

KARLOVA UNIVERZITA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A KONTROLY LÉČIV

Deriváty pyrazinu jako potenciální léčiva I

Diplomová práce



Školitel

Doc. PharmDr. Martin Doležal, Ph.D.

Hradec Králové 2009

Petr Sedlák

Poděkování

Za vedení své diplomové práce bych chtěl poděkovat svému školiteli Doc. PharmDr. Martinu Doležalovi, Ph.D. a také celé katedře Farmaceutické chemie a kontroly léčiv.

Petr Sedlák

Čestně prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně. Veškerá literatura, ze které jsem čerpal, je uvedena v oddílu Seznam literatury.

V Hradci Králové, 11. května 2009.

Petr Sedlák

.....

Abstrakt:

Název diplomové práce: Deriváty pyrazinu jako potenciální léčiva I.

V diplomové práci byla provedena rešerše se zaměřením na současnou léčbu tuberkulózy a nejnovější trendy v terapii. Bylo syntetizováno sedm dosud nepopsaných látek charakteru substituovaných pyrazinhydrazidů. Produkty byly charakterizovány teplotou tání, TLC, IČ, ^1H , popř. ^{13}C NMR spektry. Série byla podrobena *in vitro* biologickému hodnocení. Byly vypočteny hodnoty $\log P$ a $\text{Clog } P$ připravených látek. Tyto hodnoty byly uvedeny do vztahu se strukturou připravených látek.

Abstract:

Title of diploma thesis: Pyrazine derivatives as potential drugs I.

Review of tuberculosis therapy and modern research were presented in this diploma thesis. Novel pyrazine derivatives connected via CO-NH-NH- bridge with substituted phenyl derivatives were synthesized. Novel structures were characterized by melting points, TLC, IR, ^1H and ^{13}C NMR. This set was put through *in vitro* biological evaluation. $\log P$ and $\text{Clog } P$ were also calculated and were compared with novel synthesized structures.

Seznam zkratek

ATP – adenosintrifosfát

DNA – deoxyribonukleová kyselina

EMB – etambutol

IČ – infračervené absorpční spektrum

INH - isoniazid

HIV – virus lidské imunitní nedostatečnosti

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

M. – Mycobacterium

M.h. – molekulová hmotnost

MIC – minimální inhibiční koncentrace

NMR – nukleární magnetická rezonance

POA – pyrazinkarboxylová kyselina

PZA - pyrazinamid

RNA – ribonukleová kyselina

RIF - rifampicin

Rf – retenční faktor

RPMI - Roswell Park Memorial Institute medium

SM – streptomycin

TAACF - The Tuberculosis Antimicrobial Acquisition and Coordinating Facility

TB – tuberkulóza

TLC – tenkovrstvá chromatografie

T.t. – teplota tání

UV – ultrafialové absorpční spektrum

WHO – Světová zdravotnická organizace

1	Úvod.....	2
1.1	Problematika tuberkulózy	2
1.2	Mykobakteria	2
1.3	Antituberkulotika	3
1.4	Terapie tuberkulózy.....	5
1.5	Nové látky s antituberkulotickým účinkem.....	6
2	Cíl diplomové práce	9
3	Mechanismus účinku pyrazinamidu a jeho derivátů	11
4	Mechanismus účinku isoniazidu	12
5	Dělicí metody	13
5.1	Flash chromatografie.....	13
5.2	Optimalizace separace.....	14
5.3	Běžně užívaná rozpouštědla	15
5.4	Analýza separace.....	16
6	Experimentální část	17
6.1	Přístroje a chemikálie	17
6.2	Výchozí struktury	18
6.3	Obecný postup přípravy	19
6.4	Schéma reakce.....	19
6.5	Nově připravené látky	20
6.5.1	<i>N'</i> -(2,4-dinitrofenyl)pyrazin-2-karbohydrazid.....	20
6.5.2	<i>N'</i> -(2-chlorfenyl)pyrazin-2-karbohydrazid.....	21
6.5.3	<i>N'</i> -(4-chlorfenyl)pyrazin-2-karbohydrazid	22
6.5.4	<i>N'</i> -(2-nitrofenyl)pyrazin-2-karbohydrazid.....	23
6.5.5	<i>N'</i> -(2,4-dinitrofenyl)-3-aminopyrazin-2-karbohydrazid	24
6.5.6	<i>N'</i> -(2-nitrofenyl)-3-aminopyrazin-2-karbohydrazid	25
6.5.7	5- <i>terc</i> -butyl- <i>N'</i> -(2-nitrofenyl)pyrazin-2-karbohydrazid	26
7	Testování aktivity syntetizovaných derivátů	27
7.1	Antimykotická aktivita.....	27
8	Diskuze.....	29
9	Závěr	31
10	Seznam literatury.....	32

1 Úvod

1.1 Problematika tuberkulózy

Tuberkulóza je infekční onemocnění vyvolané *Mycobacterium tuberculosis komplex*. Každý rok onemocní kolem 8 miliónů lidí a 1,5 milionů na toto onemocnění umírá (jiný zdroj uvádí až 1,7 milionů obětí ročně¹). Mezi státy s největším výskytem tohoto onemocnění patří bývalé země bloku SSSR a některé jiné asijské státy. ČR se řadí k zemím, které mají celkem příznivou situaci.²

1.2 Mykobakteria

Do komplexu mykobakterií patří: *M. tuberculosis* – nejčastější původce, *M. bovis*, *M. africanum* a *M. microti*. Pokud přejde do aktivní formy, nemocnění může postihnout jakýkoliv orgán či tkáň, nejčastější je forma plicní.³ V 25 % případů (zahrnuje imuoalterované pacienty a děti) vstoupí bakterie do krve a zasáhne pleuru, meningy, lymfatický systém, urogenitální systém, kosti a klouby. Pacienti s HIV a oslabeným imunitním systémem jsou k infekci ještě více vnímaví.¹

M. tuberculosis je obligátně anaerobní bakterie, která se dělí extrémně pomalou rychlostí. Buněčná stěna zahrnuje peptidoglykany, komplex lipidů a mykolovou kyselinu, které se považují za determinanty virulence.¹

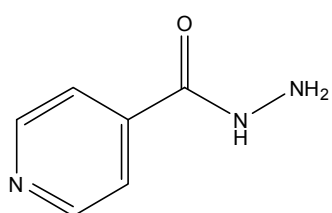
Za rezistentní kmen *M. tuberculosis* se považuje ten kmen, který se liší od úzké distribuce nezměněných kmenů, které nepřišly do styku s příslušnou léčivou látkou (antituberkulotikem)⁴.

Rezistence na TB patří k dlouhodobým problémům, WHO klade mimořádný důraz na rozšiřující rezistenci *M. tuberculosis komplex* na antituberkulotika 1. a 2. řady. Růst rezistence je především důsledkem neadekvátní a nekontrolované léčby.² Non-compliance pacienta vyplývá z ceny léčiva, mnoha vedlejších účinků terapie a dlouhé době potřebné ke kompletnímu vyléčení.¹ Problémem je rovněž globalizace a velká celosvětová migrace obyvatel. Dochází k mnoha genetickým mutacím.²

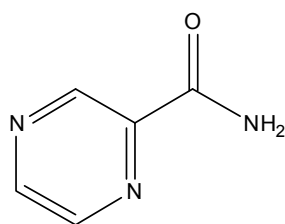
1.3 Antituberkulotika

Mnoho let je pro léčbu k dispozici pouze 5 léčiv 1. řady s antituberkulotickým efektem, čtyři mají bakteriocidní efekt: izoniazid, rifampicin, pyrazinamid, streptomycin. Etambutol vykazuje bakteriostatický účinek. Na rezistentní formy se používají preparáty 2. řady: fluorochinolony, amikacin, kanamycin, kapreomycin. Podstatně méně pak ethionamid, prothionamid, cykloserin a paraaminosalicylová kyselina.³

