

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra anorganické a organické chemie

**SYNTÉZA DERIVÁTŮ IMIDAZOLU S POTENCIÁLNÍ
ANTIMYKOBAKTERIÁLNÍ AKTIVITOU**

Diplomová práce

2011

AUTOR: Daniel Cvejn

ŠKOLITEL: Doc. RNDr. Věra Klimešová, CSc.

ŠKOLITEL SPECIALISTA: Doc. Ing. Filip Bureš, Ph.D.

Charles University in Prague
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of Inorganic and Organic Chemistry

**SYNTHESIS OF IMIDAZOLE DERIVATIVES WITH POTENTIAL
ANTIMYCOBACTERIAL ACTIVITY**

Thesis

2011

AUTHOR: Daniel Cvejn

SUPERVISOR: Doc. RNDr. Věra Klimešová, CSc.

SUPERVISOR SPECIALIST: Doc. Ing. Filip Bureš, Ph.D.

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové dne 6. 5. 2011

Daniel Cvejn

Děkuji doc. Ing. Filipu Burešovi, PhD. za trpělivé a obětavé vedení experimentální části této diplomové práce.

Děkuji doc. RNDr. Věře Klimešové, CSc. za vedení celé diplomové práce a zásadní pomoc především s její biologickou částí.

Děkuji svým kolegům Ing. Jiřímu Tydlitátovi, Parmeshwarovi Solanke, MSc. a Pravinkumarovi Mohite, MSc. za vytvoření příjemného pracovního prostředí a za četné užitečné rady ohledně praktického provedení chemické syntézy.

ABSTRAKT

V rámci této práce byly na základě literární rešerše vytipovány sloučeniny na bázi chirálních 1-[2-(4-nitrofenyl)-1*H*-imidazol-4(5)-yl]alkanaminů synteticky odvozených od opticky čistých biogenních α -aminokyselin s chráněnou i odchráněnou aminoskupinou jako látky s potenciální antimykobakteriální aktivitou. Některé vytipované deriváty byly syntetizovány a byla jim měřena minimální inhibiční koncentrace pro čtyři kmeny bakterií rodu *Mycobacterium*. Aktivita byla porovnávána s nenitrovanými analogickými 1-[2-fenyl-1*H*-imidazol-4(5)-yl]alkanaminy a z experimentálních dat jsou vyvozeny vztahy struktura účinek.

Klíčová slova: imidazol, aminy, antimykobakteriální aktivita, *Mycobacterium* spp.

ABSTRACT

New substances with potential antimycobacterial activity were predicted on the basis of literature research. The substance library includes 1-[2-(4-nitrophenyl)-1*H*-imidazol-4(5)-yl]alkanamines with or without CBz (benzyloxycarbonyl) protected alifatic amino group. Some of predicted derivatives were synthesized and minimal inhibition concentration (MIC) were then measured for four strains of *Mycobacteria*. Activity of predicted effective substances were compared with measured activity of the 1-[2-phenyl-1*H*-imidazol-4(5)-yl]alkanamines which do not possess nitro group. Structure activity relationships were also discussed.

Keywords: imidazole, amines, antimycobacterial activity, *Mycobacterium* spp.

1 Obsah

1	Obsah	6
2	Seznam zkratek	8
3	Zadání diplomové práce	10
4	Úvod	11
5	Teoretická část	13
5.1	Výběr připravovaných látek	13
5.2	Možnosti syntézy 2-fenylimidazolového skeletu	18
5.2.1	Cyklizační reakce vedoucí k 2-fenylimidazolům	18
5.2.1.1	Syntéza 2-fenylimidazolinů	18
5.2.1.2	Převod 2-fenylimidazolinů na 2-fenylimidazoly	19
5.2.1.3	Přímé cyklizace imidazolového kruhu	20
5.2.2	Arylace imidazolu do polohy 2	21
5.3	Výběr reakčního schématu.....	23
6	Experimentální část.....	25
6.1	Chemická syntéza.....	25
6.1.1	Příprava 4-nitrobenzamidin-hydrochloridu (6) ⁵¹	25
6.1.2	Příprava <i>N</i> -benzyloxykarbonylaminokyselin ⁵¹	26
6.1.3	Příprava benzyl(3-diazo-2-oxopropyl)karbamátů ⁵¹	30
6.1.3.1	Příprava <i>N</i> -methyl- <i>N</i> -nitrosomočoviny	30
6.1.3.2	Příprava etherového roztoku diazomethanu	30
6.1.3.3	Vlastní příprava diazoketonů ⁵²	31
6.1.4	Příprava bromketonů ⁵²	35
6.1.5	Příprava benzyl {1-[2-(4-nitrofenyl)-1H-imidazol-5-yl]}karbamátů ²⁴	38
6.1.6	Pokusy o přípravu 1-[2-(4-nitrofenyl)-1H-imidazol-5-yl]alkylaminů (8).....	42
6.1.6.1	Deprotekce hydrogenolýzou ²⁴	42
6.1.6.2	Deprotekce systémem HBr/CH ₃ COOH	43
6.1.6.3	Deprotekce pomocí kyseliny trifluoroctové	43

6.1.6.4	Deprotekce etherátem fluoridu boritého za přítomnosti <i>terc</i> -butylthiolu.....	43
6.1.6.5	Deprotekce hydroxidem barnatým	43
6.1.6.6	Deprotekce <i>in situ</i> generovaným trimethylsilyljodidem'	44
6.2	Identifikace a fyzikální vlastnosti syntetizovaných látek.....	45
6.2.1	Hmotnostní spektrometrie.....	45
6.2.2	¹ H- a ¹³ C-NMR spektroskopie	45
6.2.3	Elementární analýza	45
6.2.4	Infračervená spektroskopie.....	45
6.2.5	Měření optické otáčivosti.....	46
6.3	Mikrobiologická část	47
6.4	Výsledky testování antimykobakteriální aktivity.....	48
7	Diskuse	49
7.1	Diskuse chemické syntézy cílových látek	49
7.1.1	Syntéza α -bromketonů.....	49
7.1.2	Syntéza 4-nitrobenzamidin-hydrochloridu (6)	49
7.1.3	Kondenzace za vzniku látek 7a - 7g	49
7.1.4	Deprotekce	50
7.2	Diskuse výsledků testování	51
8	Závěr.....	52
9	Literatura.....	54

2 Seznam zkratek

^{13}C -NMR – Nukleární magnetická rezonance jader ^{13}C

^1H -NMR – Nukleární magnetická rezonance jader ^1H

Ac – Acetyl

AIDS – Syndrom získaného selhání imunity (Acquired Immune Deficiency Syndrome)

BM 212 – 1,5-Bis(4-chlorfenyl)-2-methyl-3-(4-methylpiperazin-1-yl)methylpyrrol

brs – V NMR spektrech široký singlet (brought singlet)

Bz – Benzyl

CBz – Benzyloxykarbonyl

CGI 17341 - 2-Ethyl-6-nitro-2,3-dihydroimidazo[2,1-*b*][1,3]oxazol

d – V NMR spekterch dublet

d_6 -DMSO – Plně deuterovaný dimethylsulfoxid

DMF – Dimethylformamid

Et – Ethyl

Et_2O – Diethylether

EtOAc – Ethylacetát

GC/MS – Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí

IBX - 1-Hydroxy-1 λ^3 -2-benziodoxol-3(1*H*)-on-1-oxid

INH – Isoniazid

IR – Spektrum v infračervené oblasti

m – V NMR spektrech multiplet

m/z – V GC/MS spektrech poměr hmotnosti a náboje

M^+ - V GC/MS spektrech jednou kladně nabitý molekulový ion

MDR-TB – Resistentní kmeny *M. tuberculosis* (Multidrug resistant *M. tuberculosis*)

Me - Methyl

MIC – Minimální inhibiční koncentrace

NXS – *N*-halogensukcinimid

OPC-67683 – (2*R*)-2-Methyl-6-nitro-2-[4-{4-[4-(trifluoromethoxy)fenoxypiperidin-1-yl]fenoxymethyl]-2,3-dihydroimidazo[2,1-*b*][1,3]oxazol

PA-824 – (6*S*)-2-Nitro-6-{{4-(trifluoromethoxy)benzyl}oxy}-6,7-dihydro-5*H*-imidazo[2,1-*b*][1,3]oxazin

Ph – fenyl

R_F – U TLC retenční faktor

s – V NMR spektrech singlet

S_{RN1} – Substituce radikálová nukleofilní monomolekulární

t – V NMR spektrech triplet

t. t. – Teplota tání

TEA – Triethylamin

THF – Tetrahydrofuran

TLC – Tenkovrstvá chromatografie (thin-layer chromatography)

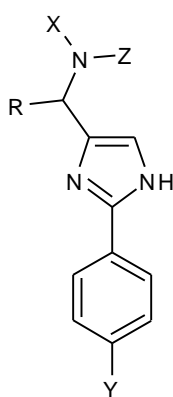
WHO – Světová zdravotnická organizace (World Health Organisation)

XDR-TB - Resistentní kmeny *M. tuberculosis* (extremely/extensively drug resistant *M. tuberculosis*)

3 Zadání diplomové práce

Cílem této práce je obohacení knihovny látek studovaných jako potenciální antimykobakteriální látky. Úkolem bylo syntetizovat deriváty 2-(4-nitrofenyl)imidazolu (**Obrázek 1**) s potenciální antimykobakteriální aktivitou, u připravených látek stanovit minimální inhibiční koncentrace pro různé kmeny *Mycobacterium* spp. a následně porovnat účinnost těchto derivátů s dříve syntetizovanými nenitrovanými 2-fenylimidazolovými deriváty a vyvodit vztahy struktura účinek u zmiňovaných imidazolových derivátů.

Obrázek 1 Obecná struktura studovaných derivátů



R = (S) CH₃, (R) CH₃, (S) CH(CH₃)CH₃, (S) CH₂CH(CH₃)CH₃, (S) CH(CH₃)CH₂CH₃,
(S) CH₂Ph

X = H nebo X+R = CH₂CH₂CH₂

Y = H, NO₂

Z = H, COOCH₂Ph

4 Úvod

Přes značné úspěchy, jichž bylo ve 20. století našeho letopočtu dosaženo v boji proti tuberkulóze, je tato nemoc stále spolu s dalšími mykobakteriálními infekcemi pro medicínu spíše rostoucím problémem. Uvádí se, že až jedna třetina světové populace je infikována bakterií *Mycobacterium tuberculosis*.¹

Zastoupení mykobakteriálních infekcí v populaci stoupá jednak kvůli zvýšené mobilitě lidí, a tím i mobilitě endemických kmenů, jednak kvůli stále vyššímu podílu imunokompromitovaných lidí ve světové populaci (AIDS, pacienti po transplantacích, s leukemiemi) a rovněž kvůli vysokému potenciálu těchto bakterií, pokud jde o vznik resistance. Riziko vzniku resistance zvyšují relativně dlouhé doby terapie (typicky 6 - 9 měsíců), které umožňují selekci rezistentních kmenů.^{1,2}

I přes přijatá strategická opatření (zavedení léčebných režimů skládajících se z kombinací léčiv) těchto rezistentních kmenů přibývá. Odborná veřejnost již delší dobu zná kmeny zkracované MDR-TB (multi-drug resistant *Mycobacterium tuberculosis*). Jedná se o kmeny rezistentní současně na isoniazid a rifampicin, tj. na dvě nejpoužívanější antituberkulotia. Od roku 2006 Světová zdravotnická organizace (WHO) zavedla nový termín XDR-TB³ (extremely/extensively drug resistant *Mycobacterium tuberculosis*) pro kmeny MDR-TB, jež jsou navíc rezistentní proti fluorochinolonům a alespoň proti jednomu léčivu z tzv. druhé linie injekčních antituberkulotik. To všechno jsou důvody, proč je potřeba vyvíjet další látky s antimykobakteriální aktivitou a zavádět nové struktury do terapie, u nichž, pokud by se staly léčivými látkami, se sníží pravděpodobnost zkřížené resistance s látkami používanými v současnosti.^{3,4,5}

Jedním z možných strukturních motivů, které jsou v současné době používány v designu antituberkulotických látek, jsou pětičlenné, elektronově bohaté, heterocykly obsahující dusíky, takzvané azoly. Látky s azolovým motivem jsou v dnešní době v terapii používány jako antimykotika, např. flukonazol, itrakonazol, clotrimazol, ekonazol nebo ketokonazol. Důležitou roli v antimikrobiální terapii mají i nitroimidazolová antibiotika v čele s metronidazolem, jež jsou užívána v terapii infekcí způsobených anaerobními bakteriemi nebo parazity.^{6,7}

Mezi tuberkulostatickými látkami první a druhé linie užívanými dnes k terapii většiny mykobakteriálních infekcí nejsou však zmíněné strukturní motivy zastoupeny. Tento fakt skýtá příležitost pro vývoj nových azolových derivátů jakožto struktur, které nejsou příbuzné se strukturami žádných dosud používaných antituberkulotik a mohly by mít jiný mechanismus účinku.

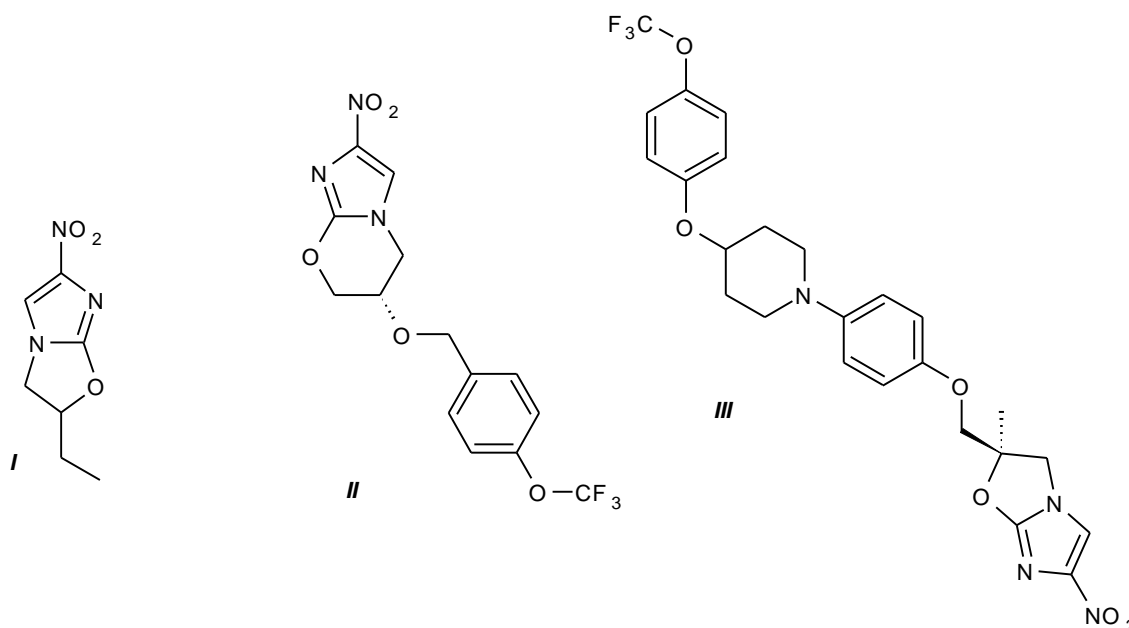
5 Teoretická část

Struktura cílových látek byla vybrána na základě rešerše struktur potenciálních léčiv, které prokazují vysokou účinnost *in vitro* a jsou již dnes ve vyšších fázích klinického testování (viz kapitola 5.1). Z těchto vůdčích struktur (tzv. leads) byl vybrán obecný vzorec cílových látek (**Obrázek 5**) poté, co byla vzata v úvahu jednak jeho aktuální syntetická dostupnost, jednak předchozí výzkumy^{8,9,10} provedené v oblasti antimykobakteriálních látek na příslušných pracovištích v Hradci Králové a v Pardubicích. Po stanovení cílové struktury byla provedena rešerše syntetických možností vedoucích k získání těchto látek. Na konci této rešerše pak bylo stanoveno obecné schéma, podle kterého byly jednotlivé deriváty syntetizovány (**Schéma 8**).

