

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

**QSPR A ELEKTROCHEMICKÁ OXIDACE
1-FENYL-5-BENZYLSULFANYLTETRAZOLŮ**

Diplomová práce
studijního programu Klinická a toxikologická analýza

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele RNDr. Karla Nesměráka, Ph.D., a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze, 30. dubna 2008.

Obsah

	Seznam použitých zkratk a symbolů	5
1	Úvod	7
1.1	Cíl práce	7
1.2	Tetrazoly	8
1.2.1	Chemické a fyzikální vlastnosti tetrazolů	8
1.2.2	Tetrazoly jako potenciální antituberkulotika	9
1.2.3	Další farmakologické využití tetrazolů	12
1.2.4	Nefarmaceutická využití tetrazolů	13
1.2.5	Elektrochemické studie tetrazolů	14
1.2.6	Chromatografické studie tetrazolů	14
1.3	Vliv substituentů na fyzikálně-chemické vlastnosti látek	15
1.3.1	Vliv substituentů na elektrochemické vlastnosti látek	16
1.3.2	Vliv substituentů na chromatografické chování látek	16
1.4	Využití elektrochemické oxidace při studiu metabolismu farmaceuticky aktivních látek	18
2	Experimentální část	19
2.1	Studované látky	19
2.2	Použité chemikálie	20
2.3	Použité metody	20
2.3.1	DC voltametrie s rotující diskovou elektrodou	20
2.3.2	Kapalinová chromatografie s UV detekcí	21
2.3.3	Molekulová absorpční spektrometrie v UV oblasti	21
2.3.4	Preparativní elektrolyza	22
2.3.5	Plynová chromatografie s hmotnostním detektorem	22
2.3.6	Infračervená spektroskopie	23
2.4	QSAR, regresní a statistické výpočty	23

Obsah	4
3	Výsledky a diskuse 24
3.1	Vliv substituentů na voltametrické chování tetrazolů 24
3.1.1	Stanovení půlvlnového potenciálu 24
3.1.2	QSER s energiemi HOMO orbitalů 26
3.1.3	QSER se substituentovými konstantami 27
3.2	Vliv substituentů na retenční chování studovaných látek 30
3.2.1	Stanovení retenčních faktorů 30
3.2.2	QSRR s rozdělovacím koeficientem oktanol/voda 34
3.2.3	QSRR s hydrofobními substituentovými π konstantami 35
3.3	Příprava a identifikace elektrooxidačních produktů 37
3.3.1	Příprava elektrooxidačních produktů 37
3.3.2	Identifikace elektrooxidačních produktů 38
3.3.3	Diskuse k elektrooxidačním produktům 41
4	Závěr 43
	Literatura 45

Seznam použitých zkratk a symbolů

a	koeficient korelační rovnice	
A	plocha elektrody <i>nebo</i> absorbance	[cm ²]
b	koeficient korelační rovnice	
c	molární koncentrace	[mol dm ⁻³]
DC	difúzí řízená voltametrie	
E	potenciál	[V]
$E_{1/2}$	půlvlnový potenciál	[V]
$(E_{1/2})_H$	půlvlnový potenciál nesubstituovaného derivátu	[V]
$(E_{1/2})_X$	půlvlnový potenciál substituovaného derivátu	[V]
$E_{1/2}^{\text{exp.}}$	experimentální hodnota půlvlnového potenciálu	[V]
$E_{1/2}^{\text{vyp.}}$	vypočítaná hodnota půlvlnového potenciálu	[V]
F	„field“ substituentová konstanta dle Norringtona <i>nebo</i> hodnota F-testu <i>nebo</i> kritická hodnota F-testu pro n měření na hladině významnosti α	
F_m	průtoková rychlost mobilní fáze	[ml min ⁻¹]
F_{R1}	Norringtonova substituentová konstanta F na fenylovém jádře	
F_{R2}	Norringtonova substituentová konstanta F na benzylovém jádře	
$F_{\text{tab.}}$	tabelovaná kritická hodnota F-testu pro n měření na hladině významnosti α	
HOMO	nejvyšší obsazený molekulový orbital	
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie	
I	proud <i>nebo</i> indikátorová konstanta	[A]
k	retenční faktor	
k_0	retenční faktor pro mobilní fázi s nulovým procentem organické složky	
K_H	rovnovážná nebo rychlostní konstanta nesubstituovaného derivátu	
K_X	rovnovážná nebo rychlostní konstanta substituovaného derivátu	
l	délka absorbující vrstvy	[m]
LUMO	nejnižší neobsazený molekulový orbital	
M	molární hmotnost	[g mol ⁻¹]
m	hmotnost	[g]
MIC	minimální inhibiční koncentrace	[μ mol l ⁻¹]
MS	hmotnostní spektroskopie	

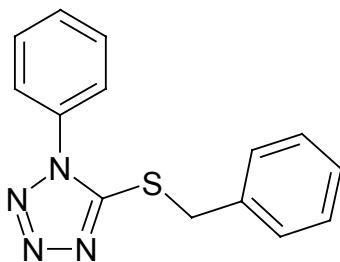
m/z	hmotnost/náboj	
n	počet měření	
P	rozdělovací koeficient oktanol/voda	
P_H	rozdělovací koeficient oktanol/voda nesubstituovaného derivátu	
P_X	rozdělovací koeficient oktanol/voda substituovaného derivátu	
QSAR	Quantitative structure-activity relationships	
QSER	Quantitative structure-electrochemistry relationships	
QSPR	Quantitative structure-property relationships	
QSRR	Quantitative structure-retention relationships	
r	korelační koeficient	
R	„resonance“ substituentová konstanta dle Norringtona	
R^1	substituent na fenylovém jádře	
R^2	substituent na benzylovém jádře	
R_{R1}	Norringtonova substituentová konstanta R na fenylovém jádře	
R_{R2}	Norringtonova substituentová konstanta R na benzylovém jádře	
s_y	směrodatná odchylka lineární regrese	
T	transmittance	[%]
t	čas	[s]
	<i>nebo</i> teplota	[°C]
t_M	mrtvý retenční čas	[s]
t_R	retenční čas	[s]
UV	ultrafialová oblast spektra	
ν	rychlost polarizace elektrody	[V s ⁻¹]
	<i>nebo</i> vlnčet	[cm s ⁻¹]
w	objemový zlomek	
α	hladina významnosti	
ϵ_{HOMO}	energie nejvyššího obsazeného molekulového orbitalu	[eV]
λ	vlnová délka	[nm]
π	substituentová konstanta hydrofobicity	
π_{R1}	konstanta hydrofobicity substituentu na fenylovém jádře	
π_{R2}	konstanta hydrofobicity substituentu na benzylovém jádře	
σ	Hammettova substituentová σ konstanta	
σ_{R1}	Hammettova substituentová σ konstanta substituentu na fenylu	
σ_{R2}	Hammettova substituentová σ konstanta substituentu na benzylu	
ρ	Hammettova reakční ρ konstanta	
ω	úhlová rychlost rotace elektrody	[s ⁻¹]

1 ÚVOD

1.1 CÍL PRÁCE

Cílem předkládané diplomové práce je elektrochemické a chromatografické studium série nově syntetizovaných 1-fenyl-5-benzylsulfanyltetrazolů vykazujících antimykobakteriální účinky. Vzorec základního skeletu je uveden na obr. 1.1, struktury všech studovaných látek jsou uvedeny v tabulce 2.1 i s číslováním, které je použito v celé práci.

První část práce se zabývá studiem vlivu substituentů na voltametrické chování (půlvolný potenciál) studovaných derivátů. Druhá část práce je zaměřena na studium závislosti retenčního faktoru studovaných látek na druhu substituentů a složení mobilní fáze při HPLC studovaných tetrazolů. Vliv substituentů na obě sledované veličiny byl kvantifikován nalezením příslušných QSPR rovnic. Cílem třetí, závěrečné části diplomové práce byla příprava a identifikace produktů elektrochemické oxidace vybraných zástupců studovaných látek.

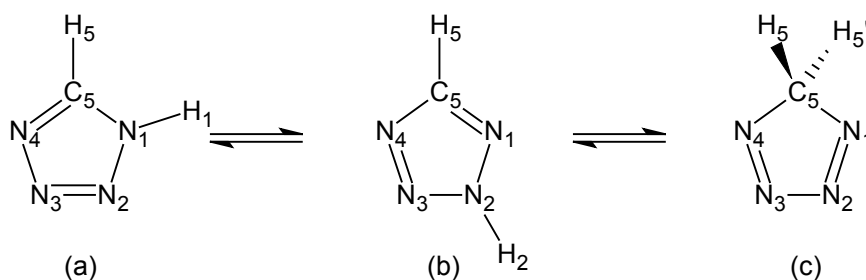


Obr. 1.1 Chemická struktura 1-fenyl-5-benzylsulfanyltetrazolu

1.2 TETRAZOLY

1.2.1 Chemické a fyzikální vlastnosti tetrazolů

Tetrazol je heterocyklická sloučenina obsahující kruhový systém tvořený jedním atomem uhlíku a čtyřmi atomy dusíku (patří tedy do skupiny tzv. azolů). Molekula tetrazolu existuje ve třech tautomerních formách (obr.1.2).



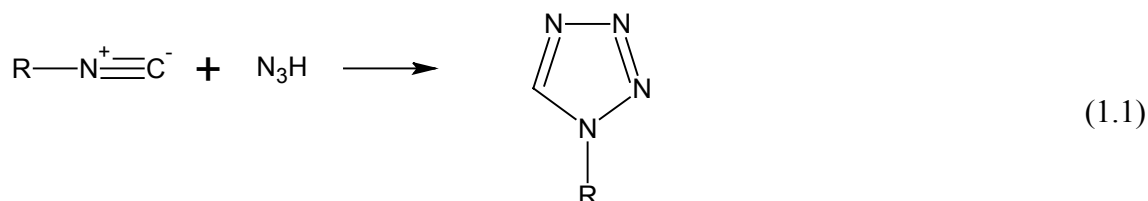
Obr.1.2 Tautomerní struktury tetrazolu (a) 1*H*-tetrazol, (b) 2*H*-tetrazol, (c) 5*H*-tetrazol.

Konjugační energie je pro tetrazoly vyšší (209 kJ mol^{-1}) než pro pyrazoly ($96,2 \text{ kJ mol}^{-1}$), které obsahují v molekule pouze dva atomy dusíku. Aromatický charakter má jen 1*H*- a 2*H*-tetrazol. Konjugační energie 5*H*-tetrazolu je pouze 85 kJ mol^{-1} , z čehož lze předpokládat, že tento tautomer nemá aromatický charakter¹. Chemické vlastnosti tetrazolu závisí na jeho tautomerii. V plynné fázi při nízkých teplotách je preferována ve směsi 2*H*-forma. Při zvýšení teploty však dochází k převážením 1*H*-formy². Výsledné změny ve struktuře tetrazolu pomáhají vysvětlit pozorované fragmentace tetrazolu v hmotnostních spektrech³.

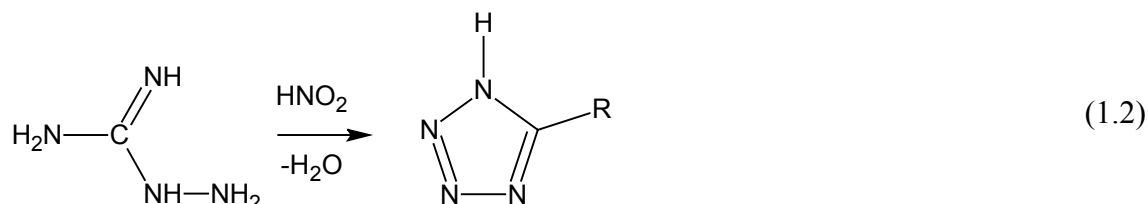
Se zvyšující se konjugační energií se u těchto sloučenin zvyšuje i stálost vůči oxidaci. Struktura azolů obsahuje trojvazný atom dusíku, jehož volný elektronový pár se nezapojuje do aromatické konjugace heterocyklického jádra. Tato vlastnost dává azolům obvykle zásaditý charakter. Naproti tomu azoly, v jejichž struktuře se objevuje skupina N-H, mají vlivem druhého heteroatomu a celého heterocyklického jádra zvýšenou schopnost odštěpit proton. To se projevuje na zvýšené kyselosti jádra. Se zvyšujícím se počtem heteroatomů, jejichž elektronegativita je větší než uhlíku, se zvyšuje i polarita jádra. Molekula tetrazolu, která obsahuje čtyři heteroatomy, se tak svým kyselým charakterem blíží kyselosti karboxylových kyselin⁴, jeho $pK_a = 4,90$. Tetrazol

je krystalická látka o bodu tání 155 °C až 156 °C, která při zahřátí na vyšší teplotu vybuchuje.

Deriváty tetrazolu, N-alkyltetrazoly i N-aryltetrazoly, lze například připravit reakcí isokyanidů s azoimidem



Pro přípravu 5-alkyltetrazolů nebo 5-aryltetrazolů lze použít kondenzaci amidrazonů s kyselinou dusitou⁵



Deriváty tetrazolů se staly předmětem zájmu velkého množství prací zabývajících se jejich syntézou⁶⁻⁸ a studiem jejich fyzikálně-chemických vlastností⁹⁻¹¹.

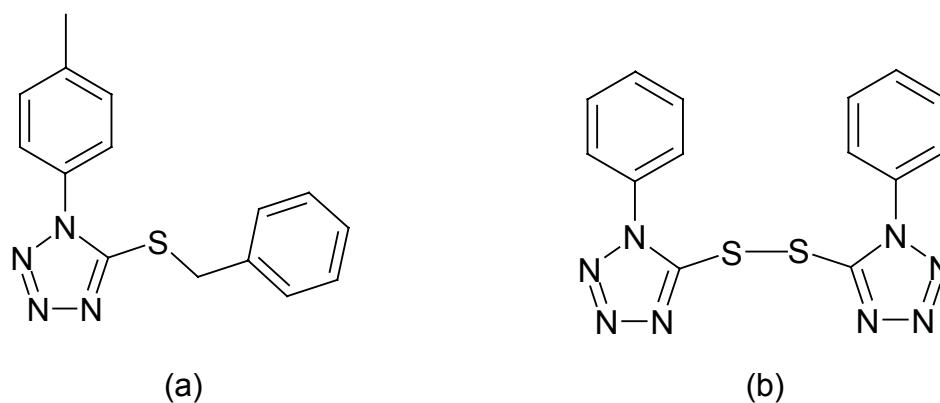
1.2.2 Tetrazoly jako potenciální antituberkulotika

Antimykobakteriální léky používané k léčbě tuberkulózy nazýváme antituberkulotika nebo tuberkulostatika. Tyto léky dělíme do dvou řad. Látky 1. řady mají vysokou účinnost a nízkou toxicitu; patří sem např. isoniazid, který se často využívá i jako standard pro srovnání účinnosti nových potenciálních léčiv. Látky 2. řady mají nižší účinnost a vyšší toxicitu, ale působí na rezistentní kmeny; sem patří kapreomycin, kanamycin nebo amikacin. Antituberkulotika 2. řady se používají až při neúspěchu léčby látkami 1. řady¹².

Na počátku 21. století by se mohlo zdát, že tuberkulóza patří mezi vymýcená onemocnění. Opak je pravdou, údaje Světové zdravotnické organizace vykazují v některých zemích stoupající tendenci¹³. Počet onemocnění vyvolaného *Mycobacterium tuberculosis* roste rovněž se zvyšujícím se výskytem nemoci AIDS.