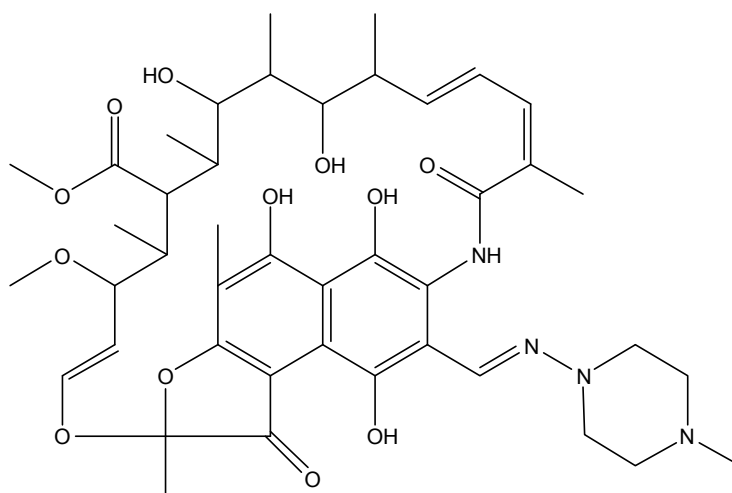
1. řada antituberkulotik



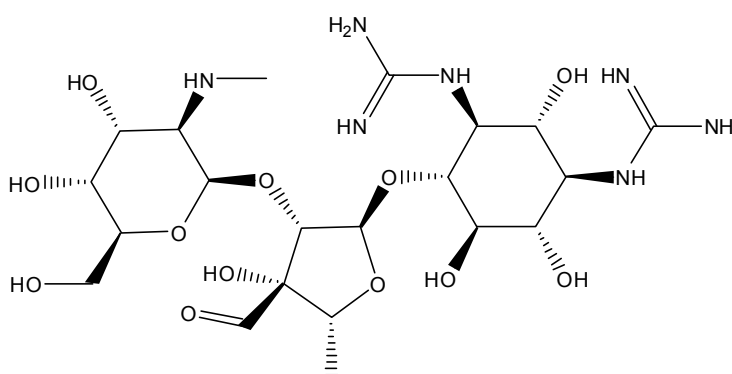
izoniazid



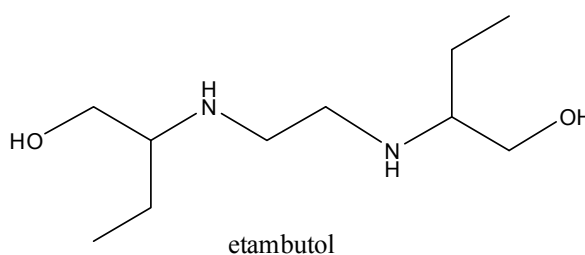
pyrazinamid



rifampicin

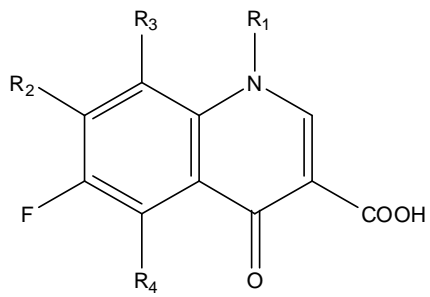


streptomycin

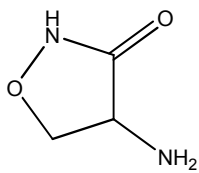


etambutol

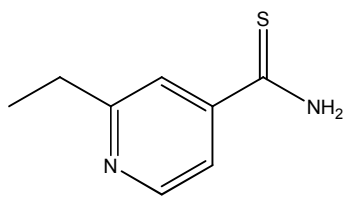
2. řada antituberkulotik



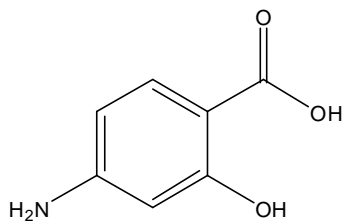
flourochinolon (chinolinového typu)



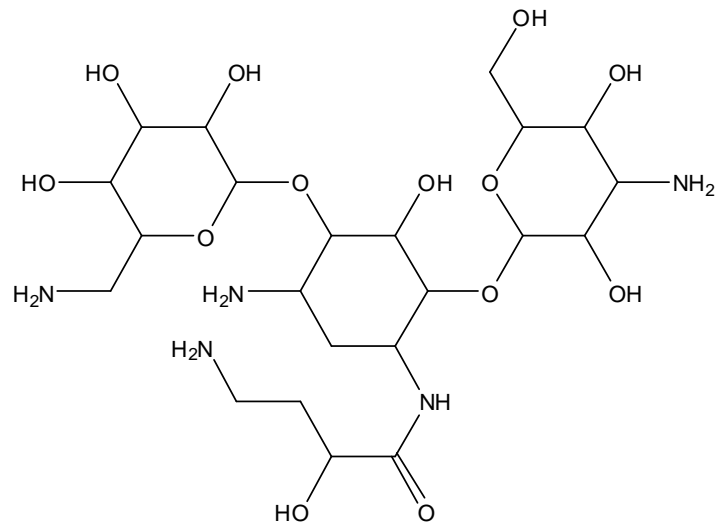
cykloserin



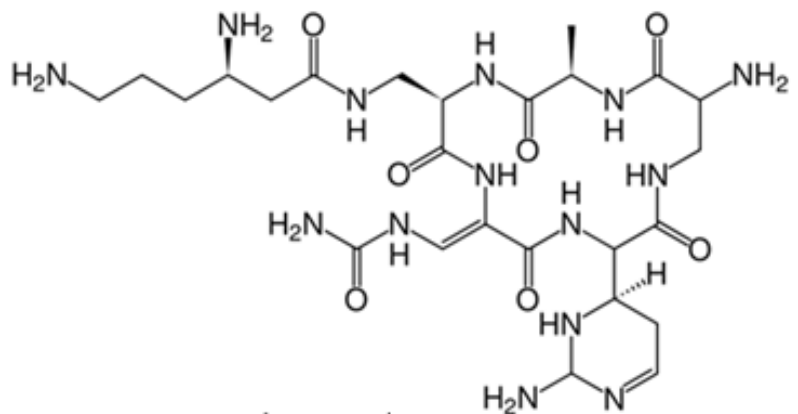
ethionamid



p-aminosalicylová kyselina



amikacin (aminoglykosid)



kapreomycin

1.4 Terapie tuberkulózy

Terapie se zahajuje kombinací čtyř léčiv: isoniazidu (INH), rifampicinu (RIF), pyrazinamidu (PZA) a etambutolu (EMB) nebo streptomycinu (SM). Délka terapie je nejméně 2 měsíce, což vede ke zničení bakterií ve všech stádiích, poté léčba pokračuje isoniazidem a rifampicinem následující 4 měsíce, kde dochází k bakteriocidnímu efektu na zbývající spící bacily a případné mutované formy jsou usmrceny isoniazidem.¹

Pokud se vyskytuje rezistence mykobakterií na některá uváděná léčiva, doporučuje se léčba se sledováním bakteriologické citlivosti na základní i rezervní antituberkulotika.⁵ Přehled uvádí Tabulka 1⁵

Tabulka 1: Terapie tuberkulózy při rezistenci⁵

rezistence na	Iniciální fáze		Pokračující fáze	
	léčiva	min. trvání léčby (měsíce)	léčiva	min. trvání léčby (měsíce)
isoniazid (streptomycin, triacetazon)	1. rifampicin	2-3	1. rifampicin	6
	2. aminoglykosid	2-3	2. etambutol	6
	3. pyrazinamid	2-3		
	4. etambutol	2-3		
isoniazid etambutol (streptomycin)	1. rifampicin	3	1. rifampicin	6
	2. aminoglykosid	3	2. etionamid	6
	3. pyrazinamid	3		
	4. etionamid	3		
isoniazid rifampicin (streptomycin)	1. aminoglykosid	3	1. etionamid	18
	2. etionamid	3	2. ofloxacin	18
	3. pyrazinamid	3	3. etambutol	18
	4. ofloxacin	3		
	5. etambutol	3		
isoniazid rifampicin streptomycin etambutol	1. aminoglykosid	3	1. etionamid	18
	2. etionamid	3	2. ofloxacin	18
	3. pyrazinamid	3	3. cykloserin	18
	4. ofloxacin	3		
	5. cykloserin	3		

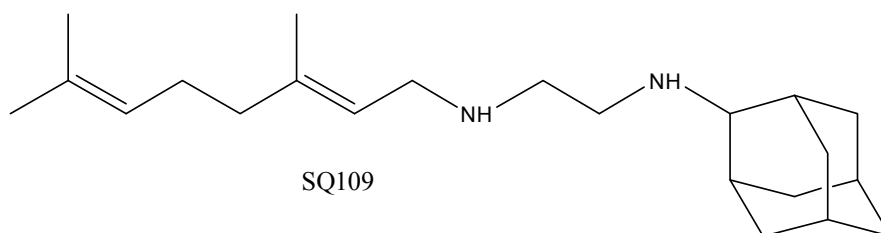
1.5 Nové látky s antituberkulotickým účinkem

Potřeba nových látek z důvodu vzrůstajícího nebezpečí rezistentních kmenů a koinfekce virem HIV vede v poslední době k obnově výzkumu nových antituberkulotických látek. Mnohé z látek s nebývalým mechanismem účinku vstupují do klinického testování. Tyto látky se zdají být mnohem účinnější proti rezistentním kmenům.¹

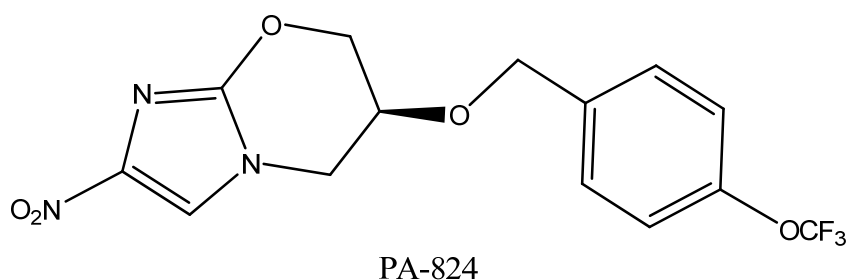
Na rezistentní formy bakterií, na které samotná první řada nemá účinek, užíváme první řadu antituberkulotik v kombinaci s druhou řadou. Široká řada fluorochinolonů inhibuje DNA gyrasu a topoizomerasu IV. Struktura rifampicinu byla modifikována a byly vytvořeny látky rifalazil, rifabutin a rifapentin, které mají delší poločas eliminace a mohou být podávány v delších intervalech, což vede k menším nežádoucím účinkům.¹

