻²	32	32	32	10 ⁻⁴	16	32	32
Ar = fenyl, 3-Br	10 ⁻³	250 nárůst	> 500	10 ⁻⁵	250 nárůst	> 500	10 ⁻⁴	500	500	> 500	10 ⁻⁴	250	500	> 500
nikotinová	10 ⁻¹	125	125 nárůst	10 ⁻⁵	250	250	10 ⁻²	62,5	125	125	10 ⁻⁴	125	125	125
Ar = fenyl, 1-OH, 5-Cl	10 ⁻³	500	1000	10 ⁻⁵	> 1 000	> 1 000	10 ⁻⁴	500	500	1000	10 ⁻⁴	250	500	1000
Ar = fenyl, 1-OH, 4-Cl	10 ⁻³	125	250 nárůst	10 ⁻⁵	62,5 nárůst	250 nárůst	10 ⁻⁴	250 nárůst	250 nárůst	250 nárůst	10 ⁻⁴	62,5 nárůst	125 nárůst	250 nárůst
Ar = fenyl, -	10 ⁻³	32	62,5	10 ⁻⁵	250	250 nárůst	10 ⁻⁴	62,5	125	125	10 ⁻⁴	62,5	62,5	125
Ar = fenyl, 3-Br	10 ⁻³	62,5	125	10 ⁻⁵	250 nárůst	500 nárůst	10 ⁻⁴	500 nárůst	500 nárůst	500 nárůst	10 ⁻⁴	125	250	500 nárůst
INH	10 ⁻³	0,5	0,5	10 ⁻⁵	> 250	> 250	10 ⁻⁴	> 250	> 250	> 250	10 ⁻⁴	2	4	4

Tabulka 6.1.1.3. Antimykobakteriální aktivity připravených látek

Legenda k tabulce 6.1.1.3. :

V první skupině (7 látek) jsou uvedeny amidy – první dva odvozené od kyseliny benzoové, dva odvozené od salicylové kyseliny a tři deriváty odvozené od pyridinu.

Druhá skupina jsou thioamidy (2 látky).

Třetí skupina zahrnuje benzoxazoly (2 látky).

Čtvrtá skupina jsou benzthiazoly (2 látky).

Poslední skupina je izoniazid pro srovnání.

7. Diskuze a závěr

7.1. Diskuze

V rámci této práce byly vyzkoušeny některé postupy přípravy amidů.

Prvním vyzkoušeným postupem byla syntéza s přidavkem chloridu fosforitého za vzniku chloridu kyseliny *in situ*. Od tohoto způsobu bylo upuštěno vzhledem k malému výtěžku reakce a vzniku velkého množství vedlejších barevných produktů z DTB-aminofenolu.

Byl tedy otestován obdobný postup vzniku chloridu *in situ* a to pomocí mikrovlnného reaktoru. Jako reakční činidlo byl opět použit PCl_3 . Tato reakce však vedla ke vzniku nového vedlejšího produktu, který se při předešlém způsobu netvořil, a také produktů vzniklých z DTB-aminofenolu. Tento produkt byl později popsán jako příslušný benzoxazol. Tato teorie, že mikrovlnný reaktor podporuje cyklizaci amidu za vzniku benzoxazolu byla ověřena syntézou ještě s jedním derivátem salicylové kyseliny – 5-chlorsalicylovou kyselinou.

Nakonec bylo přistoupeno k třetímu způsobu přípravy amidu. Nejprve byla příslušná kyselina převedena na chlorid pomocí chloridu thionylu. Ten byl poté kondenzován s DTB-aminofenolem. Tato metoda je jednoznačně nejlepší metodou pro přípravu této skupiny látek, vzhledem ke zvýšení výtěžnosti.

Dalším krokem bylo převedení připravených derivátů na jejich sirné analogy. Příprava byla prováděna pomocí Lawessonova činidla. Při reakci vznikal u některých výchozích látek také neočekávaný vedlejší produkt – benzthiazol. Je zajímavostí, že se thioamid 3-brom-N-(3,5-di-*terc*-butyl-2-hydroxyfenyl)benzenkarbothioamid podařilo převést na benzthiazol pomocí ultrazvukové lázně. U jiných thioamidů reakce v ultrazvuku neproběhla.