5.1 Výběr připravovaných látek

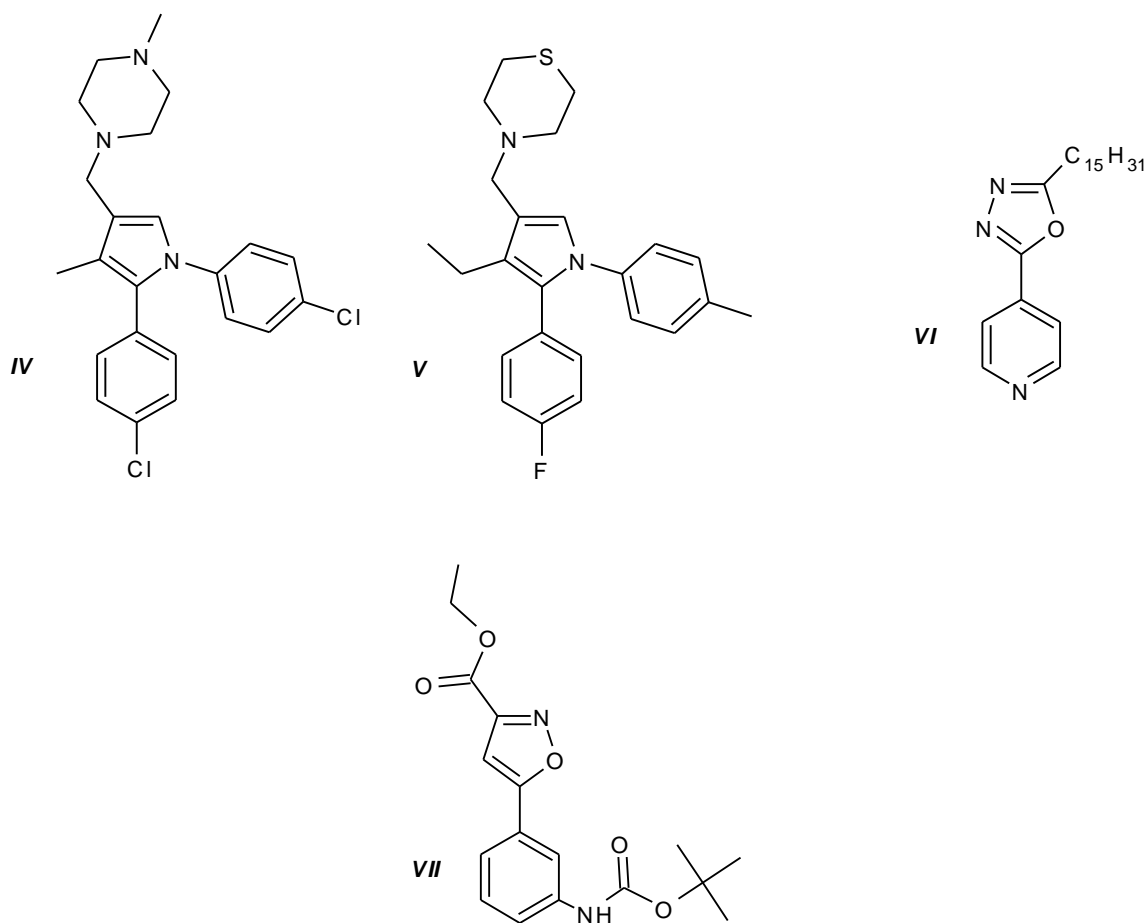
Jako centrální struktura jsou azoly u potenciálních antimykobakteriálních látek používány v posledních dvaceti letech. První azolové látky s potenciálně antituberkulotickou aktivitou měly imidazolový skelet. Jejich struktury jsou odvozené od struktury nitroimidazolových antibiotik, především metronidazolu. První testovanou látkou byla látka CGI 17341 (**Obrázek 2 - I**),¹¹ jejíž podoba se strukturou metronidazolu je zcela evidentní. Vývoj účinných 4-nitroimidazolů s kondenzovaným pěti- nebo šestičlenným cyklem (imidazoxazolanů a imidazoxazinů) dospěl až k látkám PA-824 (**Obrázek 2 - II**) a OPC-67683 (**Obrázek 2 - III**), jež jsou v druhé fázi klinického testování a jeví se jako velmi slibná antituberkulotika s jiným mechanismem než dosud používaná antituberkulotika.^{12,13,14} Patentovány již byly různé strukturní variace těchto látek včetně látek, které v sobě spojují jak nitroimidazolový, tak oxazolidinonový skelet.^{15, 16,17}

Obrázek 2 Azolové antimykobakteriální látky



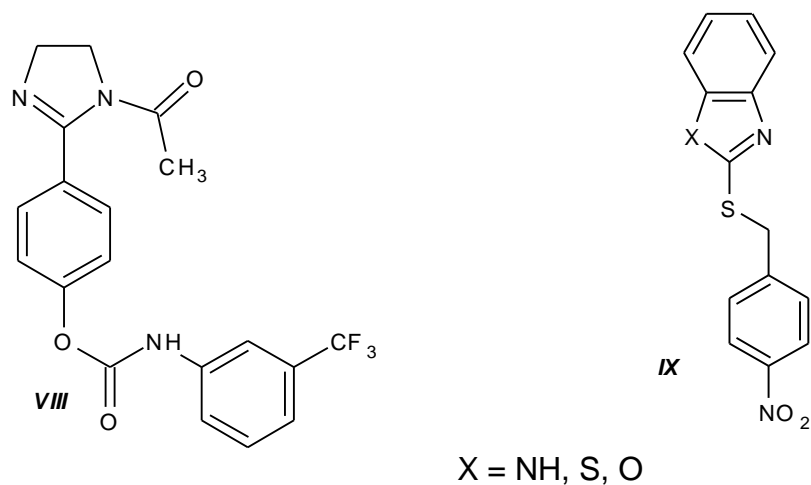
Od konce 90. let minulého století jsou především italskými výzkumnými týmy vyvíjena antituberkulotika na bázi 1,2-difenylypyrrolů, jež vykazují poměrně zajímavou účinnost především proti atypickým mykobakteriím (*M. avium*, *M. marinum* nebo *M. smegmatis*)^{18,19}. Z tohoto výzkumu pochází další látka BM 212 (**Obrázek 3 - IV**), jež se stala výchozí strukturou pro další potenciální antituberkulotika (např. **Obrázek 3 - V**). Obměňování její struktury stále pokračuje a výsledkem jsou látky, které jeví vysokou aktivitu *in vitro* proti atypickým mykobakteriím²⁰. Obecná struktura spočívající v 2-fenylsubstituovaném pětičlenném heterocyklu se také odráží v 2-(pyridin-4-yl)-1,3,4-oxadiazolových derivátech (např. **Obrázek 3 - VI**), kde hraje pětičlenný kruh roli cyklického izosteru hydrazidové skupiny isoniazidu.²¹ Podobný strukturální motiv se nachází i u 5-fenyloxazolových (např. **Obrázek 3 - VII**) a 5-fenylpyrazolových derivátů, jejichž potenciál jako budoucích antituberkulotik je též považován za vysoký.²²

Obrázek 3 Fenylazolové antimykobakteriální struktury



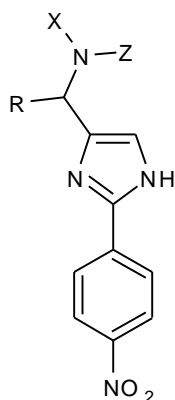
Screening 2-fenylimidazolinových a 2-fenylimidazolových derivátů, syntetizovaných původně pro jiné účely, odhalil jako úspěšnou strukturu 4-(1-acetyl-1*H*-imidazolin-2-yl)fenyl-*N*-(3-trifluoromethyl-fenyl)karbamát (**Obrázek 4 - VIII**).⁸ Předchozí výzkum na katedře obecné a anorganické chemie vedl mimo jiné k úspěšným inhibitorům mykobakterií ze skupiny 2-benzylsulfanylbenzimidazolům,⁹ – benzothiazolům,¹⁰ a –benzoxazolům,¹⁰ u nichž je benzenové jádro benzyl- skupiny substituováno nitroskupinami (např. **IX**). Substituce nitroskupinou se jeví jako podstatná pro antimykobakteriální aktivitu.

Obrázek 4 Účinné látky z výzkumu předcházejícího této práci



Na základě výše uvedených poznatků byly jako nové potenciální antimykobakteriální látky vybrány deriváty imidazolu v poloze 2 substituované 4-nitrofenyl- skupinou. Jedná se o 1-[2-(4-nitrofenyl)-1*H*-imidazol-5-yl]alkanaminy a jejich deriváty s benzyloxykarbonyl chránicí skupinou na alifatické aminoskupině (**Obrázek 5**). Vedlejší řetězec chráněných derivátů navíc obsahuje karbamátovou skupinu, která se již několikrát ukázala jako výhodná pro antimykobakteriální účinek.^{8,22} Asymetrický uhlík, který je v cílových molekulách také přítomen, skýtá možnost různé konfigurace chirálního centra. Substituce benzenového jádra byla zvolena na základě znalosti úspěšné substituce benzenového jádra na benzylsulfanylbenzimidazolech a benzylsulfanylbenzthiazolech.^{10,23} Plánované finální produkty jsou navíc odvozeny od již syntetizovaných látek, které nemají nitrovaný benzenový kruh, používaných jako ligandy v enantioselektivní katalýze.²⁴ Zmíněné látky byly také testovány na antimykobakteriální aktivitu, aby se zjistil vliv 4-nitrofenyl substituce na antimykobakteriální účinnost.

Obrázek 5 Obecná struktura připravovaných sloučenin



R = (S) CH₃, (R) CH₃, (S) CH(CH₃)CH₃, (S) -CH₂CH(CH₃)CH₃, (S) -CH(CH₃)CH₂CH₃,
(S) -CH₂Ph

X = H nebo X+R = CH₂CH₂CH₂

Y = H, NO₂

Z = H, COOCH₂Ph

5.2 Možnosti syntézy 2-fenylimidazolového skeletu

K 2-fenylimidazolovému skeletu lze dospět dvěma základními retrosyntetickými cestami, přičemž obě se v současné době používají. První z nich spočívá v kondenzaci imidazolového kruhu na benzenovém jádře (viz kapitola 5.2.1). Tuto reakci lze provádět ve dvou krocích, nejdříve jako cyklizaci derivátu kyseliny benzoové s ethylendiaminem vedoucí k 2-fenylimidazolinu a pak jako jeho následnou oxidaci na 2-fenylimidazol. Další možností je přímá cyklizace derivátu kyseliny benzoové nebo benzaldehydu a vhodné 1,2-difunkční sloučeniny.

Druhým postupem je pak arylace imidazolového kruhu ve smyslu cross-coupling reakce. V tomto případě existuje několik možností syntézy, které se liší přítomností a druhem odstupující skupiny na imidazolovém kruhu, popřípadě na benzenovém jádře. Obecně je zde hlavním problémem nalezení vhodného katalyzátoru, u kterého bude reakce ve smyslu arylace do polohy 2 na imidazolovém kruhu probíhat.²⁵

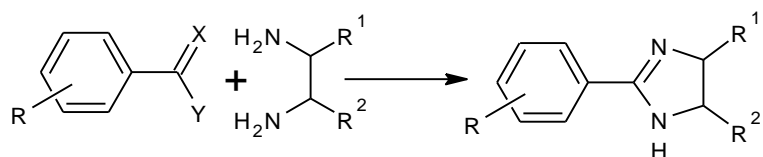
5.2.1 Cyklizační reakce vedoucí k 2-fenylimidazolům

5.2.1.1 Syntéza 2-fenylimidazolinů

Příprava 2-fenylimidazolinů a analogická příprava 2-fenylthiazolinů a oxazolinů je jedna z nejstarších reakcí heterocyklické chemie a v dnešní době je považována za klasickou reakci. Výchozí látkou je zpravidla derivát příslušné benzoové kyseliny, nebo analogický benzenkarbaldehyd, popřípadě jeho derivát. Výchozí látka reaguje s dusíkatou 1,2-difunkční sloučeninou, nejčastěji derivátem ethylendiaminu.²⁵

V současné době byly pro tuto kondenzační reakci použity téměř všechny deriváty příslušných benzoových kyselin – estery s krátkým alkoholovým řetězcem,^{26,27} nitrily nebo krátkořetězcové benzimidáty.^{27,28,29} Většina reakcí probíhá za zvýšené teploty (kolem 100°C) nebo za varu rozpouštědla nezřídka v přítomnosti katalytického množství sírné sloučeniny (H₂S, S, P₂S₅).^{27,29,30}

Schéma 1 Obecná příprava imidazolinů tradičním postupem

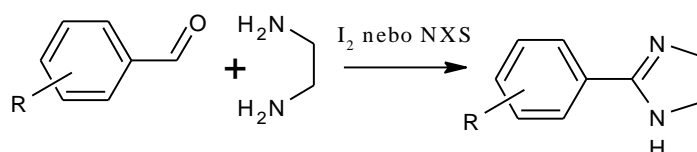


X = O, S, NH

Y = OEt, OMe, NH₂

Zajímavou novodobou variantou zavedených postupů je oxidativní cyklizace, která jako substrát používá příslušný benzenkarbaldehyd, jenž reaguje s deriváty ethylendiaminu v přítomnosti oxidačního činidla. Oxidačním činidlem může být jod v přítomnosti uhličitanu draselného nebo *N*-halogensukcinimidu.³¹

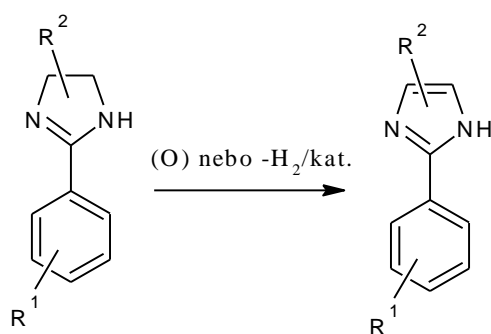
Schéma 2 Obecná příprava imidazolinů oxidativní cyklizací



5.2.1.2 Převod 2-fenylimidazolinů na 2-fenylimidazoly

Na převod imidazolinů na imidazoly, stejně tak jako na každou obdobnou reakci, lze hledět dvěma způsoby. Prvním úhlem pohledu je oxidace. Z tohoto přístupu pramení použití oxidačních činidel. Z druhého úhlu pohledu, dehydrogenace, pak vyplývá použití (de)hydrogenačních katalyzátorů (**Schéma 3**).²⁵

Schéma 3 Převod 2-fenylimidazolinů na 2-fenylimidazoly

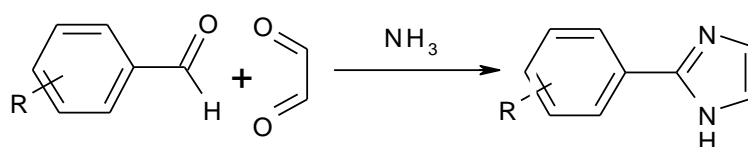


Oxidační přístup vedl například k použití oxidačních činidel na bázi manganu MnO₂, BaMnO₄,^{27,29,32} ale například i manganistanu draselného za přítomnosti oxidu hlinitého nebo silikagelu.³³ Úspěšné oxidace proběhly za pomoci dimethylsulfoxidu samotného nebo s přídavkem oxalyldichloridu či 10% Pd/C katalyzátoru.^{28,32} Použita byla také oxidační činidla na bázi jodu – kyselina *o*-jodoxybenzoová (IBX) a Dess-Martinův jodičnan.³² Z dehydrogenačních katalyzátorů, které se používají k dehydrogenaci 2-fenylimidazolinů, lze jmenovat Pd/C,³⁴ Se,³⁵ systém Zn/Al₂O₃ nebo Ni. Jednotlivé katalyzátory jsou voleny podle snadnosti průběhu konkrétní reakce.

