

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
Katedra anorganické a organické chemie



**Syntéza biologicky aktivních hydroxybenzanilidů  
a jejich analog**

Diplomová práce

Vedoucí práce: PharmDr. Lenka Kubicová, CSc.

Hradec Králové, 2006

Lukáš Láznička

## **Poděkování:**

Rád bych poděkoval všem, kteří mi v průběhu celého studia pomáhali a podporovali mě. Největší dík patří PharmDr. Lence Kubicové, CSc. za ochotu, všestrannou pomoc a vedení při přípravě diplomové práce. Děkuji též Doc. PharmDr. Miloši Macháčkovi, CSc. za interpretaci spekter NMR a Mgr. Martinu Pravdovi a Ing. Pavlu Skálovi za cenné rady při práci v laboratoři. Za měření infračervených spekter děkuji paní Ivě Vencovské, za měření NMR spekter Doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc.

# OBSAH

<b>1. ÚVOD</b>	<b>4</b>
<b>2. CÍL PRÁCE</b>	<b>6</b>
<b>3. TEORETICKÁ ČÁST</b>	<b>7</b>
3.1. Biologická aktivita 2-hydroxybenzanilidů (salicylanilidů)	7
3.2. Biologická aktivita thioanalog salicylanilidů	9
3.2.1. 2-Hydroxythiobenzanilidy	9
3.2.2. Thiobenzanilidy	11
3.2.3. Dihydroxythiobenzanilidy	12
3.2.4. Trihydroxythiobenzanilidy	12
<b>4. METODICKÁ ČÁST</b>	<b>14</b>
4.1. Metody syntézy thiosalicylanilidů	14
4.1.1. Thionace 2-hydroxybenzanilidů a jejich následná hydrolyza	14
4.1.2. Syntéza thiosalicylanilidů založená na Friedelově-Craftsově reakci	15
4.1.3. Thionace salicylanilidů s chráněním hydroxyskupiny	16
4.2. Metody syntézy salicylanilidů	18
<b>5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b>	<b>20</b>
5.1. Metody použité v experimentální části	20
5.2. Syntéza 4-chlorsalicylanilidů	21
5.3. Syntéza 4-chlorthiosalicylanilidů	27
<b>6. VÝSLEDKY A DISKUSE</b>	<b>37</b>
<b>7. ZÁVĚR</b>	<b>39</b>
<b>8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b>	<b>40</b>
<b>9. PŘÍLOHA</b>	<b>47</b>

# 1. ÚVOD

Systémové mykózy jsou vážnou a obávanou komplikací moderní medicíny. Antimykotika se systémovým účinkem jsou indikována zejména u imunoalterovaných nemocných, u nichž je porucha imunity predisponujícím faktorem pro vznik oportunních mykóz.<sup>1</sup> Incidence invazivních mykóz narůstá, mortalita na systémové mykózy se pohybuje mezi 40-90 %. Mezi nejběžnější patří kandidóza, aspergilóza a zygomykóza. Všechny jsou u imunokompromitovaných pacientů obtížně diagnostikovatelné (ante mortem) a léčba není vždy úspěšná (viz výše).<sup>2</sup> Ohroženi jsou zejména nemocní po transplantaci kostní dřeně, pacienti s akutní leukémií v indukční léčbě nebo s jinými hematologickými malignitami léčenými agresivní chemoterapií, včetně pacientů po transplantaci periferních kmenových buněk. Dále nemocní s HIV infekcí, nemocní po transplantaci orgánů (zvláště plic, jater) a někteří nemocní na jednotkách intenzivní péče.<sup>1</sup>

Pro celkové použití u systémových mykóz je dostupných několik skupin preparátů. Jsou to: polyenová antimykotika (koloidní disperze amfotericinu B, lipidový komplex amfotericinu B), deriváty triazolu (flukonazol, itrakonazol, vorikonazol a nejnovější posakonazol) a reprezentanti nové skupiny echinokandinových antimykotik (kaspofungin, micafungin, v klinickém testování aminokandin). Proti dermatofytům se používá terbinafin.<sup>3</sup>

Amfotericin B (AmB) patří stále k neúčinnějším lékům u systémových mykóz. Pro jeho časté nežádoucí účinky (nefrotoxicita, cephalea, horečka, třes, deplece kalia a magnesia) je snaha připravit jeho méně toxické formy.<sup>4</sup> Do praxe byl zaveden amfotericin B navázaný na lipidový nosič (ABLC - amphotericin B lipid komplex, Abelcet<sup>®</sup> i.v.). ABLC je složen z ekvimolárního množství amfotericinu B a dvou fosfolipidů (dimyristoylfosfatidylcholinu a dimyristoylfosfatidylglycerolu).<sup>2</sup> Proti amfoternímu koloidnímu AmB (Amphocil<sup>®</sup> i.v.) mají amfotericiny vázané na tukový nosič, vzhledem k lipofilnímu charakteru molekuly, jiné farmakokinetické (tkáňové distribuce - s depozicí nejvyšších koncentrací v RES systému jater, sleziny a plic) a farmakodynamické vlastnosti, které jsou podstatou snižené (20 %) nefrotoxicity. Vazba na lipidový nosič umožňuje "dopravit" amfotericin specificky do infikované tkáně, k fungální membráně, kde se z vazby na lipidový nosič uvolňuje, a jako volný AmB v lokálně vysoké koncentraci eliminuje infekci. Tak jen malá část volného AmB postupně interaguje s cholesterolem savčích membrán včetně tubulárního aparátu ledvin (výrazně nižší koncentrace AmB v ledvině). U ABLC slouží cirkulující makrofágy (granulocyty, monocyty) jako transportér AmB do místa fungální infekce.<sup>1</sup>

Mezi novější antimykotika patří triazolový derivát vorikonazol (Vfend<sup>®</sup> inf., tbl.) Působí fungicidně (jako jediný) u vláknitých hub (aspergily, *Fusarium*), fungistaticky u kandid.<sup>1</sup> Je tedy lékem volby u prokázané a pravděpodobné aspergilózy. Má nejlepší pozici u vysoce rizikových nemocných v empirické léčbě, lepší než lipidové formy amfotericinu.<sup>5</sup> Možná je jeho kombinace s kaspofunginem. Kontraindikace je těžké jaterní poškození, limitem použití jsou lékové interakce.<sup>1</sup>

Posakonazol (Noxafil<sup>®</sup>), stejně jako ostatní triazoly, inhibuje enzym lanosterol 14 $\alpha$ -demetylázu, důležitý enzym pro syntézu ergosterolu. Je účinný proti aspergilózám rezistentním na AmB nebo itrakonazol. Má méně nežádoucích účinků, menší riziko lékových interakcí, protože není metabolizován jaterním cytochromem P450.

Zcela odlišný mechanismus účinku od dosavadních systémových antimykotik - inhibice syntézy buněčné stěny (inhibice syntézy 1,3- $\beta$ -D-glukanu) vykazuje echinokandinový zástupce kaspofungin (Cancidas<sup>®</sup> i.v.). Jako jediný vykazuje fungicidní aktivitu u kandid, fungistatický je u vláknitých hub. Je proto lékem 1. volby u invazivní kandidózy. Odlišný mechanismus účinku je dobrým potenciálem pro kombinace s jinými antimykotiky (vorikonazol, AmB, itrakonazol atd.). Micafungin (obchodní název nebyl dosud zveřejněn), semisyntetický lipopeptid ze stejné skupiny, je indikován pro léčbu esofageální kandidózy u pacientů s HIV infekcí a jako prevence kandidové infekce u pacientů, kterým byla transplantována kostní dřeň. Jeho přesné místo v terapii se teprve vyvíjí a musíme počkat na výsledky dalších klinických studií a zkušeností s jeho používáním.<sup>6</sup>

Výzkum dalších antifungálních a antimikrobních léčiv je stále jedním z významných úkolů dnešní farmaceutické chemie a to zejména kvůli rychle narůstající rezistenci a stále se zvyšujícímu počtu imunosuprimovaných pacientů, ohrožených infekcemi vyvolanými oportunními patogeny.