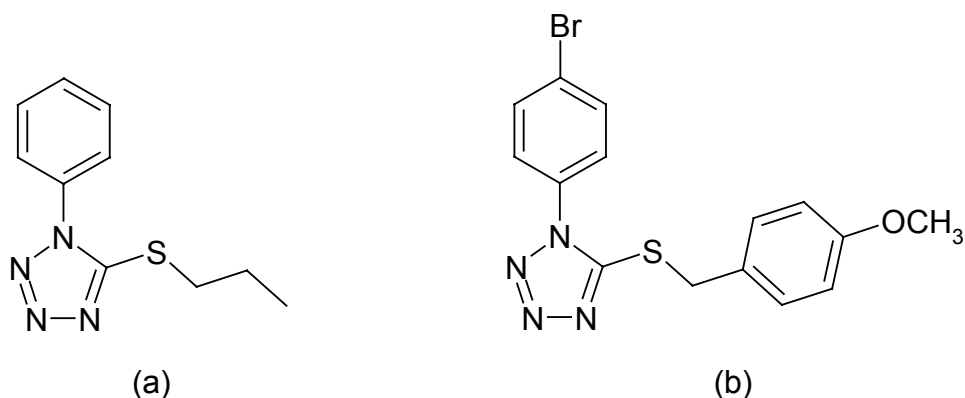
Léčba tuberkulózy je stěžována několika fakty¹⁴. Řada dříve neinfekčních kmenů druhu *Mycobacterium* se stává infekčními. Zároveň roste množství infekčních kmenů rezistentních proti dosud používaným léčivům. To je důvod proč se při léčbě pacientům podávají dvě až čtyři tuberkulostatika zároveň. TBC se také často vyskytuje u pacientů s oslabeným imunitním systémem, a nemusí se jednat jen o pacienty s HIV, ale například o pacienty po chemoterapiích u nichž je léčba TBC rovněž ztížena¹⁵. Z toho plyne potřeba hledání nových a účinnějších léčiv na tuto chorobu.

Při hledání nových antituberkulotik se vychází ze zjištění, že jedním z farmakoforů protituberkulózní aktivity je alkylthioskupina na atomu elektronově deficitního uhlíku¹⁶. Tuto teorii potvrzuje i přípravek ditophal (S,S'-diethyl-dithioisofthalát), který byl používán pro léčbu lepry, jejímž původcem je bakterie *Mycobacterium leprae*^{17, 18}. Waisser a kol.¹⁹ prokázali aktivitu ve skupině 5-alkylthiotetrazolů u sloučeniny 1-tolyl-5-benzylthiotetrazolu (obr. 1.3), jehož minimální inhibiční koncentrace (MIC) ale dosahovala jen trojnásobku MIC izoniazidu. Ve skupině 5-alkylsulfanyl-1-fenyltetrazolů bylo prokázáno²⁰, že vliv alkyly vázaného na síře je mnohem významnější než vliv methylové substituce na fenylu a aktivita zde vzrůstá se zvyšující lipofilitou alkylového řetězce. Proti kmenům *M. tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. avium* a *M. fortuitum* se ukázal jako nejúčinnější 5-butylsulfanyl-(3,4-dimethylfenyl)tetrazol. Ve skupině tetrazolyl-disulfidů byla nalezena²¹ protituberkulózní aktivita u 5-bis-(1-fenyl-1,2,3,4-tetrazolyl)-disulfidu (obr. 1.3), který při *in vitro* hodnocení dosahoval aktivity kyseliny *p*-aminosalicylové proti *M. tuberculosis* a *M. kansasii*. Z této skupiny je ještě významným derivátem bis(4-chlorfenyltetrazol-5-yl)disulfid, jehož aktivita předčila všechny používané standardy proti atypickým kmenům. Aktivita v této skupině je přikládána právě disulfidické struktuře, jelikož výchozí struktura 1-aryl-5-tetrazolthiolu se ukázala jako kompletně neaktivní.



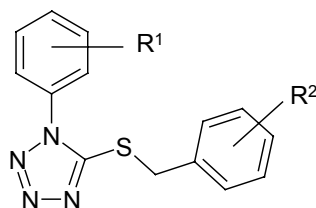
Obr. 1.3. Chemická struktura (a) 1-tolyl-5-benzylthiotetrazolu, (b) 5-bis-(1-fenyl-1,2,3,4-tetrazolyl)-disulfidu.

Při studiu dalších derivátů tetrazolu bylo zjištěno²², že deriváty 1-aryl-5-benzylsulfanyltetrazolů se projevují jako více aktivní než deriváty 1-aryl-5-alkylsulfanyltetrazolů (obr. 1.4). Ve skupině derivátů 1-aryl-5-benzylsulfanyltetrazolů jsou za zdroj antituberkulotické aktivity pokládány substituenty na fenylovém a benzylovém jádře. Největší aktivita byla prokázána u 1-(4'-bromfenyl)-5-(4''-methoxybenzyl)sulfanyltetrazolu (obr. 1.4).



Obr. 1.4. Chemická struktura (a) 1-aryl-5-alkylsulfanyltetrazolu, (b) 1-(4'-bromfenyl)-5-(4''-methoxybenzyl)sulfanyltetrazolu.

V další práci²³ však došlo ke zjištění, že největší inhibiční aktivitu má nesubstituovaný 1-fenyl-5-benzylsulfanyltetrazol nebo jeho deriváty substituované chlorem na fenylovém jádře (tab. 1.1.).

Tab. 1.1 Struktury a minimální inhibiční koncentrace derivátů 1-fenyl-5-benzylsulfanyltetrazolu proti *M. tuberculosis* (podle^{24,25})

derivát ^a	R ¹		R ²		MIC μmol l ⁻¹	derivát ^a	R ¹		R ²		MIC μmol l ⁻¹
	poloha	substituent	poloha	substituent			poloha	substituent	poloha	substituent	
6	4	-Cl	4	-OCH ₃	32	20	4	-OCH ₃			32
12	4	-CH ₃	4	-OCH ₃	32	21			4	-CH ₃	62,5
13	4	-OCH ₃	4	-Cl	62,5	24	4	-CH ₃	4	-CH ₃	62,5
15	4	-OCH ₃	4	-OCH ₃	32	25	4	-OCH ₃	4	-CH ₃	62,5
16					16	29	4	-Br	4	-OCH ₃	62,5
17	4	-Cl			16	34	3,4	-Cl ₂	4	-F	62,5
18	3,4	-Cl ₂			16	36	4	-OCH ₃	4	-F	125
19	4	-CH ₃			32	INH^b					0,5

^a Čísla odpovídají číslům derivátů studovaných v této diplomové práci; srv. tab. 2.1.

^b izoniazid.

1.2.3 Další farmakologické využití tetrazolů

V literatuře lze najít informace o anorektické aktivitě 5-fenyl-1,2,3,4-tetrazolů, které vykazovaly i nižší toxicitu než běžně používaný fentermin²⁶.

Ve skupině derivátů 1-fenyl-5-merkaptotetrazolu byl prokázán i významný analgetický účinek²⁷. Zvláště skupina karbazidů projevila ve srovnání s aminofenazonem až 70% inhibici bolesti. Orientační akutní toxicita všech látek je vyšší než 1 g kg⁻¹ u krysy.

U 1-*p*-bromfenyl-5-merkaptotetrazolu byl nalezen potencionální tyreostatický účinek²⁸. Při podávání této látky významně poklesla hladina tyroxinu a zároveň se na pokusné skupině potkanů neprojevily žádné vedlejší účinky. Látka dokonce vykazovala větší účinnost než použitý standard karbimazol.

V poslední době je zkoumán inhibiční účinek tetrazolů na monoaminoxidázy A i B (cit. ²⁹). Nejúčinnější se ukázal 5-(4-arylmethoxyfenyl)-2-(2-kyanoethyl)tetrazol, který by mohl být dále používán jako lék proti Parkinsonově nemoci a ostatním neurodegenerativním onemocněním. Své využití nachází i při tomografické diagnostice těchto chorob³⁰.

Kromě výše uvedených potenciálních léčiv lze tetrazolový kruh nalézt i v celé řadě již klinicky používaných léčiv. Jako diuretikum je úspěšně používán azosemid,

systematicky 2-chloro-5-(1*H*-tetrazol-5-yl)-4-((2-thienylmethyl)amino)-benzensulfonamid, který je silnější než běžně užívaný furosemid³¹ a je i bezpečnější při použití u pacientů se srdečním onemocněním³². Ke zvýšení účinnosti azosemidu došlo při jeho současném podávání s askorbovou kyselinou³³, která pravděpodobně inhibuje metabolismus azosemidu ve střevě a snižuje pH moči, což vede ke zvýšení dostupnosti neionizovaného léčiva v receptorových místech.

Významnou roli při regulaci krevního tlaku a iontové rovnováhy hrají antagonisté AT1 receptorů pro angiotensin II jakými jsou sartany (mezi něž patří losartan, losartan metabolit, valsartan, irbesartan, candesartan cilexetil, candesartan a eprosartan), které obsahují v molekule rovněž tetrazolový kruh³⁴. Podobně byla prokázána inhibiční aktivita tetrazolových derivátů u draselných kanálů³⁵.

Cilostazol s antitrombotickým a vazodilatačním účinkem působí jako inhibitor fosfodiesterázy a používá se při prevenci zánětlivých procesů u hypertenzních pacientů s non-inzulin dependentním diabetem^{36, 37}. Tato sloučenina se navíc ukazuje i jako nadějný lék pro prevenci mozkových ischemií³⁸.

1.2.4 Nefarmaceutická využití tetrazolů

Deriváty tetrazolů jsou pro své vlastnosti využívány v různorodých oblastech průmyslu. Pro své výbušné a hořlavé vlastnosti je 5-aminotetrazol a bis-(1(2)H-tetrazol-5-yl)-amin využíván v automobilovém průmyslu jako součást plynových generátorů pro airbagy³⁹⁻⁴¹.

Ve fotografickém průmyslu našly uplatnění merkaptotetrazoly jako stabilizátory fotografických směsí^{42, 43}.

Deriváty 5-alkyl-1*H*-tetrazolů katalyzují hydrolýzu vysoce toxických organofosfátů (používaných jako pesticidy) a mohou tak být používány k jejich odstranění⁴⁴.

Tetrazoliové soli, např. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazolium bromid (MTT), jsou používány v biochemické a toxikologické diagnostice⁴⁵⁻⁴⁷. Stanovení jsou založena na sledování barevné změny způsobené redukcí jádra tetrazoliové soli, což se využívá k měření cytotoxicity látek či buněčné proliferace⁴⁸.

1.2.5 Elektrochemické studie tetrazolů

Elektrochemickému studiu tetrazolů nebyla prozatím věnována přílišná pozornost. Podrobněji byla studována zejména elektrochemická redukce. Akbulut a kol.⁴⁹ studovali elektrochemickou redukci aryloxytetrazolů ve vodném prostředí a v prostředí dimethylformamidu. Při redukci dochází k štěpení vazby Ar-O.

Niyazymbetov a Petrosyan⁵⁰ studovali redukci tetrazolů metodou DC polarografie s rotující diskovou platinovou elektrodou v prostředí 0,1 mol dm⁻³ Bu₄NClO₄ v acetonitrilu. U 5-trichlor-methyltetrazolu dochází k štěpení vazby C-Cl dvouelektronovým pochodem a vzniku 5-dichlormethyltetrazolu. Nesubstituovaný tetrazol a 5-methyltetrazol jsou redukovány jednoelektronovým procesem za štěpení N-H vazby a vzniku příslušného N-anionu.

V práci Jordanovského a kol.⁵¹ byly studovány základní elektrochemické charakteristiky 1-benzyltetrazol-5-thiolu pomocí klasické DC polarografie, cyklické a SW voltametrie na rtuťové elektrodě. Bylo zjištěno, že thiolová skupina je schopna disociace, což se projevilo snížením půlvlnového potenciálu zároveň se zvyšující se hodnotou pH.

Nesměrák a kol.⁵² studovali elektrochemickou oxidaci derivátů 1-fenyl-5-merkaptotetrazolu na rotující diskové platinové elektrodě v prostředí acetonitrilu. Bylo zjištěno, že oxidace probíhá v jednom ireverzibilním kroku, při kterém dochází k výměně jednoho elektronu. Produktem elektrooxidace je disulfidický dimer.

1.2.6 Chromatografické studie tetrazolů

Ke stanovení derivátů tetrazolu v krevní plazmě byla vypracována HPLC metoda⁵³, při které bylo použito kolony ODS-3 RAC a fluorimetrické detekce při vlnových délkách od 370 do 410 nm. Mobilní fáze byla složena z methanolu a vody v poměru 45:55 s přídavkem 0,31 % octové kyseliny.

Helms a kol.⁵⁴ vyvinuli metodu HPLC pro stanovení tetrazolů v plazmě i v moči za použití kolony RP OTS-3 s UV detekcí při 254 nm. Mobilní fází byla opět směs methanolu a vody v poměru 48:52. Pro velké množství vzorků nabízí tato metoda rychlou separaci od biologické matrice, minimální nároky na úpravu vzorků a vysokou citlivost.

Metody HPLC bylo použito pro zjištění stability tetrazolů v krmivech při testování léčiva na laboratorních zvířatech⁵⁵. K separaci byla použita kolona Bondapak fenyl/Corasil, mobilní fáze acetonitril – 0,1 mol dm⁻³ fosfátový pufr pH = 3,2 v poměru 25:75. Látky byly detekovány UV detekcí při 254 nm.

Vzhledem ke zvyšujícímu se zájmu o sartany byly vyvinuty metody pro stanovení losartanu a jeho hlavního metabolitu draselné soli losartanu^{56–58}.

1.3 VLIV SUBSTITUENTŮ NA FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÉ VLASTNOSTI LÁTEK

Jak fyzikálně-chemické vlastnosti tak biologické účinky chemických sloučenin jsou podmíněny strukturou jejich molekuly. Studium vztahů mezi chováním látek a jejich strukturou se zabývají metody QSPR analýzy (angl. Quantitative Structure-Property Relationship = kvantitativní vztahy mezi vlastnostmi a strukturou), které se snaží matematickou modelací stanovit obecnější vztahy mezi strukturou a vlastnostmi látek⁵⁹.

Základ těmto metodám dal roku 1935 Louis Plack Hammett, který formuloval první rovnici popisující vztah mezi strukturou a vlastnostmi látky

$$\log K_X = \log K_H + \rho\sigma \quad (1.3)$$

kde K_X je rychlostní konstanta procesu, který je měřen se substituovanou molekulou derivátu, K_H je rychlostní konstanta procesu, který je měřen s nesubstituovanou molekulou derivátu, ρ je empirická konstanta charakterizující reakci a nezávisící na substituentu a σ je empirická Hammettova substituentová konstanta, která popisuje elektronový efekt substituentu.

Jednou z možností jak lze popsat fyzikálně-chemické vlastnosti derivátu jsou tedy substituentové konstanty, které jsou vztaženy pouze na substituenty matečné části molekuly. Tyto konstanty mají kvantitativní charakter a proto lze vlastnosti molekul charakterizovat číslem. Pak je možné ovlivňovat vlastnosti a chování látek změnou polohy, druhu nebo počtu substituentů.

1.3.1 Vliv substituentů na elektrochemické vlastnosti látek

V elektrochemii si vlivu substituentů na elektrochemické chování látek povšiml již J. Heyrovský. Postupně bylo studováno polarografické resp. voltametrické chování řady substitučních derivátů mnoha látek, přičemž se ukázalo, že mezi půlvalnovými potenciály a Hammettovými konstantami existuje obvykle přímý lineární vztah⁶⁰, Hammettova rovnice (1.2) pak přejde do tvaru

$$(E_{1/2})_X = (E_{1/2})_H + \rho\sigma \quad (1.4)$$

neboli Hammettovu rovnici pro půlvalnové potenciály, kde $(E_{1/2})_X$ označuje půlvalnový potenciál substituovaného derivátu, $(E_{1/2})_H$ půlvalnový potenciál nesubstituovaného derivátu, ρ Hammettovu reakční konstantu a σ Hammettovu substituentovou konstantu. Existuje však i řada případů, kdy je nutné použít konstanty jinak charakterizující vliv substituentů, např. konstanty Swain-Luptonovy.

Vzhledem k tomu, že při elektrochemické oxidaci, resp. redukci, dochází ke ztrátě nebo dopování elektronu či elektronů do vazebných molekulových orbitalů, mohou být energetické parametry molekuly dobře charakterizovány energiemi nejvyššího obsazeného (HOMO), resp. nejnižšího neobsazeného (LUMO) molekulového orbitalu. V řadě případů lze nalézt těsné korelace mezi energiemi HOMO, resp. LUMO, a půlvalnovým potenciálem^{61, 62}.

Nověji bylo pro hodnocení vlivu substituentů na elektrochemické chování navrženo pojmenování QSER (angl. Quantitative Structure-Electrochemistry Relationships = kvantitativní vztahy mezi strukturou a elektrochemií)⁶³.

1.3.2 Vliv substituentů na chromatografické chování látek

Ke zjištění, že narkotický účinek neutrálních organických sloučenin závisí na jejich rozdělovacím koeficientu v systému olej-voda, došel již před více než 100 lety E. Overton⁶⁴. Konstanta rozdělovacího koeficientu oktanol/voda P je společně s konstantou hydrofobicity π důležitým parametrem hydrofobicity, jenž určuje chemické chování látek, stejně jako jejich chování v biologickém systému. Jedná se o experimentální konstanty, vyjadřující kvantitativně lipofilitu látky, resp. substituentu.