5.2.1.3 Přímé cyklizace imidazolového kruhu

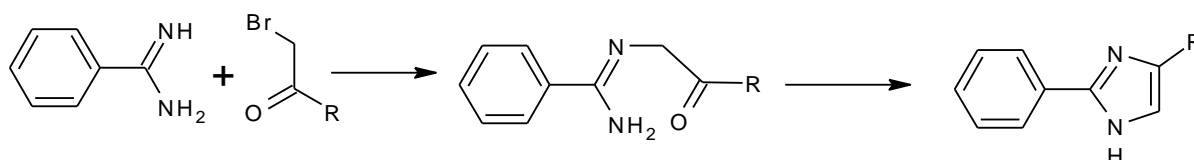
Co se týká substrátů, tyto reakce se příliš neliší od syntéz 2-fenylimidazolinů. Rozdíl spočívá v tom, že 1,2-difunkční sloučenina zavádějící do molekuly dva atomy uhlíku nemůže být příslušný ethylendiamin, ale sloučenina mající alespoň jeden karbonylový uhlík často v podobě acetalu. Nejstarším uspořádáním této reakce je reakce substituovaného benzenkarbaldehydu s 1,2-dioxosloučeninou (například s glyoxalem) za přítomnosti amoniaku nebo octanu amonného (**Schéma 4**).^{36,37,38,39}

Schéma 4 Přímá cyklizace imidazolového kruhu s použitím glyoxalu



Dalšími reakcemi, jež nepotřebují externí zdroj dusíku, jsou kondenzace benzimidátu získaného zpravidla z příslušného nitrilu a z něj odvozeného esteru benzimidové kyseliny s 2,2-dimethoxy- nebo 2,2-diethoxy-1-aminoethanem, čili acetalu aminoacetaldehydu.^{40,41,42} Podobnou reakcí je také kondenzace α -bromketonu s benzamidinem. Mechanismus této reakce je předpokládán jako dvojkrokový a sestává z alkylace a následné cyklizace (**Schéma 5**).²⁴

Schéma 5 Předpokládaný mechanismus vzniku 2-fenylimidazolů reakcí bromketonu s benzamidinem



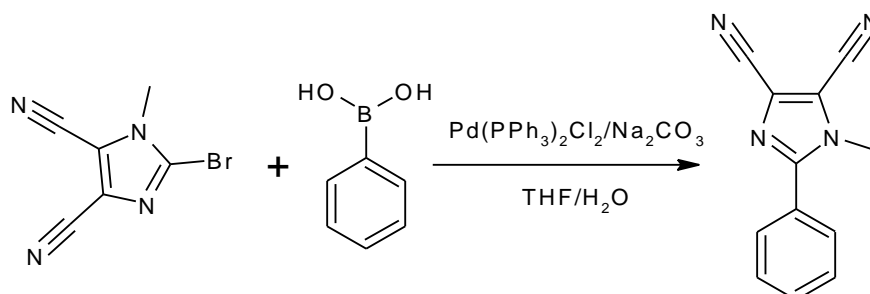
5.2.2 Arylace imidazolu do polohy 2

K 2-fenylimidazolům lze dojít i reakcemi, při kterých není ani jeden z kruhů budován, ale dochází ke spojení obou kruhů ve smyslu cross-coupling reakce. Tento druh reakcí se v dnešní době dynamicky rozvíjí spolu s dalšími cross-coupling reakcemi. Možnost 2-arylace imidazolu je poprvé zmíněna v souvislosti se zkoumáním průběhu reakcí typu S_{RN1}. 2-Fenylimidazoly jsou v tomto případě nalezeny ve směsi produktů. V tomto případě ovšem nešlo o cílenou syntézu 2-arylimidazolů. Naopak 2-arylimidazoly byly často spíše jedněmi z produktů (nezřídka minoritními) ve výsledných směsích, jejichž analýza byla podstatou zmíněných prací.^{25, 43, 44}

Užitečným syntetickým nástrojem pro přípravu 2-fenylimidazolů jsou však cross-couplingové reakce. U *N*-chráněného imidazolu probíhá Negishiho cross-coupling s fenylohalogenidem, například při reakci 1-[(dimethylamino)sulfonyl]imidazolyl-2-zinku s fenylojodidem.^{45,46} U *N*-methylsubstituovaných imidazolů byl proveden také Suzukiho

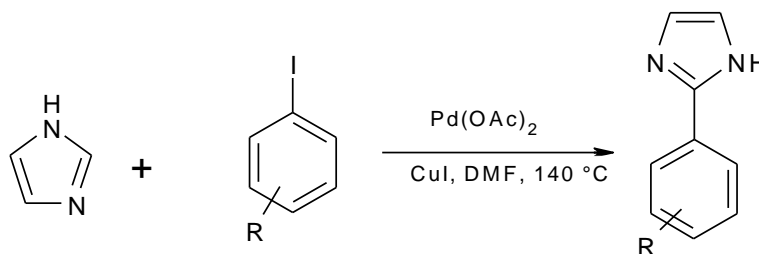
cross-coupling reakcí 2-brom-4,5-dikyano-1-methylimidazolu s příslušnou fenyloborovou kyselinou (**Schéma 6**).⁴⁷

Schéma 6 Příklad cross-couplingové reakce vedoucí k 2-fenylimidazolovému skeletu



Mnohem pozoruhodnější je ale reakce katalyzovaná octanem palladnatým a jodidy mědi probíhající při teplotách okolo 140 °C, která selektivně aryluje azoly jako je imidazol, benzimidazol nebo indol a od nich odvozené látky v pozici 2 pomocí aromatických jodidů, které mohou být vytvářeny *in situ* z analogických bromidů (**Schéma 7**).^{46,48,49} Tato reakce je příklad vzácného, o to však chemiky vítanějšího C-H cross-couplingu. Reakce byla původně vyvinuta pro 1-fenylsubstituované imidazoly tak, aby produkty byly 1,2-diarylimidazoly,⁴⁸ reakce však může proběhnout za určitých podmínek i u imidazolu s nechráněnou NH vazbou. Konkurenční reakcí pro zmíněnou reakci je cross-coupling na imidazolový dusík (tzv. Buchwaldův-Hartwigův cross-coupling).⁵⁰

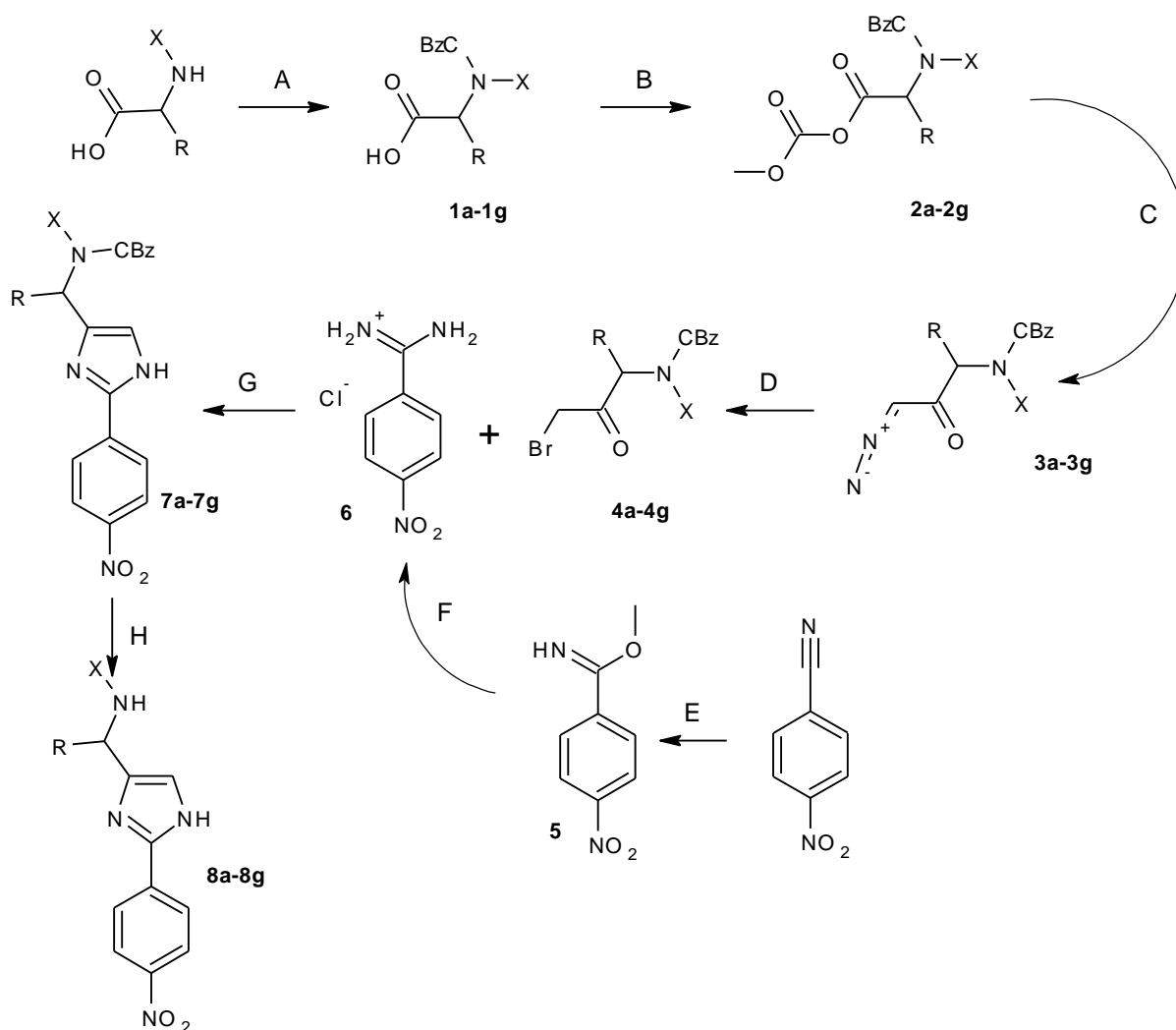
Schéma 7 Selektivní 2-arylace imidazolu



5.3 Výběr reakčního schématu

Pro cílové látky byla zvolena syntetická cesta, analogická se syntetickou cestou, jež byla použita v případě již syntetizovaných derivátů bez nitroskupiny.²⁴ Imidazoly při této reakci vznikají kondenzací bromketonu připraveného z aminokyselin s 4-nitrobenzamidinem, který lze připravit z 4-nitrobenzonnitrilu (**Schéma 8**).⁵¹ Vzhledem k tomu, že se vycházelo z opticky čistých aminokyselin, předpokládá se inherentní chiralita i u cílových produktů. Jako výchozí aminokyseliny byly zvoleny biogenní α -aminokyseliny s alifatickými substituenty, aby případné další skupiny přítomné ve vedlejších řetězci nemohly zasahovat do reakčního schématu a nevznikala potřeba je chránit. Jako výchozí aminokyseliny byly tedy zvoleny L-alanin, D-alanin, L-valin, L-leucin, L-soleucin, L-fenylalanin a L-prolin.

Schéma 8 Souhrnné schéma zvolené syntetické cesty



CBz = $-\text{COCH}_2\text{Ph}$

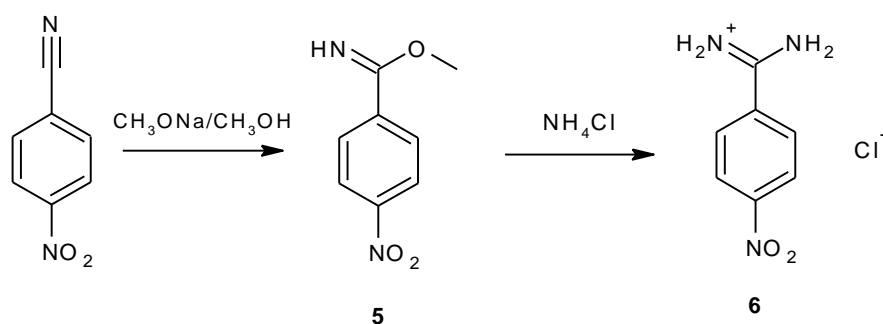
- 1a - 8a** R = (S) CH_3 ; X = H
1b - 8b R = (R) CH_3 ; X = H
1c - 8c R = (S) $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_3$; X = H
1d - 8d R = (S) CH_2Ph ; X = H
1e - 8e R = (S) $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_3$; X = H
1f - 8f R = (S) $\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$; X = H
1g - 8g R + X = $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$

- A** – CBzCl, NaOH, H₂O
B – ClCOOMe, TEA, THF
C – CH_2N_2 , THF, Et₂O
D – 48% HBr, CH_3COOH
E – MeONa, MeOH, reflux
F – NH_4Cl
G – K_2CO_3 , THF, H₂O
H – $\text{H}_2/10\% \text{ Pd/C}$

6 Experimentální část

6.1 Chemická syntéza

6.1.1 Příprava 4-nitrobenzamidin-hydrochloridu (**6**)⁵¹



Do 50 ml baňky vybavené zpětný chladičem bylo předloženo 4,8 g komerčního (Sigma-Aldrich) 4-nitrobenzonitrilu (32,4 mmol) a 15 ml methanolu o kvalitě p. a. K tomuto roztoku bylo za laboratorní teploty přidáno 0,165 g (3,1 mmol) pevného methoxidu sodného. Poté byl roztok přiveden k varu a refluxován 12 hod. Přítomnost meziproductu **5** v reakční směsi byla ověřena pomocí TLC (SiO₂, EtOAc) a pomocí GC/MS. Do reakční směsi bylo přidáno 2,85 g (53,3 mmol) chloridu amonného. Pevná látka se ve směsi rozpouštěla. Asi po 15 minutách se ze směsi začala vylučovat žlutá krystalická látka. Zahřívání bylo ukončeno a směs byla volně ochlazena na 25 °C. Následně byla směs zfiltrována a filtrační koláč byl promyt studeným methanolem a diethyletherem. Výsledkem bylo 3,85 g (59 %) žlutého prášku.