Salicylanily a thiosalicylanily jsou pro své široké spektrum biologických aktivit potenciálními modelovými strukturami pro vývoj dalších léčiv.

## 2. CÍL PRÁCE

Předkládaná diplomová práce je příspěvkem k výzkumu thiosalicylanilidů jako látek s významnou biologickou aktivitou. Protože dosud nebyla studována aktivita 4-chlorthiosalicylanilidů, je předmětem diplomové práce syntéza různě substituovaných 4-chlorthiosalicylanilidů a porovnání jejich antifungální aktivity se 4-methylthiosalicylanilidy a s thiosalicylanilidy substituovanými chlorem v jiných polohách. Cílem bylo:

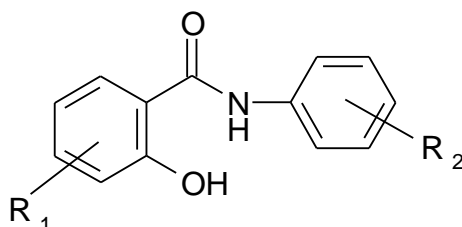
- 1) v teoretické části shrnout základní poznatky o biologické aktivitě 2-hydroxybenzanilidů a jejich thioanalog
- 2) optimalizovat metodiku syntézy a izolace 2-hydroxybenzanilidů a 2-hydroxythiobenzanilidů substituovaných chlorem v poloze 4 v podmínkách mikrovlnného reaktoru
- 3) připravit sérii různě substituovaných 4-chlor-2-hydroxythiobenzanilidů a jejich vzorky odevzdat k testování biologické aktivity

Práce je součástí výzkumu KAOCH řešeného v rámci grantu GAUK 312/2005 B CH a výzkumného záměru MŠMT č. MSM 0021620822.

## 3. TEORETICKÁ ČÁST

### 3.1. Biologická aktivita 2-hydroxybenzanilidů (salicylanilidů)

Salicylanilidy jsou skupinou látek se širokým spektrem biologické aktivity, která závisí na druhu, počtu a poloze substituentů. Nejvýznamnější z nich jsou např. účinky: antimykotické, antibakteriální, antituberkulózní, antiprotozoální, herbicidní, anthelmintické. Pro své desinfekční a antioxidační účinky nacházely salicylanilidy využití jak v medicínských, tak v technických a průmyslových oborech. V kosmetice se používaly jako součást detergenčních směsí.



Ze zástupců lze jmenovat např.: florosalan (3,5-dibrom-4'-trifluormethylsalicylanilid), tribromsalan (3,4',5'-tribromsalicylanilid) a 3,3',4',5'-tetrachlorsalicylanilid. Přestože z prvních toxikologických studií, prováděných v době jejich zavádění do praxe, vyšly salicylanilidy jako sloučeniny s velmi nízkou akutní i chronickou toxicitou, již za několik let se ukázalo, že vyvolávají alergické reakce projevující se jako dermatitidy.<sup>7</sup> U halogenovaných salicylanilidů pozorujeme dva typy reakcí souvisejících s ozářením. První z nich je fotoalergická, buňkami zprostředkovaná, alergická reakce pozdního typu, kde salicylanilid (fotoalergen) působí jako prohaptén. Druhou z nich je tzv. fototoxický účinek, což je zánětlivá reakce na chemické poškození tkání reaktivními formami kyslíku, které jsou produkovány působením fototoxické látky a UV záření.<sup>8,9,10,11</sup>

Právě tyto fotokontaktní dermatitidy byly hlavním důvodem postupného stahování halogenovaných salicylanilidů z používání.<sup>7</sup> V roce 1975 dokonce americký úřad Food and Drug Administration nařídil jejich stažení.<sup>12</sup>

V posledních letech se však salicylanilidy začaly těšit znovu větší pozornosti v souvislosti s jejich významnou biologickou aktivitou, která byla ve většině případů objasněna na molekulové úrovni. Staly se modelovými strukturami pro vývoj nových typů hlavně antivirotik, cytostatik a antimikrobních léčiv.<sup>13,14,15</sup> Např. v roce 2003 byl objeven účinek niklosamidu na koronavirus, který způsobuje obávané respirační onemocnění SARS. Niklosamid a salicylanilidy inhibují virovou proteázu, která je důležitá pro správnou replikaci

viru.<sup>16</sup> Rovněž nedávno byl popsán účinek salicylanilidů na proteintyrosinkinázu receptoru pro epidermální růstový faktor, který je perspektivním místem zásahu nových cytostatik proti nádorům epiteliálního původu (karcinom prsu, ovaria, plic atd.). Salicylanilidy zde působí jako ATP kompetitivní inhibitory s aktivním místem enzymu.<sup>17</sup>

Na antibakteriálním účinku salicylanidů se podílí více mechanismů. Kromě již delší dobu známého účinku na oxidativní fosforylaci,<sup>18,19</sup> je to inhibice dvoukomponentových regulačních systémů bakterií složených z histidin-proteinkinázy (HPK) a regulátoru odpovědi.<sup>20</sup> Dále je to např. ovlivnění sekrece typu III u patogenních gramnegativních bakterií.<sup>21</sup>

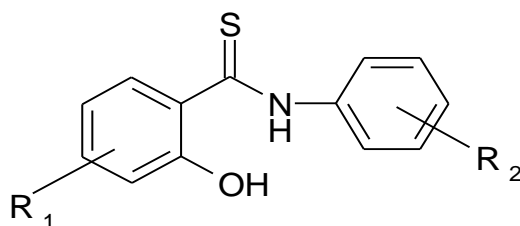


## 3.2. Biologická aktivita thioanalog salicylanilidů

Thioamidová funkční skupina se vyskytuje jako farmakofor u mnoha protituberkulózně účinných látek včetně některých antituberkulotik zavedených do praxe a také u některých antimykotik (tolnaftát). Záměna oxoskupiny thioxoskupinou vede často k prudkému vzestupu antimykobakteriální aktivity nebo rozšíření spektra účinku na atypické kmeny mykobakterií.<sup>22</sup>

### 3.2.1. 2-Hydroxythiobenzanilidy

2-Hydroxythiobenzanilidy (thiosalicylanilidy) mají různé biologické účinky v závislosti na substituci.<sup>23</sup> V minulosti byly vyvíjeny především jako anthelmintika, ale mají i antimykotické, antibakteriální, antiprotozoální a herbicidní účinky.<sup>24</sup>