Rozdělovací koeficient oktanol/voda⁶⁵ je důležitou veličinou pro předpovídání biologické účinnosti zkoumané látky, neboť zhruba kvantifikuje teoretickou prostupnost látky biologickými lipofilními membránami, podobnými přibližně svou strukturou oktanolu. Lipofilita je rovněž toxikologicky významným faktorem pro predikci možné kumulace látky v tukových tkáních a je taktéž určující pro způsob eliminace. Ačkoliv existují i jiné konstanty, charakterizující biologickou účinnost molekul v souvislosti s hydrofobicitou, je standardně používanou právě rozdělovací koeficient oktanol/voda. Dnes, coby výsledek dlouhodobého výzkumu a statistických výpočtů, existují matematické postupy, jak teoreticky poměrně spolehlivě odhadnout hodnotu P pouze na základě znalosti molekulové struktury látky⁶⁶. Rozdělovací koeficient P je definován jako poměr rovnovážných koncentrací látky mezi nevodnou a vodnou fází. Této rovnováhy se účastní pouze nedisociovaná forma molekul; je tedy zřejmé, že hodnota rozdělovacího koeficientu závisí na pH prostředí a při odhadu jeho hodnoty je nutné tento faktor zohlednit.

Substituentová konstanta hydrofobicity π , charakterizující příspěvek daného substituentu k celkové hydrofobicitě molekuly, je podobně jako Hammettova σ konstanta substituentovou termodynamickou konstantou, jež je lineárně závislá na změně Gibbsovy energie. Konstantu hydrofobicity π lze vypočítat ze vztahu

$$\pi = \log P_X - \log P_H \quad (1.5)$$

kde P_H je rozdělovací koeficient oktanol/voda pro nesubstituovanou látku a P_X je rozdělovací koeficient oktanol/voda pro substituovaný derivát. Za standard s $\pi = 0$ byl zvolen vodík. Kladných hodnot konstanty π tedy nabývají ty substituenty, které mají větší hydrofobní efekt, než vodík, záporných hodnot konstanty π pak hydrofilnější látky. Známe-li tedy P_H pro základní skelet molekuly, můžeme pomocí π konstant dopočítat lipofilní parametry pro různě substituované deriváty.

Vhodným nástrojem ke studiu hydrofobních vlastností biologicky aktivních organických látek je především vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Studiu problematiky kvantifikace vztahů mezi strukturou a retenčními vlastnostmi sloučenin, zvanému QSRR (angl. Quantitative Structure-Retention Relationships = kvantitativní vztahy mezi strukturou a retencí) se věnoval zejména Kaliszan⁶⁷. Pomocí HPLC byly nalezeny korelace mezi retenčními vlastnostmi sloučenin a parametry lipofily. Zjistilo

se, že mezi retenčním faktorem k a rozdělovacím koeficientem oktanol/voda, resp. konstantou hydrofobicity π , existuje lineární vztah

$$\log P = a \log k + b \quad (1.6)$$

$$\pi = a \log k + b \quad (1.7)$$

kde a je směrnice a b úsek této závislosti.

Výzkum zaměřený na hledání vhodné stacionární fáze, zajišťující lineární závislost mezi $\log k$ a $\log P$, prozatím ukázal coby nejvhodnější stacionární fázi C_{18} silikagel⁶⁸. Obvykle se retenční faktor měří při různých složeních mobilní fáze metanol-voda, resp. acetonitril-voda, a posléze se extrapoluje na mobilní fázi s nulovým procentem organické složky^{69,70}.

1.4 VYUŽITÍ ELEKTROCHEMICKÉ OXIDACE PŘI STUDIU METABOLISMU FARMACEUTICKY AKTIVNÍCH LÁTEK

Jednou z důležitých oblastí farmaceutického výzkumu je studium biotransformace léčiv, které je ovšem *in vivo* značně složité a obtížné. Proto se k němu, alespoň v prvních krocích, využívá jednodušších *in vitro* modelů, z nichž k těm významnějším patří elektrochemický model I. fáze biotransformace. Je založen na podobnosti oxidačně-redukčních reakcí na elektrodě s oxidačně-redukčními enzymatickými reakcemi probíhajícími během I. fáze biotransformace⁷¹. Vlastní studium probíhá obvykle v nevodném prostředí; kromě důvodů elektrochemických (rozpustnost studovaných látek, anodické potenciálové okno) je hlavním důvodem pro použití takového prostředí i to, že řada metabolických reakcí probíhá v prostředí lipofilní povahy (fosfolipidové membrány).

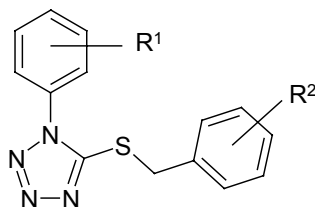
Elektrochemie lze tak výhodně využít k přípravě a studiu metabolitů. Prozatím však nebyly publikovány práce, které by obsahovaly informace o metabolitech tetrazolů, které by byly výsledkem I. fáze biotransformačních reakcí nebo o jejich přípravě. V literatuře byly publikovány práce identifikující (ovšem po *in vivo* experimentu) produkty II. fáze biotransformace tertazolů jako příslušné glukuronidy^{72,73}.

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 STUDOVANÉ LÁTKY

Studované 1-fenyl-5-benzylsulfanyltetrazoly byly syntetizovány²¹ na Katedře anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové. Totožnost a čistota byly stanoveny elementární analýzou, měřením bodu tání a nukleární magnetickou rezonancí. Přehled studovaných látek je podán v tab. 2.1.

Tab. 2.1 Struktury a molární hmotnosti studovaných 1-fenyl-5-benzylsulfanyltetrazolů.



derivát	R ¹		R ²		M g mol ⁻¹
	poloha	substituent	poloha	substituent	
1			4	-Cl	302,78
2			4	-CF ₃	336,34
3			4	-OCH ₃	298,36
4	4	-Cl	4	-Cl	337,23
5	4	-Cl	4	-CF ₃	370,78
6	4	-Cl	4	-OCH ₃	332,81
7	4	-Cl	3	-OCH ₃	332,81
8	3,4	-Cl ₂	4	-Cl	371,67
9	3,4	-Cl ₂	4	-OCH ₃	367,25
10	4	-CH ₃	4	-Cl	316,81
11	4	-CH ₃	4	-CF ₃	350,36
12	4	-CH ₃	4	-OCH ₃	312,39
13	4	-OCH ₃	4	-Cl	332,81
14	4	-OCH ₃	4	-CF ₃	366,36
15	4	-OCH ₃	4	-OCH ₃	328,39
16					268,34
17	4	-Cl			302,78
18	3,4	-Cl ₂			337,23
19	4	-CH ₃			282,36
20	4	-OCH ₃			298,36
21			4	-CH ₃	282,36
22	4	-Cl	4	-CH ₃	316,81
23	3,4	-Cl ₂	4	-CH ₃	351,25
24	4	-CH ₃	4	-CH ₃	296,39
25	4	-OCH ₃	4	-CH ₃	312,39
26	4	-Br			347,23
27	4	-Br	4	-Cl	381,68
28	4	-Br	4	-CF ₃	415,23
29	4	-Br	4	-OCH ₃	377,26
30	4	-Br	4	-CH ₃	361,26
31	4	-Br	4	-F	365,22
32			4	-F	286,33
33	4	-Cl	4	-F	320,77
34	3,4	-Cl ₂	4	-F	355,22
35	4	-CH ₃	4	-F	300,36
36	4	-OCH ₃	4	-F	316,35
37	2	-OCH ₃	4	-OCH ₃	328,42
38	2	-OCH ₃	4	-Cl	332,83
39	2	-OCH ₃			298,39
40	2	-OCH ₃	3	-Cl	332,83
41	2	-OCH ₃	4	-F	316,38
42	2	-OCH ₃	4	-Br	377,28
43	2	-OCH ₃	4	-CH ₃	312,42

2.2 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE

Jako prostředí pro elektrochemické, spektrofotometrické a chromatografické studium byl použit acetonitril Chromasolv (Sigma-Aldrich) s obsahem vody nižším než 0,02 obj. %. Byla používána redestilovaná voda připravená na zařízení UltraPure (Watrex).

Jako základní elektrolyt byl použit chloristan sodný pro HPLC (Fluka). Ostatní použité chemikálie byly analytické čistoty: aceton (Lachema), argon (Linde-Technoplyn), dusičnan stříbrný (Lachema), 1,2-dichlorethan (Penta), thiomocovina (Sigma Aldrich).

2.3 POUŽITÉ METODY

2.3.1 DC voltametrie s rotující diskovou elektrodou

Měření probíhalo v třídílné polarografické nádobce na přístroji Eco-Tribo Polarograf (Eco-Trend Plus, ČR) se sběrem dat softwarem Polar Pro v. 2.0 (Eco-Trend Plus, ČR). Bylo použito tříelektrodové zapojení. Pracovní elektrodou byla platinová rotující disková elektroda o ploše 13,986 mm² (EM-EDI-Pt-D5, Radiometer), rychlost rotace elektrody byla 1226 ot min⁻¹ a rychlost polarizace 10 mV s⁻¹. Elektroda byla umístěna do měřicího prostoru s roztokem základního elektrolytu 0,1 mol dm⁻³ chloristanu sodného v acetonitrilu. Referentní elektrodu tvořil stříbrný plíšek o ploše 4,8 cm² ponořený do roztoku 0,01 mol dm⁻³ dusičnanu stříbrného v 1 mol dm⁻³ roztoku chloristanu sodného v acetonitrilu. Referentní elektroda byla od měřicího prostoru oddělena meziprostorem s náplní 0,5 mol dm⁻³ roztoku chloristanu sodného v acetonitrilu. Pomocná elektroda byla realizována platinovým plíškem o ploše 0,55 cm². Obsah měřicího prostoru byl před každým měřením 5 minut probubláván argonem. Měření probíhalo za laboratorní teploty 22 ± 1 °C.

Ze získaných polarogramů byly vyhodnoceny hodnoty půlvlnových potenciálů $E_{1/2}$.

2.3.2 Kapalinová chromatografie s UV detekcí

Měření bylo prováděno na kapalinovém chromatografu HP 1090 L (Hewlett Packard) na koloně RP C-18 ZORBAX délky 250 mm, průměru 4,6 mm a velikosti zrn 5 μm při laboratorní teplotě. Průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,8 ml min^{-1} . K dávkování vzorků byl použit ventil Rheodyne s nástřikovou smyčkou o objemu 10 μl . Detekce byla spektrofotometrická při vlnové délce 235 nm. Získané chromatogramy byly vyhodnoceny pomocí programu CSW 32.

Mobilní fázi byla směs acetonitrilu a vody o objemovém zlomku acetonitrilu 0,70, 0,65 a 0,60. Roztoky studovaných derivátů o koncentraci 1×10^{-4} mol dm^{-3} byly připraveny v acetonitrilu. Stanovení mrtvého retenčního času t_M bylo provedeno nástřikem roztoku thiomočoviny ($c = 1 \times 10^{-4}$ mol dm^{-3}).

K měření byly použity roztoky studovaných látek o koncentraci 1×10^{-4} mol dm^{-3} v acetonitrilu. Z naměřených chromatogramů byly odečteny retenční časy a odpovídající retenční faktor byl vypočítán ze vztahu

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (2.1)$$

kde t_R je retenční čas daného derivátu [s] a t_M je mrtvý retenční čas thiomočoviny [s]. Z naměřených dat byl extrapolací^{69,70} získán retenční faktor k_0 odpovídající mobilní fázi s nulovým procentem organické složky.

2.3.3 Molekulová absorpční spektrometrie v UV oblasti

Spektrofotometrická měření byla realizována na spektrofotometru HP 8453 (Hewlett Packard) s diodovým polem. Měrná tloušťka křemenné kyvety byla 1 cm a měření probíhalo ve vlnovém rozsahu 200–400 nm.

2.3.4 Preparativní elektrolýza

Produkty elektrochemické oxidace studovaných látek byly získány pomocí preparativní elektrolýzy. Pro elektrolýzu bylo použito 10 mg vzorku.

Elektrolýza probíhala ve skleněné nádobce H-typu, za použití tří elektrod. Pracovní i pomocnou elektrodu tvořila Fischerova velkoplošná platinová elektroda. Obě elektrody byly ponořeny do 0,1 mol dm⁻³ roztoku chloristanu sodného v acetonitrilu a byly od sebe odděleny meziprostorem s náplní 0,5 mol dm⁻³ roztoku chloristanu sodného v acetonitrilu. Objem 0,1 mol dm⁻³ roztoku chloristanu sodného v acetonitrilu v prostoru elektrolýzy byl 40 ml. Referentní elektroda byla realizována stříbrným drátkem ponořeným do 0,01 mol dm⁻³ roztoku dusičnanu stříbrného a 1 mol dm⁻³ roztoku chloristanu sodného v acetonitrilu. Zdrojem napětí byl Potenciostat/Galvanostat Model 273 (EG&G Princeton Applied Research). Elektrolýza probíhala za intenzivního míchání za laboratorní teploty po dobu jedné hodiny (před elektrolýzou látky byl vždy po dobu 20 minut elektrolyzován samotný základní elektrolyt pro odstranění případných nečistot).

Před zahájením elektrolýzy i v jejím průběhu bylo měřeno UV spektrum elektrolyzátu. Ke spektrometrickému měření (podmínky viz. kap. 2.3.3) bylo vždy odebráno 50 µl elektrolyzátu a zředěno čistým acetonitrem na objem 3 ml.

Po skončení elektrolýzy byl elektrolyzát odpařen do sucha na vakuové rotační odparce s vodní lázní o teplotě 85 °C a extrahován 1,2-dichlorethanem. Oddělený extrakt byl odebrán, opětovně odpařen a podroben identifikaci metodou hmotnostní spektrometrie (kap. 2.3.5). Zbývající pevná fáze po extrakci byla pro odstranění chloristanu sodného promývána destilovanou vodou, nerozpustný zbytek byl podroben identifikaci metodou infračervené spektrometrie (kap. 2.3.6).

2.3.5 Plynová chromatografie s hmotnostním detektorem

Extrakt elektrooxidačních produktů v 1,2-dichlorethanu byly analyzovány pomocí plynové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Měření byla realizována na plynovém chromatografu Varian 3400 s kolonou DB5 (5 % difenylsiloxan, 95 % dimethylsiloxan) délky 30 m, vnitřního průměru 0,25 mm, tloušťka filmu 0,012 mm. Injektor byl vyhříván na teplotu 250 °C. Jako detektor byl použit hmotnostní

spektrometr Finnigan MAT INCOS 50 s ionizací nárazem elektronů a s ionizací elektroprejem.

2.3.6 Infračervená spektroskopie

Druhé produkty elektrochemické oxidace studovaných látek byly analyzovány metodou infračervené spektroskopie. Infračervená spektra byla měřena technikou difúzní reflexe (DRIFTS) na FTIR spektrometru Nicolet Magna 760 v oblasti od 4000 do 400 cm^{-1} s rozlišením 4 cm^{-1} .

2.4 QSAR, REGRESNÍ A STATISTICKÉ VÝPOČTY

Substituentové Hammettovy σ konstanty byly převzaty z tabulek Hansche, Lea a Hoekmana⁷⁴. Swain-Luptonovy konstanty byly převzaty podle úpravy provedené Norringtonem⁷⁵. Substituentové hydrofobní π konstanty byly použity podle Fujita a kol.⁷⁶. Substituentové konstanty látek, u kterých se v molekule vyskytovalo více substituentů, byly získány součtem substituentových konstant jednotlivých substituentů⁷⁷. Regresní výpočty byly provedeny v programu QSAR-PC:RAR (Biosoft, UK).

Výpočty hodnot rozdělovacích koeficientů oktanol-voda byly provedeny pomocí modulu PrologP programu Pallas 2.0 (CompuDrug, USA).

Odhad možných metabolitů studovaných látek byl proveden pomocí modulu MetabolExpert v programu Pallas 3.1 (CompuDrug, USA).