Látka **SQ109** (diaminový analog etambutolu) vykazuje aktivitu proti *M. tuberculosis*, zahrnuje také rezistentní kmeny k INH, EMB, RIF. Mechanismus účinku není znám, předpokládá se však účinek na syntézu buněčné stěny a to jiným způsobem než EMB.^{1 6 7}

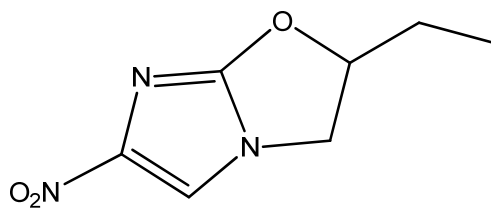
14



PA-824 vychází strukturně z metronidazolu a na rozdíl od své výchozí látky (2-ethyl-6-nitro-2,3-dihydroimidazo[2,1-b]oxazolu) nevykazuje mutagenitu. Je ve stádiu klinického testování a zdá se slibná proti latentní fázi TB. Mechanismus účinku je inhibice lipidové a proteinové syntézy, což znemožňuje syntézu buněčné stěny.^{1 14} Působí zde i role proléčiva, redukce nitroskupiny na imidazooxazinovém jádře má také částečný efekt v mechanismu účinku.⁸

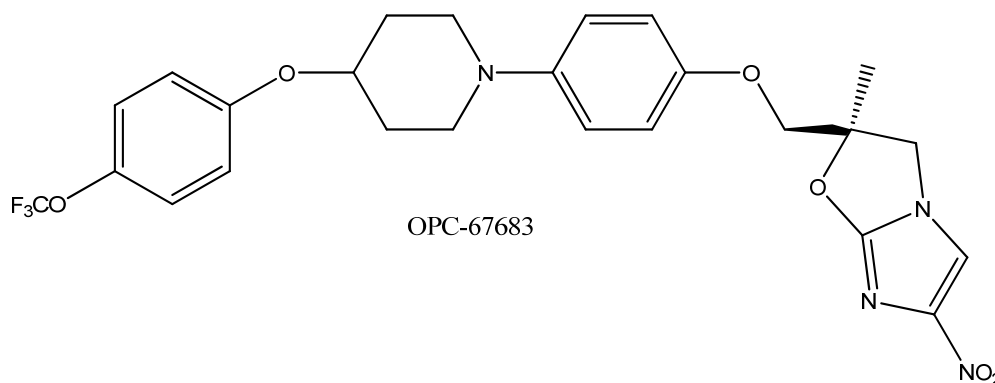


CGI 17341 – látka má základní strukturu podobnou PA-824, základ tvoří dihydroimidazo[2,1-b]oxazol. Vykazuje *in vitro* a *in vivo* aktivitu proti rezistentní *M. tuberculosis*.⁹



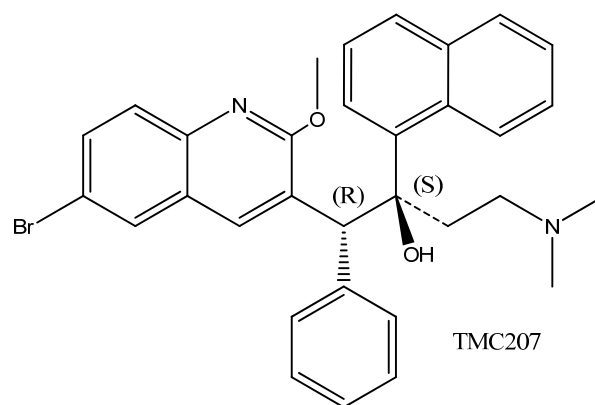
CGI 17341

OPC-67683 vykazuje dobrou aktivitu proti rezistentním kmenům *M. tuberculosis*. Látka by mohla být přínosem pro pacienty trpící koinfekcí HIV/TB. Mechanismem je inhibice syntézy ketomykolové a methoxymykolové kyseliny. Působí tedy podobně jako INH, ale v nižších koncentracích. Jedná se rovněž o proléčivo.¹ Kombinace OPC-67683, RIF a PZA vykazuje zvýšenou eradikační schopnost ve srovnání se standardní kombinací RIF, INH, EBM a PZA.¹⁰

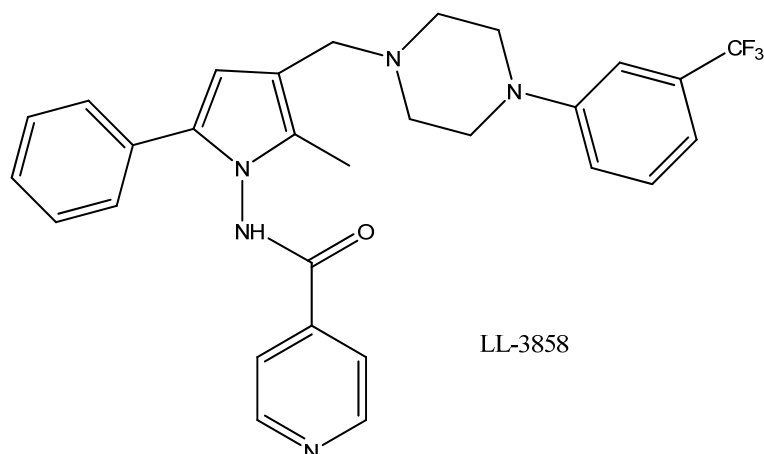


OPC-67683

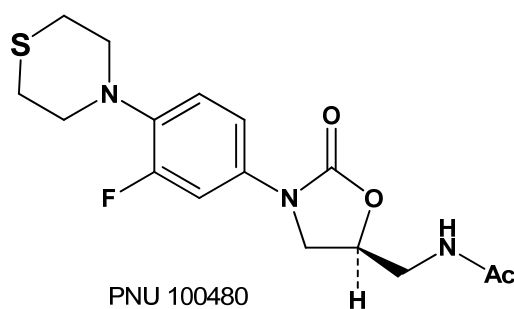
TMC207 se zdá být účinná minimálně srovnatelně, jako kombinace antituberkulotik první řady. Zamýšlí se perorální podání z důvodu dobré absorpce a dlouhého eliminačního poločasů. Předpokládaný mechanismus účinku je inhibice protonové pumpy *M. tuberculosis* ATP synthasy. Na molekulové úrovni změnou konformace ATP synthasy zabraňuje TMC207 protonovému transferu, což blokuje tvorbu ATP.^{1 11}



LL-3858 je analog isoniazidu, je aktivní proti citlivé i senzitivní formě *M. tuberculosis*. Předpokládá se nový mechanismus účinku. Látka je ve fázi klinického testování.¹²

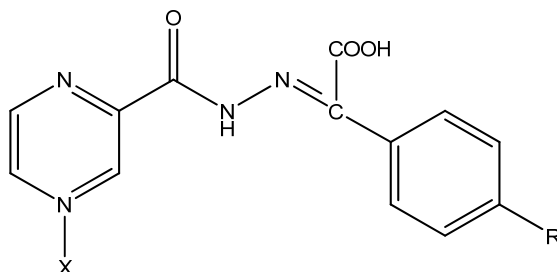


PNU-100480 je látka ze skupiny thiomorfolinů. Vykazuje strukturní podobnost s linezolidem, což je látka aktivní proti rezistentním G- patogenům. Analog PNU-100480 je antimykobakteriálně aktivní.¹³ Inhibuje proteosyntézu navázáním na 50S ribozomální podjednotku.¹⁴



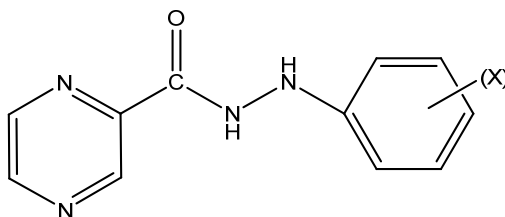
2 Cíl diplomové práce

Látky podobné struktury, jako byly cílem našeho výzkumu, byly popsány v roce 1977. Vycházely ze struktury 2-fenyl-2-(2-(pyrazin-2-karbonyl)hydrazon)octové kyseliny.