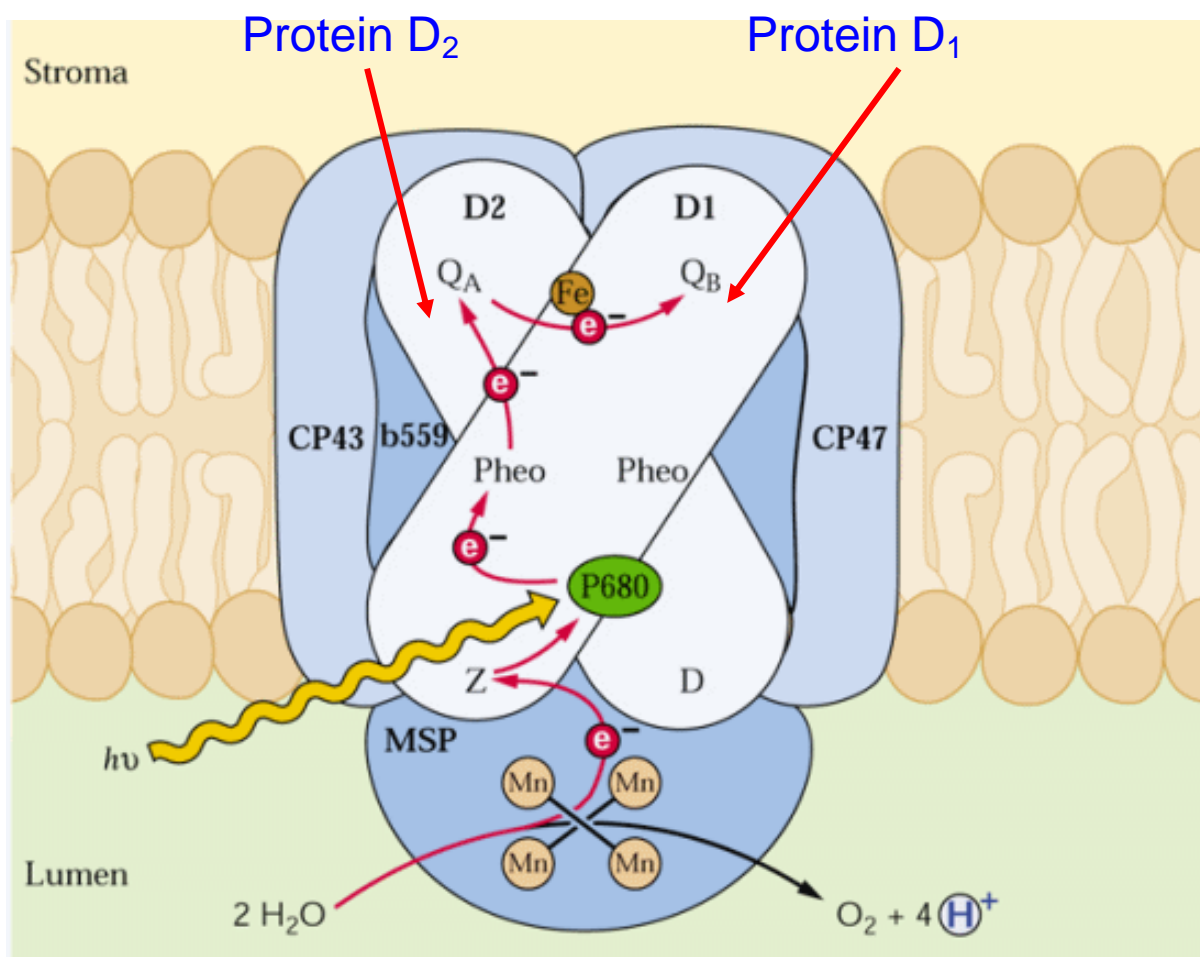
V roce 1998 byla popsána jejich antimykobakteriální aktivita K. Waissereem et al.<sup>7</sup> Oproti thiobenzanilidům nebo 2-aminothiobenzanilidům projevují in vitro vyšší antimykobakteriální účinnost, což lze přičíst právě substituci hydroxyskupinou v poloze 2.<sup>25,26</sup> Účinnost se dále zvyšuje při substituci chlorem v poloze 5, disubstituce chlorem v polohách 3 a 5 aktivitu spíše snižuje.<sup>27,28</sup> 3',4'-Dichlorthiosalicylanilid, testovaný in vivo na modelu experimentální tuberkulózy myši, nebyl účinný, pravděpodobně pro příliš nízkou rozpustnost ve vodě.<sup>29</sup> Z dalších studií vyplynulo, že pro účinnost vůči atypickým kmenům mykobakterií nemá patrně thiokarbonylová skupina tak velký význam, jak se původně předpokládalo.<sup>30,31,32</sup> Také mezi cyklickými deriváty thiosalicylanilidů byly nalezeny vysoce účinné antimykobakteriální látky se širokým spektrem aktivity - 3-aryl-2*H*-1,3-benzoxazin-2(3*H*)-dithiony a 3-aryl-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazin-2(3*H*)-ony. Substitucí chlorem v poloze 6 bylo u těchto cyklických látek dosaženo zvýšení aktivity.<sup>32</sup>

Antifungální aktivita thiosalicylanilidů je známa již od 60. let.<sup>24</sup> Zájem o ně, jako potenciální antimykotika, vzrostl v souvislosti s jejich specifickou aktivitou proti *Absidia corymbifera* z řádu Mucorales (*Zygomycetes*), do kterého patří původci těžkých systémových

mykóz. Tyto houby jsou rezistentní na všechna antimykotika kromě amfotericinu B. Právě thiosalicylanilidy byly proti *A. corymbifera* in vitro účinnější než amfotericin B používaný jako standard. Přítomnost chloru v poloze 5 i disubstituce chlorem v polohách 3 a 5 dále zvyšují účinek proti *A. corymbifera*.<sup>33</sup> 3,5-Dichlor-4'-ethylthiosalicylanilid byl účinný již v koncentraci  $0,03 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Vysoká aktivita byla nalezena také vůči *Trichophyton mentagrophytes*.<sup>28</sup>

Thiosalicylanilidy, podobně jako většina látek obsahujících skupinu CSNH, také působí herbicidně, interagují s chlorofylem a způsobují inhibici transportu elektronů při fotosyntéze. Inhibiční účinek je vyvolán jejich interakcí s intermediátem  $D^+$ , tj. s tyrosinovým radikálem na 161. pozici proteinu  $D_2$  na donorové straně fotosystému 2, který je umístěn na thylakoidní membráně.<sup>34</sup>

Obrázek 1<sup>35</sup>



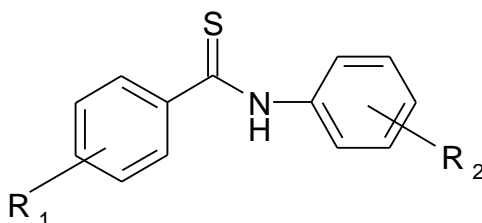
Tento jejich účinek byl podrobně studován např. u 3-methylthiosalicylanilidů. Spektrofotometricky se sledoval vliv na inhibici rychlosti vývoje kyslíku v chloroplastech špenátu (*Spinacia oleracea*) v přítomnosti akceptoru elektronů 2,6-dichlorfenol-indofenolu

(DPIP). Po přidání donoru elektronů 1,5-difenyلكarbazidu (DPC) se známým místem účinku (intermediáty Z+/D+) k chloroplastům inhibovaným thioanilidy, docházelo ke kompletní obnově redukce DPIP. Z toho vyplývá, že jádro fotosystému 2 (P680) a část elektronového transportního řetězce (přinejmenším po plastochinon) zůstaly nepoškozené.<sup>36</sup>

Thiosalicylanilidy vykazují také antialgální aktivitu. Inhibiční účinek thiosalicylanilidů na produkci chlorofylu byl studován ve staticky kultivovaných algálních suspenzích *Chlorella vulgaris*. Stejně jako v předchozích případech se i zde projevila důležitost substituce hydroxyskupinou v poloze 2.<sup>37,38</sup>

### 3.2.2. Thiobenzanilidy

Thiobenzanilidy vykazují antifungální, antibakteriální, herbicidní a insekticidní aktivitu. Studována byla též jejich antimykobakteriální účinnost.<sup>39</sup>



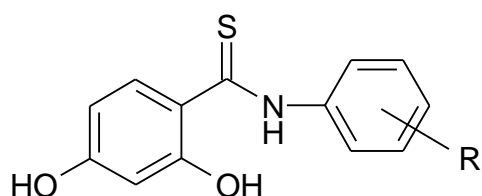
Thiobenzanilidy substituované v poloze 2' pětičlenným heterocyklem se dvěma heteroatomy byly patentovány pro svoji účinnost proti fytopatogenním houbám.<sup>40</sup> Významnou aktivitu vůči *Trichophyton mentagrophytes* a *Candida albicans* vykazuje skupina 3- a 4-fluorthiobenzanilidů, které jsou dále různě substituovány v anilidové části molekuly.<sup>41</sup> Inhibice fotosyntézy v chloroplastech špenátu byla pozorována u thiobenzanilidů substituovaných v poloze 3 nebo 4 halogenem. Také některé 5-fluorsubstituované deriváty působí herbicidně.<sup>42</sup>

Na Farmaceutické fakultě UK byla studována antimykobakteriální aktivita 4'-alkylthiobenzanilidů. Zjistilo se, že 4'-isopropylderiváty jsou účinnější než 4'-butylderiváty, vliv substituentu v poloze 3' se jevil jako zanedbatelný.<sup>43</sup>

Mezi substituovanými thioanilidy byly též nalezeny sloučeniny způsobující selektivní inhibici reverzní transkriptázy viru HIV-1. Thiobenzanilidy však nepatřily k látkám s nevyšší aktivitou.<sup>44,45</sup> *N*-[(2-Hydroxycyklohexyl)methyl]thiobenzamidy byly účinné proti viru chřipky, selektivně inhibovaly fúzi virové a endosomální membrány stabilizací hemaglutininu.<sup>46</sup>

### 3.2.3. Dihydroxythiobenzanilidy

Dihydroxythiobenzanilidům byla v posledních letech věnována značná pozornost. Skupina autorů z Polska syntetizovala tyto sloučeniny různě substituované v anilidové části molekuly, bez další substituce v thioacylové části molekuly. Tyto látky vykazovaly vysokou aktivitu proti dermatofytům<sup>47</sup>, kvasinkám<sup>48</sup>, vláknitým<sup>49</sup> a fytopatogenním<sup>50</sup> houbám.