7.2. Závěr

Připravené deriváty byly otestovány na biologickou aktivitu v programu TAACF. Bohužel v současné době nejsou tyto výsledky dostupné. Také byly odeslány na testování aktivity proti atypickým kmenům do Národní referenční laboratoře pro *Mycobacterium kansasii*.

Výsledkem jsou tyto závěry:

Nejaktivnějšími deriváty s aktivitou srovnatelnou s INH jsou ty, které obsahují volnou hydroxylovou skupinu na původně kyselé části molekuly. Tyto deriváty mají však vyšší aktivitu pro atypické kmeny – *M. avium* My 330/88 a *M. kansasii* My 235/80 – než INH. Aktivita pro kmen *M. kansasii* 6 509/96 je srovnatelná. Substituce původní kyseliny na benzenovém kruhu zvyšuje aktivitu ve srovnání s derivátem bez substituce. Nejaktivnějším derivátem v podskupině amidů s pyridinem je derivát nikotinové kyseliny. Tyto deriváty jsou ale méně aktivní než deriváty odvozené od salicylové kys., avšak aktivnější než deriváty odvozené od benzoové kyseliny.

Cyklizací, tj. vznikem benzoxazolu se aktivita snížila.

Substituce karbonylového kyslíku za síru nevede u thioamidů ke zvýšení aktivity. Ovšem v případě aktivity benzoxazolů v porovnání s benzthiazoly je tomu právě naopak. Benzthiazoly vykazují větší aktivitu oproti odpovídajícím benzoxazolům. Substituce benzthiazolů vede ke snížení aktivity oproti nesubstituovanému derivátu vycházejícímu z benzoové kyseliny.

Tato fakta tedy napomáhají teorii, že aktivita „otevřených forem“ je vyšší, než u odpovídajících cyklických látek. Tedy i závěru, že metabolismus

benzoxazolů je otevření kruhu a tyto metabolity jsou posléze zodpovědné za účinnost derivátu.

Konečným závěrem tedy je, že nejperspektivnějšími látkami nadále zůstávají deriváty odvozené od salicylové kyseliny a to jejich amidy.

Pro zobecnění závěrů získaných z dosud připravených derivátů je třeba rozšířit jednotlivé série o větší počet analogů.

8. Abstrakt

8.1. Abstrakt v českém jazyce

Zavedení *terc*-butylových skupin do molekuly benzoxazolů vede ke zvýšení lipofility a tím i snazší penetraci lipoidní mykobakteriální stěnou. Z námi připravené série 5,7-di-*terc*-butyl-benzoxazolů substituovaných v poloze 2 aromatickým substituentem vykazalo několik derivátů 100-90 % aktivitu v koncentraci 6,25 µg/ml vůči *Mycobacterium tuberculosis H₃₇Rv*. Protože se benzoxazoly metabolicky pravděpodobně otevírají, je cílem tohoto příspěvku příprava substituovaných *N*-(3,5-di-*terc*-butyl-2-hydroxyphenyl)benzamidů a pyridinkarboxamidů, jejich tzv. „otevřených forem“, které mohou být rovněž považovány za „převrácené salicylanilidy“, u nichž byla také nalezena významná antituberkulotická aktivita.