R_F (SiO₂, EtOAc) = 0,75 (**5**); 0,0 (**6**); 0,3 (**6** volná báze);

b.t. 288-291 °C (lit. 285-287 °C)

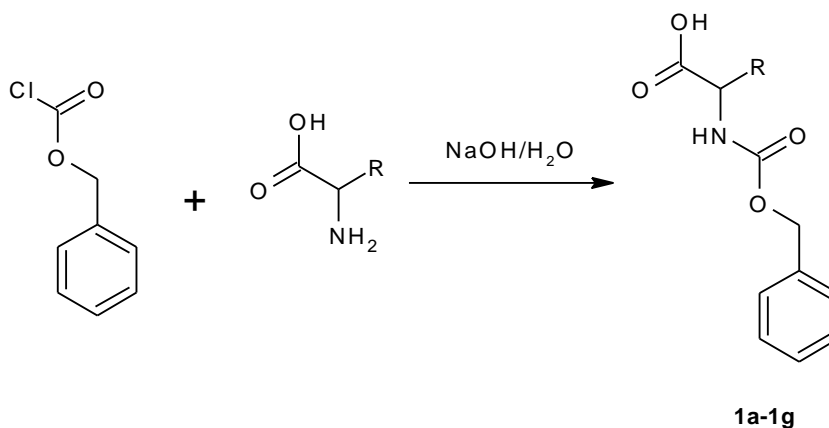
GC/MS m/z (%) **5**: 179 (100) [M⁺ - H], 163 (65) [M⁺ - CH₃], 149 (90), 133 (40), 103 (45), 91 (25), 76 (20).

6 (volná báze; mikroextrakce EtOAc): 166 (80) [M⁺], 150 (100) [M⁺ - NH₂], 120 (20), 104 (35), 92 (25), 76 (33).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz; d_6 -DMSO): δ 8,13 – 8,16 ppm (m, 1H, ArH), 8,22 – 8,24 ppm (m, 1H, ArH), 8,42 – 8,47 ppm (m, 2H, ArH), 8,35 – 8,75 ppm (brs, 3H, C(NH₂)NH₂).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz; d_6 -DMSO): δ 123,8 ppm, 124,4 ppm, 130,0 ppm, 134,1 ppm, 134,2 ppm, 150,3 ppm, 164,5 ppm.

6.1.2 Příprava *N*-benzyloxykarbonylaminokyselin⁵¹



K roztoku α -aminokyseliny (56 mmol) v 1M vodném hydroxidu sodném (60 ml) byl během 45 minut za laboratorní teploty přikapáván benzylochlorformiát (8,5 ml, 60 mmol). Po dobu přikapávání benzylochlorformiátu bylo pH reakce udržováno mezi 9 – 10 přidávkou 1M roztoku hydroxidu sodného. Po ukončení přikapávání benzylochlorformiátu byl roztok míchán dvě hodiny a průběžně mu bylo kontrolováno pH, které bylo udržováno nad hodnotou 9 případnými dalšími přidávkami zmiňovaného roztoku NaOH. Poté byl vzniklý roztok ochlazen na 0 °C a extrahován 2×25 ml diethyletheru. Vodná vrstva byla po kapkách okyselena koncentrovanou kyselinou fosforečnou až na pH 0 – 1. Vzniklá suspenze nebo emulze byla extrahována dichlormethanem (3×50 ml). Spojené dichlormethanové frakce byly vysušeny bezvodým síranem sodným a rozpouštědlo bylo vakuově odpařeno. Výsledkem byla tuhá látka, nebo viskózní olej. V případě nedostatečné čistoty indikované TLC (SiO₂, EtOAc/hexan 1:1) chráněné aminokyseliny byla provedena rekrystalizace ze směsi ethylacetát/hexan. Výsledky pro jednotlivé aminokyseliny jsou shrnuty v **Tabulce 1**.

Tabulka 1 Přehled výsledků CBz protekce α -aminokyselin

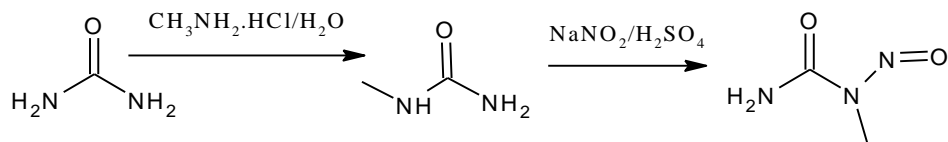
Látka	R	Výtěžek [%]	t.t./t.t. lit. ⁵² [°C]	¹ H- a ¹³ C-NMR	$[\alpha]_D^{20}$ (MeOH)
1a	(S) CH ₃	89	83-86/83-84	¹ H (400MHz, CDCl ₃) δ : 1,44 – 1,46 ppm (d, 3H, CH ₃), 4,30 – 4,45 ppm (m, 1H, CH), 5,07 – 5,14 ppm(m, 2H, OCH ₂), 6,71 – 6,80 ppm(brs, 1H, COOH), 7,25 – 7,35 ppm (m, 5H, PhH) ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) δ : 18,56 ppm, 49,64 ppm, 67,31 ppm, 128,33 ppm, 128,45 ppm, 128,74 ppm, 136,29 ppm, 156,09 ppm, 176,65 ppm	-20,7
1b	(R) CH ₃	88	81-83/77-79	¹ H (400MHz, CDCl ₃) δ : 1,42 – 1,44 ppm (d, 3H, CH ₃), 4,30 – 4,45 ppm (m, 1H, CH), 5,07 – 5,14 ppm(m, 2H, OCH ₂), 6,71 – 6,78 ppm(brs, 1H, COOH), 7,25 – 7,35 ppm (m, 5H, PhH) ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) δ : 18,56 ppm, 49,64 ppm, 67,31 ppm, 128,33 ppm, 128,45 ppm, 128,74 ppm, 136,29 ppm, 156,09 ppm, 176,65 ppm	20,1
1c	(S)(CH ₃) ₂ CH	90	66-67/65-66	¹ H (400MHz, CDCl ₃) δ : 0,90 – 0,99 ppm (dd, 6H, CH ₃), 2,20 – 2,25 ppm (m, 1H, CH ₃ CHCH ₃) 4,16 – 4,36 ppm (m, 1H, CHNCBz), 5,08 – 5,14 ppm(m, 2H, OCH ₂), 5,31 + 6,27 ppm(2d, 1H, CbzNH), 7,25 – 7,36 ppm (m, 5H, PhH), 8,35 (brs, COOH) ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) δ : 17.51 ppm, 19.19 ppm, 31.21 ppm, 59,01 ppm, 67.43 ppm, 128.36 ppm, 128.46 ppm,	-7,0

				128.75 ppm, 136.24 ppm, 156.58 ppm, 177,1 ppm	
1d	(S)PhCH ₂	94	50-52/Olej	¹ H (400MHz, CDCl ₃) δ: 3,15 – 3,32 ppm (m, 2H, PhCH ₂ CH), 4,30 – 4,45 ppm (m, 1H, CH), 5,14 – 5,21 ppm (m, 2H, OCH ₂ Ph), 7,22 – 7,45 ppm (m, 10H, PhH+PhH) 7,99 ppm (brs, 1H, COOH), ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) δ: 37,86 ppm, 54,78 ppm, 65,35 ppm, 67,32 ppm, 127,26 ppm, 127,34 ppm, 127,88 ppm, 128,12 ppm, 128,26 ppm, 128,40 ppm, 128,69 ppm, 128,72 ppm, 128,80 ppm, 129,51 ppm, 136,72 ppm, 156,11 ppm, 175,95 ppm	-18,1
1e	(S)(CH ₃) ₂ CHCH ₂	78	52-54/olej	¹ H (400MHz, CDCl ₃) δ: 0,86 -0,95 ppm (m, 6H, CH ₃), 1,51 – 1,58 ppm (m, 1H, CH ₃ CHCH ₃), 1,64 – 1,75 ppm (m, 2H, CH ₂ CH(CH ₃) ₂), 4,37 – 4,43 (m, 1H, CHNHCBz), 5,07 – 5,13 ppm (m, 2H, OCH ₂), 5,32 + 6,35 (2d, 1H, NHCBz), 7,25 – 7,34 ppm (m, 5H, PhH), 8,88 (brs, 1H, COOH) ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) δ: 21,86 ppm, 23,00 ppm, 24,91 ppm, 41,56 ppm, 52,55 ppm, 67,34 ppm, 128,27 ppm, 128,38 ppm, 128,70 ppm, 136,25 ppm, 156,43 ppm, 178,03 ppm	-18,0
1f	(S)CH ₃ CH ₂ (CH ₃)CH	96	108-110/112-113	¹ H (400MHz, CDCl ₃) δ: 0,90 – 0,95 ppm (m, 6H, CH ₃ +CH ₃) 1,18 – 1,22 ppm + 1,43 – 1,48 (2m, 2H, CHCH ₂ CH ₃) 1,92 – 1,96 ppm (m, 1H, CHCH ₂ CH ₃), 4,36 –	6,0

				<p>4,68 ppm (m, 1H, CHNHCbz), 5,10 – 5,13 ppm (m, 2H, OCH₂), 5,45 + 6,25 (2d, 1H, NHCbz), 7,08 (brs, 1H, COOH), 7,33 – 7,35 ppm (m, 5H, PhH)</p> <p>¹³C (100 MHz, CDCl₃)</p> <p>δ: 22,04 ppm, 23,24 ppm, 24,91 ppm, 41,56 ppm, 52,35 ppm, 67,39 ppm, 128,32 ppm, 128,39 ppm, 128,70 ppm, 136,38 ppm, 156,43 ppm, 178,33 ppm</p>	
1g	<p>(S)</p>	90	olej/olej	<p>¹H (400MHz, CDCl₃)</p> <p>δ: 1,89-1,95 ppm (m, 2H, CCH₂C), 2,14-2,18 ppm (m, 2H, CCH₂C), 3,44-3,61 ppm (m, 2H, N-CH₂C), 4,35-4,41 ppm (m, 1H, N-CHC), 5,11-5,14 ppm (m, 2H, O-CH₂), 7,25-7,36 ppm (m, 5H, PhH), 9,2 ppm (brs, 1H, COOH)</p> <p>¹³C (100 MHz, CDCl₃)</p> <p>δ: 23,58 ppm, 24,40 ppm, 29,67 ppm, 31,01 ppm, 46,73 ppm, 47,07 ppm, 58,80 ppm, 59,37 ppm, 67,30 ppm, 67,58 ppm, 127,78 ppm, 128,01 ppm, 128,05 ppm, 128,23 ppm, 128,53 ppm, 128,64 ppm, 136,48 ppm, 136,58 ppm, 154,66 ppm, 155,78 ppm, 176,74 ppm, 178,01 ppm</p>	-41,5

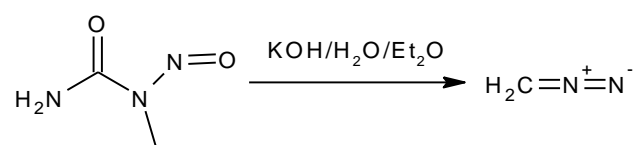
6.1.3 Příprava benzyl(3-diazo-2-oxopropyl)karbamátů⁵¹

6.1.3.1 Příprava *N*-methyl-*N*-nitrosomočoviny



Methylamin-hydrochlorid (102 g, 1,5 mol) byl rozpuštěn ve 400ml vody, k roztoku byla přikapávána koncentrovaná kyselina chlorovodíková až dokud přibližné pH dle univerzálního indikátorového papírku nedosáhlo hodnoty 4. Poté bylo přidáno 300 g (1,5 mol) močoviny a roztok byl 4 hodiny refluxován. Roztok byl nejdříve zchlazen na teplotu 25 °C a bylo v něm rozpuštěno 110 g (1,5 mol) dusitanu sodného. Po rozpuštění veškerého dusitanu sodného byl roztok zchlazen systémem led/kuchyňská sůl na teplotu pod 0 °C. Takto zchlazený roztok byl následně opatrně přiléván do podchlazené kyseliny sírové. Teplota reakce byla udržována chlazením pod 5 °C. Mezi jednotlivými přidávkami byla reakční směs energicky míchána skleněnou tyčinkou. Vzniklá zpěněná suspenze byla zfiltrována a vlhký filtrační koláč byl bez jakéhokoliv pokusu o sušení skladován v lednici (*N*-methyl-*N*-nitrosomočovina je v suchém stavu a za vyšších teplot výbušná).