Ze studií QSAR (kvantitativní hodnocení vztahů mezi chemickou strukturou a biologickou aktivitou) vyplynulo, že zavedením lipofilních substituentů do anilínové části molekuly stoupá jejich aktivita proti dermatofytům. Závisí však také na poloze substituentů.<sup>51</sup> Proti vláknitým houbám vykazují největší aktivitu halogenované deriváty.<sup>49</sup> Vysoce účinný byl také derivát 4'-*sek*-butyl-2,4-dihydroxybenzanilid. Přestože se pro antimykotický účinek jeví jako rozhodující parametr lipofilita molekuly, v případě vláknitých hub a kvasinek se uplatňují i elektronové vlivy.<sup>52,53</sup>

Velmi účinné antifungální látky byly nalezeny i ve skupině *N*-heterocyklických analog<sup>54</sup> a *N,N* disubstituovaných 2,4-dihydroxythiobenzanilidů.<sup>55</sup> Obměny na thioamidové funkční skupiny vedou ke snížení nebo ztrátě antifungální aktivity.<sup>50</sup>

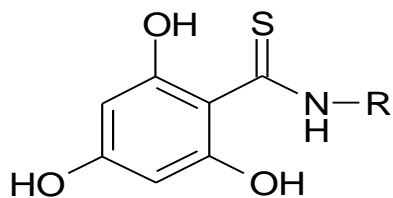
Antimikrobní aktivita proti grampozitivním bakteriím *in vitro* byla nalezena i u různě substituovaných 2,4-dihydroxythiobenzanilidů.<sup>56</sup> U 4,4'-dihydroxythiobenzanilidů substituovaných na dusíku thioamidové skupiny substituentem obsahujícím trifluormethyl byla nalezena vysoká afinita k estrogením jaderným receptorům.<sup>57</sup>

Toxikologické studie ukázaly relativně nízkou akutní toxicitu 2,4-dihydroxybenzanilidů.<sup>58</sup> Cytotoxicita byla nižší než u enilkonazolu použitého jako standard a závisela na substituci a anilínové části molekuly. Nejvyšší cytotoxicitu vykazovaly deriváty substituované chlorem nebo fluorem.<sup>59</sup>

### 3.2.4. Trihydroxythiobenzanilidy

*N*-substituované trihydroxybenzanilidy a trihydroxythiobenzanilidy byly testovány *in vitro* v primárním screeningu protinádorové aktivity, kde vykazovaly poměrně silnou aktivitu na rozdíl od mono- a dihydroxyderivátů, které byly neaktivní. *N*-Alkylthiobenzamidy byly

účinnější a méně cytotoxické než odpovídající amidy. *N-sec-Butyl-3-propanoyl-2,4,6-trihydroxythiobenzamid* byl účinný také in vivo v testu na inhibici karcinogeneze kožních nádorů u myší.<sup>60</sup>



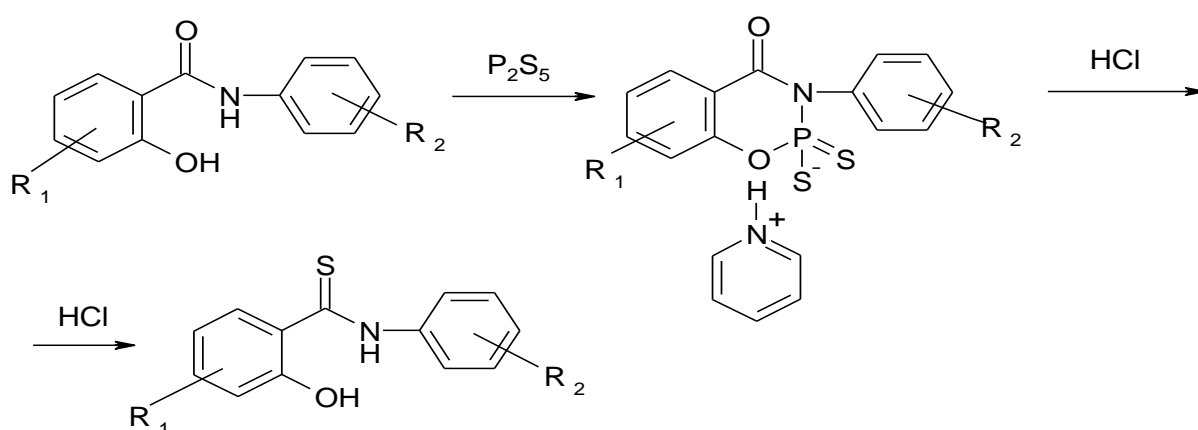
Biologické aktivitě trihydroxythiobenzanilidů s jinými kombinacemi poloh hydroxyskupin v thioacylové části molekuly nebyla dosud věnována pozornost.

## 4. METODICKÁ ČÁST

### 4.1. Metody syntézy thiosalicylanilidů

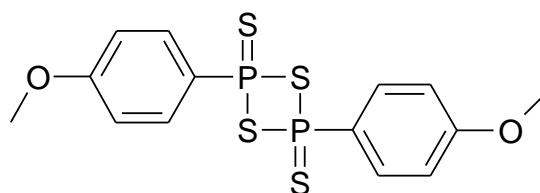
#### 4.1.1. Thionace salicylanilidů a jejich následná hydrolýza

Dřívější pokusy o thionaci salicylanilidů sulfidem fosforečným nebyly úspěšné a mělo se za to, že thiosalicylanilidy nelze tímto způsobem připravit. Teprve před několika lety byla na KAOCH vyvinuta nová metoda přípravy.<sup>61</sup>



Tento postup vychází z reakce 2-hydroxybenzanilidu se sulfidem fosforečným v prostředí pyridinu. Vzniklý meziproduct (pyridinium-3-fenyl-2,4-dithio-3,4-dihydro-1,3,2λ<sup>5</sup>-benzoxazafosfinin-2-thiolát) lze snadno rozložit kyselou hydrolýzou, která se provádí ve směsi toluen - voda 1:1. Vodná fáze se okyslí přidávkem kyseliny chlorovodíkové. Dále se směs za intenzivního míchání zahřívá pod zpětným chladičem nebo v mikrovlnném reaktoru. Výsledný lipofilní produkt, hromadící se v organické fázi, lze relativně snadno izolovat z reakční směsi. Pro správný průběh syntézy je důležité zvolit vhodné množství pyridinu, aby nedošlo k narušení tvorby vznikající pyridinové soli. Vyvinutá metoda je pro poměrně vysoké výtěžky vhodná pro přípravu salicylanilidů.

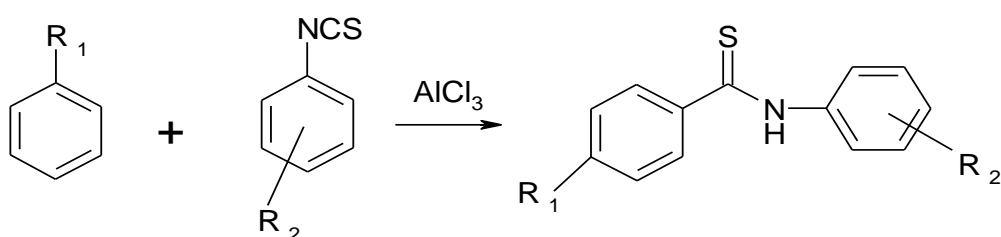
Thionace Lawessonovým činidlem je obecná metoda, kdy lze převést oxoskupinu na thioskupinu při teplotě 20°C. Thionačním činidlem je Lawessonovo činidlo: 2,4-bis(4-methoxyfenyl)cyklodifosfathian-2,4-dithion.