Naměřená data byla zpracována běžnými statistickými postupy^{78,79}. Uvedené výsledky sériových měření jsou mediány tří měření. Lineární závislosti dvou proměnných byly zpracovány metodou lineární regrese s vyhodnocením příslušných odchylek a korelačních koeficientů. Výpočty byly realizovány pomocí softwarových programů Microcal Origin 6.0 (Microcal Software, USA) a Microsoft Excel 97 (Microsoft Corporation, USA).

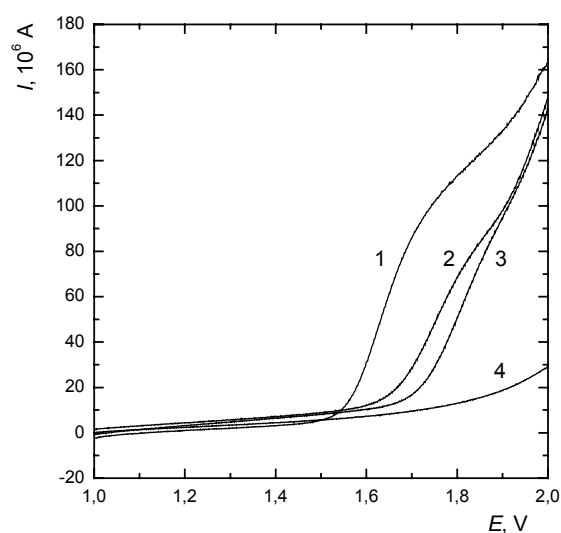
3 VÝSLEDKY A DISKUSE

3.1 VLIV SUBSTITUENTŮ NA VOLTAMETRICKÉ CHOVÁNÍ TETRAZOLŮ

3.1.1 Stanovení půlvlnového potenciálu

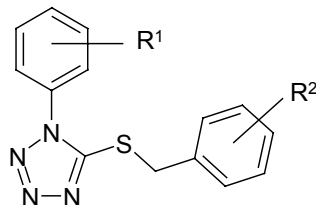
Vliv substituentů na voltametrické chování studovaných 1-fenyl-5-benzylsulfanyl-tetrazolů byl studován metodou DC voltametrie s rotující diskovou elektrodou. V souladu s literaturou⁸⁰ bylo zjištěno, že elektrooxidační vlnu poskytují pouze deriváty obsahující methoxyskupinu.

Studované methoxy deriváty tetrazolu poskytovaly v prostředí 0,1 mol dm⁻³ chloristanu sodného v acetonitrilu jednu zřetelnou oxidační vlnu (obr. 3.1). Kalibrační závislosti byly lineární v rozsahu 0,5–1,5×10⁻⁴ mol dm⁻³ a půlvlnové potenciály nezávisely na koncentraci látky. Naměřené hodnoty půlvlnových potenciálů, příslušné Hammettovy a Swain-Luptonovy substituentové konstanty a energie HOMO orbitalů zachycuje tab. 3.1.



Obr. 3.1 DC voltametrie (1) 5-(4-methoxybenzylsulfanyl)-1-(2-methoxyfenyl)tetrazolu (derivát 37), (2) 5-benzylsulfanyl-1-(2-methoxyfenyl)tetrazolu (derivát 39) a (3) 5-(4-brombenzylsulfanyl)-1-(2-methoxyfenyl)tetrazolu (derivát 42) a v 0,1 mol dm⁻³ chloristanu sodném v acetonitrilu (4). ($c = 1,5 \times 10^{-4}$ mol dm⁻³, $A = 13,986$ mm², $v = 10$ mV s⁻¹, $\omega = 1226$ ot min⁻¹, měřeno proti Ag/0,01 mol dm⁻³ AgNO₃/0,1 mol dm⁻³ NaClO₄)

Tab. 3.1 Struktury, Hammettovy a Swain-Luptonovy substituentové konstanty, rozdělení do trénovací a kontrolní sady, indikátorová konstanta a půlvolné potenciály první oxidační vlny studovaných methoxy derivátů tetrazolu v 0,1 mol dm⁻³ chloristanu sodném v acetonitrilu ($c = 1,5 \times 10^{-4}$ mol dm⁻³, $A = 13,986$ mm², $v = 10$ mV s⁻¹, $\omega = 1226$ ot min⁻¹, měřeno proti Ag/0,01 mol dm⁻³ AgNO₃/0,1 mol dm⁻³ NaClO₄)



derivát	R ¹					R ²					sada ^a	I	E _{1/2} V	ε _{HOMO} eV
	poloha	substituent	σ _{R1}	F _{R1}	R _{R1}	poloha	substituent	σ _{R1}	F _{R1}	R _{R1}				
3^b	4	-H	0,00	0,00	0,00	4	-OCH ₃	-0,27	0,41	-0,50	+	1	1,370	-0,22069
6^a	4	-Cl	0,23	0,69	-0,16	4	-OCH ₃	-0,27	0,41	-0,50	-	1	1,390	-0,22342
7^a	4	-Cl	0,23	0,69	-0,16	3	-OCH ₃	0,12	0,41	-0,17	+	1	1,430	-0,22462
9^a	3, 4	-Cl ₂	0,60	1,37	-0,22	4	-OCH ₃	-0,27	0,41	-0,50	-	1	1,400	-0,22504
12^a	4	-CH ₃	-0,17	-0,05	-0,14	4	-OCH ₃	-0,27	0,41	-0,50	+	1	1,400	-0,21956
13^a	4	-OCH ₃	-0,27	0,41	-0,50	4	-Cl	0,23	0,69	-0,16	-	1	1,580	-0,23869
14^a	4	-OCH ₃	-0,27	0,41	-0,50	4	-CF ₃	0,54	0,63	0,19	+	1	1,590	-0,24052
15^a	4	-OCH ₃	-0,27	0,41	-0,50	4	-OCH ₃	-0,27	0,41	-0,50	-	1	1,375	-0,2188
20^a	4	-OCH ₃	-0,27	0,41	-0,50	4	-H	0,00	0,00	0,00	+	1	1,565	-0,23515
25^a	4	-OCH ₃	-0,27	0,41	-0,50	4	-CH ₃	-0,17	-0,05	-0,14	-	1	1,550	-0,23290
29^a	4	-Br	0,23	0,73	-0,18	4	-OCH ₃	-0,27	0,41	-0,50	+	1	1,405	-0,22343
36^a	4	-OCH ₃	-0,27	0,41	-0,50	4	-F	-0,06	0,71	-0,34	-	1	1,580	-0,23719
37	2	-OCH ₃	- ^c	0,52	-0,43	4	-OCH ₃	-0,27	0,41	-0,50	+	0	1,630	-0,21388
38	2	-OCH ₃	-	0,52	-0,43	4	-Cl	0,23	0,69	-0,16	-	0	1,780	-0,23725
39	2	-OCH ₃	-	0,52	-0,43	4	-H	0,00	0,00	0,00	+	0	1,760	-0,23310
40	2	-OCH ₃	-	0,52	-0,43	3	-Cl	0,23	0,69	-0,16	-	0	1,800	-0,23965
41	2	-OCH ₃	-	0,52	-0,43	4	-F	-0,06	0,71	-0,34	+	0	1,800	-0,23444
42	2	-OCH ₃	-	0,52	-0,43	4	-Br	0,23	0,73	-0,18	-	0	1,815	-0,23562
43	2	-OCH ₃	-	0,52	-0,43	4	-CH ₃	-0,17	-0,05	-0,14	+	0	1,760	-0,22886

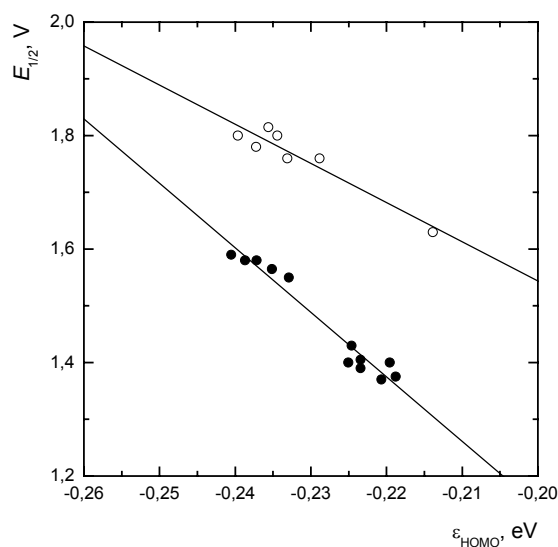
^a Sada: trénovací (+), kontrolní (-).

^b Hodnoty převzaty z práce⁸⁰.

^c Hodnoty nejsou přesně definovány.

3.1.2 QSER s energiemi HOMO orbitalů

Jak bylo uvedeno výše v kap. 1.3.1 je dobrou charakteristikou energetických parametrů molekuly v případě oxidačních dějů hodnota energie nejvýše obsazeného molekulového orbitalu. Vynesením závislosti půlvolného potenciálu studovaných tetrazolů na hodnotě energie HOMO (obr. 3.2) bylo zjištěno, že hodnota půlvolného potenciálu je výrazně ovlivněna pozicí methoxy skupiny na fenylu, která deriváty rozdělila na dvě skupiny: 2-methoxyderiváty a ostatní deriváty.

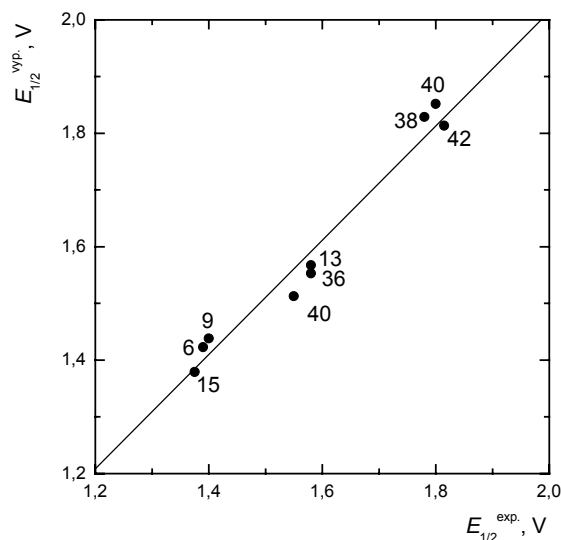


Obr. 3.2 Korelace mezi hodnotami půlvolných potenciálů a hodnotami energií HOMO orbitalů pro studované methoxy deriváty tetrazolu: 2-methoxyfenyltetrazoly (○), ostatní studované deriváty (●). Půlvolné potenciály měřeny v 0,1 mol dm⁻³ NaClO₄ v acetonitrilu, c = 1,5 × 10⁻⁴ mol dm⁻³ vs. Ag / 0,01 mol dm⁻³ AgNO₃ / 1 mol dm⁻³ NaClO₄.

Byla proto zavedena indikátorová konstanta I charakterizující druh a polohu substituentu na fenylu, definovaná jako $I = 0$ pro 2-methoxyfenyl deriváty a $I = 1$ pro ostatní methoxy deriváty. Oprávněnost zavedení indikátorové konstanty byla otestována rozdělením naměřených dat na trénovací a kontrolní sadu (tab. 3.1). Pomocí trénovací sady byla vypočítána regresní rovnice mezi půlvolným potenciálem a energií HOMO orbitalu

$$E_{1/2} (\text{V}) = -9,459 \varepsilon_{\text{HOMO}} (\text{eV}) - 0,275 I - 0,415 \quad (3.1)$$

Správnost regresní rovnice (3.1) byla testována pomocí kontrolní sady, na obr. 3.3 je znázorněna korelace mezi půlvlnovými potenciály derivátů kontrolní sady vypočítaných z regresní rovnice (3.1) a skutečnými experimentálními hodnotami.



Obr. 3.3 Korelace mezi naměřenými hodnotami půlvlnových potenciálů a hodnotami vypočítanými z rovnice (3.1) pro kontrolní sadu studovaných derivátů tetrazolu, $r = 0,9844$ (čísla u jednotlivých bodů odpovídají číslům derivátů).

Na obr. 3.3 lze vidět, že regresní rovnice je velmi dobře použitelná pro oba druhy studovaných derivátů tetrazolu. S použitím experimentálních dat všech studovaných derivátů byla získána výsledná regresní rovnice popisující závislost půlvlnového potenciálu na energii HOMO orbitalu

$$E_{1/2} \text{ (V)} = -9,634 \varepsilon_{\text{HOMO}} \text{ (eV)} - 0,260 I - 0,470 \quad (3.2)$$

$$n = 19, r = 0,988, s_y = 0,028, F = 319,57 > F_{2, 16, 0,01} = 6,23$$

3.1.3 QSER se substituentovými konstantami

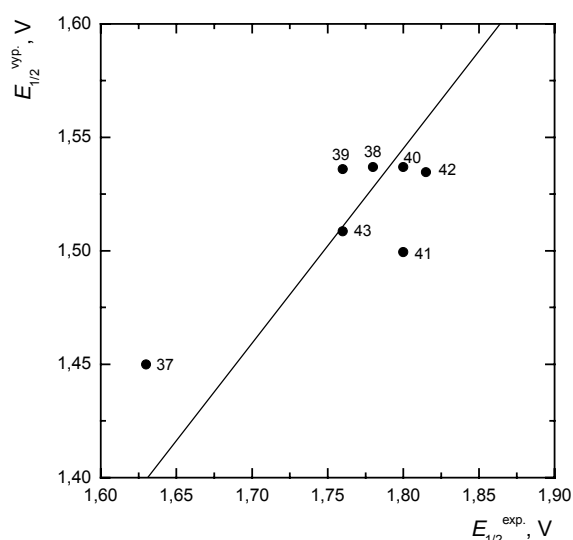
Vliv substituentů na voltametrické chování studovaných derivátů byl v předešlé práci⁸⁰ kvantifikován pomocí Hammettových σ konstant. Použití této korelační rovnice pro 2-methoxyfenyl tetrazoly však nebylo možné, jelikož literatura neuvádí spolehlivé hodnoty Hammettovy σ konstanty pro methoxy skupinu v *ortho*-poloze (literatura⁸¹ nabízí hodnoty v rozmezí od $-0,67$ do $+0,60$). Tato skutečnost je zapříčiněna tzv. *ortho*-efektem, který je způsoben přímým elektrostatickým působením substituentu a reakčního centra, sterickeým efektem a vliv zde má i tvorba vodíkových můstků⁸².

Nevýhodou Hammettových σ konstant je nad to skutečnost, že jsou mírou celkového elektronového efektu substituentů a nerozlišují mezi induktivním a mesomerním efektem. Tento nedostatek se pokusili odstranit Swain a Lupton, kteří dospěli k závěru, že každý elektronový parametr lze vyjádřit F a R konstantami, které popisují zvlášť vliv induktivního (field) a mesomerního (resonance) efektu⁸².

V literatuře⁸⁰ byla publikována následující korelační rovnice popisující závislost půlvolných potenciálů studovaných tetrazolů na hodnotě Swain-Luptonových F a R konstant, získaná z experimentálních dat pro deriváty **3**, **6**, **7**, **9**, **12–15**, **20**, **25**, **29**, **36**

$$E_{1/2}(\text{V}) = -0,016 F_{R1} - 0,217 R_{R1} + 0,051 F_{R2} + 0,214 R_{R2} + 1,451 \quad (3.3)$$

Byla otestována použitelnost regresní rovnice (3.3) pro 2-methoxyfenyl tetrazoly; jak ukazuje obr. 3.4 rovnice pro tyto deriváty nevyhovuje.

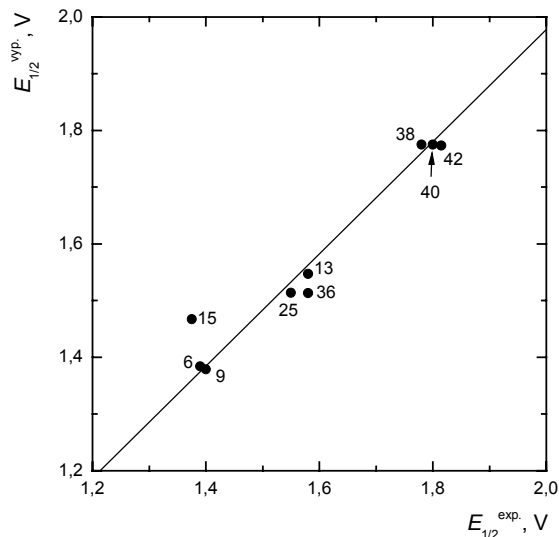


Obr. 3.4 Korelace mezi naměřenými hodnotami půlvolných potenciálů studovaných 2-methoxyfenyl tetrazolů s hodnotami vypočítanými z rovnice (3.3), $r = 0,8427$ (čísla u jednotlivých bodů odpovídají číslům derivátů).