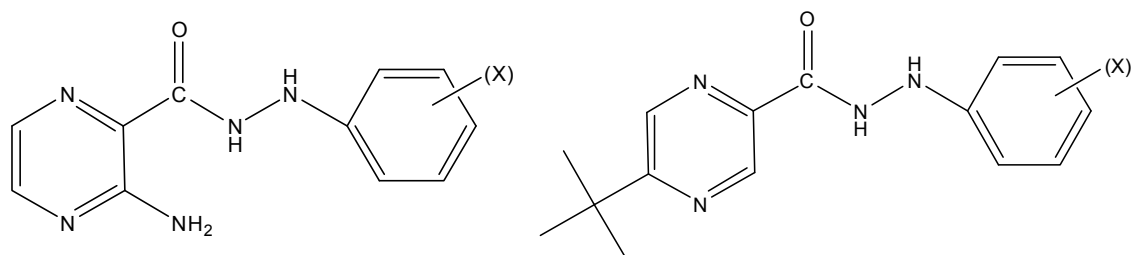


Jedná se o deriváty pyrazinu nebo jeho N-oxidy (X). Fenyl byl substituován skupinami -Cl, -Br, -OCH₃ a -NHCOCH₃. Produkty syntézy měly vysoké teploty tání, nízkou rozpustnost (zejména N-oxidy). Ve výzkumech antibakteriální aktivity *in vitro* provedených s lidským kmenem H₃₇Rv a kmeny saprofytických ATCC 607 prokázaly zkoumané sloučeniny slabou tuberkulostatickou aktivitu.¹⁵

V našem výzkumu jsme uvažovali rovněž o spojení mechanismů účinku dvou dlouho používaných látek, isoniazidu a pyrazinamidu. Diplomová práce Substituované deriváty pyrazinu jako potenciální léčiva I se zabývá deriváty arylhydrazidů resp. pyrazinhydrazidů. Za základní heterocykl jsme použili pyrazin, který je v poloze 2 substituovaný fenyhydrazidovou skupinou.



Pyrazinový kruh je nesubstituovaný, substituovaný v poloze 3 aminoskupinou nebo v poloze 5 *tert*-butylem.



Fenyl je substituovaný v poloze 2 nebo 4 chlórem, v poloze 2 nebo 4 nitroskupinou nebo 2 a 4 dvěma nitroskupinami.

3 Mechanismus účinku pyrazinamidu a jeho derivátů

Kmeny *M. tuberculosis* citlivé k pyrazinamidu hydrolyzují PZA na pyrazinkarboxylovou kyselinu (POA), která má antituberkulotickou aktivitu. Tento mechanismus se využívá i při testování kmenů citlivých na PZA, ale nelze ho použít u kmenů rezistentních na PZA, protože ty PZA nehydrolyzují.¹⁶ Pyrazinamid je efektivní pouze při nízkém extracelulárním pH. Rezistence na PZA často koreluje se ztrátou pyrazinamidasové aktivity vázané genem *pncA*. Některé kmeny mají rovněž efluxní aktivní mechanismy, které snižují intracelulární koncentraci POA, z čehož se zdá, že koncentrace POA je základem toxicity PZA. Mechanismus účinku pyrazinamidu není ještě přesně objasněn. Výzkumy ukazují, že Synthasa mastných kyselin (FAS-I) není pravděpodobně cílem účinku PZA. Předpokládá se, že POA, resp. anion této kyseliny má nespecifikovaný inhibiční efekt na buněčný metabolismus.^{17 18}

Z dalších studií vyplývá, že FAS-I je potenciálně cílem derivátů pyrazinamidu. Sloučenina 5-chlorpyrazinamid inhibuje FAS-I samostatně, kdežto inhibice PZA samostatně se nepotvrdila. Substituované estery pyrazinkarboxylové kyseliny byly také shledány jako dobré inhibitory FAS-I. Obecně se jako nejučinnější deriváty ukázaly látky se substituovanou 5 polohou pyrazinového jádra.¹⁹

Byly testovány některé slabé kyseliny (benzoová, sorbová, propylhydroxybenzoová), u kterých se předpokládalo zvýšení aktivity proti *M. tuberculosis*. Aktivita PZA vykazuje růst s klesajícím pH. Tyto kyseliny v kombinaci s PZA zvyšovaly aktivitu proti jen starším bakteriím *M. tuberculosis*, nově pomnožené bakterie byly imunní. U kyseliny salicylové a mléčné se neprokázala zvýšená aktivita. UV záření, které poškozuje membránu bakterie, zvyšuje rovněž aktivitu PZA.²⁰

4 Mechanismus účinku isoniazidu

Isoniazid byl syntetizován již roku 1912. Jeho antituberkulotická aktivita byla potvrzena až o 40 let později.²¹

Pro mykobakterie je nezbytně nutná kyselina mykolová jako základní stavební jednotka buněčné stěny. Isoniazid působí na mykobakteria baktericidně.²²

Studium mechanismu účinku isoniazidu ukázalo, že katalasou-peroxidasou (KatG) je isoniazid aktivován a oxidován a jeho aktivní reaktanty jsou schopny alkylovat nukleofilní řetězce proteinů.²³ Isoniazid v případě *M. bovis* inhibuje DNA syntézu, následovány inhibicí RNA a kaskádu uzavírá inhibice proteosyntézy.²⁴ V přítomnosti peroxidu vodíku nebo superoxidových radikálů konvertuje KatG INH do radikálové formy, která acyluje nikotinadenin dinukleotid kofaktor a tvoří INH-NAD(P). Tento komplex inhibuje reduktasy potřebné pro prodlužovací fázi a syntézy mykolové kyseliny.²⁵

Některá rezistentní mykobakteria neprodukují katalasu-peroxidasu z důvodu chybění genu KatG, což bývá příčinou rezistence na isoniazid. Tato mutace je však přítomná u minority rezistentních kmenů. Podrobným průzkumem genu enzymu katalasy-peroxidasy byly zjištěny některé jeho mutace, které mají za následek změnu struktury aktivního místa enzymu.²¹

5 Dělicí metody

Destilace, rekrystalizace a extrakce jsou důležité techniky používané při čištění organických látek. Technika, která je však nejčastěji běžně využívána v moderním organickém výzkumu, je preparativní chromatografie. U běžné sloupcové chromatografie je čištěný vzorek nanesen navrch sloupce, který obsahuje pevnou fázi, nejčastěji silikagel. Zbytek sloupce je poté naplněn rozpouštědlem (nebo směsí rozpouštědel), které následně promývají sloupec působením gravitace. Směs látek je rozdělena na sloupci nestejnou rychlostí, jednotlivé frakce jsou odděleně sbírány na konci sloupce. Čas potřebný na tuto metodu je ovšem značný. U flash chromatografie je použit tlak k urychlení toku rozpouštědla, což snižuje dobu potřebnou pro čištění vzorku.²⁶

5.1 Flash chromatografie

Látky získané v syntetické části byly čištěny pomocí flash chromatografie.

Flash chromatografie je rychlá forma sloupcové chromatografie založená na optimalizovaných předplněných sloupcích, do kterých je vháněno rozpouštědlo ve vysokém spádu. Technika byla publikovaná v *Journal of Organic Chemistry* v roce 1978 jako alternativa ke klasickému provedení preparativní sloupcové chromatografie.²⁷

Chromatografie se skládá z plastového sloupce naplněného pevnou fází (silikagel), navrch sloupce je nanesen vzorek, zbytek sloupce je naplněn isokratickým nebo gradientním rozpouštědlem, které s pomocí tlaku umožňuje vzorku se v průběhu průchodu sloupcem rozdělit. V minulosti byl užíván tlak vzduchu, v moderní flash chromatografii dnes užíváme tlakové pumpy, které urychlují separaci. Techniku řadíme k nízko- až středně-tlakovým. Může být upravena pro dělení látek o hmotnosti několika miligramů až ke stovkám gramů.²⁷

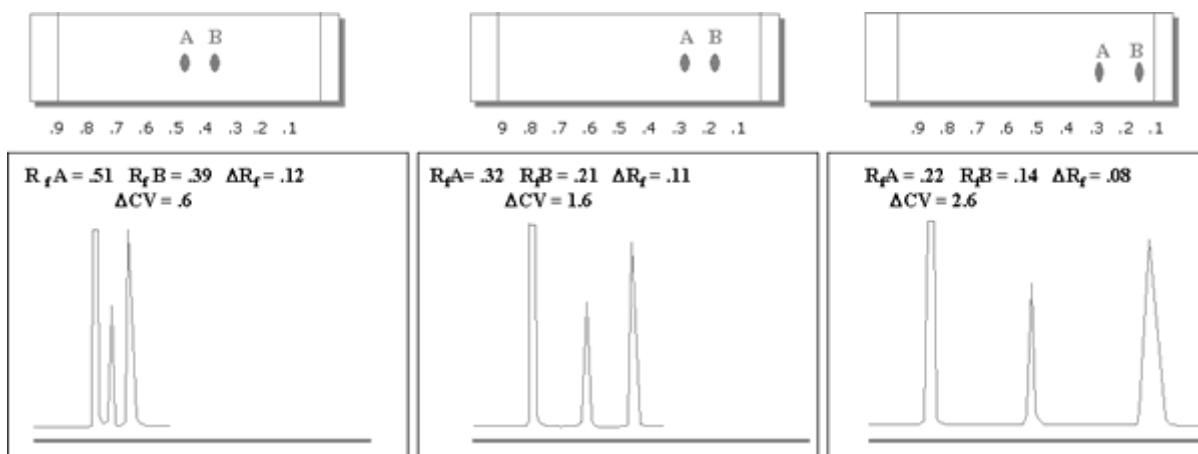
V analytické chromatografii se ke kvantifikaci užívá retenční čas nebo rychlost separace. U flash chromatografie se nejčastěji používá objem sloupce nebo objem užitého rozpouštědla.²⁷

5.2 Optimalizace separace

K předpovědi průběhu flash chromatografie často užíváme TLC (Thin Layer Chromatography). Výhodou je zaměřit se na co nejnižší retenční faktory (R_f) látek, užití slabšího elučního systému (viz. Tabulka 4: Běžně užívaná rozpouštědla ²⁷) výrazně zlepšuje separaci. Optimalizace separace pomocí TLC však nezbytně nevede k optimální flash chromatografii. ²⁷

Využíváme obecný vztah $CV = \frac{1}{R_f}$, kde CV vyjadřuje počet objemů sloupce nutného pro eluci látky ze sloupce nezávislého na rozměrech sloupce, R_f vyjadřuje retenční faktor. Obecně – čím lepší dosáhneme separace, tím větší množství vzorku můžeme rozdělit. Obrázek 1 ²⁷ ukazuje závislost dle obecného vztahu pro určení hmotnosti vzorku, který je možné na základně ΔCV kolonou rozdělit. ²⁷

Obrázek 1 ²⁷



Příklady hodnot CV pro hodnoty R_f uvádí Tabulka 2: Počet objemů sloupce pro eluci ²⁷.