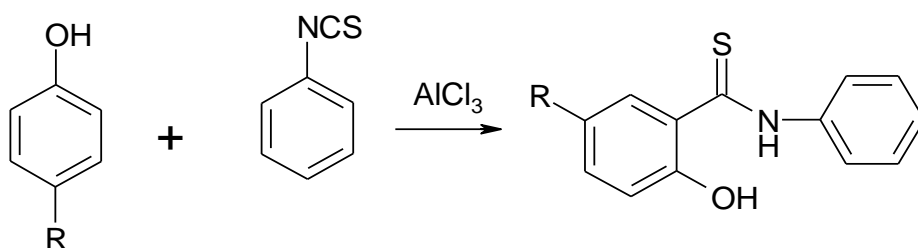
Reakce probíhá v prostředí tetrahydrofuranu, poměr<sup>62</sup> substrátu a Lawessonova činidla je 2:1. Bylo však zjištěno, že přítomnost hydroxyskupiny v poloze 2 má za následek vznik znečištěných produktů a je příčinou nízkých výtěžků. Vznik vedlejších cyklických produktů lze omezit změnou reakčního prostředí na hexamethyltriamid fosforylu.<sup>63,64</sup> Jeho použití je však do značné míry limitováno jeho vysokou toxicitou.

#### 4.1.2. Syntéza thiosalicylanilidů založená na Friedelově-Craftsově reakci

Nejstarším způsobem syntézy thiosalicylanilidů je reakce fenyliothiokyanátu s aromatickými uhlovodíky v prostředí nitrobenzenu.<sup>65</sup>



Při reakci se projevuje orientující vliv substituentů. Ze sterických důvodů fenolu nevzniká salicylanilid, ale 4-hydroxythiobenzanilid.<sup>66</sup> Pokud bychom chtěli připravit thiosalicylanilid, museli bychom použít fenol s obsazenou polohou para vůči fenolické skupině.<sup>67</sup>



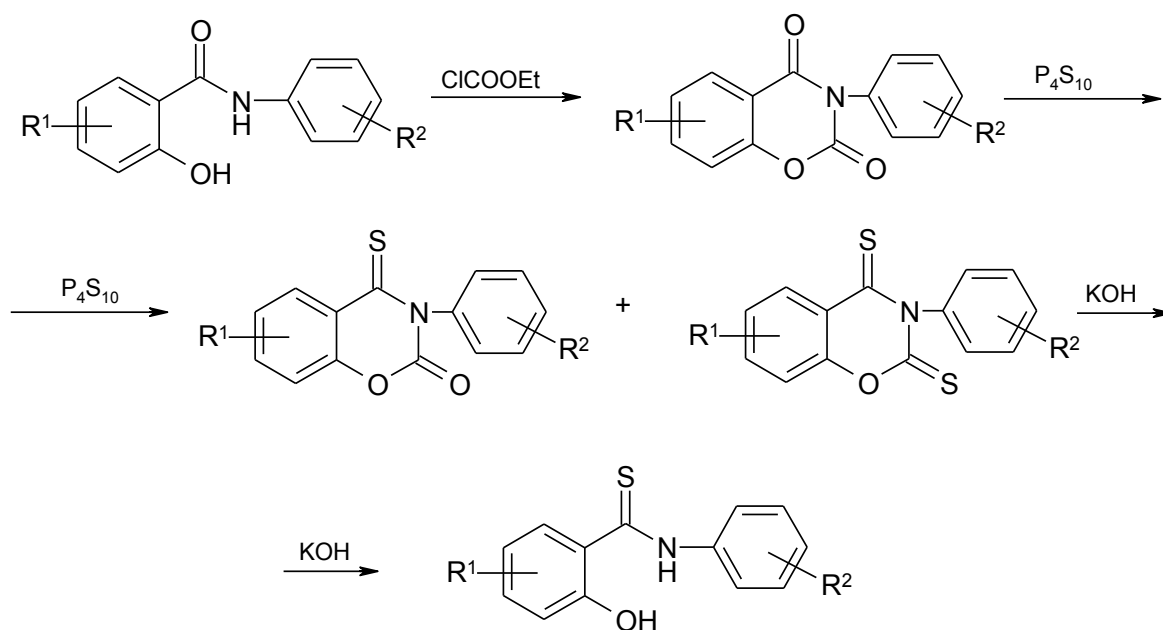
R = alkyl, halogen

Omezením syntéz založených na Friedelově-Craftsově reakci (stejně jako při přípravě salicylanilidů) je příprava thiosalicylanilidů pouze s určitými, pro elektrofilní substituci výhodnými kombinacemi substituentů.

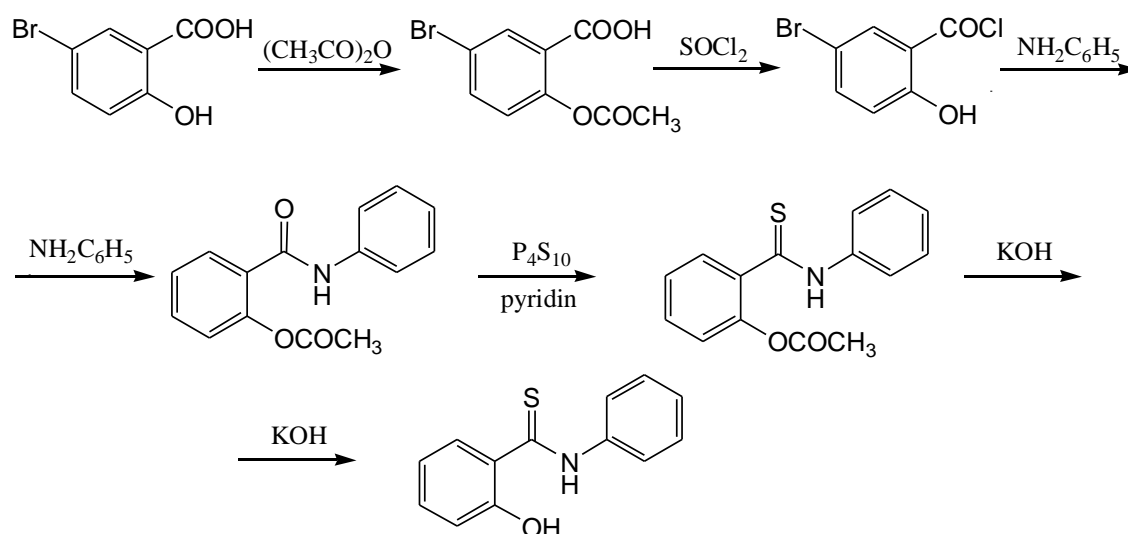
### 4.1.3. Thionace salicylanilidů s chráněním hydroxyskupiny

Hydroxyskupinu můžeme chránit buď acetylací (Jančevska et al.),<sup>68</sup> nebo cyklizací dle Wagnera.<sup>69</sup>

Wagnerova metoda využívá cyklizaci salicylanlidu s estery kyseliny chlormravenčí. Vzniklý meziprodukt se taví se sulfidem fosforečným a následnou alkalickou hydrolyzou vzniká konečný produkt - thiosalicylanilid.



V druhém případě se chrání hydroxyskupina acetylací. Z 5-bromsalicylové kyseliny vzniká reakcí s acetanhydridem 2-acetyl-5-bromsalicylová kyselina, která je převedena na chlorid. Ten reaguje s anilinem a vzniklý anilid je podroben thionaci sulfidem fosforečným. Volnou hydroxyskupinu získáme zpět alkalickou hydrolyzou.