Bylo proto přistoupeno k přepočítání regresních parametrů rovnice (3.3), do níž byla na základě skutečností zjištěných výše v kap. 3.1.2 zahrnuta i indikátorová konstanta charakterizující druh a polohu substituentu na fenylu, definovaná jako $I = 0$ pro 2-methoxyfenyl deriváty a $I = 1$ pro ostatní deriváty. Pomocí trénovací sady byla vypočítána regresní rovnice mezi půlvolným potenciálem, F a R substituentovými konstantami a indikátorovou konstantou

$$E_{1/2}(\text{V}) = -0,028 F_{R1} - 0,221 R_{R1} + 0,051 F_{R2} + 0,193 R_{R2} - 0,247 I + 1,691 \quad (3.4)$$

Správnost regresní rovnice (3.4) byla testována pomocí kontrolní sady, na obr. 3.5 je znázorněna korelace mezi půlvlnovými potenciály derivátů kontrolní sady vypočítaných z regresní rovnice (3.4) a skutečnými experimentálními hodnotami.



Obr. 3.5 Korelace mezi naměřenými hodnotami půlvlnových potenciálů a hodnotami vypočítanými z rovnice (3.4) pro kontrolní sadu studovaných derivátů tetrazolu, $r = 0,9696$ (čísla u jednotlivých bodů odpovídají číslům derivátů).

S použitím experimentálních dat všech studovaných derivátů byla získána výsledná regresní rovnice popisující závislost půlvlnového potenciálu na F a R substituentových konstantách a indikátorové konstantě

$$E_{1/2} (\text{V}) = -0,014 F_{R1} - 0,197 R_{R1} + 0,081 F_{R2} + 0,242 R_{R2} - 0,247 I + 1,700 \quad (3.5)$$

$$n = 19, r = 0,975, s_y = 0,044, F = 50,31 > F_{5, 13, 0,01} = 4,86$$

Z hodnot regresních koeficientů korelační rovnice je patrné, že větší vliv mají R substituentové konstanty, jež charakterizují mesomerní efekt substituentů.

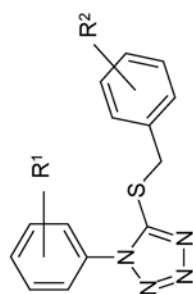
3.2 VLIV SUBSTITUENTŮ NA RETENČNÍ CHOVÁNÍ STUDOVANÝCH LÁTEK

3.2.1 Stanovení retenčních faktorů

Byl studován vliv substituentů na retenční časy derivátů tetrazolu při HPLC chromatografii na reverzní fázi C-18. Jako mobilní fáze byla použita směs acetonitril-voda s proměnlivým složením acetonitrilu $w(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,70; 0,65$ a $0,60$. Byly naměřeny retenční časy studovaných derivátů, vypočítány příslušné retenční faktory (tab. 3.2) a extrapolací získán retenční faktor k_0 pro mobilní fázi s nulovým obsahem acetonitrilu.

Vliv substituentů na retenční čas je na obr. 3.6 demonstrován na příkladu derivátů s odlišnou pozicí methoxy skupiny na fenylu a na obr. 3.7 s různými substituenty na benzylsulfanylu.

Tab. 3.2 Struktury, hydrofóbní substituentové konstanty, logaritmy rozdělovacího koeficientu oktanol/voda, rozdělení do trénovací a kontrolní sady, indikátorová konstanta, retenční časy a kapacitní faktory studovaných derivátů tetrazolu při HPLC chromatografii na koloně RP C-18 ZORBAX (250 × 4,6 mm), mobilní fáze acetonitril-voda. ($c = 1 \times 10^{-4}$ mol dm⁻³, $F_m = 0,8$ cm³ min⁻¹, $\lambda = 235$ nm, $t_M(w(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,70) = 94$ s, $t_M(w(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,65) = 91,2$ s, $t_M(w(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,60) = 91,4$ s, nástřík 10 μ l).



derivát	R ¹		R ²		log P sada ^b		w(CH ₃ CN)=0,70		w(CH ₃ CN)=0,65		w(CH ₃ CN)=0,60		w(CH ₃ CN) = 0,00			
	poloha substituent	π_{R1}	poloha substituent	π_{R2}	$\log P$	$\log P$	$t_{R,S}$	k	$t_{R,S}$	k	$t_{R,S}$	k	$t_{R,S}$	k_0	$\log k_0$	
1	4	-H	4	0,00	0,93	5,11	+	0	261	1,812	339	2,664	452	3,906	16,404	1,215
2	4	-H	4	0,00	1,49	5,47	-	0	263	1,837	347	2,754	480	4,202	18,301	1,263
3^a	4	-H	4	0,00	-0,12	3,60	+	1	194	1,156	237	1,633	306	2,400	9,819	0,993
4	4	-Cl	4	0,93	0,93	5,67	-	0	368	2,970	496	4,371	711	6,712	29,008	1,463
6^a	4	-Cl	4	0,93	-0,12	4,13	+	1	262	1,911	340	2,778	463	4,144	17,461	1,243
7^a	4	-Cl	3	0,93	0,12	4,13	-	1	264	1,933	342	2,800	473	4,256	18,091	1,258
8	3,4	-Cl ₂	4	1,97	0,93	6,22	+	0	518	4,586	735	6,957	1102	10,950	48,860	1,689
9^a	3,4	-Cl ₂	4	1,97	-0,12	4,69	-	1	356	2,956	484	4,378	704	6,822	29,852	1,475
10	4	-CH ₃	4	0,48	0,93	5,59	+	0	333	2,585	445	3,813	627	5,801	24,971	1,398
11	4	-CH ₃	4	0,48	1,49	5,56	-	0	332	2,579	457	3,944	664	6,200	27,777	1,444
12^a	4	-CH ₃	4	0,48	-0,12	4,06	+	1	238	1,644	302	2,356	409	3,544	14,865	1,173
13^a	4	-OCH ₃	4	-0,12	0,93	4,35	-	1	252	1,800	325	2,611	451	4,011	17,180	1,236
14^a	4	-OCH ₃	4	-0,12	1,49	4,78	+	1	254	1,822	336	2,733	479	4,322	19,209	1,284
15^a	4	-OCH ₃	4	-0,12	-0,12	3,58	-	1	190	1,111	232	1,578	303	2,367	9,846	0,994
16	4	-H	4	0,00	0,00	4,55	+	0	207	1,230	250	1,701	319	2,464	9,822	0,993

^a Hodnoty převzaty z práce⁸⁰

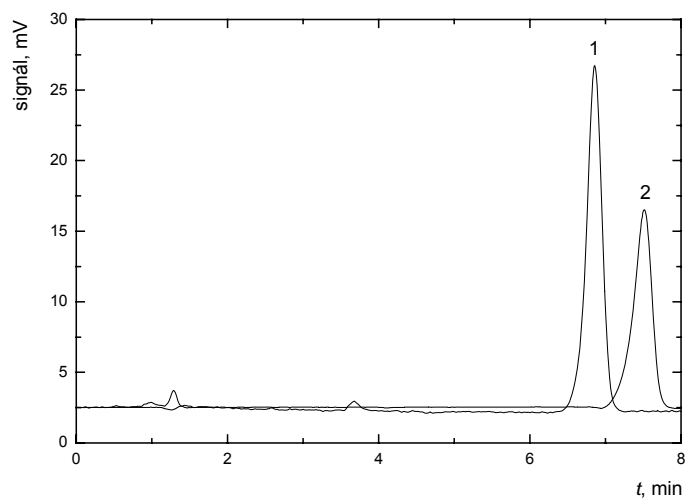
^b Sada: trénovací (+), kontrolní (-).

Tabulka 3.2 pokračuje na následující straně.

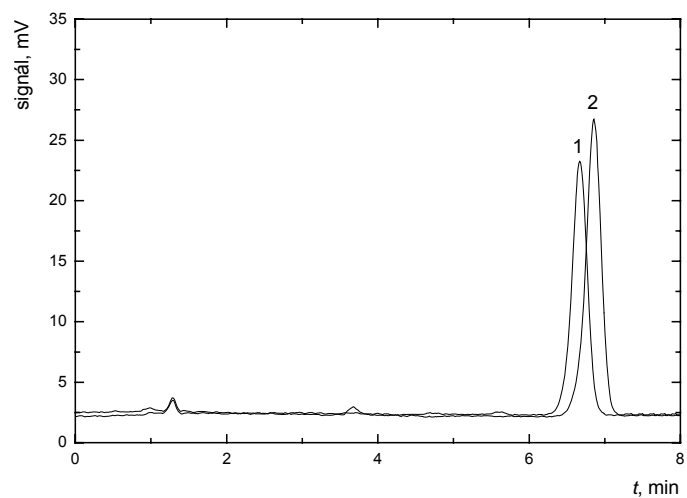
Pokračování tabulky 3.2 z předchozí strany.

derivát	R ¹		R ²		log P sada ^b	π _{R2}	w(CH ₃ CN)=0,70		w(CH ₃ CN)=0,65		w(CH ₃ CN)=0,60		log k ₀			
	poloha substituent	π _{R1}	poloha substituent	π _{R2}			f _{R, S}	k	f _{R, S}	k	f _{R, S}	k				
17	4	-Cl	0,93	-H	0,00	5,11	-	0	281	2,033	358	2,872	489	4,308	17,855	1,252
18	3,4	-Cl ₂	1,97	-H	0,00	5,67	+	0	387	3,167	529	4,719	762	7,266	31,694	1,501
19	4	-CH ₃	0,48	-H	0,00	5,04	-	0	256	1,754	323	2,497	432	3,687	15,211	1,183
20 ^a	4	-OCH ₃	-0,12	-H	0,00	3,62	+	1	199	1,211	245	1,722	321	2,567	10,644	1,028
21	4	-H	0,00	-CH ₃	0,48	5,04	-	0	263	1,829	326	2,526	443	3,802	15,540	1,192
22	4	-Cl	0,93	-CH ₃	0,48	5,59	+	0	371	2,993	490	4,303	702	6,614	28,171	1,450
23	3,4	-Cl ₂	1,97	-CH ₃	0,48	6,15	-	0	528	4,687	736	6,962	1092	10,846	47,534	1,678
24	4	-CH ₃	0,48	-CH ₃	0,48	5,52	+	0	327	2,527	436	3,719	609	5,603	23,942	1,380
25 ^a	4	-OCH ₃	-0,12	-CH ₃	0,48	4,06	-	1	248	1,756	317	2,522	436	3,844	16,285	1,212
26	4	-Br	1,13	-H	0,00	5,38	+	0	306	2,297	391	3,233	538	4,834	19,945	1,300
27	4	-Br	1,13	-Cl	0,93	5,94	-	0	389	3,190	535	4,788	796	7,630	34,065	1,533
28	4	-Br	1,13	-CF ₃	1,49	6,3	+	0	389	3,192	546	4,911	854	8,260	38,397	1,585
29 ^a	4	-Br	1,13	-OCH ₃	-0,12	4,29	-	1	279	2,100	364	3,044	514	4,711	20,257	1,307
30	4	-Br	1,13	-CH ₃	0,48	5,87	+	0	390	3,200	542	4,865	799	7,665	34,265	1,535
31	4	-Br	1,13	-F	0,31	5,54	-	0	291	2,131	448	3,849	546	4,922	21,776	1,338
32	4	-H	0,00	-F	0,31	4,71	+	0	206	1,221	250	1,704	326	2,534	10,351	1,015
33	4	-Cl	0,93	-F	0,31	5,27	-	0	278	1,991	356	2,849	498	4,404	18,768	1,274
35	4	-CH ₃	0,48	-F	0,31	5,19	+	0	254	1,738	323	2,491	445	3,829	16,276	1,212
36 ^a	4	-OCH ₃	-0,12	-F	0,31	3,77	-	1	199	1,211	246	1,733	326	2,622	11,028	1,043
37	2	-OCH ₃	-0,33	-OCH ₃	-0,12	4,30	+	0	180	0,921	221	1,421	280	2,068	8,924	0,951
38	2	-OCH ₃	-0,33	-Cl	0,93	4,98	-	0	235	1,501	304	2,333	412	3,505	15,475	1,190
39	2	-OCH ₃	-0,33	-H	0,00	4,42	+	0	188	1,002	231	1,529	296	2,236	9,611	0,983
40	2	-OCH ₃	-0,33	-Cl	1,04	4,98	-	0	229	1,446	297	2,252	401	3,389	14,998	1,177
41	2	-OCH ₃	-0,33	-F	0,31	4,58	+	0	187	0,996	233	1,550	302	2,300	10,092	1,004
42	2	-OCH ₃	-0,33	-Br	1,13	5,25	-	0	250	1,665	327	2,588	449	3,915	17,344	1,240
43	2	-OCH ₃	-0,33	-CH ₃	0,48	4,91	+	0	228	1,433	293	2,213	394	3,311	14,525	1,163

^a Hodnoty převzaty z práce⁶⁰.^b Sada: trénovací (+), kontrolní (-).



Obr. 3.6 Vliv substituentů na retenční čas derivátů tetrazolu při HPLC na koloně RP C-18 ZORBAX ($250 \times 4,6$ mm), mobilní fáze acetonitril-voda ($w(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,60$): (1) 1-(2-methoxyfenyl)-5-(4-chlorbenzylsulfanyl)tetrazol (derivát **38**) a (2) 1-(4-methoxyfenyl)-5-(4-chlorbenzylsulfanyl)tetrazol (derivát **13**). ($c = 1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $F_m = 0,8 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, $\lambda = 235 \text{ nm}$, $t_M = 90 \text{ s}$, nástřik $10 \mu\text{l}$)

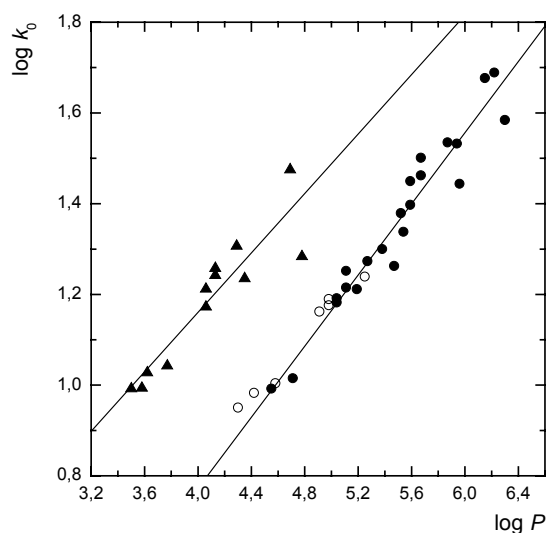


Obr. 3.7 Vliv substituentů na retenční čas derivátů tetrazolu při HPLC na koloně RP C-18 ZORBAX ($250 \times 4,6$ mm), mobilní fáze acetonitril-voda ($w(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,60$): (1) 1-(2-methoxyfenyl)-5-(3-chlorbenzylsulfanyl)tetrazol (derivát **40**) a (2) 1-(2-methoxyfenyl)-5-(4-chlorbenzylsulfanyl)tetrazol (derivát **38**). ($c = 1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $F_m = 0,8 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, $\lambda = 235 \text{ nm}$, $t_M = 90 \text{ s}$, nástřik $10 \mu\text{l}$)

3.2.2 QSRR s rozdělovacím koeficientem oktanol/voda

Z naměřených retenčních faktorů byl extrapolací získán retenční faktor k_0 při složení mobilní fáze $w(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,00$. Vynesením závislosti logaritmu k_0 studovaných tetrazolů na hodnotě rozdělovacího koeficientu oktanol-voda (obr. 3.8) bylo zjištěno, že závislost rozdělí studované deriváty na dvě skupiny:

1. deriváty s methoxy skupinou v poloze 4 na fenylu nebo/a benzylsulfanylu,
2. ostatní deriváty.