6.1.3.2 Příprava etherového roztoku diazometanu

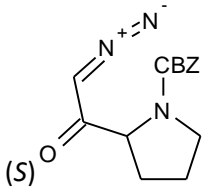


Vypočtené množství *N*-methyl-*N*-nitrosomočoviny bylo postupně přidáváno do 1000 ml baňky obsahující 30 – 40% roztok hydroxidu draselného převrstvený diethyletherem. Baňka byla vybavena nástavcem odvádějícím plyny přes systém dvou promývaček naplněných do dvou třetin podchlazeným etherem (chladičím systémem suchý led/acetone) odvedený do odtahu digestoře. Konec reakce byl indikován jako konec vývoje plynů v systému a rozpuštění *N*-methyl-*N*-nitrosomočoviny v hydroxidové vrstvě. Výsledný roztok byl získán slítím etherové vrstvy a několikanásobným promytím

Tabulka 2 Přehled výsledků syntézy diazoketonů **3a - 3g**

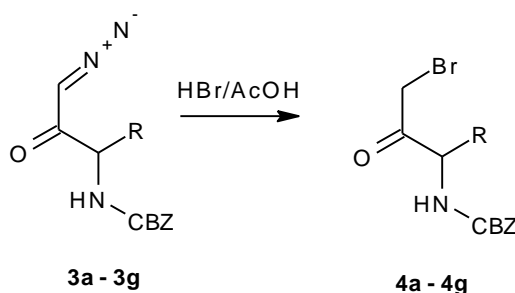
Číslo látky	R	Výtěžek [%]	t.t./t.t. lit. ⁵¹ [°C]	¹ H- a ¹³ C-NMR	[α] _D ²⁰ (MeOH)
3a	(S) CH ₃	83	87-88/93-94	¹ H (400 MHz, CDCl ₃) δ: 1,30 ppm (3H, d, CH ₃), 4,12 (0,5H, CBzNHCH), 4,24 ppm (1H, m, CBzNHCH), 5,06 ppm (2H, 2d, PhCH ₂ O), 5,40 ppm (1H, brs, CHN ₂), 5,52 -5,61 ppm (1H, brs, CBzNHCH), 7,26–7,33 ppm (5H, m, PhH). ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) δ: 18,54 ppm, 53,68 ppm, 54,53 ppm, 67,08 ppm, 128,19 ppm, 128,33 ppm, 128,62 ppm, 136,41 ppm, 155,88 ppm, 194,12 ppm.	-59,1
3b	(R) CH ₃	86	86-89/92-94	¹ H (400 MHz, CDCl ₃) δ: 1,30 (d, 3H, CH ₃), 4,11 + 4,24 ppm (m, 1H, CBzNHCH), 5,06 ppm (2d, 2H, PhCH ₂ CO), 5,40 (brs, 1H, CHN ₂), 5,52 + 5,61 (brs, 1H, CBzNH), 7,26–7,33 (m, 5H, ArH). ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) δ: 18,53 ppm, 53,71 ppm, 54,53 ppm, 67,09 ppm, 128,22 ppm, 128,31 ppm, 128,62 ppm, 136,41 ppm, 155,96 ppm, 194,11 ppm.	57,9
3c	(S)(CH ₃) ₂ CH	81	olej/30-31	¹ H (400 MHz, CDCl ₃) δ: 0,84 ppm (d, 3H, CH ₃), 0,94 ppm (d, 3H, CH ₃),	-31,5

				<p>2,04 ppm (m, 1H, $CH(CH_3)_2$), 3,95 ppm + 4,10 ppm (m, 1H, $CBzNHCH$), 5,06 ppm (m, 2H, $PhCH_2OCO$), 5,39 ppm (brs, 1H, CHN_2), 5,59 ppm (d, 1H, $CBzNH$), 7.23–7.36 ppm (m, 5H, ArH).</p> <p>^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$)</p> <p>δ: 17,4 ppm, 19,5 ppm, 31,2 ppm, 54,8 ppm, 63,0 ppm, 67,1 ppm, 128,1 ppm, 128,2 ppm, 128,6 ppm, 136,3 ppm, 156,5 ppm, 193,6 ppm.</p>	
3d	(S)PhCH ₂	79	olej/olej	<p>1H (400 MHz, $CDCl_3$)</p> <p>δ: 3,06 (d, 2H, $PhCH_2CH$), 4,50 (m, 1H, $CBzNHCH$), 5,09 (m, 2H, $PhCH_2CO$), 5,22 (brs, 1H, CHN_2), 5,40 (1H, brs, $CBzNH$), 7,18–7,36 (m, 10H, PhH).</p> <p>^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$)</p> <p>δ: 38,3 ppm, 54,4 ppm, 58,7 ppm, 66,9 ppm, 127,0 ppm, 127,9 ppm, 128,1 ppm, 128,4 ppm, 128,5 ppm, 129,2 ppm, 135,9 ppm, 136,0 ppm, 155,6 ppm, 192,6 ppm.</p>	-54,0
3e	(S)(CH ₃) ₂ CHCH ₂	82	olej/61-63	<p>1H (400 MHz, $CDCl_3$)</p> <p>δ: 0,91 – 0,92 ppm (m, 6H, CH_3), 1,45 – 1,53 ppm (m, 2H, $CH_2CH(CH_3)_2$), 1,95 ppm (m, 1H, $CH_2CH(CH_3)_2$), 4,12 – 4,24 ppm (m, 1H, $CBzNHCH$), 5,07 ppm (m, 2H, $PhCH_2OCO$), 5,43 ppm (brs, 1H, CHN_2), 5,46 ppm (brs, 1H, $CBzNH$), 7,29–7,33 (m, 5H, PhH).</p>	-43,1

				^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 21,9 ppm, 23,2 ppm, 24,8 ppm, 41,5 ppm, 54,0 ppm, 56,5 ppm, 67,1 ppm, 128,2 ppm, 128,3 ppm, 128,6 ppm, 136,4 ppm, 156,2 ppm, 194,4 ppm.	
3f	$(S)\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}_3)\text{C}$ H	91	81-84/78-80	^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 0,87 ppm (t, 3H, CH_2CH_3), 0,92 ppm (d, 3H, CHCH_3), 1,08 + 1,41 ppm (2m, 2H, CH_3CH_2), 1,81 ppm (m, 1H, MeCHEt), 4,01 - 4,13 (m, 1H, CHNHCBz), 5.08 (2H, m, PhCH_2OCO), 5.40 (1H, brs, CHN_2), 5.50 ppm (d, 1H, CBzNH), 7,26–7,34 (m, 5H, PhH). ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 11,6 ppm, 15,8 ppm, 24,7 ppm, 37,8 ppm, 55,0 ppm, 62,5 ppm, 67,2 ppm, 128,2 ppm, 128,3 ppm, 128,7 ppm, 136,4 ppm, 156,4 ppm, 193,6 ppm.	-42,8
3g		97	olej/olej	^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 1,83 - 1,86 ppm (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2,0 (m, 2H, CHCH_2CH_2), 3,52 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 4,29 (m, 1H, CH_2CHN), 5,12 (m, 2H, PhCH_2CO), 5,25 + 5,46 (1H, brs, CHN_2), 7.25–7.33 (5H, m, ArH). ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : 23,6 ppm + 24,4 ppm, 29,7 ppm + 31,2 ppm, 46,9 ppm + 47,4 ppm, 52,7 ppm + 53,3 ppm,	-96,1

				64,0 ppm, 67,2 ppm, 127,7 ppm, 127,9 ppm, 128,1 ppm, 128,4 ppm, 128,5 ppm, 136,4 ppm + 136,6 ppm, 154,5 + 155,3 ppm, 194,5 + 195,3 ppm.	
--	--	--	--	---	--

6.1.4 Příprava bromketonů⁵²

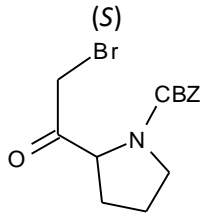


Do suspenze diazoketonu (33 mmol) v ledové kyselině octové 40 ml byla pomalu přikapávána 48% kyselina bromovodíková (8,8 ml). Roztok zpočátku intenzivně pěnil vlivem uvolňování dusíku, po prvních několika podílech bylo uvolňování dusíku méně intenzivní. Po přidavku posledního podílu kyseliny bromovodíkové byla směs míchána po dobu 50 min. Reakční směs byla nalita na přibližně 50 ml ledu. Vzniklá sraženina zpravidla nebyla filtrovatelná, proto byla směs extrahována dichlormethanem (3×40 ml). Spojené dichlormethanové frakce byly promyty 3×50 ml demineralizované vody a 50 ml solanky, vysušeny bezvodým síranem sodným a odpařeny na vakuové odparce. Takto připravený bromketon obsahoval dle NMR ještě stopy kyseliny octové, které vadily při následné reakci. Proto byla provedena rekrystalizace ze systému diethylether/petrolether. Výsledky pro jednotlivé bromketony jsou shrnuty v **Tabulce 3**.

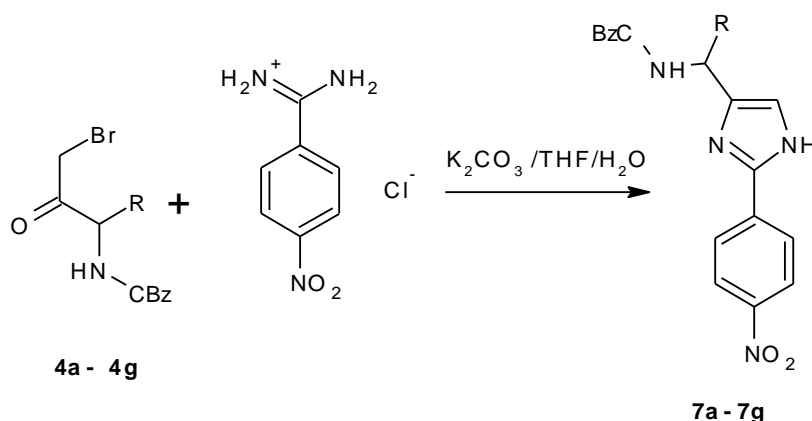
Tabulka 3 Přehled výsledků syntézy bromketonů **4a - 4g**

Číslo látky	R	Výt. [%]	t.t./t.t. lit. ⁵¹ [°C]	¹ H-NMR δ[ppm] ¹³ C-NMR δ[ppm]	[α] _D ²⁰ (MeOH)
4a	(S) CH ₃	94	83-86/82-83	¹ H (400 MHz, CDCl ₃) δ: 1,38 (d, 3H, CH ₃), 4,00 – 4,04 (m, 2H, CH ₂ Br), 4,63 (m, 1H, CBzNHCH), 5,07 (m, 2H, PhCH ₂ OCO), 5.41 - 5.49 (brs, 1H, CBzNH), 7.31–7.33 (m, 5H, PhH). ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) δ: 18,0 ppm, 31,6 ppm, 53,8 ppm, 67,3 ppm, 128,2 ppm, 128,5 ppm, 128,7 ppm, 136,2 ppm, 155,9 ppm, 201,3 ppm.	-33,7
4b	(R) CH ₃	97	78-79/78-79	¹ H (400 MHz, CDCl ₃) δ: 1,38 ppm (d, 3H, CH ₃), 4,02 ppm (m, 2H, CH ₂ Br), 4,63 ppm (m, 1H, CBzNHCH), 5,05 ppm – 5,09 ppm (2d, 2H, PhCH ₂ CO), 5.41 - 5.49 (1H, brs, CBzNH), 7.31–7.33 (m, 5H, PhH). ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) δ: 18,0 ppm, 31,6 ppm, 53,8 ppm, 67,3 ppm, 128,3 ppm, 128,5 ppm, 128,7 ppm, 136,2 ppm, 155,9 ppm, 201,3 ppm.	33,5
4c	(S)(CH ₃) ₂ CH	94	69-73/81-82	¹ H (400 MHz, CDCl ₃) δ: 0,82 ppm (d, 3H, CH ₃), 1,00 ppm (d, 3H, CH ₃), 2,20 ppm (m, 1H, CH(CH ₃) ₂), 4,04 ppm (m, 2H, CH ₂ Br), 4,57 ppm (m, 1H, CBzNHCH), 5,09 ppm (m, 2H, PhCH ₂ OCO), 5,50 ppm (1H, d, J = 8.5, CBzNH), 7.27–7.37 ppm (m, 5H, PhH). ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) δ: 17,0 ppm, 19,8 ppm, 30,2 ppm, 33,1 ppm, 63,0 ppm, 67,3 ppm, 128,2 ppm, 128,6 ppm, 129,1 ppm, 136,1 ppm, 156,5 ppm, 200,8 ppm.	-21,9
4d	(S)PhCH ₂	87	102-	¹ H (400 MHz, CDCl ₃)	-45,8

			103/102-103	<p>δ: 3,12 ppm (m, 2H, PhCH₂CH), 3,89 ppm (m, 2H, CH₂Br), 4,72 ppm (m, 1H, CBzNHCH), 5,10 (2d, 2H, PhCH₂OCO), 5,39 (m, 1H, CBzNH), 7,19 (d, 2H, PhH), 7.33–7.42 (m, 8H, PhH).</p> <p>¹³C (100 MHz, CDCl₃)</p> <p>δ: 33,2 ppm, 38,1 ppm, 59,0 ppm, 67,5 ppm, 127,6 ppm, 128,3 ppm, 128,5 ppm, 128,8 ppm, 129,2 ppm, 129,3 ppm, 135,6 ppm, 136,3 ppm, 155,7 ppm, 201,2 ppm.</p>	
4e	(S)(CH ₃) ₂ CHCH ₂	97	olej/olej	<p>¹H (400 MHz, CDCl₃)</p> <p>δ: 0,92 ppm + 0,94 ppm (m, 6H, CH₃), 1,44 + 1,59 ppm (m, 2H, CH₂CH(CH₃)₂), 1,69 ppm (m, 1H, CH₂CH(CH₃)₂), 4,06 ppm (m, 2H, CH₂Br), 4,60 ppm (m, 1H, CBzNHCH), 5,07 ppm (m, 2H, PhCH₂OCO), 5,52 ppm (brs, 1H, CBzNH), 7,27 ppm–7,37 ppm (5H, m, PhH).</p> <p>¹³C (100 MHz, CDCl₃)</p> <p>δ: 13,9 ppm, 21,5 ppm, 23,3 ppm, 24,9 ppm, 40,5 ppm, 56,6 ppm, 67,2 ppm, 128,1 ppm, 128,6 ppm, 128,8 ppm, 136,1 ppm, 156,3 ppm, 201,6 ppm.</p>	-26,1
4f	(S)CH ₃ CH ₂ (CH ₃)C H	94	108-110	<p>¹H (400 MHz, CDCl₃)</p> <p>δ: 0,87 ppm (t, 3H, CH₂CH₃), 0,96 ppm (d, 3H, CHCH₃), 1,07 ppm - 1,31 ppm (m, 2H, CH₃CH₂), 1,92 ppm (m, 1H, CH₃CHCH₂CH₃), 4,04 ppm (m, 2H, CH₂Br), 4,57 ppm (m, 1H, CBzNHCH), 5,08 ppm (m, 2H, PhCH₂OCO), 5,33 ppm (d, 1H, CBzNH), 7,30–7,36 (m, 5H, PhH).</p> <p>¹³C (100 MHz, CDCl₃)</p> <p>δ: 11,6 ppm, 16,2 ppm, 24,4 ppm, 33,3 ppm, 37,1 ppm, 62,8 ppm, 67,4 ppm, 128,3 ppm, 128,5 ppm, 128,8 ppm, 136,2 ppm, 156,5 ppm, 201,0 ppm.</p>	-25,8

<p>4g</p>		<p>88</p>	<p>Olej/olej</p>	<p>^1H (400 MHz, CDCl_3) δ: 2,11 ppm (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2,22 ppm (2H, m, CHCH_2CH_2), 3,58 ppm (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$), 4,42 ppm (m, 1H, CH_2CHN), 4,53 ppm (m, 2H, CH_2Br), 5,18 ppm (m, 2H, PhCH_2OCO), 7,30–7,44 (m, 5H, PhH).</p> <p>^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ: 23,8 ppm + 25,1 ppm, 29,6 + 31,0 ppm, 45,8 ppm + 47,1 ppm, 52,5 ppm + 53,0 ppm, 60,8 ppm, 67,5 ppm, 127,9 ppm, 128,1 ppm, 128,4 ppm, 128,6 ppm, 128,9 ppm, 136,1 ppm + 136,6 ppm, 154,2 ppm + 155,1 ppm, 194,8 ppm + 195,7 ppm</p>	<p>-9,0</p>
------------------	---	-----------	------------------	--	-------------

6.1.5 Příprava benzyl {1-[2-(4-nitrofenyl)-1H-imidazol-5-yl]}karbamátů²⁴



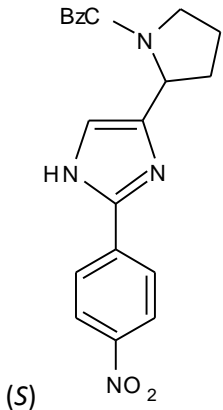
Směs 4-nitrobenzamidinu (5,8 g, 29 mmol), bezvodého uhlíčitanu sodného (12,3 g, 116 mmol), suchého tetrahydrofuranu (80 ml) a vody (20 ml) byla v 250 ml trojhrdlé baňce vybavené zpětným chladičem přivedena k varu. Poté během 15 minut byl k této směsi přikapáván roztok příslušného bromketonu (29 mmol) v tetrahydrofuranu (50 ml). Směs byla refluxována 3 dny. Z reakční směsi byla vakuově odpařena všechna rozpouštědla, odparek byl rozdělen mezi vodu (40 ml) a dichlormethan (40 ml). Vodná frakce byla extrahována 2×60 ml dichlormethanu. Spojené dichlormethanové frakce byly promyty 100 ml demineralizované vody a 100 ml solanky, vysušeny bezvodým síranem sodným a vakuově odpařeny. Surový produkt byl čištěn sloupcovou chromatografií

(silikagel/ethylacetát:hexan 1:1). Výsledky syntézy pro jednotlivé imidazoly jsou uvedeny v **Tabulce 4**.