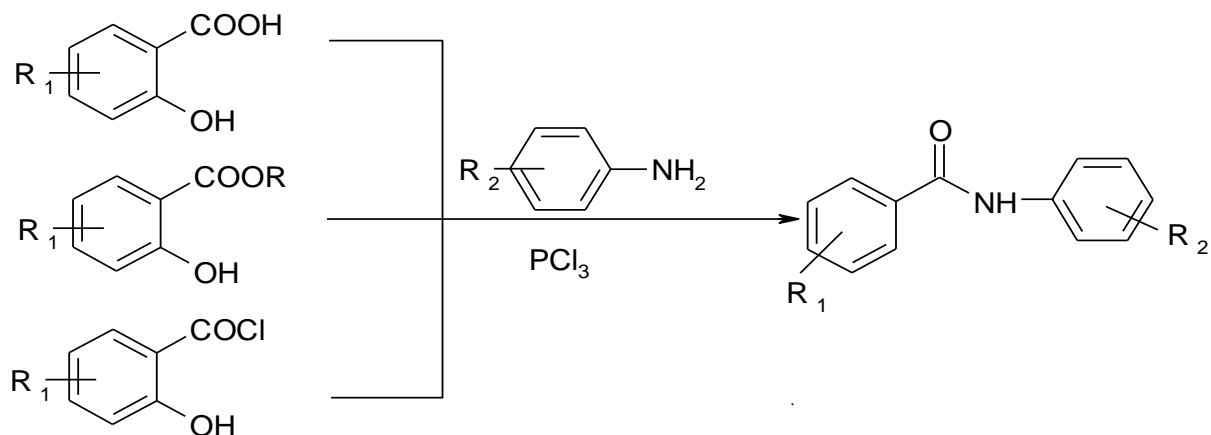




Zvolená metoda syntézy thiosalicylanilidů byla thionace salicylanilidů sulfidem fosforečným s následnou kyselou hydrolýzou.<sup>61</sup> Jako thionační činidlo byl zvolen sulfid fosforečný, protože z předchozích studií vyplynulo,<sup>70,71,72</sup> že oproti jiným thionačním činidlům (např. Lawessonovo činidlo) vede k dosažení nejvyšších výtěžků thiosalicylanilidů. Další výhodou použití sulfidu fosforečného je relativně snadná izolace produktu.

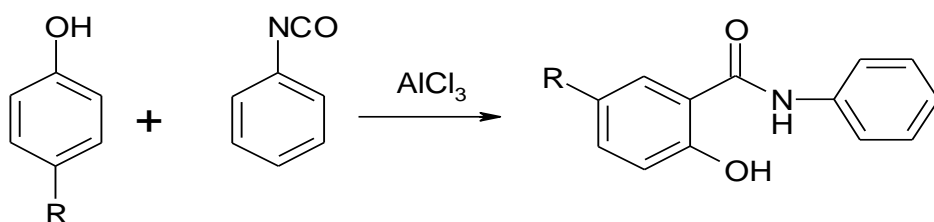
## 4.2. Metody syntézy salicylanilidů

Výchozí salicylanilidy lze připravit přímo z kyseliny salicylové nebo z jejích funkčních derivátů – chloridů a esterů. Reakce kyseliny salicylové s různě substituovanými aniliny probíhá za přítomnosti chloridu fosforitého v prostředí nepolárního rozpouštědla.<sup>73,74</sup> Rozpouštědlem bývá nejčastěji chlorbenzen, toluen nebo xylén.

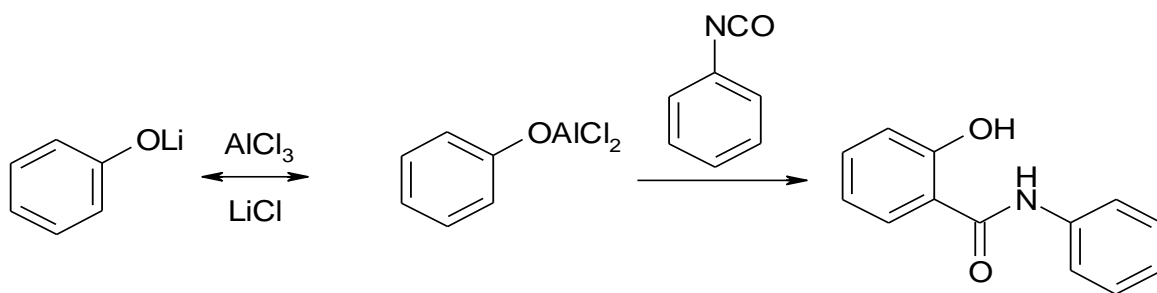


Pyridin, který používali jako rozpouštědlo Kótai a Szokán, se sice jeví jako vhodné (váže v reakci vznikající chlorovodík), jeho nevýhodou je však podstatně pracnější izolace produktu z reakční směsi.<sup>75</sup>

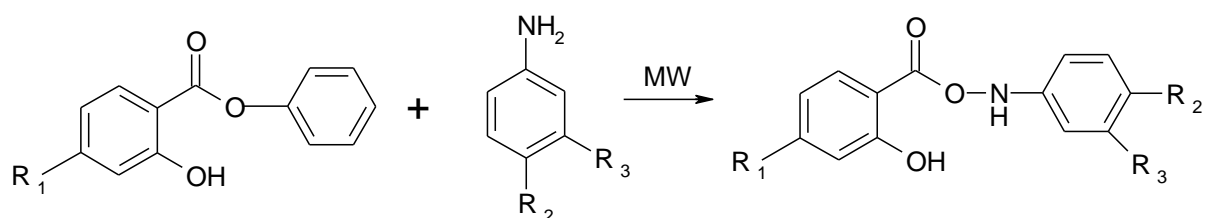
Dále existuje možnost přípravy salicylanilidů z fenolů *ortho*-aminokarbonylací fenyloisokyanátem. Reakce je založena na principu Friedelovy-Craftsovy reakce.<sup>66</sup>



Varianta této syntézy byla popsána Balduzzim et al.<sup>76</sup> Jedná se o reakci fenolu s roztokem *n*-bytyllithia v hexanu a s chloridem hlinitým v prostředí xylenu za pokojové teploty. Po přidání fenyloisokyanátu v xylenu je směs udržována za varu pod zpětným chladičem po dobu 20 hodin. Reakce se ukončí přidáním 10 % kyseliny chlorovodíkové. Reakční podmínky se musí přesně dodržet, jakákoli změna totiž vede ke vzniku směsi produktů či k výraznému poklesu výtěžku.



Stále více se dnes v organické syntéze využívá mikrovlnného záření (např. k urychlení reakcí). Jde o trend převedení různých syntetických reakcí do mikrovlnného reaktoru. V roce 2003 byla slovenskými autory popsána i tzv. „solvent-free“ syntéza salicylanilidů založená na reakci esterů kyseliny salicylové s aniliny.<sup>77</sup>



Z popsaných metod byla pro syntézu salicylanilidů použita reakce kyseliny salicylové s anilinem a chloridem fosforitým v chlorbenzenu. Jedná se o jednostupňovou reakci s dobrým výtěžkem. Pro syntézu jsme se rozhodli využít mikrovlnný reaktor.

## 5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 5.1. Metody použité v experimentální části

Průběh reakcí a čistotu produktů jsem sledoval pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC) na Silufolu UV 254/366. Jako mobilní fázi jsem používal ethylacetát nebo směsi aceton-petrolether 1:4, aceton-hexan 1:4. Chromatografické sloupce pro sloupcovou chromatografii jsem připravil nalitím řídké suspenze adsorbentu v rozpouštědle do chromatografické trubice. Adsorbentem byl vždy silikagel o velikosti částic 0,1 – 0,2 mm. Jako mobilní fázi jsem použil směsi acetonu a petroletheru 1:15. Preparativní tenkovrstvou chromatografii na sypaných vrstvách jsem prováděl běžným způsobem, tzn. nanesením adsorbentu v tenké vrstvě na pevnou podložku, v chromatografických komorách nasycených parami rozpouštědel. Adsorbentem byl vždy silikagel o velikosti částic 0,1 – 0,2 mm a jako mobilní fázi jsem použil směsi acetonu a petroletheru 1:9. Preparativní chromatografii na silufolu jsem prováděl nanesením roztoku vzorku ve vhodném rozpouštědle na linii startu ve formě proužku. Jako mobilní fázi jsem použil směsi acetonu a petroletheru 1:9. Po vyvinutí a vysušení jsem seškrabal jednotlivé zóny spolu se sorbentem z desky a vhodným rozpouštědlem jsem je extrahoval.