Syntéza analogů nejúčinnějších benzoxazolů vycházela z 2-amino-3,5-di-*terc*-butylfenolu, který byl připraven reakcí 3,5-di-*terc*-butyl-1,2-benzochinonu s amoniakem a následnou redukcí chinoniminu. Takto získaný DTB-aminofenol byl kondenzován s příslušnými aromatickými či heteroaromatickými kyselinami za přítomnosti PCl_3 v chlorbenzenu. Poměrně dlouhá reakční doba vedla ke zvyšování podílu barevných vedlejších produktů v neprospěch požadovaného produktu. Proto bylo přistoupeno k reakci v mikrovlnném reaktoru, který značně zkrátil dobu reakce z hodin na minuty. Jako vedlejší produkty byly vyizolovány též benzoxazoly, které díky své hydroxylové skupině světélkují pod UV 254 nm. Avšak nejlepší metodou pro přípravu těchto látek se jeví kondenzace DTB-aminofenolu se samostatně připraveným chloridem kyseliny. Připravené amidy byly převedeny reakcí s Lawessonovým činidlem na příslušné thioamidy, jejichž cyklizace vedla částečně též k benzothiazolům. U připravených látek a jejich sirných analogů bude stanovena antituberkulotická aktivita a porovnána s předlohovými látkami.

Práce vznikla za finanční podpory grantu GAUK 64407 (2007) a MSM 002162082.

8.2. Abstract in English Language

Implementation of *tert*-butyl group into the molecule of benzoxazoles leads to enhancement of lipophilicity and therefore better penetration through lipid mycobacterial cell-wall. Several derivatives had shown 100-90 % activity in concentration 6,25 µg/ml against *Mycobacterium tuberculosis H₃₇Rv* in our series of 5,7-di-*tert*-butyl-benzoxazoles substituted in position No. 2 with aromatic substituent. Metabolism of benzoxazoles probably includes the opening of their structure. The goal of this thesis is to synthesize substituted *N*-(3,5-di-*tert*-butyl-2-hydroxyphenyl)benzamides and pyridinecarboxamides, their so-called "open forms". These structures could be also considered as "reversed salicylanilides" which have also a significant antitubercular activity.

The first step of the synthesis of these analogues is preparation of 2-amino-3,5-di-*tert*-butylphenol. It was prepared by reaction of 3,5-di-*tert*-butylbenzo-1,2-quinone with ammonia and following reduction by NaBH₄. Resulting DTB-aminophenol has been condensed with appropriate aromatic or heteroaromatic acids, while PCl₃ in chlorobenzene was added. Quite a long reaction time increased the fraction of tinted by-products at the expense of the amount of the requested product. Therefore the reaction was moved into the microwave reactor, which considerably shortened the reaction time (from hours to minutes). Benzoxazoles, unexpected by-products, were also isolated. These by-products, due to their hydroxyl group, laminate in UV light (254 nm). However the best method to synthesize these amides is condensation of DTB-aminophenol with separately prepared acid chloride. Resulting amides has been transferred into their appropriate thioamides, by-products of these reactions were benzothiazoles. The final products will be tested for antitubercular activity and their results will be compared to benzoxazolic patterns.

Creation of this thesis was enabled thanks to financial support of the grant GAUK 64407 (2007) a MSM 002162082.