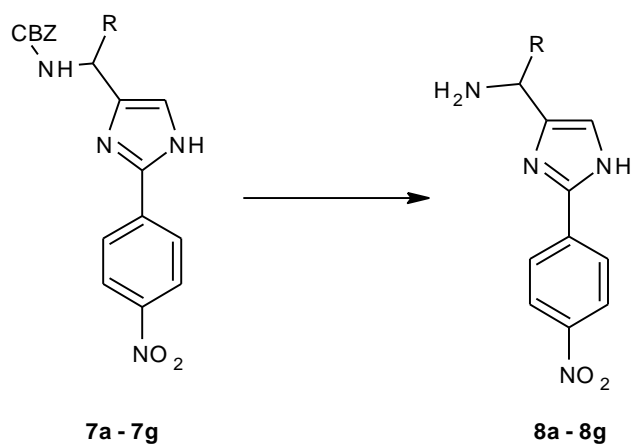
Tabulka 4 Přehled výsledků syntézy látek **7a - 7g**

Číslo látky	R	Výt. [%]	t.t. [°C]	¹ H- a ¹³ C-NMR, FT-IR	[α] _D ²⁰ (MeOH)
7a	(S) CH ₃	25	178 – 179	¹ H (400 MHz, <i>d</i> ₆ -DMSO) δ: 1,46 ppm (d, 3H, CH ₃), 4,77 ppm (m, 1H, CBzNHCH), 5,09 ppm (s, 2H, PhCH ₂ OCO), 7,04 ppm + 7,22 ppm (2brs, 1H, CH _{im}), 7,36 ppm – 7,42 ppm (m, 5H, CH ₂ PhH), 7,62 (m, 1H, NHCbz), 8,19 ppm + 8,35 ppm (2m, 4H, PhHNO ₂), 12,85 ppm (brs, 1H, NH _{im}). ¹³ C (100 MHz, <i>d</i> ₆ -DMSO) δ: 21,1 ppm, 65,3 ppm, 124,3 ppm, 125,4 ppm, 127,8 ppm, 128,4 ppm, 136,6 ppm, 137,3 ppm, 143,0 ppm, 146,4 ppm, 155,5 ppm. FT-IR (cm ⁻¹): 1047, 1347, 1407, 1445, 1520, 1677, 3400 – 2950.	-31,6
7b	(R) CH ₃	37	176 – 178	¹ H (400 MHz, <i>d</i> ₆ -DMSO) δ: 1,48 ppm (d, 3H, CH ₃), 4,80 ppm (m, 1H, CBzNHCH), 5,10 ppm (s, 2H, PhCH ₂ OCO), 7,20 ppm (s, 1H, CH _{im}), 7,36 ppm – 7,42 ppm (m, 5H, CH ₂ PhH), 7,62 (m, 1H, NHCbz), 8,19 ppm + 8,35 ppm (2m, 4H, PhHNO ₂), 12,85 ppm (brs, 1H, NH _{im}). ¹³ C (100 MHz, <i>d</i> ₆ -DMSO) δ: 21,1 ppm, 65,3 ppm, 124,5 ppm, 125,4 ppm, 127,9 ppm, 128,4 ppm, 136,6 ppm, 137,3 ppm, 143,0 ppm, 146,3 ppm, 155,5 ppm. FT-IR (cm ⁻¹): 1047, 1347, 1407, 1445, 1520, 1677, 3010 – 3450.	32,0
7c	(S)(CH ₃) ₂ CH	10	185 – 187	¹ H (400 MHz, <i>d</i> ₆ -DMSO) δ: 0,88 ppm – 0,93 ppm (m, 6H, CH ₃), 2,08 ppm – 2,20 ppm (m, 1H, CH(CH ₃) ₂),	-58,1

				<p>4,50 ppm – 4,65 ppm (m, 1H, CBzNHCH), 5,05 ppm – 5,13 ppm (m, 2H, PhCH₂OCO), 7,07 ppm + 7,25 ppm (2s, 1H, CH_{im}), 7,35 ppm - 7,41 ppm (m, 5H, CH₂PhH), 7,54 ppm + 7,75 ppm (2d, 1H, NHCBz), 8,18 ppm – 8,20 ppm + 8,34 ppm – 8,36 ppm (2m, 4H, PhHNO₂).</p> <p>¹³C (100 MHz, <i>d</i>₆-DMSO)</p> <p>δ: 18,4 ppm, 19,6 ppm, 32,2 ppm, 32,7 ppm, 55,4 ppm, 65,2 ppm + 65,5 ppm, 116,3 ppm, 124,3 ppm, 125,1 ppm, 125,3 ppm, 127,7 ppm, 127,8 ppm, 128,3 ppm, 136,6 ppm + 137,3 ppm, 142,7 ppm, 144,5 ppm, 146,3 ppm, 156,0 ppm.</p> <p>FT-IR (cm⁻¹): 1047, 1297, 1345, 1417, 1445, 1541, 1673, 3400 – 2950.</p>	
7d	(<i>S</i>)PhCH ₂	16	163 – 165	<p>¹H (400 MHz, <i>d</i>₆-DMSO)</p> <p>δ: 3,01 ppm – 3,06 ppm + 3,20 – 3,31 ppm (2m, 2H, CHCH₂Ph), 4,90 ppm – 5,06 ppm (m, 3H, CHNHCOOCH₂Ph), 7,07 ppm – 7,40 ppm (m, 11H, PhH + PhH + CH_{im}), 7,73 ppm + 7,91 ppm (2d, 1H, NHCBz), 8,21 ppm + 8,36 ppm (2m, 4H, PhHNO₂), 12,89 ppm (NH_{im}).</p> <p>¹³C (100 MHz, <i>d</i>₆-DMSO)</p> <p>δ: 51,2 ppm, 65,0 ppm, 65,2 ppm, 116,1 ppm, 124,3 ppm, 125,3 ppm, 126,0 ppm, 127,4 ppm, 127,6 ppm, 127,7 ppm, 128,1 ppm, 128,2 ppm, 128,8 ppm, 136,5 ppm, 137,4 ppm, 138,9 ppm, 142,9 ppm, 145,1 ppm, 146,4 ppm, 154,3 ppm.</p> <p>FT-IR (cm⁻¹): 1047, 1347, 1407, 1443, 1518, 1660, 300 – 2790.</p>	-18,4
7f	(<i>S</i>)CH ₃ CH ₂ (CH ₃)CH	7	98 – 101	<p>¹H (400 MHz, <i>d</i>₆-DMSO)</p> <p>δ: 0,83 ppm – 0,91 ppm (m, 6H, CH₃ + CH₃), 1,16 ppm – 1,20 ppm + 1,54 ppm (2m, 2H, CH₂CH₃), 4,55 ppm – 4,66 ppm (m, 1H, CBzNHCH), 5,07 ppm (m, 2H, PhCH₂), 7,05 ppm + 7,25 ppm (2s, 1H, CH_{im}), 7,35 ppm – 7,41 ppm (m, 5H, PhH), 7,54 ppm + 7,75 ppm (2d, 1H, NHCBz),</p>	-26,6

				<p>8,18 ppm + 8,35 ppm (2m, 4H, PhHNO₂), 12,77 ppm + 12,86 ppm (2brs, NH_{im}).</p> <p>¹³C (100 MHz, d₆-DMSO)</p> <p>δ: 11,1 ppm + 11,3 ppm, 15,6 ppm + 15,8 ppm, 24,9 ppm, 51,8 ppm + 54,1 ppm, 65,3 ppm, 116,1 ppm, 124,3 ppm, 125,2 ppm + 125,35 ppm, 127,7 ppm + 127,8 ppm, 128,4 ppm, 135,2 ppm + 136,6 ppm, 137,1 ppm + 137,4 ppm, 142,7 ppm, 144,3 ppm, 146,3 ppm, 153,6 ppm.</p> <p>FT-IR (cm⁻¹): 841, 934, 1113, 1335, 1410, 1445, 1530, 1685, 2950 –3400.</p>	
7g	 <p>(S)</p>	27	<p>101 – 102</p> <p>¹H (400 MHz, d₆-DMSO)</p> <p>δ: 1,93 ppm – 1,96 ppm (m, 1H, CH₂), 2,03 ppm – 2,07 ppm (m, 2H, CH₂), 2,25 ppm (m, 1H, CH₂), 2,54 ppm -2,56 ppm (2m, 2H, CH₂), 4,96 ppm - 5,14 ppm (m, 3H, PhCH₂OCONHCBz), 7,18 ppm – 7,42 ppm (m, 6H, CH₂PhH + CH_{im}), 8,18 ppm – 8,20 ppm + 8,34 – 8,36 ppm (2m, 4H, PhHNO₂), 12,86 (brs, 1H, NH_{im}).</p> <p>¹³C (100 MHz, d₆-DMSO)</p> <p>δ: 22,6 ppm + 23,5 ppm, 31,8 ppm + 32,9 ppm, 46,1 ppm + 46,6 ppm, 55,2 ppm + 55,6 ppm, 65,4 ppm + 65,7 ppm, 115,9 ppm + 116,1 ppm, 124,3 ppm + 125,3 ppm, 126,9 ppm, 127,4 ppm, 127,7 ppm, 128,1 ppm, 128,4 ppm, 136,6 ppm + 137,3 ppm, 142,9 ppm, 145,3 ppm, 145,9 ppm, 146,3 ppm, 154,0 ppm"</p> <p>FT-IR (cm⁻¹): 1047, 1347, 1407, 1445, 1520, 1677, 2950 – 3400.</p>	-54,4	

6.1.6 Pokusy o přípravu 1-[2-(4-nitrofenyl)-1H-imidazol-5-yl]alkylaminů (8)



Protože výsledky pokusů o hydrogenolytické odstranění chránicí skupiny, které se u analogických derivátů osvědčilo, byly neuspokojivé, byly provedeny pokusy o deprotekcí jinými způsoby nalezenými v literatuře. Většina pokusů o deprotekcí byla provedena na derivátech vycházejících z aminokyseliny L-alaninu a L-prolinu, protože těchto sloučenin bylo k dispozici nejvíce. U jednotlivých pokusů bylo zastoupení výchozích látek a produktů v průběhu reakce monitorováno metodou TLC (SiO_2 ; ethylacetát:hexan 1:1). Výsledky všech pokusů o deprotekcí shrnuje **Tabulka 5** na konci této kapitoly.

6.1.6.1 Deprotekce hydrogenolýzou²⁴

Roztok 0,15 mmol chráněného imidazolu v 10 ml methanolu byl předložen do tlakové patrony, která byla umístěna do autoklávu. K roztoku bylo přidáno 0,1 g 10% palladia na aktivním uhlí. Směs byla míchána za laboratorní teploty ve vodíkové atmosféře pod tlakem 300 kPa po dobu 24 hodin. Reakce byla sledována pomocí TLC (SiO_2 ; ethylacetát:hexan 1:1), při jeho negativním výsledku byla reakce dále zahřívána až do teploty 70 °C po dobu dalších 24 hodin. Byl proveden také pokus, kdy bylo do reakční směsi přidáno katalytické množství kyseliny trifluoroctové.

6.1.6.2 Deprotekce systémem HBr/CH₃COOH⁵³

V 10 ml ledové kyseliny octové bylo rozpuštěno 0,15 mmol chráněného imidazolu a ke směsi bylo přidáno dalších deset mililitrů komerčního 33% roztoku bromovodíku v kyselině octové (Fluka). Roztok byl takto míchán 5 hodin za pokojové teploty za průběžné kontroly změn pomocí TLC (SiO₂; ethylacetát:hexan 1:1). Poté, co TLC přestala indikovat přítomnost výchozí látky, bylo rozpouštědlo spolu s bromovodíkem vakuově odpařeno. Část takto vzniklé krystalické látky byla extrahována nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného v methanolu.

6.1.6.3 Deprotekce pomocí kyseliny trifluoroctové⁵⁴

V 50 ml trojhrdlé baňce opatřené zpětným chladičem byl roztok 0,15 mmol látky **7a** v 15 ml suchého tetrahydrofuranu přiveden k varu. Po dosažení varu bylo přikapáno 1,1 ml (15 mmol) kyseliny trifluoroctové. Reakce byla refluxována po 8 hodin za průběžné kontroly konverze výchozí látky pomocí TLC (SiO₂; ethylacetát:hexan 1:1).

6.1.6.4 Deprotekce etherátem fluoridu boritého za přítomnosti *tert*-butylthiolu⁵⁵

Pod inertní argonovou atmosférou bylo 59 mg (0,15 mmol) látky **7g** rozpuštěno v 10 ml dichlormethanu v kvalitě p. a. K roztoku bylo nejdříve přikapáno 0,19 ml (1,5 mmol) fluoridu boritého triethyletherátu a posléze 0,23 ml (2 mmol) *tert*-butylmerkaptanu. Reakce byla míchána 16 hod. pod inertní atmosférou za sledování změn pomocí TLC (SiO₂; ethylacetát:hexan 1:1). Poté, co nebyla indikována výchozí látka, byla reakční směs extrahována 3×5 ml nasyceného vodného roztoku hydrogenuhličitanu sodného. Spojené vodné frakce byly promyty 20 ml dichlormethanu. Spojené dichlormethanové podíly byly vysušeny bezvodým síranem sodným a vakuově odpařeny.