Teploty tání jsem měřil na Koflerově bloku a nekorigoval jsem je. Vzorky k analýze jsem sušil 24 hodin nad oxidem fosforečným při tlaku 66 Pa a teplotě 61°C.

Infračervená spektra byla měřena v tabletách bromidu draselného na přístroji NICOLET IMPACT 400.  $^1\text{H}$  a  $^{13}\text{C}$  NMR spektra roztoků v DMSO- $d_6$  byla měřena na přístroji Varian Mercury-Vx BB 300. Chemický posun  $\delta$  je udáván v ppm vzhledem k tetramethylsilanu TMS za použití signálu rozpouštědla jako sekundárního standardu (2,49 pro  $^1\text{H}$  a 39,7 pro  $^{13}\text{C}$  NMR). Interakční konstanty  $J$  jsou uvedeny v Hz.

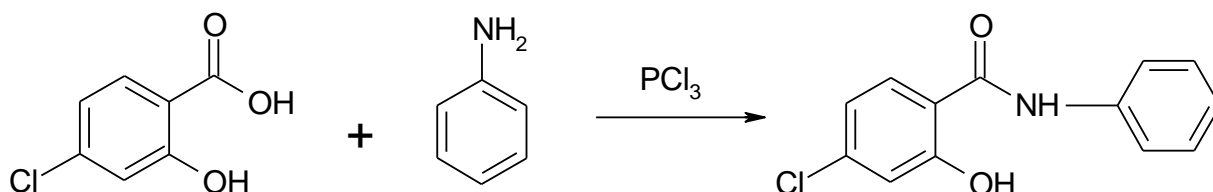
## 5.2. Syntéza 4-chlorsalicylanilidů

### 5.2.1. Syntéza 4-chlorsalicylanilidu (1a)

Sumární vzorec:  $C_{13}H_{10}ClNO_2$

Molekulová hmotnost: 247,70

Schéma reakce:



**Pracovní postup:** 1,00 g (0,0058 mol) kyseliny 4-chlorsalicylové a 0,53 ml (0,0058 mol) anilinu jsem rozpustil v 25 ml chlorbenzenu a přidal 0,5 ml (0,0029 mol) chloridu fosforitého. Směs jsem zahříval v mikrovlnném reaktoru při výkonu 600 W po dobu 20 minut. Průběh reakce jsem hodnotil pomocí TLC. Jako mobilní fázi jsem použil směs aceton-hexan 1:4. Po ukončení reakce jsem chlorbenzen oddestiloval za sníženého tlaku. Produkt jsem rekrystalizoval ze směsi ethanol-voda s přidavkem aktivního uhlí.

**Charakteristika produktu:** bílá krystalická látka

**Teplota tání:** 217-219 °C

**Teplota tání uvedená v literatuře:**<sup>78</sup> 218-220 °C

**Teoretický výtěžek:** 2,31 g

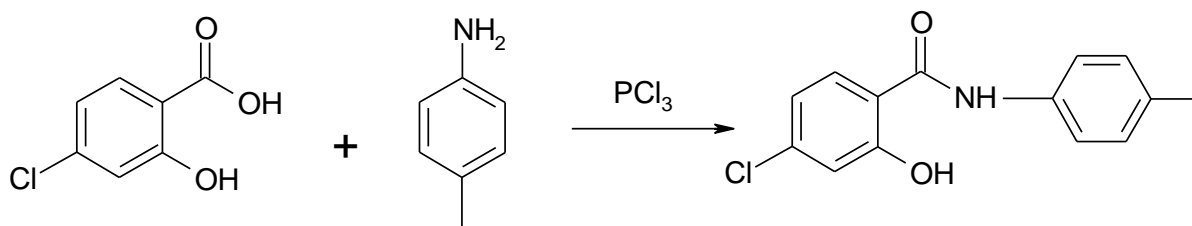
**Praktický výtěžek:** 1,61 g, tj. 70 %

### 5.2.2. Syntéza 4-chlor-4'-methylsalicylanilidu (1b)

Sumární vzorec:  $C_{14}H_{12}ClNO_2$

Molekulová hmotnost: 261,70

Schéma reakce:



**Pracovní postup:** 1,00 g kyseliny (0,0058 mol) a 0,62 g (0,0058 mol) 4-methylanilinu jsem rozpustil v 25 ml chlorbenzenu a přidal 0,25 ml (0,00289 mol) chloridu fosforitého. Směs jsem zahříval v mikrovlnném reaktoru při 600 W po dobu 20 minut. Průběh reakce jsem sledoval pomocí TLC. Jako mobilní fázi pro TLC jsem použil směs aceton-hexan 1:4. Po ukončení reakce jsem chlorbenzen oddestiloval za sníženého tlaku. Produkt jsem rekrystalizoval ze směsi ethanol-voda s přidavkem aktivního uhlí.

**Charakteristika produktu:** bílá krystalická látka

**Teplota tání:** 221-223 °C

**Teplota tání uvedená v literatuře:**<sup>78</sup> 220-223 °C

**Teoretický výtěžek:** 1,67 g

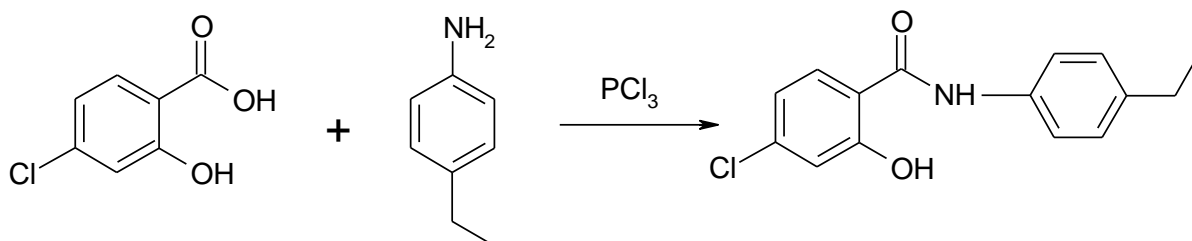
**Praktický výtěžek:** 1,10 g, tj. 66 %

### 5.2.3. Syntéza 4-chlor-4'-ethylsalicylanilidu (1c)

**Sumární vzorec:** C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>ClNO<sub>2</sub>

**Molekulová hmotnost:** 275,72

**Schéma reakce:**



**Pracovní postup:** 1,50 g (0,0087 mol) 4-chlorsalicylové kyseliny a 1,05 g (0,0087 mol) 4-ethylanilinu jsem rozpustil v 25 ml chlorbenzenu a přidal 0,4 ml (0,0043 mol) chloridu fosforitého. Směs jsem zahříval v mikrovlnném reaktoru při výkonu 600 W po dobu 20 minut.

Průběh reakce jsem hodnotil pomocí TLC. Jako mobilní fázi jsem používal aceton-hexan v poměru 1:4. Reakci jsem ukončil a chlorbenzen jsem oddestiloval za sníženého tlaku. Produkt jsem rekrystalizoval ze směsi ethanol-voda.

**Charakteristika produktu:** bílá krystalická látka

**Teplota tání:** 192-194 °C

**Teplota tání uvedená v literatuře:**<sup>79</sup> 196 °C

**Teoretický výtěžek:** 2,40 g

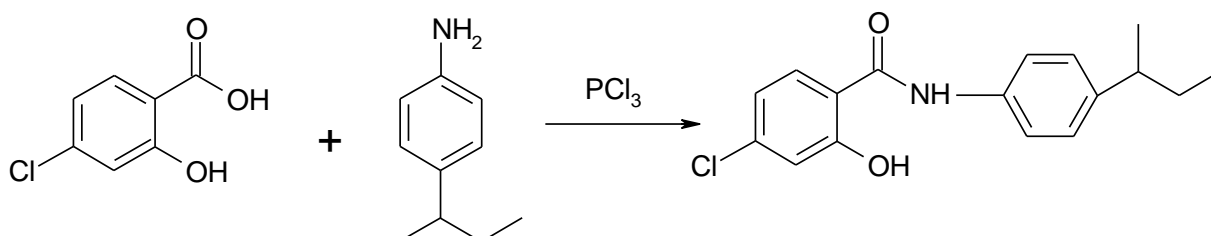
**Praktický výtěžek:** 2,30 g, tj. 96%

#### 5.2.4. Syntéza 4'-sek-butyl-4-chlorsalicylanilidu (1d)

**Sumární vzorec:** C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>ClNO<sub>2</sub>

**Molekulová hmotnost:** 303,77

**Schéma reakce:**



**Pracovní postup:** 1,50 g (0,0087 mol) 4-chlorsalicylové kyseliny a 1,30 g (0,0087 mol) 4-*sek*-butylanilinu jsem rozpustil v 25 ml chlorbenzenu a přidal 0,4 ml (0,0043 mol) chloridu fosforitého. Směs jsem zahřival v mikrovlnném reaktoru při výkonu 600 W po dobu 20 minut. Průběh reakce jsem hodnotil pomocí TLC. Jako mobilní fázi pro TLC jsem používal směs aceton- hexan 1:4. Po ukončení reakce jsem chlorbenzen oddestiloval za sníženého tlaku. Produkt jsem rekrystalizoval ze směsi ethanol-voda s přidavkem aktivního uhlí.