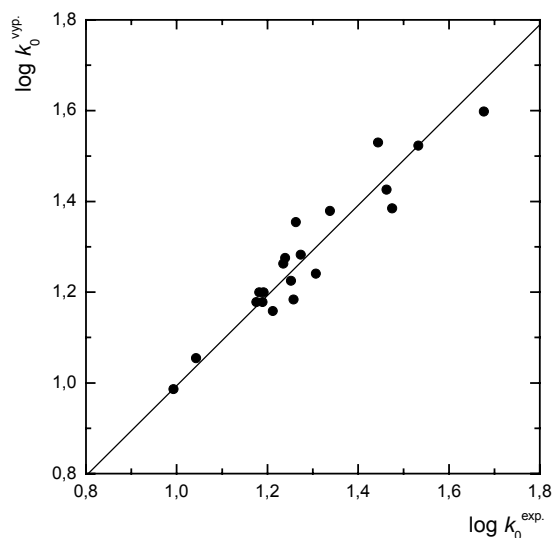


Obr. 3.8 Korelace mezi hodnotami retenčních faktorů k_0 a hodnotou rozdělovacího koeficientu oktanol-voda při HPLC na koloně RP C-18 ZORBAX pro deriváty neobsahující methoxy skupinu v molekule 1-fenyl-5-benzylsulfanyltetrazolu (●), pro deriváty obsahující 2-methoxy skupinu v molekule 1-fenyl-5-benzylsulfanyltetrazolu (○) a pro deriváty obsahující 4-methoxy skupinu v molekule 1-fenyl-5-benzylsulfanyltetrazolu (▲). ($c = 1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $F_m = 0,8 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, $\lambda = 235 \text{ nm}$, $t_M = 90 \text{ s}$, nástřík $10 \mu\text{l}$)

Z toho plyne, že regresní rovnici závislosti $\log k_0$ na $\log P$ je třeba doplnit o indikátorovou konstantu I , charakterizující příslušnou skupinu derivátů a definovanou jako $I = 1$ pro deriváty s methoxy skupinou na fenylu nebo/a benzylsulfanylu v pozici 4, a $I = 0$ pro ostatní deriváty. Oprávněnost zavedení indikátorové konstanty byla otestována rozdělením naměřených dat na trénovací a kontrolní sadu (tab. 3.2). Pomocí trénovací sady byla vypočítána regresní rovnice

$$\log k_0 = 0,359 \log P + 0,311 I - 0,610 \quad (3.6)$$

Správnost regresní rovnice (3.6) byla testována pomocí kontrolní sady, na obr. 3.9 je znázorněna korelace log k_0 derivátů kontrolní sady vypočítaných z regresní rovnice (3.6) a skutečnými experimentálními hodnotami.



Obr. 3.9 Korelace mezi experimentálně získanými hodnotami logaritmu retenčního faktoru k_0 a hodnotami vypočítanými z rovnice (3.6) pro kontrolní sadu studovaných derivátů tetrazolu, $r = 0,9508$.

S použitím experimentálních dat všech studovaných derivátů byla získána výsledná regresní rovnice popisující závislost logaritmu retenčního faktoru k_0 na logaritmu rozdělovacího koeficientu oktanol-voda a indikátorové konstantě I

$$\begin{aligned} \log k_0 &= 0,366 \log P + 0,345 I - 0,652 & (3.7) \\ n &= 41, r = 0,969, s_y = 0,050, F = 290,03 > F_{2, 38, 0,01} = 5,18 \end{aligned}$$

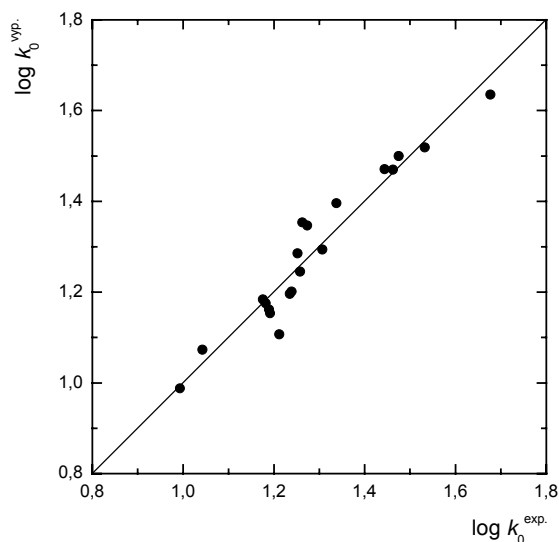
3.2.3 QSRR s hydrofobními substituentovými π konstantami

Druhou možností jak kvantifikovat vliv substituentů na chromatografické chování studovaných derivátů je použití hydrofobních substituentových π konstant.

S použitím výše definované indikátorové konstanty I byla za pomoci trénovací sady vypočítána regresní rovnice

$$\log k_0 = 0,245 \pi_{R1} + 0,198 \pi_{R2} - 0,017 I + 1,058 \quad (3.8)$$

Správnost regresní rovnice (3.8) byla testována pomocí kontrolní sady, na obr. 3.10 je znázorněna korelace mezi $\log k_0$ derivátů kontrolní sady vypočítaných z regresní rovnice (3.8) a skutečnými experimentálními hodnotami.



Obr. 3.10 Korelace mezi experimentálně získanými hodnotami logaritmu retenčního faktoru k_0 a hodnotami vypočítanými z rovnice (3.8) pro kontrolní sadu studovaných derivátů tetrazolu, $r = 0,9638$.

S použitím experimentálních dat všech studovaných derivátů byla získána výsledná regresní rovnice popisující závislost logaritmu retenčního faktoru k_0 na hydrofobních π konstantách a indikátorové konstantě I

$$\log k_0 = 0,239 \pi_{R1} + 0,199 \pi_{R2} - 0,030 I + 1,056 \quad (3.9)$$

$$n = 41, r = 0,967, s_y = 0,052, F = 175,85 > F_{3, 37, 0,01} = 4,31$$

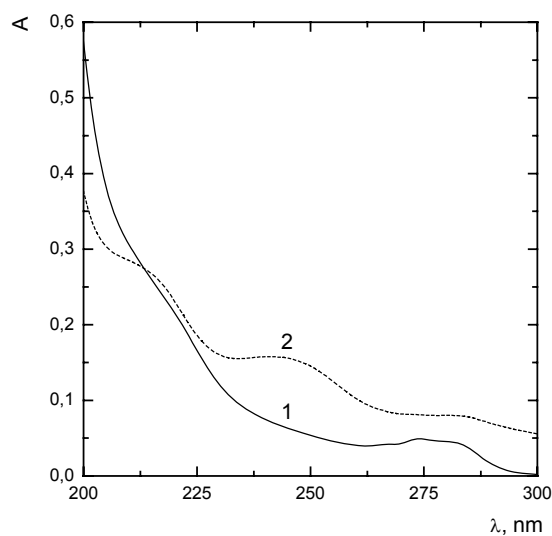
Z hodnot regresních koeficientů je patrné, že větší vliv na chromatografické chování mají π_{R1} substituentové konstanty a tudíž substituenty na fenylu. Ze statistických parametrů rovnic (3.7) a (3.9) je patrné, že lze úspěšně použít obě regresní rovnice pro výpočet logaritmu hodnoty retenčního faktoru k_0 .

3.3 PŘÍPRAVA A IDENTIFIKACE ELEKTROOXIDAČNÍCH PRODUKTŮ

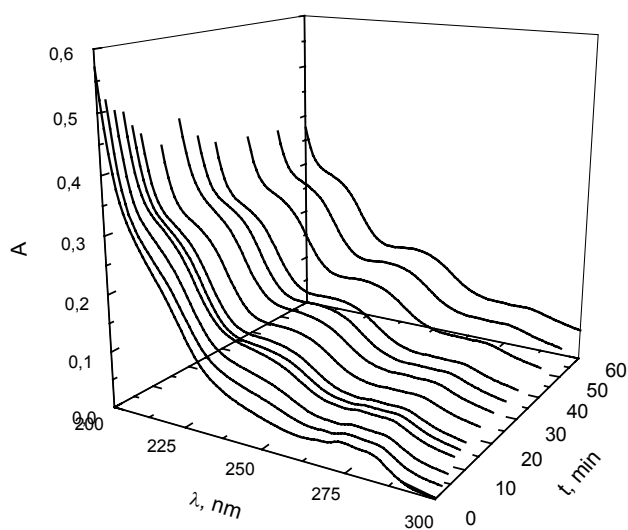
3.3.1 Příprava elektrooxidačních produktů

Produkty elektrochemické oxidace studovaných tetrazolů byly připraveny pro vybrané zástupce 4-methoxyfenyl derivátů (derivát **20**) a 2-methoxyfenyl derivátů (deriváty **38**, **39**).

Elektrooxidační produkty byly připraveny metodou preparativní elektrolýzy, postupem popsaným v kap. 2.3.4 při potenciálu odpovídajícímu limitnímu konvektivně-difúznímu proudu prvního oxidačního stupně. Průběh elektrolýzy byl sledován spektrofotometrickým měřením, jako příklad jsou na obr. 3.11 a 3.12 uvedeny změny UV spekter v průběhu elektrooxidace derivátu **39**.



Obr. 3.11 UV monitoring průběhu preparativní elektrolýzy 1-(2-methoxyfenyl)-5-benzylsulfanyltetrazolu (derivát **39**): (1) před elektrolýzou a (2) po elektrolýze (podmínky viz. kap. 2.3.4).

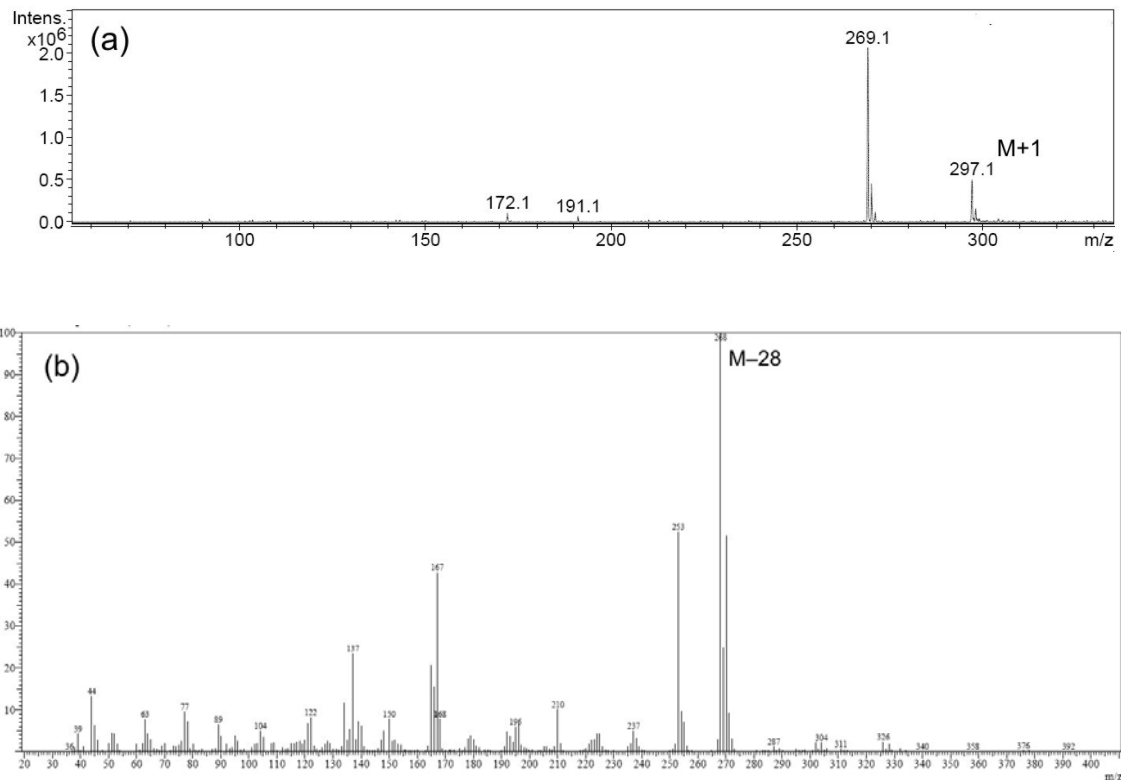


Obr. 3.12 UV monitoring průběhu preparativní elektrolýzy 1-(2-methoxyfenyl)-5-benzylsulfanyltetrazolu (derivát **39**) v závislosti na čase elektrolýzy (podmínky viz. kap. 2.3.4).

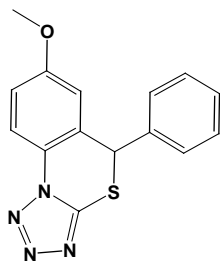
3.3.2 Identifikace elektrooxidačních produktů

Jak je uvedeno v kap. 2.3.4 byly produkty elektrooxidace studovaných látek analyzovány metodou GC-MS, u 2-methoxyfenyl derivátů byl analyzován i neextrahovatelný zbytek metodou infračervené spektroskopie.

U studovaného 4-methoxyfenyl derivátu (derivát **20**) byl na základě hmotnostních spekter (obr. 3.13) identifikován jediný produkt, jehož pravděpodobná struktura je uvedena na obr. 3.14. Rozdíl mezi hmotnostmi iontů naměřenými při ionizaci nárazem elektronů a ionizaci elektrosprejem odpovídá ztrátě dvou dusíků z tetrazolového kruhu.

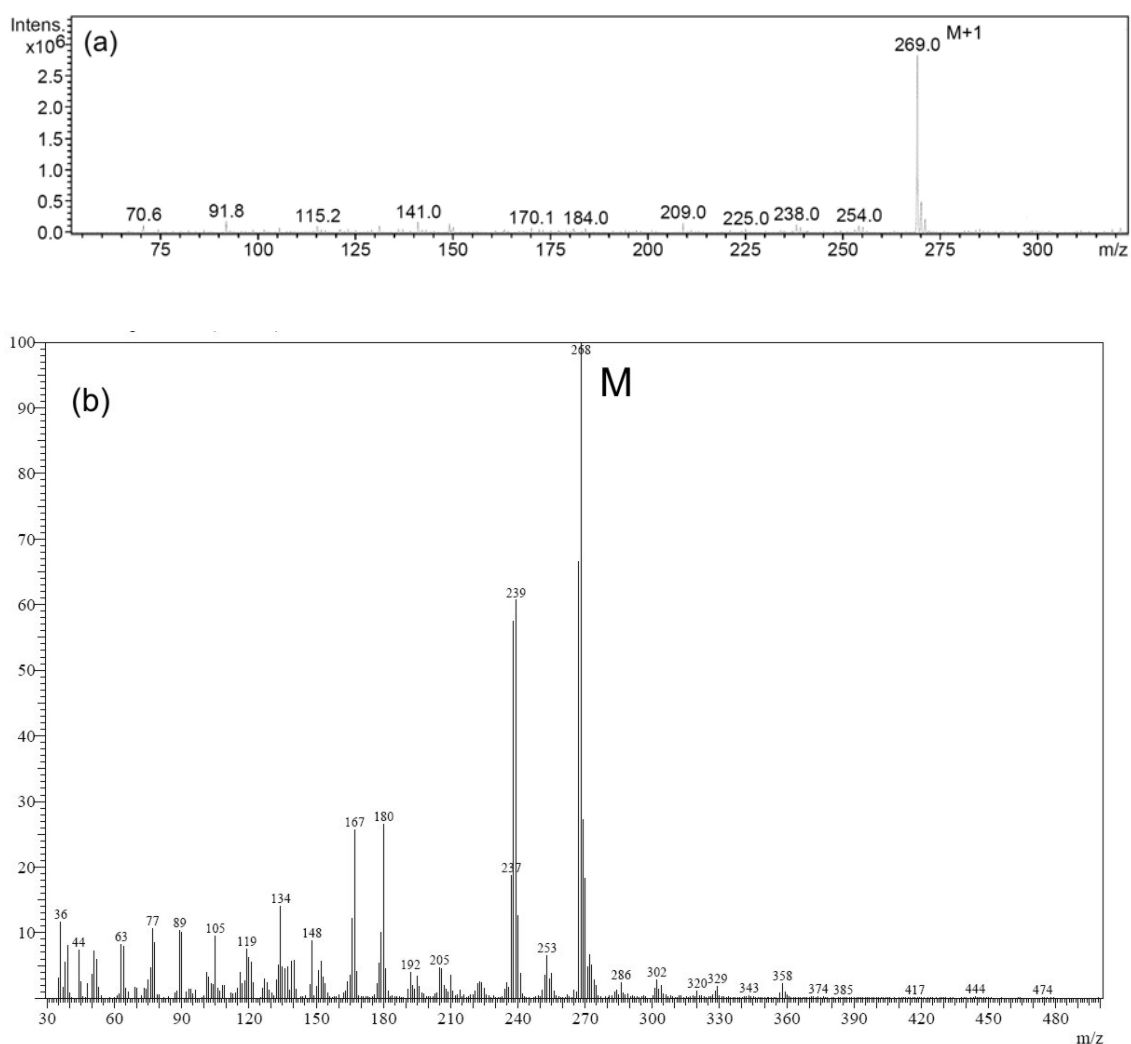


Obr. 3.13 Hmotnostní spektra elektrooxidačního produktu 1-(4-methoxyfenyl)-5-benzylsulfanyltetrazolu (derivát **20**) (a) spektrum s ionizací elektrosprejem, (b) spektrum s ionizací nárazem elektronů.