6.1.6.5 Deprotekce hydroxidem barnatým⁵⁶

59 mg (0,15 mmol) látky **7g** bylo rozpuštěno v 15 ml absolutního ethanolu. Bylo přidáno 257 mg (1,5 mmol) hydroxidu barnatého a roztok byl přiveden k varu. Roztok byl refluxován po 12 hodin za průběžného monitorování pomocí TLC.

6.1.6.6 Deprotekce *in situ* generovaným trimethylsilyljodidem^{57,58}

V 10 ml suchého acetonitrilu bylo za laboratorní teploty, za energického míchání a pod argonovou atmosférou suspendováno 225 mg (1,5 mmol) jodidu sodného. Poté, co vznikla jemná suspenze, byla celá soustava zchlazena na -10 °C. Za této teploty bylo do roztoku přikapáváno 0,1 ml (0,75 mmol) trimethylsilylchloridu. Roztok se okamžitě mléčně zakalil vznikem chloridu sodného. K takto připravenému roztoku byl přikapán roztok 59 mg látky **7g** (0,15 mmol). Po 20 minutách při teplotě -10 °C byla chladicí lázeň odstraněna a reakční směs bylo umožněno, aby dosáhla 25 °C. Reakční směs byla dále míchána 5 hodin při průběžné kontrole TLC (SiO₂; ethylacetát:hexan 1:1).

Tabulka 5 Přehled výsledků pokusů o deprotekcí látek **7a** a **7g**

Deprotekce	7a	7g
H ₂ /Pd	Za nízké teploty deprotekcce neprobíhá, za vyšší teploty nebo v přítomnosti CF ₃ COOH nedělitelná směs produktů rozkladu.	Za nízké teploty deprotekcce neprobíhá, za vyšší teploty nebo v přítomnosti CF ₃ COOH nedělitelná směs produktů rozkladu
HBr/CH ₃ COOH	Získán surový produkt, indikován pouze na TLC (SiO ₂ ; ethylacetát:hexan 1:1)	Získán surový produkt ¹ H-NMR (400 MHz, d ₆ -DMSO)δ: 2,17 ppm – 2,28 ppm (2m, 3H, CH ₂ CH ₂ CH ₂), 2,38 ppm – 2,56 ppm (m, 1H, CH ₂ CH ₂ CH ₂), 3,21 ppm – 3,38 ppm (m, 2H, NHCH ₂ CH ₂), 4,77 ppm (m, 1H, NHCHCH ₂), 7,77 ppm (s, 1H, CH _{im}), 8,27 ppm + 8,45 ppm (2m, 4H, PhHNO ₂).
CF ₃ COOH	Neprobíhá	Neprobíhá
BF ₃ OEt ₂ /tBuSH	Neprobíhá	Neprobíhá
Ba(OH) ₂	Neprobíhá	Neprobíhá
Me ₃ SiI	Tvoří se nedělitelné směsi	Tvoří se nedělitelné směsi

6.2 Identifikace a fyzikální vlastnosti syntetizovaných látek

6.2.1 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektra byla naměřena na sestavě Agilent Technologies (plynový chromatograf 6890N s hmotnostním detektorem 5973 firmy Network). Pro měření byly použity přibližně 5% roztoky látek v acetonu, dichlormethanu nebo diethyletheru. Přístroj byl používán především k ověření čistoty produktů a meziproductů. Cílové látky nebyly dostatečně těžké pro převedení na chromatografickou kolonu na rozdíl od nejvýznamnější hydrolytické nečistoty benzylalkoholu.

6.2.2 ^1H - a ^{13}C -NMR spektroskopie

^1H -NMR a ^{13}C -NMR spektra byla měřena na spektrometru BRUKER AVANCE 400, při 400 MHz (^1H) respektive 100 MHz (^{13}C) a teplotě 25 °C. Přístroj byl vybaven 5 mm gradientní broadband sondou. Pro měření byly použity roztoky látek v d_6 -DMSO a CDCl_3 . Chemické posuny $\delta(^1\text{H})$ látek rozpuštěných v DMSO- d_6 byly vztaženy k signálu d_6 -DMSO ($\delta(^1\text{H})$ 2,55 ppm; $\delta(^{13}\text{C})$ 39,51 ppm) a v CDCl_3 vztaženy k signálu CDCl_3 ($\delta(^1\text{H})$ 7,25 ppm; $\delta(^{13}\text{C})$ 77,23 ppm). Analýza protonových spekter byla provedena dle štěpení prvního řádu a s pomocí integrálních intenzit.

6.2.3 Elementární analýza

Elementární analýzy byly naměřeny na automatickém analyzátoru EA 1108 firmy FISOONS. Za čisté látky byly považovány vzorky, jejichž relativní rozdíl od teoretické hodnoty byl nižší než 0,3 %.

6.2.4 Infračervená spektroskopie

Infračervená spektra byla měřena na infračerveném spektrometru s Fourierovou transformací Perkin Elmer FT-IR System Spectrum BX opatřeným horizontálním ATR modulem se ZnSe krystalem, který umožňuje měření pevných i kapalných vzorků. Spektra byla měřena v rozsahu od 650 cm^{-1} do 4000 cm^{-1} .

6.2.5 Měření optické otáčivosti

Optická otáčivost byla měřena na polarimetru PERKIN ELMER 341. Byly měřeny methanoloové roztoky o koncentraci 1g látky na 100 ml rozpouštědla v kyvetě dlouhé 10 cm při vlnové délce sodíkového dubletu (589,3 nm).

6.3 Mikrobiologická část

Mikrobiologické testování bylo provedeno v laboratoři pro diagnostiku mykobakterií Zdravotního ústavu se sídlem v Ostravě. Byly testovány tři série látek. Látky **7a**, **7b**, **7c**, **7d**, **7f** a **7g** byly připraveny v rámci této diplomové práce. Látky **9a** – **9g**²⁴ odpovídají obecnému vzorci uvedenému na **Obrázku 1**, kde substituent Y je vodík, substituent Z je skupina benzyloxykarbonyl- a substituenty X a R odpovídají substituentům u analogických sloučenin **7a** – **7g**. Látky **10a** – **10g**²⁴ odpovídají obecnému vzorci uvedenému na **Obrázku 1**, kde substituent Y je vodík, substituent Z je vodík a substituenty X a R odpovídají substituentům u analogických sloučenin **7a** – **7g**.

Antimykobakteriální hodnocení aktivity připravených látek bylo provedeno *in vitro*, mikrometodou pro stanovení minimálních inhibičních koncentrací (MIC) v Šulově půdě (SEVAC, Praha), v plastických P–destičkách. Preparáty byly připraveny ředěním v DMSO v koncentracích 1 – 1 000 $\mu\text{mol/l}$. Jako standard byl použit isoniazid (INH), který byl ředěn sterilní destilovanou vodou v rozsahu 0,5 – 250 $\mu\text{mol/l}$.

K testování byly použity kmeny: *Mycobacterium tuberculosis* (My 331/88), *Mycobacterium avium* (My 330/88), *Mycobacterium kansasii* (My 235/80), *Mycobacterium kansasii* (6 509/96). První tři jmenované kmeny jsou sbírkové kmeny z České národní sbírky typových kultur (CNCTC). *M.kansasii* (6 509/96) je kmen klinicky izolovaný od pacienta z okresu Karviná.

Odečítání MIC bylo provedeno u *M. tuberculosis* a *M. avium* po 14 a 21 dnech inkubace při 37 °C, u *M.kansasii* po 7, 14 a 21 dnech inkubace při 37 °C.

6.4 Výsledky testování antimykobakteriální aktivity

Výsledky testů jsou zpracovány souhrnně v **Tabulce 6**

Tabulka 6 – Výsledky testů antimykobakteriální aktivity

Látka	<i>M. tuberculosis</i> My 331/88 14 / 21 dní	<i>M. avium</i> My 330/88 14 / 21 dní	<i>M. kansasii</i> My 235/80 7 / 14 / 21 dní	<i>M. kansasii</i> 6 509/96 7 / 14 / 21 dní
7a	>125 / >125	>125 / >125	>125 / >125/>125	>125 / >125/>125
7b	>125 / >125	>125 / >125	>125 / >125/>125	>125 / >125/>125
7c	16/16	>125 / >125	32/62,5/62,5	16/32/32
7d	16/16	>62,5/>62,5	16/32/>62,5	8/16/16
7f	16/32	>125 / >125	32/62,5/62,5	16/16/32
7g	32/32	>250/>250	62,5/125/250	32/62,5/62,5
9a	125/125	125/250	125/250/250	125/125/125
9b	125/125	250/250	125/250/250	62,5/125/125
9c	16/62,5	>250/>500	62,5/62,5/62,5	32/62,5/62,5
9d	500/>250	>250/>500	>250/ >500/>500	>250/ >250/>250
9e	125/>250	>250/>500	250/>500/>500	>125/>125/>250
9f	32/125	>250/>500	32/62,5/62,5	32/32/32
9g	62,5/62,5	>250/>250	32/62,5/62,5	62,5/62,5/62,5
10a	>1000/> 1000	>1000/>1000	>1000/>1000/>1000	250/1000/1000
10b	500/1000	>1000/>1000	500/1000/1000	500/500/1000
10c	125/250	500/1000	125/125/250	62,5/62,5/62,5
10d	125/250	250/250	125/125/250	32/125/125
10e	62,5/250	500/500	62,5/125/125	62,5/62,5/62,5
10f	62,5/250	500/500	62,5/125/125	32/62,5/62,5
10g	1000/1000	1000/1000	1000/1000/1000	500/500/500
INH	0,5/1	>250/>250	>250/>250/>250	2/4/8

7 Diskuse

7.1 Diskuse chemické syntézy cílových látek

7.1.1 Syntéza α -bromketonů

Reakční cesta od aminokyselin až po chirální bromketony byla vyvinuta na pracovišti, kde byly produkty připravovány, a je velmi dobře propracována. Z naměřených hodnot specifické optické otáčivosti (α) lze usoudit, že během celé syntézy nedošlo ani při jednom kroku k racemizaci meziproductů nebo produktů. Naměřené hodnoty jsou navíc v dobré shodě s literaturou (viz **Tabulka 1 - 4**). Lze tedy usoudit, že produkty jsou opticky čisté látky. Výtěžky reakcí jsou v podstatě ve shodě s literárními hodnotami. Diazoketony (látky **3a - 3g**) bylo nutné k reakcím používat co nejrychleji po přípravě, postupem času měly tendenci podléhat dekompozici, jež vedla ke snížení výtěžků bromace. Bromketony (látky **4a - 4g**) jsou poněkud překvapivě látky na vzduchu stálé, byly však používány bez prodloužení, aby se snížilo riziko hydrolyzy.

7.1.2 Syntéza 4-nitrobenzamidin-hydrochloridu (**6**)

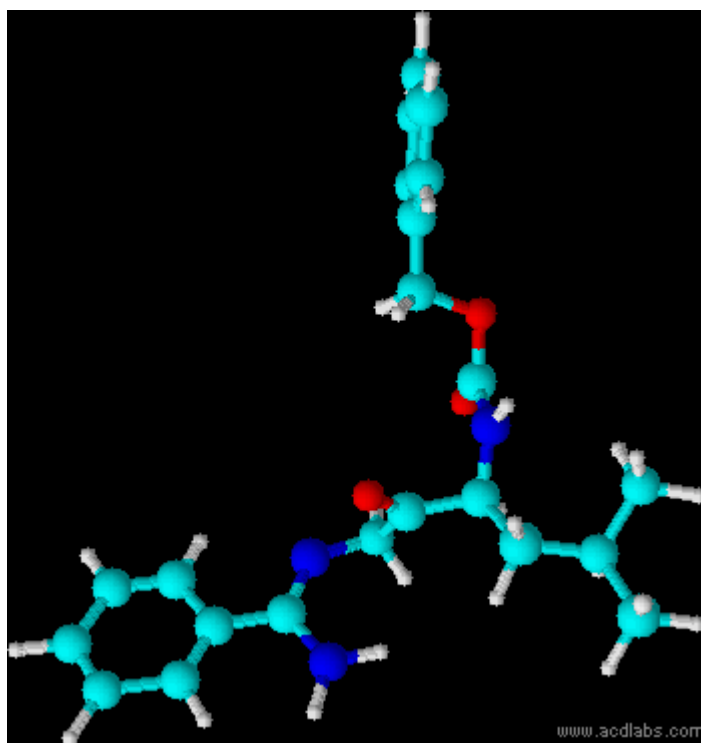
Syntéza benzamidin-hydrochloridu byla prováděna v jedné baňce tzv. one-pot způsobem. Bylo tak činěno proto, že meziproduct methyl-4-nitrobenzimidát (**5**), který byl alternativní výchozí látkou pro kondenzaci na imidazolový kruh, se jevil jako látka velmi nestálá a při všech pokusech o jeho izolaci se hydrolyzovala na příslušný benzamid. Vzniklý benzamidin-hydrochlorid (**6**) byla naopak látka velmi stálá a bylo možno ho připravovat do zásoby.

7.1.3 Kondenzace za vzniku látek **7a - 7g**

Kondenzace imidazolového kruhu na látky **7a - 7g** neměla příliš uspokojivé výtěžky. Silný záporný mezomerní efekt nitroskupiny prokazatelně snižoval ochotu benzamidinu k cyklizaci. Tento problém se podařilo částečně vyřešit prodloužením reakční doby, obecně však lze říci, že v tomto případě je prováděná reakce jako syntetická cesta spíše nevhodná. Pro účely této práce šlo ovšem především o to, abychom látky obdrželi jako takové, a výtěžek byl spíše vedlejší záležitostí. Lze vyzdvihnout, že při kondenzaci

bromketonů, jejichž výchozí látky byly aminokyseliny s rozvětveným vedlejším řetězcem, byly výtěžky výrazně nižší, než tomu bylo v případě bromketonu odvozeného od L- a D-alaninu, prolinu nebo fenylalaninu, jež mají konsolidovanější vedlejší řetězce. V případě látky **7e**, jejíž výchozí látkou byl bromketon odvozený od isoleucinu, se dokonce nepodařilo v potřebném množství čistý produkt získat. Obtížnost cyklizace může být způsobena sterickým bráněním rozvětveného alifatického řetězce (isobutylu), jenž může stejně jako jemu podobné alifatické zbytky stericky bránit alkylovanému meziproductu reakce v cyklizaci. Zajímavý náhled na sterickou náročnost druhého kroku cyklizace ukazuje kvantově chemický výpočet geometrických poměrů v alkylovaném meziproductu, který tuto teorii podporuje (**Obrázek 6**).