Tabulka 2: Počet objemů sloupce pro eluci ²⁷

R _f	CV
0.90	1.10
0.70	1.40
0.50	2.00
0.30	3.33
0.10	10.00

Tabulka 3: Množství vzorku ve vztahu k CV ²⁷ uvádí množství vzorku, který je možné rozdělit s užitím cartridge o rozměrech 40 × 150 mm.

Tabulka 3: Množství vzorku ve vztahu k CV ²⁷

ΔCV	Množství vzorku
1	250mg - 1g
2	1-2g
6	2-5g

5.3 Běžně užívaná rozpouštědla

Tabulka 4: Běžně užívaná rozpouštědla ²⁷

Rozpouštědlo	Hustota (g/cm ³)	Síla eluce	Skupina rozp.	Teplota varu (°C)	UV signál (nm)	TLV (ppm)
n-hexan	0.66	0.01	1	69	195	100
2,2,4-trimethylpentan	0.69	0.02	1	99	210	300
cyklohexan	0.77	0.03	1	81	200	100
1,1,2-trichlormethan	1.48	0.31	8	61	245	50
toluen	0.87	0.22	7	110	285	100
dichlormethan	1.33	0.30	5	40	232	100
ethylacetát	0.90	0.45	6	77	256	400
methyl-terc-butylether	0.74	0.48	2	55	210	40
aceton	0.79	0.53	6	56	330	750
tetrahydrofuran	0.89	0.35	4	66	212	200
acetonitril	0.78	0.50	6	82	190	40
isopropanol	0.79	0.60	3	82	205	400
ethanol	0.79	0.88	3	78	210	1000
methanol	0.79	0.70	3	65	205	200
voda	1.00	0.073	8	100	180	-1
octová kyselina	1.04	0.073	8	118	210	10

5.4 Analýza separace

Po rozdělení vzorku potvrdíme přítomnost vzorků a čistotu dělení. V našem případě jsme zvolili TLC, je možné použít i HPLC (High Performance Liquid Chromatography). Porovnání metod TLC a HPLC uvádí Tabulka 5: Porovnání TLC a HPLC ²⁷.

Tabulka 5: Porovnání TLC a HPLC ²⁷

	TLC	HPLC
Výhody:	Vzorky k porovnání na jedné desce Dobrá korelace s flash chromatografií Nízké náklady	Vysoké rozlišení Výsledek lehce analyzovatelný
Nevýhody:	Nízké rozlišení	Vzorky se detekují odděleně Relativně drahé Nekoreluje s flash chromatografií

6 Experimentální část

6.1 Přístroje a chemikálie

U použitých chemikálií byly ověřeny fyzikální konstanty. Rozpouštědla byla před použitím vysušena a obvyklým způsobem čištěna.

Průběh reakcí a čistota látek byly sledovány pomocí tenkovrstvé chromatografie na deskách Merck, Silica gel 60 F₂₅₄, za použití vyvíjecí soustavy hexan – ethylacetát (1:1) a toluen – aceton (1:1). Detekce byla prováděna UV světlem o vlnové délce 254 nm.

Látky pro analýzu byly přečištěny krystalizací s aktivním uhlím a za použití flash-chromatografie na přístroji CombiFlash® Rf, Teledyne Isco, Inc. Lincoln, Nebraska, USA.

Teploty tání byly stanoveny v kapiláře na přístroji Stuart Scientific, SMP3, Bibby Sterling LTD, UK a nejsou korigovány.

Elementární analýzy CHN na analyzátoru EA1110CE (Fisons Instruments S.p.A, Milano, Itálie) provedla paní Hronová na KFCHKL.

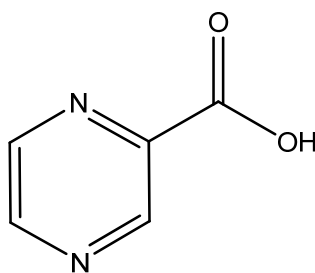
Infračervená spektra byla změřena na přístroji Nicolet Impact 400 na Katedře anorganické a organické chemie p. Ivou Vencovskou.

¹H NMR spektra byla měřena na přístroji Varian Mercury Vx BB300 (299,95 MHz pro ¹H a 75,43 MHz pro ¹³C) Bruker Comp. (Karlsruhe, Německo). Měření provedl doc. PharmDr. J. Kuneš, Csc. z KAOCH Faf UK. Spektra vyhodnotil doc. PharmDr. Martin Doležal, PhD. z KFCHKL. Chemické posuny jsou vztaženy k Si(CH₃)₄.

Log *P* sloučenin byl vypočten programem CS ChemBioOffice Ultra, verze 11.0 (CambridgeSoft, Cambridge, MA, USA)

6.2 Výchozí struktury

- 1) pyrazin-2-karboxylová kyselina (Cat.: P5,610-0, Aldrich)

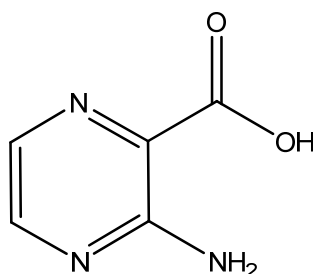


Log P: -0,66

Chemical Formula: C₅H₄N₂O₂

Molecular Weight: 124,10

- 2) 3-aminopyrazin-2-karboxylová kyselina (Cat.: A7,698-2, Aldrich)

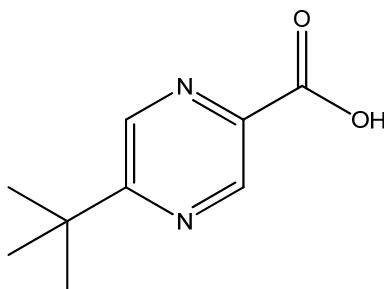


Log P: -0,75

Chemical Formula: C₅H₅N₃O₂

Molecular Weight: 139,11

- 3) 5-*tert*-butylpyrazin-2-karboxylová kyselina²⁸



5-*tert*-butylpyrazin-2-karboxylová kyselina

Log P: 1,47

Chemical Formula: C₉H₁₂N₂O₂

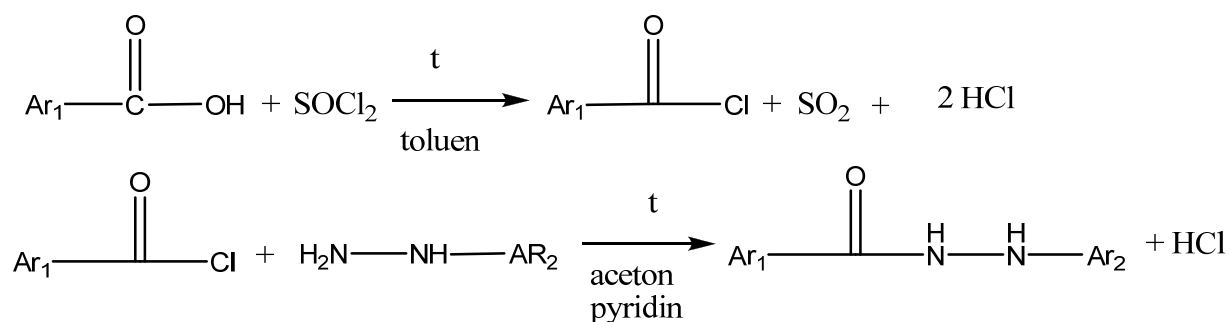
Molecular Weight: 180,20

6.3 Obecný postup přípravy

Výchozí karboxylová kyselina byla rozpuštěna v toluenu (bezvodý), byl přidán pětinašobek chloridu thionylu pro přípravu chloridu karboxylové kyseliny. Reakce probíhala za zvýšené teploty pod zpětným chladičem po dobu cca 1 hod. Toluén byl odpařen do sucha na vakuové odparce, vzniklý chlorid karboxylové kyseliny byl rozpuštěn v acetonu (bezvodý), bylo přidáno několik kapek pyridinu (bezvodý). V acetonu jsem rozpustil rovněž fenyldiazinový derivát a přidal do reakce. Zahřívání jsem k varu pod zpětným chladičem za zvýšené teploty po dobu 1 hod, odpařil aceton do sucha na vakuové odparce. Produkty jsem rozpustil v ethanolu, přidal aktivní uhlí pro odstranění nečistot a krystalizoval ze směsi rozpouštědel (ethanol : voda).