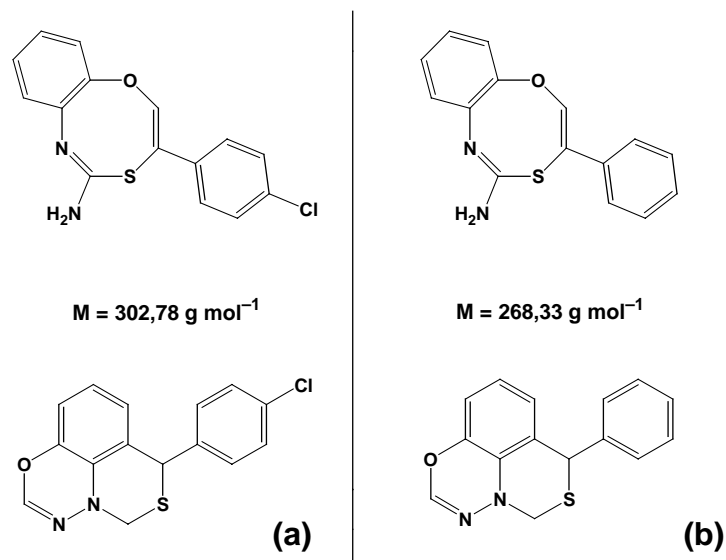


Obr. 3.14 Navržená struktura elektrooxidačního produktu 1-(4-methoxyfenyl)-5-benzylsulfanyltetrazolu (derivát **20**), $M = 296,35 \text{ g mol}^{-1}$

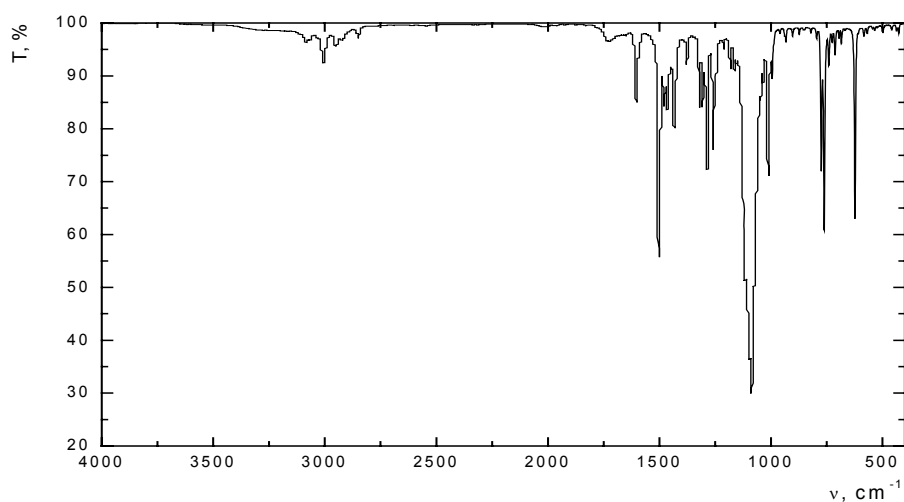
U derivátů 2-methoxyfenyl tetrazolu (deriváty **38** a **39**) byl na základě hmotnostních spekter (obr. 3.15) identifikován jediný produkt. Pravděpodobné struktury produktů jsou uvedeny na obr. 3.16. Produkty elektrooxidace obou derivátů **38** a **39** měly analogická hmotnostní spektra a lišily se o $m/z = 30$ od hmotností výchozích derivátů. Tento rozdíl je pravděpodobně způsoben rozpadem tetrazolového jádra, doprovázeného ztrátou dvou dusíkových a dvou vodíkových atomů. U obou produktů se projevují ionty $M-1$, $M-29$, $M-88$ a $M-101$. Ionty $M-1$ a $M-29$ ukazují na aromatický aldehyd či keton. Tuto domněnku potvrzuje i infračervené spektrum produktů (obr. 3.17), kde lze identifikovat charakteristickou vibraci $\nu = 1740 \text{ cm}^{-1}$ (podrobnější rozbor spektra nebyl možný kvůli přítomnosti nezreagované výchozí látky a zbytkům chloristanu sodného ze základního elektrolytu).



Obr. 3.15 Hmotnostní spektra elektrooxidačního produktu 1-(2-methoxyfenyl)-5-benzylsulfanyltetrazolu (derivát **39**) (a) spektrum s ionizací elektrospřejem, (b) spektrum s ionizací nárazem elektronů.



Obr. 3.16 Navržené struktury elektrooxidačních produktů (a) 1-(2-methoxyfenyl)-5-(4-chlorbenzylsulfanyl)tetrazolu (derivát **38**), a (b) 1-(2-methoxyfenyl)-5-benzylsulfanyltetrazolu (derivát **39**).



Obr. 3.17 Infračervené spektrum elektrooxidačního produktu 1-(2-methoxyfenyl)-5-benzylsulfanyltetrazolu (derivát **39**).

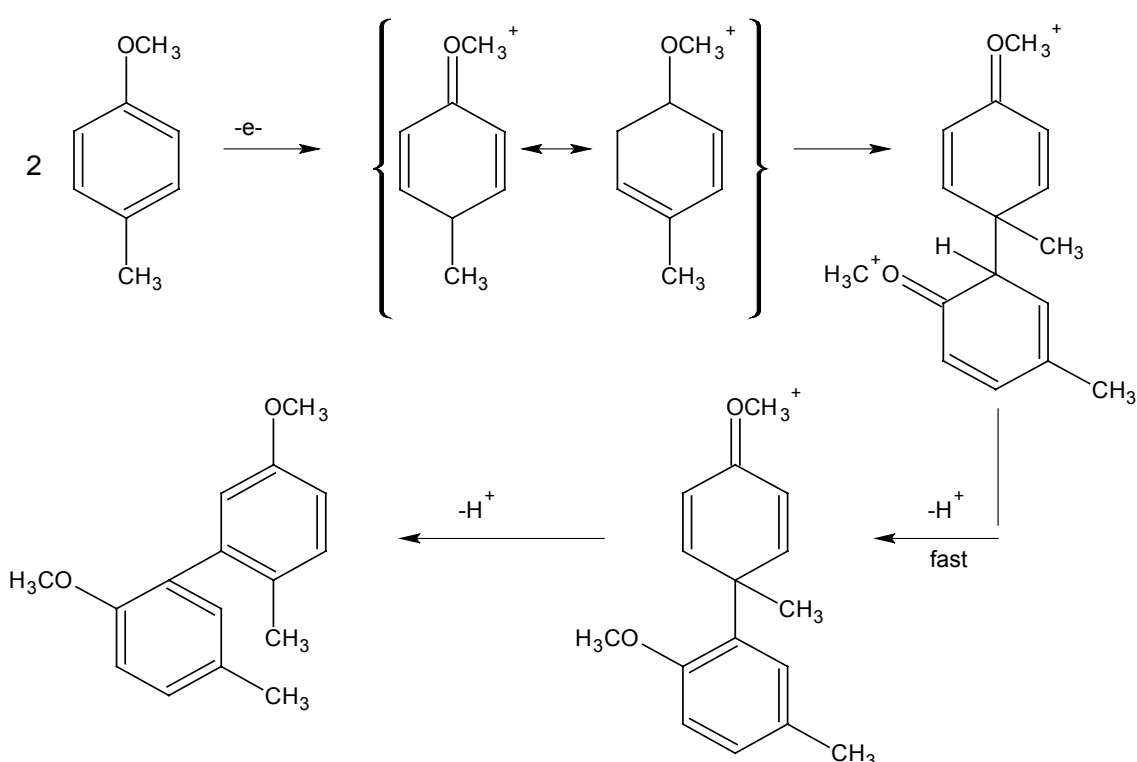
3.3.3 Diskuse k elektrooxidačním produktům

Jak bylo uvedeno výše v kap. 3.1, elektrochemicky oxidovatelné jsou pouze ty deriváty 1-fenyl-5-benzylsulfanyltetrazolu, které v molekule obsahují alespoň jednu methoxy skupinu. Elektrochemická oxidace vede pravděpodobně ke vzniku radikál kationu lokalizovaného na methoxy skupině. V případě 4-methoxyfenyl tetrazolů dochází k jeho delokalizaci do polohy 2, následované uzavřením nového cyklu s $-\text{CH}_2-$ skupinou benzylsulfanylu. V případě 2-methoxyfenyl tetrazolů dochází rovněž k uzavření nového

cyklu s –CH₂– skupinou benzylsulfanylu. Druhou alternativou je vznik kruhu mezi radikálem tvořeným methoxyskupinou a zbytkem tetrazolového kruhu.

Navržený mechanismus je v souladu s literaturou o elektrochemické oxidaci organických látek s methoxy skupinou v molekule.

Said a kol.⁸³ studovali elektrooxidaci *p*-methoxytoluenu v bezvodém acetonitrilu. Prvním krokem spárování dvou radikálkationtů vedoucí ke vzniku dimeru s vazbou v *ortho* poloze k methoxy skupině jednoho z radikálkationtů. Tento dimer podléhá rychlé monodeprotonaci (obr. 3.18). Vznik různých dimerů pozorovali titíž autoři i v případě elektrooxidace 3.4.5-trimethoxytoluenu v acetonitrilu⁸⁴.



Obr. 3.18 Schéma elektrochemické oxidace *p*-methoxytoluenu v acetonitrilu

Dimerizace vznikajících radikálkationtů byla rovněž popsána pro 9-methoxyanthracen nebo 9-acetoxanthracen⁸⁵.

Vznik nových cyklů byl pozorován u elektrochemické oxidace různých methoxy derivátů acenaftylenu a acenaftenu⁸⁶ a u *N*-(4-methoxyfenyl)-*N'*-aryl-2,2,2-trifluoroethanimidamidů⁸⁷.

4 ZÁVĚR

Předkládaná diplomová práce se zaměřila na QSPR studium elektrochemických a chromatografických vlastností nově syntetizovaných derivátů 1-fenyl-5-benzylsulfanyl-tetrazolu a na přípravu a pokus o identifikaci produktů jejich elektrochemické oxidace.

V první části práce byl studován vliv substituentů na voltametrické chování studovaných látek v prostředí acetonitrilu. Bylo zjištěno, že elektrochemicky aktivní jsou pouze methoxy deriváty studovaných tetrazolů; tento jev pravděpodobně souvisí s vlastností methoxy skupiny, která je elektrondonorová a zvyšuje tak elektronovou hustotu na sousedních atomech. Byly naměřeny půlvlnové potenciály všech methoxy derivátů studovaných látek a pomocí QSPR analýzy byla nalezena regresní rovnice popisující závislost půlvlnového potenciálu na energii HOMO orbitalu

$$E_{1/2} \text{ (V)} = -9,634 \varepsilon_{\text{HOMO}} \text{ (eV)} - 0,260 I - 0,470 \quad (3.2)$$

Vzhledem k neexistenci spolehlivé hodnoty Hammettovy σ konstanty pro methoxy skupinu byl vliv substituentů na půlvlnový potenciál studovaných tetrazolů kvantifikován pomocí Swain-Luptonových konstant

$$E_{1/2} \text{ (V)} = -0,014 F_{R1} - 0,197 R_{R1} + 0,081 F_{R2} + 0,242 R_{R2} - 0,247 I + 1,700 \quad (3.5)$$

Z hodnot regresních koeficientů jasně vyplývá, že větší vliv mají R substituentové konstanty, jež charakterizují mesomerní efekt substituentů.

Metodou RP-HPLC byl studován vliv substituentů na chromatografické chování (retenční faktor) methoxy derivátů tetrazolu. Vliv hydrofobicity molekuly, charakterizované pomocí vypočítané hodnoty rozdělovacího koeficientu oktanol/voda, na hodnotu retenčního faktoru bylo možno kvantifikovat následující korelační rovnicí

$$\log k_0 = 0,366 \log P + 0,345 I - 0,652 \quad (3.7)$$

Pomocí QSPR analýzy byla rovněž nalezena rovnice kvantifikující vliv substituentů na retenční faktor na základě hydrofobních π konstant

$$\log k_0 = 0,239 \pi_{R1} + 0,199 \pi_{R2} - 0,030 I + 1,056 \quad (3.9)$$

Z korelační rovnice je patrné, že na hodnotu retenčního faktoru má větší vliv substituent na fenyly.

Byly připraveny a analyzovány elektrooxidační produkty vybraných zástupců 2-methoxyfenyl a 4-methoxyfenyl tetrazolů. Elektrochemická oxidace vede pravděpodobně ke vzniku radikál kationu lokalizovaného na methoxy skupině. V případě 4-methoxyfenyl tetrazolů dochází k jeho delokalizaci do polohy 2, následované uzavřením nového cyklu s $-\text{CH}_2-$ skupinou benzylsulfanylu. V případě 2-methoxyfenyl tetrazolů dochází rovněž k uzavření nového cyklu s $-\text{CH}_2-$ skupinou benzylsulfanylu. Druhou alternativou je vznik kruhu mezi radikálem tvořeným methoxyskupinou a zbytkem tetrazolového kruhu.

Literatura

1. Wong M. W., Leung-Toung R., Wentrup C.: Tautomeric equilibrium and hydrogen shifts of tetrazole in the gas phase and in solution. *Journal of the American Chemical Society* **115**, 2465–2472 (1993).
2. Zhaoxu Ch., Heming X.: *Ab initio* study of thermodynamic and kinetic properties of tetrazole and its tautomerization. *Journal of Molecular Structure (Theochem)* **453**, 65–70 (1998).
3. Mazurek A. P., Osman R.: Molecular orbital studies of tautomerism in tetrazole. *Journal of Physical Chemistry* **89**, 460–463 (1985).
4. Kováč J., Kováč Š.: *Organická chémie*. ALFA, Praha 1977, str. 654.
5. Bláha K., Dědek V.: *Chemie organických sloučenin*. Díl druhý. SNTL, Praha 1987, str. 373.
6. Lenda F., Guenoun F., Martinez J., Lamaty F.: Synthesis of new tetrazole and triazole substituted pyroglutamic acid and proline derivatives. *Tetrahedron Letters* **48**, 805–808 (2007).
7. Huff B. E., LeTourneau M. E., Stazsak A., Ward J. A.: Protection, methylation and electrophilic substitution of 5-methyltetrazole. *Tetrahedron Letters* **37**, 3655–3658 (1996).
8. Biadatti T., Quicklet-Sire B., Saunier J.-B., Zard S. Z.: The tetrazolylmethyl and related radicals: A convenient access to tetrazoles and other heterocyclic derivatives. *Tetrahedron Letters* **39**, 19–22 (1998).
9. Bloor I. E., Breen D. L.: Valence-shell calculations on polyatomic molecules. I. CNDO SCF calculations on nitrogen and oxygen heterocyclics. *Journal of the American Chemical Society* **89**, 6835–6841 (1967).
10. Kabo G. J., Kozyro A. A., Krasulin A. P., Sevruk V. M., Ivashkevich L. S.: Thermodynamic properties and tautomerism of tetrazole. *Journal of Chemical Thermodynamics* **25**, 485–493 (1993).
11. Krugh W. D., Gold L. P.: The microwave spectrum of tetrazole. *Journal of Molecular Spectroscopy* **49**, 423–431 (1974).
12. Hynie S.: *Speciální farmakologie*. Díl VII/B. Karolinum, Praha 2003, str. 145.
13. World Health Organization. Data dostupná z :
<<http://www.who.int/globalatlas/dataQuery/reportData.asp?rptType=1>> [cit. 6.1.2008].
14. Samad A., Sultana Y., Akhter M. S., Aqil M.: Treatment of tuberculosis: use of active pharmaceuticals. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery* **3**, 34–44 (2008).
15. Al-Anazi K. A., Al-Jasser A. M., Evans D. A. P.: Infections caused by *Mycobacterium tuberculosis* in patients with hematological disorders and in recipients of hematopoietic stem cell transplant, a twelve year retrospective study. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* **6**, 6–16 (2007).