Obrázek 6 kvantově chemický výpočet geometrických poměrů meziproductu při syntéze látky **7e**



7.1.4 Deprotekce

První pokus o deprotekci byl učiněn podle stejného protokolu, podle něhož byla provedena deprotekce analogických nenitrovaných derivátů (kapitola 5.1.6.1). Nitroskupina byla vedena v patrnosti jako případný zdroj problémů při deprotekci, avšak v literatuře existují zmínky o úspěšných hydrogenolytických deprotekcích vedle přítomné aromatické

nitroskupiny. Dále pak očekávané vedlejší produkty 1-[2-(4-aminofenyl)-1*H*-imidazol-4(5)-yl]alkanaminy byly též látky zajímavé, co se týká antimykobakteriální aktivity. Bohužel výsledné reakční směsi jevíly známky naprostého rozkladu výchozího *N*-chráněného aminu na dále nedělitelnou směs produktů. Z toho důvodu byly prováděny pokusy o alternativní deprotekcce. Částečného úspěchu bylo dosaženo deprotekcí systémem kyselina octová/HBr (viz kapitola 5.1.6.2), u kterého se podařilo připravit hydrobromid od látky **8g**. Problémem byl výtěžek reakce, který byl natolik nízký, že se nepodařilo obdržet dostatečné množství látek na jejich plnou charakterizaci, tedy testování jejich antimykobakteriální aktivity by bylo v tom případě zcela irelevantní. Další pokusy o deprotekcce kyselou hydrolyzou (kapitola 5.1.6.3), silnými Lewisovými kyselinami (kapitoly 5.1.6.4 a 5.1.6.6) nebo bazickou hydrolyzou (kapitola 5.1.6.5) se ukázaly jako neúčinné pro deprotekcce daných systémů.

7.2 Diskuse výsledků testování

Výsledky testování minimálních inhibičních koncentrací odhalují očekávaný trend účinnosti, co se týká 4-nitrofenylsubstituce na benzenovém jádře. Látky **7a** – **7d** a **7f** – **7g** mají vyšší účinnost oproti analogickým látkám z řady **9** a **10**. Nejúčinnější látky vůči *M. tuberculosis* jsou **7c**, **7d** a **7f** s hodnotami MIC 16 μmol/l. Aktivita vůči oběma kmenům *M. kansasii* je shodná, na rozdíl od účinnosti INH. Jako nejúčinnější se jeví látky **7c**, **7d** a **7f** s MIC 8 – 62,5 μmol/l. Kmen *M. avium* se jeví jako málo citlivý na všechny testované látky. Vzhledem k prakticky totožné účinnosti derivátů **7a** a **7b**, **9a** a **9b**, **10a** a **10b** lze usoudit, že na účinnost této skupiny látek nemá konfigurace chirálního uhlíku žádný vliv. Z porovnání účinnosti látek řady **9** a látek řady **10** také vyplývá, že přítomnost karbamátové ochranné benzyloxykarbonyl skupiny na alifatickém dusíku má spíše příznivý vliv na účinnost látek. Účinnost poněkud zvyšují objemné lipofilní substituenty R (podle obecného vzorce uvedeného na **Obrázku 1**) jako například but-2-yl, isopropyl- nebo fenylmethyl-.

8 Závěr

Jako nová obecná struktura potenciálních antituberkulotik byly predikovány deriváty 1-[2-(4-nitrofenyl)-1*H*-imidazol-4(5)-yl]alkanaminů. Šest z navržených derivátů (**7a**, **7b**, **7c**, **7d**, **7f** a **7g**) bylo syntetizováno a jejich účinnost byla porovnávána s INH a s látkami řady **9** a **10**, jež byly připraveny již dříve a za jiným účelem a které se liší substitucí na benzenovém jádře.

Ani jedna z testovaných látek neznamená přílišný přínos pro inhibici bakterií rodu *Mycobacterium*. Jako relevantní inhibitory mohou být považovány látky **7c** a **7d** v případě klinického kmene *M. kansasii*. Hlavní přínos syntetizovaných a testovaných látek je však pro obohacení poznání vztahů struktura účinek na 2-arylazolových skeletech potenciálních nových antituberkulotik.

Z provedených testů a literárních údajů lze také předpovědět další možnosti obměny 2-fenylimidazolového kruhu, které by mohly vést k vyšší antimykobakteriální účinnosti. Vyšší účinnost lze očekávat při N-alkyl nebo N-arylsubstituci imidazolového jádra. Zvláště N-arylované preparáty by se strukturně velmi blížily úspěšným látkám **VI** a **VII**, navíc by v tomto případě bylo možné odlišit 4 a 5 substituované imidazolové regioisomery, což by zvýšilo možnosti další strukturní obměny. Další možnou obměnou struktury je přítomnost jiné karbamátové skupiny na alifatické aminoskupině. Pokud aplikujeme zkušenosti se vztahy struktura aktivita na benzylsulfanylbenzazolových derivátech, které vedly k designu cílových látek **7** a **8**, lze také očekávat, že vyšší nitrosubstituce na benzenovém jádře bude zvyšovat antimykobakteriální účinnost. Dalším návrhem může být 4-nitrosubstituce na imidazolovém kruhu. K syntéze výše nitrovaných 2-fenylimidazolů však nebude možno použít metodu, jež byla použita v této práci, nebo ji bude potřeba zásadně přepracovat vzhledem k tomu, že nitrosubstituce na benzamidinu silně znesnadňovala jeho cyklizaci s bromketony.

Přítomnost imidazolového jádra, chirálního centra, karbamátové (amidové) skupiny a postranních řetězců biogenních činí syntetizované látky podobné strukturám, jež lze nalézt v biogenních molekulách. Také proto v současné době probíhá screening látek **7a**, **7b**, **7c**, **7f** a **7g** také na další antimikrobiální aktivitu na Veterinární a Farmaceutické Univerzitě v Brně. Jeho výsledky však dosud ještě nejsou známy.

9 Literatura

1. WHO Tuberculosis facts: dostupné [online, 2. 5. 2011]:
<http://www.who.int/tb/publications/2009/tbfactsheet_2009update_one_page.pdf>
2. Katzung, B. G.: *Basic & Clinical Pharmacology* 10th edition New York: McGraw-Hill, **2008**.
3. Janin, Y. L.: *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 2479 – 2513.
4. Ballell, L., Field, R. A., Duncan, K., Young R.J.: *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2005**, *49*, 2153-2163.
5. O'Brien, R. J., Spiegelman, M.: *Clin. Chest. Med.* **2005**, *26*, 327 – 340.
6. Hartl, J., Palát, K.: *Farmaceutická Chemie I.* 2. vyd. Praha: Karolinum, **2007**, 103 s.
7. Patrick, G.: *Introduction to Medicinal Chemistry* 3rd edition, Oxford, Oxford University Press, **2005**, 741 s.
8. Pařík, P., Jansa, J., Holešová, S., Marek, A., Klimešová, V.: *J. Heterocycl. Chem.* **2011**, v tisku.
9. Klimešová, V., Kočí, J., Pour, M., Stachel, J., Waisser, K., Kaustová, J.:
Eur. J. Med. Chem. **2002**, *37*, 409 – 418.
10. Kočí, J., Klimešová, V., Waisser, K., Kaustová, J., Dahse, H. M., Möllmann, U.:
Bioorg. Med. Chem. Letters **2002**, *22*, 3275-3278.
11. Ashtekar, D. R., Costa-Perira, R., Nagrajan, K., Viashvanathan, N., Bhatt, A. D., ,
Rittel, W.: *Antimicrob. Agents Chemother.* 1993, *37*, 183 – 186.
12. Matsumoto, M., Hashizume, H., Tomishige, T., Kawasaki, M., Tsubouchi, H.,
Sasaki, H., Shimokawa, Y., Komatsu, M.: *PLoS Med.* **2006**, *3*, 2131-
13. Tomioka, T., Tatano, Y., Yasumoto, K., Shimizu, T.: *Expert Rev. Resp. Med.* **2008**,
2, 455-471.
14. Singh, R., Manjunatha, U., Boshoff, H. I. M., Ha, Y. H., Niyomrattanakit, P.,
Ledwidge, R., Dowd, C. S., Lee, I. Y., Kim, P., Zhang, L., Kang, S., Keller, T. H.,
Jiricek, J., Barry, C. E. 3rd.: *Science* **2008**, *322*, 1392-1395.
15. Patent US2007148093A1, **2007-01-28**.
16. Patent US2009281088A1, **2009-11-12**.
17. Patent WO2011014776A1, **2011-02-03**.
18. Deidda, D., Lampis, G., Fioravanti, R., Biava, M., Porretta, G. C., Zanetti, S.,
Pompei, R.: *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, *11*, 3035–3037.
19. Biava, M. Porretta, G. C., Poce, G., Supino, S., Deidda, D., Pompei, R., Molicotti,
P., Manetti, F., Botta, M.: *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 4946-4952.

20. Biava, M., Porretta, G C, Poce, G., De Logu, A., Meleddu R., De Rossi E., Manetti F., Botta, M.: *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 4734 – 4738.
21. Navarrete-Vazquez, G., Molina-Salinas, G. M., Duarte-Fajardo, Z. V., Vargas-Villarreal, J., Estrada-Soto, S., Gonzalez-Salazar, F., Hernandez-Nunez, E., Said-Fernandez, S.: *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 5502 - 5507.
22. Lilienkampf, A., Pieroni, M., Wan, B., Wang, Y., Franzblau, S. G., Kozikowski, A. P., *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 678–688.
23. Pytela, O., Klimešová, V.: *Chem. Pharm. Bull.* **2011**, *59*, 179—184.
24. Bureš, F., Kulhánek, J.: *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 1347–1354.
25. Cvejn, D.: Bakalářská práce, Univerzita Pardubice, Pardubice, **2008**.
26. Rogers, G. A., Bruice, T. C.: *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 2463 - 2465.
27. Anastassiadou, M., Baziard-Mouysset, G., Payard, M.: *Synthesis* **2000**, *13*, 1814 - 1816.
28. Anastassiadou, M., Danoum, S., Crane, L., Baziard-Mouysset, G., Payard, M., Caignard D.-H., Rettori, M.-C., Renard, P.: *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, *9*, 585 - 592.
29. de la Hoz, A., Díaz-Ortiz, Á., Mateo, M.-d.-C., Moral, M., Moreno, A., Elguero, J., Foces-Foces, C., Rodríguez, M. L., Sánchez-Migallón, A.: *Tetrahedron.* **2006**, *62*, 5868 - 2874.
30. Marsilje, T. H., Roses, J. B., Calderwood, E. F., Stroud, S. G., Forsyth, N. E., Blackburn, C., Yowe, D. L., Miao, W., Drabic, S. V., Bohane, M. D., Daniels, J. S., Li, P., Wu, L., Patane, M. A., Claiborne. C. F.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 3721 – 3725.
31. Ishiara, M., Togo, H.: *Synlett.* **2006**, *2*, 227 - 230.
32. Haneda, S., Okui, A., Ueba, C., Hayashi, M.: *Tetrahedron.* **2007**, *63*, 2414 - 2417.
33. Abdollahi-Alibeik, M., Mohammadpoor-Baltork, I., Zolfigol, M. A.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 6079 – 6082.
34. Foces-Foces, C, Llamas-Saiz, A. L., Claramunt, R. M., Cabildo, P., Elguero, J.: *Journal of Molecular Structure* **1998**, *440*, 193 – 202.
35. Klem, R. E., Skinner, H. F., Walba, H., Isensee, R. W.: *J. Heterocycl. Chem.* **1970**, *7*, 403 - 408.
36. Fife, T. H., Bambery, R. J., Demark, B. R.: *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 5500 – 5507.
37. Baldwin, J. J., Christy, M. E., Denny, G. H., Habecker, C. N., Freedman, M. B., Lyle, P. A., Ponticello, G. S., Varga, S. L., Gross, D. M. , Sweet, C. S.: *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 1065 - 1080.

38. Hagedorn, A. A. III, Erhardt, P. W., Lumma, W. C. Jr., Wohl, R. A., Cantor, E., Chou, Y.-L., Ingebretsen, W. R., Lampe, J. W., Pang, D., Pease, C. A., Wiggins, J.: *J. Med. Chem.* **1987**, *30*, 1342 - 1347.
39. Nakamura, T., Sato, M., Kakinuma, H., Miyata, N., Taniguchi, K., Bando, K., Koda, A., Kameo, K.: *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 5416-5427.
40. Jensen, N. P., Schmitt, S. M., Windholz, T. B., Shen, T. Y., Mandel, L. R., Lopez-Ramos, B., Porter, C. C.: *J. Med. Chem.* **1972**, *15*, 341 - 344.
41. Jones, H., Fordice, M. W., Greenwald, R. B., Hannah, J., Jacobs, A., Ruyle, W. V., Walford, G. L., Shen, T. Y.: *J. Med. Chem.* **1978**, *21*, 1100 - 1104.
42. Young, M. B., Barrow, J. C., Glass, K. L., Lundell, G. F., Newton, C. L., Pellicore, J. M., Rittle, K. E., Selnick, H. G., Stauffer, K. J., Vacca, J. P., Williams, P. D., Bohn, D., Clayton, F. C., Cook, J. J., Krueger, J. A., Kuo, L. C., Dale Lewis, S., Lucas, B. J., McMasters, D. R., Miller-Stein C., Pietrak, B. L., Wallace, A. A., White, R. B., Wong, B., Yan, Y., Nantermet, P. G.: *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 2995 - 3008.
43. Médebielle, M., Oturan, M. A., Pinson, J., Savéant, J.-M.: *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 1331 - 1340.
44. Chanma, M., Combellas, C., Thiébault, A.: *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 8015 – 8022.
45. Marek, A., Kulhánek, J., Bureš, F.: *Synthesis* **2009**, *2*, 325-331.
46. Bellina, F., Calandri, C., Cauteruccio, S., Rossi, R.: *Tetrahedron* **2007**, *63*, 1970 – 1980.
47. Kulhánek, J., Bureš, F., Pytela, O., Mikysek, T., Ludvík, J., Růžička, A.: *Dyes and Pigments* **2010**, *85*, 57 – 65.
48. Bellina, F., Cauteruccio, S., Rossi, R.: *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, *7*, 1379 - 1382.
49. Bellina, F., Cauteruccio, S., Monti S., Rossi, R.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 5757 - 5762.
50. Altman, R. A., Koval, E. D., Buchwald, S. L.: *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 6190 - 6199.
51. Schaefer, F. C., Peters, G. H.: *J. Org. chem.* **1961**, *26*, 412 – 418.
52. Bureš, F.: Disertační práce, Universita Pardubice, Pardubice **2005**.
53. Treder, A. P., Andruszkiewicz, R., Walkowiak, A., Zgoda, W., Ford, C., Hudson, A. L.: *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 156 – 167.
54. Patent US6369034 B1 **2002**-4-9.
55. Bose, D. S., Thurston, D E.: *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 6903 – 6906.
56. Patent US2008/194535 A1 **2008**-08-14.

57. Guianvarc'h, D., Fourrey, J.-L., Dau, M.-E., Tran H.; Guerineau, V.: *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3724 – 3732.
58. Twyman, L. J., Beezer, A. E., Esfand, R., Mathews, B. T., Mitchell, J. C.: *J. Chem. Res.* **1998**, *12*, 3408 – 3460.