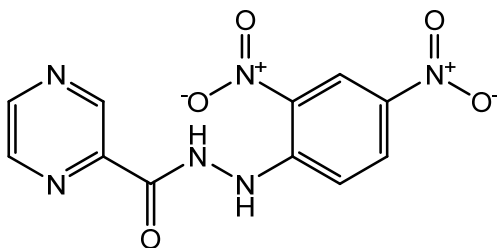
Čištění látek probíhalo rovněž za užití separační metody flash-chromatografie.

6.4 Schéma reakce



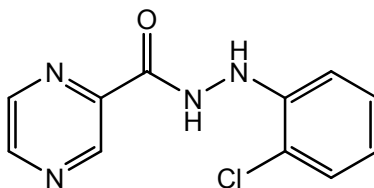
6.5 Nově připravené látky

6.5.1 *N'*-(2,4-dinitrofenyl)pyrazin-2-karbohydrazid



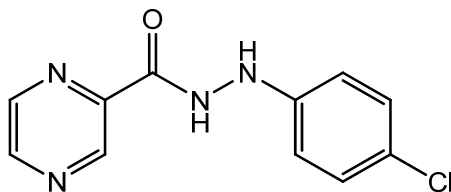
Sumární vzorec	C ₁₁ H ₈ N ₆ O ₅
M.h.	304,22
T _t	149 °C
Elementární analýza	Teor.: C, 43.43; H, 2.65; N, 27.62; O, 26.30 Prakt.: nebylo v době odevzdání práce k dispozici
log <i>P</i>	0,35
Clog <i>P</i>	-0,182357
IČ spektrum (KBr), [cm ⁻¹]	3312 (NH), 3110 (NH), 1616 (C=O), 1500 (fenyl), 1446,1378, 1246, 1130 (pyrazin).
¹ H NMR (300MHz, CDCl ₃)	Nebylo v době odevzdání práce k dispozici
¹³ C NMR (75MHz, CDCl ₃)	Nebylo v době odevzdání práce k dispozici

6.5.2 *N'*-(2-chlorfenyl)pyrazin-2-karbohydrazid



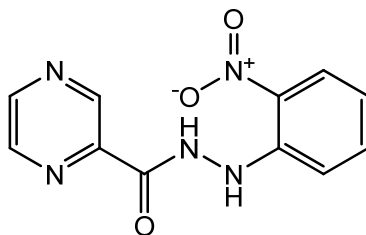
Sumární vzorec	C ₁₁ H ₉ ClN ₄ O
M.h.	248,67
T _t	156 °C
Elementární analýza	Teor.: C, 53.13; H, 3.65; N, 22.53; Prakt.: C, 52.95; H, 3.52; N, 22.33
log <i>P</i>	0,66
Clog <i>P</i>	0,974524
IČ spektrum (KBr), [cm ⁻¹]	3460 (NH), 3096 (NH), 1683 (C=O), 1594 (fenyl), 1487, 1394, 1314, 1260, 1154 (pyrazin)
¹ H NMR (300MHz, CDCl ₃)	9,38 (CH pyr.,d); 8,85 (CH pyr., d); 8,60 (CH pyr. d); 8,0 (NH hydrazid); 7,3-7,1 (4H,m); 6,9 (NH hydrazid).
¹³ C NMR (75MHz, CDCl ₃)	169,6 (C=O); 148,1; 145,6; 144,5; 143,4; 141,2; 129,6; 127,7; 121,7; 113,7.

6.5.3 *N'*-(4-chlorfenyl)pyrazin-2-karbohydrazid



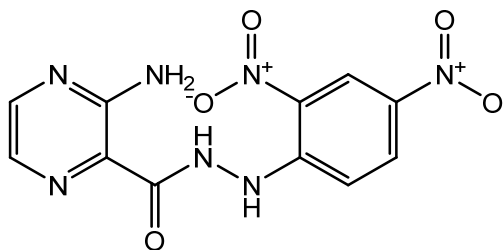
Sumární vzorec	C ₁₁ H ₉ ClN ₄ O
M.h.	248,67
T _t	159 °C
Elementární analýza	Teor.: C, 53.13; H, 3.65; N, 22.53; Prakt.: C, 53.28; H, 4.02; N, 22.53;
log <i>P</i>	0,66
Clog <i>P</i>	0,974524
IČ spektrum (KBr), [cm ⁻¹]	3353 (NH), 3090 (NH), 1695 (C=O), 1530 (fenyl), 1478, 1398, 1275, 1172 (pyrazin)
¹ H NMR (300MHz, CDCl ₃)	10,38 (1H pyr.,d); 9,38 (1H pyr.,d); 8,80 (1H pyr.,d); 8,56 (NH) 8,35 (NH); 7,45 – 7,18 (4H,m)
¹³ C NMR (75MHz, CDCl ₃)	162,8 (C=O); 148,4; 148,1; 147,6; 146,1; 143,3; 129,3; 129,1; 128,1; 114,9

6.5.4 *N'*-(2-nitrofenyl)pyrazin-2-karbohydrazid



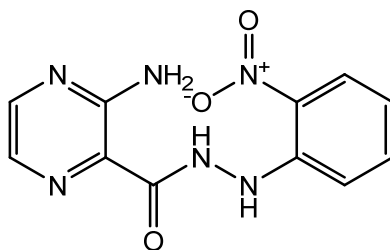
Sumární vzorec	C ₁₁ H ₉ N ₅ O ₃
M.h.	259,22
T _t	159 °C
Elementární analýza	Teor.: C, 50.97; H, 3.50; N, 27.02 Prakt.: nebylo v době odevzdání práce k dispozici
log <i>P</i>	0,39
Clog <i>P</i>	0,0468603
IČ spektrum (KBr), [cm ⁻¹]	Nebylo v době odevzdání práce k dispozici
¹ H NMR (300MHz, CDCl ₃)	Nebylo v době odevzdání práce k dispozici
¹³ C NMR (75MHz, CDCl ₃)	Nebylo v době odevzdání práce k dispozici

6.5.5 *N'*-(2,4-dinitrofenyl)-3-aminopyrazin-2-karbohydrazid



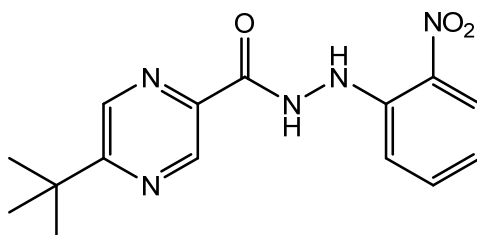
Sumární vzorec	C ₁₁ H ₉ N ₇ O ₅
M.h.	319,23
T _t	110 °C
Elementární analýza	Teor.: C, 41.39; H, 2.84; N, 30.71; O, 25.06 Prakt.: nebylo v době odevzdání práce k dispozici
log <i>P</i>	-0,23
Clog <i>P</i>	0,064267
IČ spektrum (KBr), [cm ⁻¹]	Nebylo v době odevzdání práce k dispozici
¹ H NMR (300MHz, CDCl ₃)	Nebylo v době odevzdání práce k dispozici
¹³ C NMR (75MHz, CDCl ₃)	Nebylo v době odevzdání práce k dispozici

6.5.6 *N'*-(2-nitrofenyl)-3-aminopyrazin-2-karbohydrazid



Sumární vzorec	C ₁₁ H ₁₀ N ₆ O ₃
M.h.	274,24
T _t	191 °C
Elementární analýza	Teor.: C, 48.18; H, 3.68; N, 30.65; O, 17.50 Prakt.: nebylo v době odevzdání práce k dispozici
log <i>P</i>	-0,19
Clog <i>P</i>	0,293484
IČ spektrum (KBr), [cm ⁻¹]	Nebylo v době odevzdání práce k dispozici
¹ H NMR (300MHz, CDCl ₃)	Nebylo v době odevzdání práce k dispozici
¹³ C NMR (75MHz, CDCl ₃)	Nebylo v době odevzdání práce k dispozici

6.5.7 5-*tert*-butyl-*N'*-(2-nitrofenyl)pyrazin-2-karbohydrazid



C ₁₅ H ₁₇ N ₅ O ₃	C ₁₅ H ₁₇ N ₅ O ₃
M.h.	315,33
T _t	168 °C
Elementární analýza	Teor.: C, 57.13; H, 5.43; N, 22.21 Prakt.: C, 57.25; H, 5.75; N, 22.48
log <i>P</i>	2,5
Clog <i>P</i>	1,87286
IČ spektrum (KBr), [cm ⁻¹]	Nebylo v době odevzdání práce k dispozici
¹ H NMR (300MHz, CDCl ₃)	9,22 (1H,pyr, m); 8,85 (1H,pyr, m); 8,21 (NH, m); 7,44 (1H,m); 7,24 (1H,m), 7,08 (1H,m); 6,9 (1H,m); 3,9 (NH); 1,42 (9H,m)
¹³ C NMR (75MHz, CDCl ₃)	162,2 (C=O); 161,8; 144,5; 143,9; 139,8; 136,5; 126,8; 122,6; 119,4; 114,2; 37,6; 29,6, 29,6; 29,6

7 Testování aktivity syntetizovaných derivátů

7.1 Antimykotická aktivita

Připravené deriváty pyrazinu byly testovány *in vitro* na antifungální aktivitu ve Fakultní nemocnici Hradec Králové.