16. Waisser K., Klimešová V., Odlerová Ž.: The alkylthiogroup bound to the elektron-deficient atom of carbon as the pharmacophore of antituberculous activity. *Folia Pharmaceutica Universitatis Carolinae* **18**, 31–34 (1995).
17. Negwer M.: *Organic-Chemical Drugs and Their Synonyms. Vol. 2.* Berlin, Akademie Verlag 1987, p. 413.
18. Davies G. E., Driver G. W.: Action of two ethyl thiol esters against experimental tuberculosis in the guinea-pig. *British Journal of Pharmacology* **15**, 122–127 (1960).
19. Waisser K., Drhová L.: Pokroky ve vývoji nových antituberkulotik ze skupin pětičlenných heterocyklických sloučenin obsahujících jeden druh heteroatomu. *Česká a slovenská farmacie* **48**, 147–155 (1999).
20. Klimešová V., Kočí J., Zahajská L.: Pokroky ve vývoji nových antimykobakteriálních látek alkylsulfanyl skupina – farmakofor antimykobakteriální aktivity. *Česká a slovenská farmacie* **51**, 26–36 (2002).
21. Adamec J., Waisser K., Kuneš J., Kaustová J.: A note on the antitubercular activities of 1-aryl-5-benzylsulfanyltetrazoles. *Archiv der Pharmazie* **338**, 385–389 (2005).
22. Waisser K., Adamec J., Doležal R., Kaustová J.: 1-Aryl-5-benzylsulfanyltetrazoles, a New Group of Antimycobacterial Compounds against Potentially Pathogenic Strains. *Folia Microbiologica* **50**, 195–197 (2005).
23. Waisser K.: QSAR in drug design: Antitubercotics. *Folia Pharmaceutica Universitatis Carolinae* **19**, 83–90 (1995).
24. Waisser K., Doležal R., Adamec J., Palát K.: QSAR analysis of antitubercular 1-aryl-5-benzylsulfanyltetrazoles. *Folia Pharmaceutica Universitatis Carolinae* **34**, 13–16 (2006).
25. Adamec J., Beckert R., Weiß D., Klimešová V., Waisser K., Möllmann U., Kaustová J., Buchta V.: Hybrid molecules of estrone: New compounds with potential antibacterial, antifungal and antiproliferative activities. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **15**, 2898–2906 (2007).
26. Holbová E., Wildt S.: Mannichovy sloučeniny na bázi benzotiazolu jako potenciální anorektika. *Československá farmacie* **33**, 230–234 (1984).
27. Kejha J., Sluková D., Brůnová B., Maturová E., Grimová J.: Nové analgeticky účinné deriváty 1-fenyl-5-merkaptotetrazolu. *Československá farmacie* **39**, 294–298 (1990).
28. Nedvídková J., Štolba P., Štrbák V., Vanžura J., Hrabálek A., Vinšová J.: Vliv 1-p-bromfenyl-5-merkpto-1,2,3,4-tetrazolu (Br FMT) na funkci štítné žlázy potkana. *Československá farmacie* **40**, 75–77 (1991).
29. Harfenist M., Heuser D. J., Joyner Ch. T., Batchelor J. F., White H. L.: Selective inhibitors of monoamine oxidase. 3. Structure-activity relationship of tricyclics bearing imidazoline, oxadiazole, or tetrazole groups. *Journal of Medicinal Chemistry* **39**, 1857–1863 (1996).
30. Lebreton L., Curet O., Gueddari S., Mazouz F., Bernard S., Burstein C., Milcent R.: Selective and potent monoamine oxidase type B inhibitors: 2-substituted 5-aryltetrazole derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry* **38**, 4786–4792 (1995).
31. Krück F., Bablok W., Besenfelder E., Betzien G., Kaufmann B.: Clinical and pharmacological investigations of the new saluretic azosemid. *European Journal of Clinical Pharmacology* **14**, 153–161 (1978).

32. Yoshida J., Yamamoto K., Mano T., Sakata Y., Nishio M., Ohtani T., Hori M., Miwa T., Masuyama T.: Different effects of long- and short-acting loop diuretic on survival rate in Dahl high-salt heart failure model rats. *Cardiovascular Research* **68**, 118–127 (2005).
33. Choi K. Y., Kim Y. C., Lee M. G.: Mechanism of enhanced bioavailability and diuretic effect of azosemide by ascorbic acid in rats. *Life Sciences* **78**, 1057–1062 (2006).
34. Vauquelin G, Fierens F, Van Liefde I.: Long-lasting angiotensin type 1 receptor binding and protection by candesartan: comparison with other biphenyl-tetrazole sartans. *Journal of hypertension. Supplement.* **24**, S23-S30 (2006).
35. Wu S., Fluxe A., Sheffer J., Janusz J. M., Blass B. E., White R., Jackson Ch., hedges R., Murawsky M., fang B., Fadayel G. M., Hare M., Djandjighian L.: Discovery and in vitro/in vivo studies of tetrazole derivatives as Kv1.5 blockers. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **16**, 6213–6218 (2006).
36. Agrawal N. K., Maiti R., Dash d., Pandey B. L.: Cilostazol reduces inflammatory burden and oxidative stress in hypertensive type 2 diabetes mellitus patients. *Pharmacological Research* **56**, 118–123 (2007).
37. Gao L., Wang F., Wang B., Gong B., Zhang J., Zhang X., Zhao J.: Cilostazol protects diabetic rats from vascular inflammation via nuclear factor κ B-dependent down-regulation of vascular cell adhesion molecule-1 expression. *Journal of Pharmacology and Experimental therapeutics* **318**, 53–58 (2006).
38. Torii H., Kubota H., Ishihara H., Suzuki M.: Cilostazol inhibits the redistribution of the actin cytoskeleton and junctional proteins on the blood-brain under hypoxia/reoxygenation. *Pharmacological Research* **55**, 104–110 (2007).
39. US Pat 5501823. Lund G. K., Blau R. J.: *Preparation of anhydrous tetrazole gas generant compositions.* 26.3.1996.
40. US Pat 5516377. Highsmith T. K., Lund G. K., Blau R. J., Hinshaw J. C., Doll D. W.: *Gas generating compositions based on salts of 5-nitraminotetrazole.* 14.5.1996.
41. EU Pat 0600691. Onishi A., Tanaka H.: *Method of reducing the physical properties of tetrazoles.* 8.6.1994.
42. US Pat 4451555. Pollet R. J., Vandenberghe A. L., Spriet, R. A.: *Antifogging compounds and their use in silver halide photography.* 29.5.1984.
43. US Pat 7314707. Ihama M., Kawakami H., Mori, T.: *Silver halide photographic emulsion.* 1.1.2008.
44. Bhattacharya S., Vemula P. K.: Effect of heteroatom insertion at the side chain of 5-alkyl-1H-tetrazoles on their properties as catalysts for ester hydrolysis at neutral pH. *Journal of Organic Chemistry* **70**, 9677–9685 (2005).
45. Fotakis G., Timbrell J. A.: In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology letters* **160**, 171–177 (2006).

46. Mitsuyoshi H., Nakashima T., Yoshio S., Takaharu Y., Yoshiki N., Hiroki I., Koji I., Yoshikuni S., Takeshi O., Kei K.: Ursodeoxycholic acid protects hepatocytes against oxidative injury via induction of antioxidants. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **263**, 537–542 (1999).
47. Berridge M. V., Tan A. S., McCoy K. D., Wang R.: The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. *Biochemica* **4**, 14–19 (1996).
48. Mosmann T.: Rapid colometric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* **65**, 55–63 (1983).
49. Akbulut U., Toppare L., Utley J. H. P.: Electro-organic reactions. Part 18. The competition between cleavage at aryl-oxygen and at tetrazol-5-yl-oxygen bonds in the cathodic reduction of aryl tetrazolyl ethers. *Journal of the Chemical Society – Perkin Transactions II* **4**, 391–394 (1982).
50. Niyazymbetov M. E., Petrosyan V. A.: Cathodic behaviour of 5-trichloromethyltetrazole and some tetrazole derivates. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **338**, 239–249 (1992).
51. Jordanovski B., Mirčeski V., Stojanova K.: Square-wave voltammetry of 1-benzyl-tetrazole-5-thiol. *Croatica Chemica Acta* **69**, 37–47 (1996).
52. Nesměrák K., Pospíšek M., Němec I., Waisser K., Gabriel J.: Antifungal properties of substituted 1-phenyl-5-mercaptotetrazoles and their oxidation product, 5-bis-(1-phenyltetrazolyl)disulfide. *Folia Microbiologica* **45**, 138–142 (2000).
53. Cheng H., Pittman K. A., Dandekar K. A.: Liquid chromatographic determination of 9-methyl-3-(1H-tetrazol-5-yl)-4H-pyrido[1,2-a]pyrimidin-4-one in human plasma with fluorescence detection. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **76**, 918–919 (1987).
54. Helms R. J., Muni I. A., Leeling J.L.: High-pressure liquid chromatographic analysis of a tetrazolylchromone in biological fluids. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **68**, 1185–1186 (1978).
55. Tan H. S. I., Brake N. W., Keily H. J., Dalal K. J., Higson H. G.: High-performance liquid chromatographic determination of azosemide in commercial animal feed. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **68**, 1413–1416 (1979).
56. Soldner A., Spahn-Langguth H., Mutschler E.: HPLC assays to simultaneously determine the angiotensin-AT1 antagonist losartan as well as its main and active metabolite EXP 3174 in biological material of humans and rats. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **16**, 863–873 (1998).
57. Agra A. M., Huang S.: High-performance liquid chromatographic determination of a potent AII receptor antagonist (DMP 8 11) in plasma. *Journal of Chromatography* **620**, 205–209 (1993).
58. Lee J. W., Naidonga W., Johnson T., Dzerk A., Miyabayashi T., Motohashi M.: Development and validation of column-switching highperformance liquid chromatographic methods for the determination of a potent AII receptor antagonist, TCV-116, and its metabolites in human serum and urine. *Journal of Chromatography B* **670**, 287–298 (1995).
59. Hansch, C.; Leo, A.: *Exploring QSAR. Vol. I – Fundamentals and Application in Chemistry and Biology*. Washington, American Chemical Society 1995.
60. Zuman, P.: *Substituent Effects in Organic Polarography*. Plenum Press, New York 1967.

61. Okazaki, S.; Oyama, M.; Nomura, S.: Correlation between the redox potentials of 9-substituted anthracenes and the results of PM3 calculation. *Electroanalysis* **9**, 1242–1246 (1997).
62. Sioda R. E., Frankowska B.: Voltammetric oxidation of naphthalene derivatives. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **612**, 147–150 (2008).
63. Driebergen, R. J., Moret, E. E., Janssen, L. H. M., Blauw, J. S., Holthuis, J. J. M., Kelder, S. J. P., Verboom, W., Reinhoudt, D. N., Linden, W. E.: Electrochemistry of potentially bioreductive alkylating quinones Part 3. Quantitative structure-electrochemistry relationships of aziridinylquinones. *Analytica Chimica Acta* **257**, 257–273 (1992).
64. Overton E.: Ueber die osmotischen Eigenschaften der Zelle in Iber Bedeutung für die Toxikologie und Pharmakologie. *Zeitschrift für Physikalische Chemie* **22**, 189–209 (1897).
65. Lyman, W.J.: Octanol/water partition coefficient. In: *Handbook of Chemical Property Estimation Methods. Environmental Behavior of Organic Compounds*. Eds. W. J. Lyman, W. F. Reehl, D. H. Rosenblatt. Washington, American Chemical Society 1990, p. 1–54.
66. Hansch, C.; Leo, A.: *Exploring QSAR. Vol. I – Fundamentals and Application in Chemistry and Biology*. Washington, American Chemical Society 1995. *Chapter 5. Calculation of Octanol-Water Partition Coefficients by Fragments*. p. 125–168.
67. Kalizsan, R.: *Quantitative Structure-Chromatographic Retention Relationships*. New York, Wiley 1987.
68. Unger, S. H.; Cook, J. R.; Hollenberg, J. S.: Simple procedure for determining octanol-aqueous partition, distribution, and ionization coefficients by reversed-phase high-pressure liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **67**, 1364–1367 (1978).
69. Braumann T., Weber G., Grimme L. H.: Quantitative structure-activity relationships for herbicides. *Journal of Chromatography* **261**, 329–343 (1983).
70. Hammers W. E., Meurs G. J., De Ligny C. L.: Corelations between liquid chromatographic capacity ratio data on lichrosorb RP-18 and partition coefficients in the octanol-water system. *Journal of Chromatography* **24**, 1–13 (1982).
71. Berry, M.N.; Grivell, A.R.; Phillips, J.W.: Hypothesis: The electrochemical regulation of metabolism. *Pure and Applied Chemistry* **65**, 1957–1962 (1993).
72. Dalvie D. K., Kalgutkar A. S., Khojasteh-Bakht C. S., Obach R. S., O'Donnell J. P.: Biotransformation reactions of five-membered heterocyclic rings. *Chemical Research in Toxicology* **15**, 269–299 (2002).
73. Huskey S. W., Miller R. R., Chiu S. L.: *N*-glucuronidation reactions. I. Tetrazole *N*-glucuronidation of selected angiotensin II receptor antagonists in hepatic microsomes from rats, dogs, monkeys and humus. *Drug Metabolism and Disposition* **21**, 792–798 (1993).
74. Hansch C., Leo A., Hoekman D.: *Exploring QSAR 2 – Hyprophobic, Electronic, and Steric Constants*. American Chemical Society, Washington 1995.
75. Norrington F.E., Hyde R.M., Williams S.G., Wootton R.: Physicochemical-activity relations in practise. 1. Rational and self-consistent data bank. *Journal of Medicinal Chemistry* **18**, 604–607 (1975).
76. Fujita T., Iwasa J., Hansch C.: A new substituent constant, π , derived from partition coefficient. *Journal of the American Chemical Society* **86**, 5175–5180 (1964).

77. Hansch C., Leo A., Unger S.H., Kim K.H., Nikaitani D., Lien E.J.: "Aromatic" substituent constants for structure-activity correlations. *Journal of Medicinal Chemistry* **16**, 1207–1216 (1973).
78. Doerffel K., Eckschlager K.: *Optimální postup chemické analýzy*. SNTL, Praha 1985.
79. Miller J.C., Miller J.N.: *Statistics for Analytical Chemistry*. 2nd. Ellis Horwood, New York 1992.
80. Bártl J.: *Diplomová práce*. Praha, UK PŘF 2005.
81. Hansch C., Leo A., Hoekman D.: *Exploring QSAR – Hydrophobic, Electronic, and Steric Constants*. American Chemical Society, Washington 1995, str. 233.
82. Kuchař M., Rejholec V.: *Využití kvantitativních vztahů mezi strukturou a biologickou aktivitou*. Academia, Praha 1987, str. 88–94.
83. Said A. H., Mhalla F. M., Amatore C., Verpeaux J.: Mechanistic investigation of the anodic oxidation of *p*-methoxytoluene in dry and wet acetonitrile. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **464**, 85–92 (1999).
84. Said A. H., Mhalla F. M., Amatore C., Thouin L., Pebay C., Verpeaux J.: Mechanistic investigation of the anodic oxidation of 3,4,5-trimethoxytoluene in acetonitrile. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **537**, 39–46 (2002).
85. Parker V. D.: Anodic oxidation of oxygen-containing compounds. In: *Organic Electrochemistry*. M. M. Baizer (ed.). New York, Marcel Decker 1973, p. 531–550.
86. Ogibin Y. N., Ilovaisky A. I., Nikishin G. I.: Electrooxidative cleavage of C₁–C₂ bonds in acenaphthylene and acenaphthenes. *Electrochimica Acta* **42**, 1933–1946 (1997).
87. Uneyama K., Kobayashi M.: Syntheses of 1-aryl-2-trifluoromethylbenzimidazoles via electrochemically prepared *p*-benzoquinone imines. *Tetrahedron Letters* **32**, 5981–5982 (1991).

Poděkování

Děkuji za poskytnutý čas a trpělivost při experimentálním řešení této práce RNDr. Janě Sobotníkové, PhD., RNDr. Martinu Štíchovi a Mgr. Ivanu Němcovi, PhD., a zejména pak RNDr. Karlu Nesměrákovi, PhD. za rady, užitečné připomínky a odborné vedení. Děkuji celé své rodině za hmotnou i psychickou podporu po celou dobu studia.