9. Použitá literatura

-
- ¹ www.who.int/tb/ (duben 2008)
- ² Lüllmann H., Mohr K., za spolupráce Wehlinga M.: Farmakologie a toxikologie, Grada Publishing, spol. s r.o. Praha, 1. vydání, 503-508 (2002)
- ³ Klener P. et al: Vnitřní lékařství, Galén Praha, 280 - 285 (2001)
- ⁴ Fiddler D.F.: Emerge. Infect. Dis. 4, 169 (1998)
- ⁵ Oren I., Temiz O., Yalcin I., Sener E., Altanlar N.: Eur. J. Pharm. Sci. 7, 153 (1998)
- ⁶ Hong C. Y. Z.: Farmaco. 56, 41 (2001)
- ⁷ Vinšová J., Horák V., Buchta V., Kaustová J.: Molecules, 10, 760-770 (2005)
- ⁸ Vinšová J., Čermáková K., Tomečková A., Čečková M., Buchta V., Jampílek J., Čermák P., Kuneš J., Doležal M., Štaud F. Synthesis of Novel 2 Substituted 5,7-Di-*tert*-butylbenzoxazoles as Potential Antimicrobial Agents. Bioorg. Med. Chem., 14, 5850-5865 (2006)
- ⁹ Waisser K.; Matyk J.; Divisova H., et al. The oriented development of antituberculotics: Salicylanilides. Arch. Pharm., 339, 616-620 (2006).
- ¹⁰ Kubicová L., Waisser K.: Čes. slov. Farm., 4, 208 (1992)
- ¹¹ Macielag M. J., Demers J. P., Fraga-Spano S. A. et al.: J. Med. Chem. 4, 2939 (1998)
- ¹² Ellsworth E. L., Olson E. R., Showalter H. D. H.: Chemtracts., 2, 656 (1999); ref. Chem. Abstr., 3, 29529 (1999)
- ¹³ Vinšová J., Imramovský A.: Salicylanilidy – stále aktuální skupina s potenciální antibakteriální aktivitou, Čes. slov. Farm., 53294-299 (2004)
- ¹⁴ Coburn R. C., Clark M. T., Švand R. T., Genco R. J.: J. Med. Chem., 30, 205 (1987)
- ¹⁵ Waisser K., Bureš O., Holý P. et al.: Pharmazie, 58, 83-94 (2003)
- ¹⁶ Vinšová J., Imramovský A., Buchta V. et al.: Salicylanilide acetates: Synthesis and antibacterial evaluation, Molecules, 12, 1-12 (2007)
- ¹⁷ Imramovsky A.; Vinsova J.; Ferriz, J. M. et al. Salicylanilide esterification: unexpected formation of novel seven-membered rings, Tetrahedron letters, 47, 29, 5007-5011 (2006)
- ¹⁸ Yasui K., Goto T., Ito S., Ueno C.: Jap. pat., 028708 (1998); ref. Chem. Abstr., 29, 45856 (1998)

-
- ¹⁹ Evans R. T., Coburn R. A., Genco R. A., Dunn J. A.: US pat., 59589 (1999); ref. Chem. Abstr., 3, 223499 (1999)
- ²⁰ Akutu M., Tominaga N., Ooya K., Tomita A.: Jap. pat., 0725703 (1995); ref. Chem. Abstr., 24, 60447 (1996)
- ²¹ Vol'eva V. B., Prokof'eva T. I., Prokof'ev A. I., Belostotskaya I. S., Komissarova N. L., Ershov V. V.: Russ. Chem. Bl. 44 (9), 1720 (1995).
- ²² Suzuki Y., Kashiwa N., Fujita T.: Chem. Lett. 31, 3, 358 (2002)
- ²³ Jimenez P. V. M., Camacho C. C., Gueizado R. M., Noeth H., Contreras R.: J. Organomet. Chem 614, 283 (2000)
- ²⁴ Ivakhnenko E. P., Lyubchenko S. N., Kogan V. A., Olekhovich L. P., Prokof'ev A. I.: J. Gen. Chem. USSR 56, 765 (1986)
- ²⁵ Devínský F. et al.: Organická chémia pre farmaceutov, Osveta Martin, 445 (2001)
- ²⁶ Zálétalová J., Dzurilla M., Kutschy P., Pazdera P. Kováčik V., Aldolfi J., Benešová S.: Collect. Czech. Chem. Commun. 69, 453-460 (2004)
- ²⁷ Kunes, J., Balsanek, V., Pour, M. et al.: On the relationship between the substitution pattern of thiobenzanilides and their antimycobacterial activity, Farmaco Volume 57, 9,777-782 (2002)
- ²⁸ Pedersen, B. S., Scheibye, S., Nilsson, N. H., Lawesson, S. O.: Bull. Soc. Chim. Belg., 87, 223 (1978)
- ²⁹ Zálétová J. et al.: Synth. Of 4,6-disubst.-2-(1*H*-indol-3-yl)-benzothiazoles, Collect. Czech. Chem. Commun., Vol. 69, 453 (2004)
- ³⁰ www.wikipedia.com
- ³¹ Stegmann H. B.: Justus Liebigs Ann. Chem. 755, 17 (1972)