Byl použit mikrodiluční bujónový test.

Použité médium: RPMI 1640 s glutathionem

Délka inkubace 24-48 (u TM 48-72h)

Způsob inkubace: statický, ve tmě, humidní atmosféra

Odečítání: vizuální/fotometrické (OD 540nm), MIC = IC80 (80% inhibice kontroly)

pH/pufř: 7,0 / MOPS (0,165M)

Teplota: 35 °C

Testované kmeny (kód, číslo)

1. **CA1** – *Candida albicans* ATCC 44859
2. **CT** – *Candida tropicalis* 156
3. **CK2** – *Candida krusei* E28
4. **CG** – *Candida glabrata* 20/I
5. **TA** – *Trichosporon asahii* 1188
6. **AF** – *Aspergillus fumigatus* 231
7. **AC** – *Absidia corymbifera* 272
8. **TM** – *Trichophyton mentagrophytes* 445

Tabulka 6: MIC syntetizovaných látek

Kmen (kód)		Testovaná látka – MIC/IC ₈₀ (μmol.l ⁻¹)	
		2	3
CA	24h	62,5	15,62
	48h	62,5	31,25
CT	24h	125	31,25
	48h	125	62,5
CK	24h	15,62	15,62
	48h	15,62	31,25
CG	24h	250	15,62
	48h	250	62,5
TA	24h	125	31,25
	48h	125	62,5
AF	24h	250	500
	48h	>500	>500
AC	24h	62,5	125
	48h	62,5	250
TM	24h	15,62	15,62
	48h	31,25	15,62

U látek, které nejsou v tabulce uvedeny, nejsou dosud k dispozici výsledky testu na antimykotickou aktivitu.

Tabulka7: Hodnoty MIC/IC 80 standardů flukonazolu, ketokonazolu a amfotericinu B

Kmen (kód)		Testovaná látka – MIC/IC ₈₀ (μmol.l ⁻¹)		
		flukonazol	ketokonazol	amfotericin B
CA	24h	0,06	<0,24	0,016
	48h	0,12	<0,24	0,063
CT	24h	0,12	1,95	0,063
	48h	>125	3,91	0,063
CK	24h	3,91	0,98	0,125
	48h	15,62	1,95	0,25
CG	24h	0,98	0,49	0,031
	48h	3,91	1,95	0,125
TA	24h	0,24	<0,24	1
	48h	0,48	<0,24	2
AF	24h	>125	7,81	0,25
	48h	>125	7,81	0,125
AC	24h	>125	31,25	1
	48h	>125	31,25	2
TM	24h	1,95	0,98	1
	48h	3,91	1,95	1

8 Diskuze

Ve své diplomové práci jsem se zaměřil na syntézu derivátů pyrazinu, resp. pyrazinhydrazidů. Na katedře Farmaceutické chemie a kontroly léčiv probíhá v současnosti výzkum dalších derivátů pyrazinu.

Celkem bylo připraveno 7 látek, které lze rozdělit do 3 skupin:

1. deriváty pyrazin-2-karboxylové kyseliny
2. deriváty 3-aminopyrazin-2-karboxylové kyseliny
3. deriváty 5-*terc*-butylpyrazinkarboxylové kyseliny

Látky byly připraveny z chloridu pyrazinkarboxylové kyseliny reakcí s příslušnými hydraziny. Syntéza probíhala ve 2 stupních:

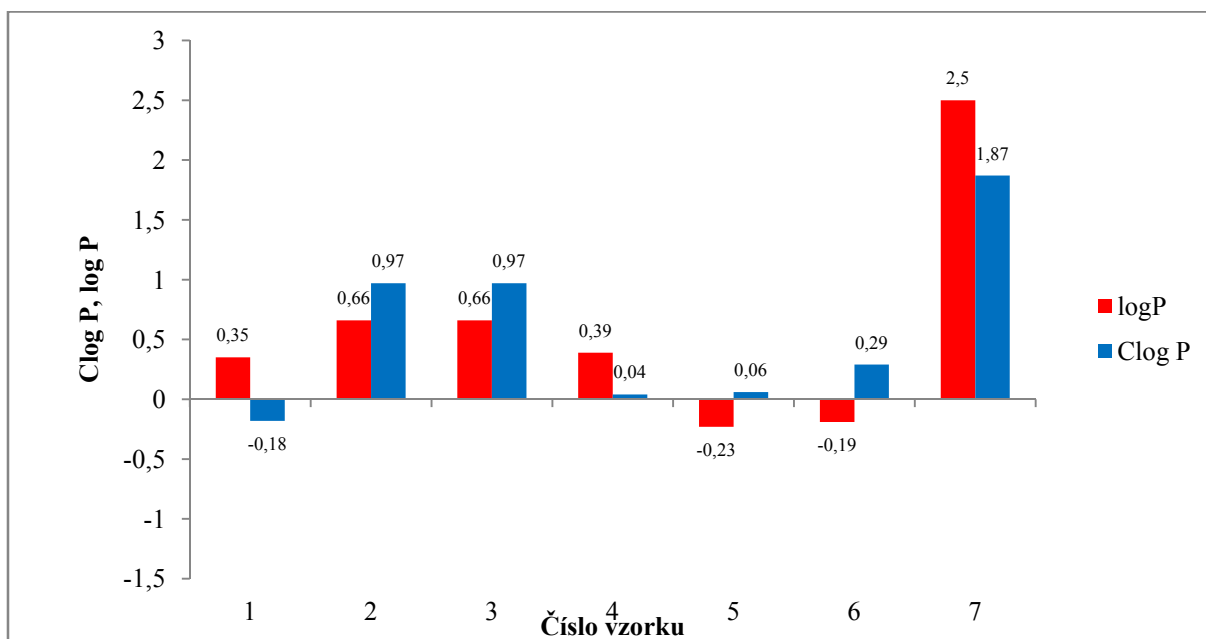
1. příprava chloridu pyrazinkarboxylové kyseliny v bezvodém toluenu
2. vlastní syntéza hydrazidu v bezvodém acetonu

Syntetizované deriváty byly charakterizovány pomocí teploty tání, TLC, IČ spektry, ^1H NMR spektry. Čištění látek bylo prováděno krystalizací ze směsi ethanol/voda nebo za použití flash-chromatografie.

Dále byly určeny hodnoty $\text{Clog } P$ a $\log P$ pomocí programu CS ChemOffice Ultra verze 11.0 (CambridgeSoft, Cambridge, MA, U.S.A. Hodnota $\text{Clog } P$ je rozdělovací koeficient oktanol/voda, při jehož určení jsou vzaty v potaz možné chemické interakce. Hodnota $\log P$ je rozdělovací koeficient v soustavě *n*-oktanol/voda. Hodnota lipofility je významný parametr pro predikci prostupu nově syntetizovaných látek přes mykobakteriální stěnu.

Optimální hodnoty se u podobných pyrazinových derivátů připravených v minulosti pohybovaly v rozmezí $\log P = 2,0-3,0$.²⁹ Vypočítaná lipofilita se pohybuje v rozmezí $\text{Clog } P -0,18 - 1,87$; $\log P -0,23 - 2,5$. Srovnání lipofilit znázorňuje Graf 1.

Graf 1: Srovnání lipofility připravených látek



Hodnoty lipofilit látek stoupají od nitroderivátů odvozených od 3-aminopyrazin-2-karboxylové kyseliny (látky 5 a 6), přes nitroderiváty (látky 1 a 4) a chlorderiáty (látky 2 a 3) pyrazinkarboxylové kyseliny, až k nitroderivátu odvozeného od 5-*terc*-butylpyrazinkarboxylové kyseliny (látka 7).

Látky byly podrobeny testování na antimykotickou aktivitu, nejvyšší aktivitu *in vitro* vykazovala látka číslo 2 a to proti kmenům CK a TM a látka číslo 3 proti kmenům CA, CK a TM. Syntetizované látky jsou méně účinné než v současnosti používané standardy. U látek, které nejsou v tabulce uvedeny, nejsou dosud známy výsledky antimykotických aktivit.

9 Závěr

V rámci své diplomové práce jsem se zaměřil na následující úkoly:

1. S použitím odborné literatury a internetu jsem zpracoval rešerši zaměřenou na problematiku tuberkulózy, využití léčiv v její současné léčbě a zaměřil jsem se rovněž na nová potenciální léčiva, která by mohla být po ukončení klinických fází testování, uvedena do praxe. Zmíněna byla metoda flash-chromatografie – metoda preparativní sloupcové chromatografie.
2. Praktickou část tvořila příprava substituovaných derivátů pyrazinkarboxylové kyseliny.
3. Připravil jsem tyto v literatuře dosud nepopsané produkty:
 - 1) *N'*-(2,4-dinitrofenyl)pyrazin-2-karbohydrazid
 - 2) *N'*-(2,4-dinitrofenyl)pyrazin-2-karbohydrazid
 - 3) *N'*-(4-chlorofenyl)pyrazin-2-karbohydrazid
 - 4) *N'*-(2-nitrofenyl)pyrazin-2-karbohydrazid
 - 5) *N'*-(2,4-dinitrofenyl)-3-aminopyrazin-2-karbohydrazid
 - 6) *N'*-(2-nitrofenyl)-3-aminopyrazin-2-karbohydrazid
 - 7) 5-*terc*-butyl-*N'*-(2-nitrofenyl)pyrazin-2-karbohydrazid
4. Výše uvedené produkty charakterizuje teplota tání, IČ a ¹H NMR spektrum.
5. Série látek byla podrobena biologickému hodnocení na antimykotickou aktivitu.
6. Sloučeniny 2, 3 a 7 byly odeslány na hodnocení jejich antimykobakteriální aktivity (TAACF).³⁰
7. Byly vypočteny hodnoty log *P* a Clog *P* nově připravených látek, které jsou graficky zpracované.

10 Seznam literatury

- ¹ RIVERS, C.E.; MANCERA, L.R. New Anti-tuberculosis Drugs in Clinical Trials with Novel Mechanism of Action. *Drug Discovery Today*, Dec.2008. Vol 13, No 23/24: 1090-1098.
- ² BÁRTŮ, V. Tuberkulóza a její rezistentní formy. *Interní Med.* 2007; 9(9): 372–373. Dostupný z WWW: <http://www.solen.cz/pdfs/int/2007/09/02.pdf>
- ³ BÁRTŮ, V. Tuberkulóza – infekční choroba v 21. století. *Med. pro praxi* 2008; 5(6): 245–248. Dostupný z WWW: <http://www.solen.cz/pdfs/med/2008/06/03.pdf>
- ⁴ MITCHISON, D.A. Drug Resistance in Tuberculosis. *Eur Respir J.* 2005; 25: 376–379.
- ⁵ RAJECOVÁ, E.; SOLOVIČ, I. Súčasný pohľad na otázky v liečbe tuberkulózy. *Klin. farmakol. farm.* 2003; 1: 25–28.
- ⁶ JIA, L.; TOMASZEWSKI, E.J.; HANRAHAN, C.; COWARD, L.; NOKER, P.; GORMAN, G.; NIKONENKO, B.; PROTOPOPOVA, M. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of SQ109, a New Diamine-based Antitubercular Drug. *British Journal of Pharmacology* (2005) 144: 80–87.
- ⁷ MARIGOT-OUTTANDY, D.; PERRONNE, C. Les nouveaux antituberculeux. 2009. *Modele + REAURG* 2733: 1-9.
- ⁸ SINGH, R.; MANJUNATHA, U.; BOSHOFF, H.; HA H.Y.; NIYOMRATTANAKIT, P.; LEDWIDGE, R.; DOWD, C.S.; LEE, I.Y.; KIM, P.; ZHANG, L.; KANG, S.; KELLER, T.H. JIRICEK, J.; BARRY, C.F. PA-824 Kills Nonreplicating Mycobacterium tuberculosis by Intracellular NO Release. *Science* 28. Nov 2008: Vol. 322. no. 5906: 1392 – 139.
- ⁹ ASHTEKAR, D.R.; COSTA-PERIRA, R.; VISHVANATHAN, N.N.; BHATT, D.A.; RIFTLEL, W. In Vitro and in Vivo Activities of the Nitroimidazole CGI 17341 against M.tuberculosis. *Antimicrob. Agents and Chemoter.* Feb 1993: 183-186.
- ¹⁰ MATSUMOTO, M.; HASHIZUME, H.; TOMISHIGE, T.; KAWASAKI, M.; TSUBOUCHI, H.; SASAKI, H.; SHIMOKAWA, Y.; KOMATSU, M. OPC-67683, a Nitro-Dihydro-Imidazooxazole Derivative with Promising Action against Tuberculosis In Vitro and In Mice. *Issue of PLoS Medicine.* Nov. 2006: 2131-44.
- ¹¹ DE SOUZA, V.N.; PAIS, C.K.; KAISER, C.R.; PERALTA, M.A.; FERREIRA, M.L.; LOURENÇO, M.C.S. Synthesis and in vitro antitubercular activity of a series of quinoline derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 2009. Vol 17: 1474–1480.
- ¹² GUTIERREZ-LUGO, M.T.; BEWLEY, C.A. Natural Products, Small Molecules, and Genetics in Tuberculosis Drug Development. *J.Med.Chem.*2008, 51: 2606-2612.
- ¹³ DIXIT, P.P.; PATIL, V.J.; NAIR, P.S.; JAIN, S.; SINHA, N.; ARORA, S.K. Synthesis of 1-[3-(4-benzotriazol-1/2-yl-3-fluorophenyl)-2-oxo-oxazolidin-5-ylmethyl]-3-substituted-thiourea derivatives as antituberculosis agents. *European J. of Med. Chem.* 41. 2006: 423–428.

-
- ¹⁴ ZHANG, Y.; POST-MARTENS, K.; DENKIN, S. New drug candidates and therapeutic targets for tuberculosis therapy. *DDT*. Jan. 2006.. Vol. 11, No 1/2: 21-27.
- ¹⁵ FOKS, H.; JANOWIEC, M. Kondensacja pirazinohydrazynu i jego 4-N-tlenku z kwasami fenyloglioksalowymi. *Acta Polon. Pharm.* 1977. XXXIV, Nr.6: 679-680.
- ¹⁶ SALFINGER, M.; HEIFETS, L.B. Determination of Pyrazinamide MICs for *M.tuberculosis* at Different PH by Radiometric Method. *Antimic.Agents and Chemoth.* 1988, Vol 32. No7: 1002-1004.
- ¹⁷ BOSHOFF, H.I; MIZRAHI, V.; BARRY E.C. Effects of Pyrazinamide on Fatty Acid Synthesis by Whole Mycobacterial Cells and Purified Fatty Acid Synthase I. *Journal of Bacteriol.*, Apr. 2002, 2167–2172.
- ¹⁸ SHEEN, P.; FERRER, P.; GILMAN, R.H.; LÓPEZ-LLANO, J.; FUENTES P.; VALENCIA, E.; ZIMIC, M.J. Effect of pyrazinamidase activity on pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*. 2009. Vol.89: 109–113.
- ¹⁹ NGO, S.C; ZIMHONY, O; CHUNG, W.J.; SAYAHI, H; JACOBS, .R; WELCH, J.T; Inhibition of Isolated *Mycobacterium tuberculosis* Fatty Acid Synthase I by Pyrazinamide Analogs. *Antimicrob. Ag. and Chemother.*, July 2007: 2430–2435.
- ²⁰ WADE, M.M.; ZHANG, Y. Effects of weak acids, UV and proton motive force inhibitors on pyrazinamide activity against *Mycobacterium tuberculosis* in vitro. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2006. 58: 936–941.
- ²¹ HEYM, B.; COLE, T.S. Multidrug resistance in *M.tuberculosis*. *Int. J. of Antimicrob. Agents*. 1997. Vol. 8: 61-70.
- ²² LÜLLMANN, H.; MOHR, K.; WEHLING, M. Farmakologie a toxikologie. Grada Publ. Praha 2004.
- ²³ JOHNSON, K.; KING, D.S.; SCHULTZ, P.G. Studies of Mechanism of Action of Isoniazid and Ethionamide in the Chemotherapy of Tuberculosis . *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, 117: 5009-5010.
- ²⁴ MCCLATCHY, J.K. Mechanism of Action of Isoniazid on *Mycobacterium bovis* Strain BCG. *Infeccion and Immunity*. Apr. 1971: 530-534.
- ²⁵ Zhao, X.; Yu, S.; Magliozzo, R.S. Characterization of the Binding of Isoniazid and Analogues to *Mycobacterium tuberculosis* Catalase-Peroxidase. *Biochemistry* 2007, 46: 3161-3170.
- ²⁶ STILL, W.C; KAHN,M.; MITRA, A. *J. Org. Chem.* 1978, 43: 2923-2925.
- ²⁷ SMI-LabHut Ltd UK, What is Flash Chromatography? [online]. 2009- [cit. 2009-01-31]. Dostupný z WWW: <http://www.labhut.com/education/flash/index.php> .

²⁸ DOLEŽAL, M.; HARTL, J.; MILETÍN, M.; MACHÁČEK, M.; KRÁLOVÁ, K. Synthesis and photosynthesis-inhibiting activity of some anilides of substituted pyrazine-2-carboxylic acids. *Chem. Pap.* 1999. 53 (2): 126-130.

²⁹ HARTL, J.; KRINKOVÁ, J.; ODLEROVÁ, Ž. Synthesis and antimycobacterial evaluation of pyrazinecarboxylic acid derivatives. *Folia Pharm. Univ. Carol.*, 1998, vol. 23, no. 1: 51–58.

³⁰ The Tuberculosis Antimicrobial Acquisition and Coordinating Facility. Dostupný z WWW: <http://www.taacf.org/> .