**Charakteristika produktu:** bílá krystalická látka

**Teplota tání:** 197-200°C

**Teplota tání uvedená v literatuře:** není

**Teoretický výtěžek:** 2,64 g

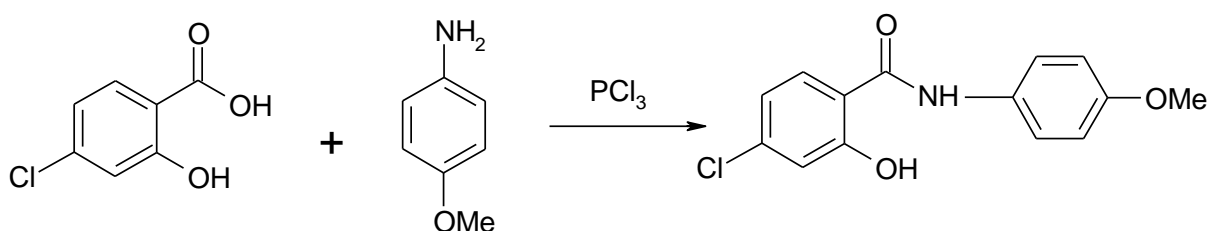
**Praktický výtěžek:** 1,62 g, tj. 62 %

### 5.2.5. Syntéza 4-chlor-4'-methoxysalicylanilidu (1e)

**Sumární vzorec:**  $C_{14}H_{12}ClNO_3$

**Molekulová hmotnost:** 277,7

**Schéma reakce:**



**Pracovní postup:** 1,50 g (0,0087 mol) 4-chlorsalicylové kyselinay a 1,00 g (0,0087 mol) 4-methoxyanilinu jsem rozpustil v 25 ml chlorbenzenu a přidal 0,4 ml (0,00434 mol) chloridu fosforitého. Směs jsem zahříval 20 minut v mikrovlnném rektoru při výkonu 600 W. Průběh reakce jsem sledoval pomocí TLC, jako mobilní fázi jsem použil směs aceton-hexan v poměru 1:4. Po ukončení reakce jsem chlorbenzen oddestiloval za sníženého tlaku. Produkt jsem rekrystalizoval ze směsi ethanol-voda s přidavkem aktivního uhlí.

**Charakteristika produktu:** bílá krystalická látka

**Teplota tání:** 203-205 °C

**Teplota tání uvedená v literatuře:**<sup>78</sup> 205-207 °C

**Teoretický výtěžek:** 2,42 g

**Praktický výtěžek:** 1,65 g, tj. 68 %

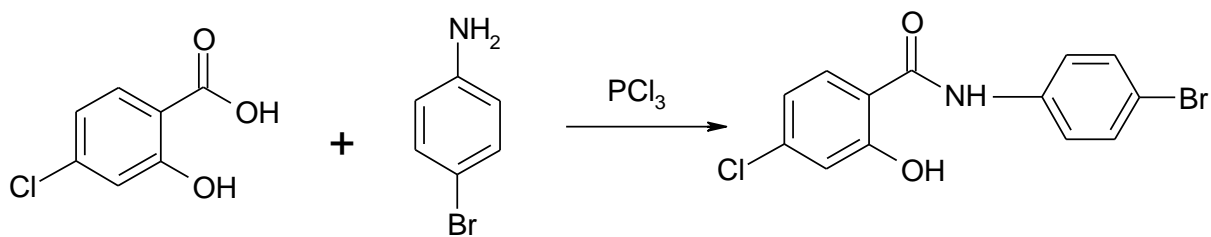
### 5.2.6. Syntéza 4'-brom-4-chlorsalicylanilidu (1f)

**Sumární vzorec:**  $C_{13}H_9ClBrNO_2$

**Molekulová hmotnost:** 326,62

**Schéma reakce:**





**Pracovní postup:** 1,00 g (0,00577 mol) 4-chlorsalicylové kyseliny a 1,00 g (0,00577 mol) 4-bromanilinu jsem rozpustil v 25 ml chlorbenzenu. Přidal jsem 0,25 ml (0,00289 mol) chloridu fosforitého. Směs jsem zahříval 20 minut v mikrovlnném rektoru při výkonu 600 W. Průběh reakce jsem sledoval pomocí TLC, jako mobilní fázi jsem použil směs aceton-hexan v poměru 1:4. Po ukončení reakce jsem chlorbenzen oddestiloval za sníženého tlaku. Produkt jsem rekrystalizoval ze směsi ethanol-voda s přidávkem aktivního uhlí.

**Charakteristika produktu:** bílá krystalická látka

**Teplota tání:** 169-171 °C

**Teplota tání uvedená v literatuře:**<sup>78</sup> 220-222 °C

**Teoretický výtěžek:** 1,89 g

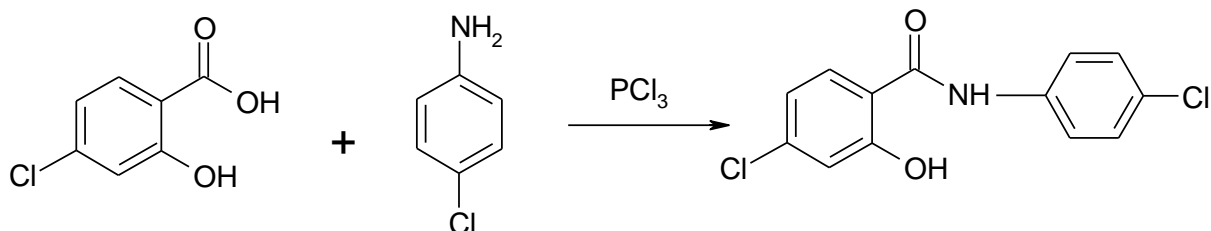
**Praktický výtěžek:** 1,52 g tj. 80 %

### 5.2.7. Syntéza 4,4'-dichlorsalicylanilidu (1g)

**Sumární vzorec:** C<sub>13</sub>H<sub>9</sub>Cl<sub>2</sub>NO<sub>2</sub>

**Molekulová hmotnost:** 282,12

**Schéma reakce:**



**Pracovní postup:** 1,00 g (0,0058 mol) 4-chlorsalicylové kyseliny a 0,75 g (0,0058 mol) 4-chloranilinu jsem rozpustil v 25 ml chlorbenzenu a přidal jsem 0,25 ml (0,0029 mol) chloridu fosforitého. Směs jsem zahříval v mikrovlnném rektoru při výkonu 600 W po dobu 20 minut.

Průběh reakce jsem sledoval pomocí TLC. Jako mobilní fázi jsem použil směs aceton-hexan v poměru 1:4. Po ukončení reakce jsem chlorbenzen oddestiloval za sníženého tlaku. Produkt jsem rekrystalizoval ze směsi ethanol-voda s přidavkem aktivního uhlí.

**Charakteristika produktu:** bílá krystalická látka

**Teplota tání:** 220-222°C

**Teplota tání uvedená v literatuře:**<sup>78</sup> 222-223°C

**Teoretický výtěžek:** 1,63 g

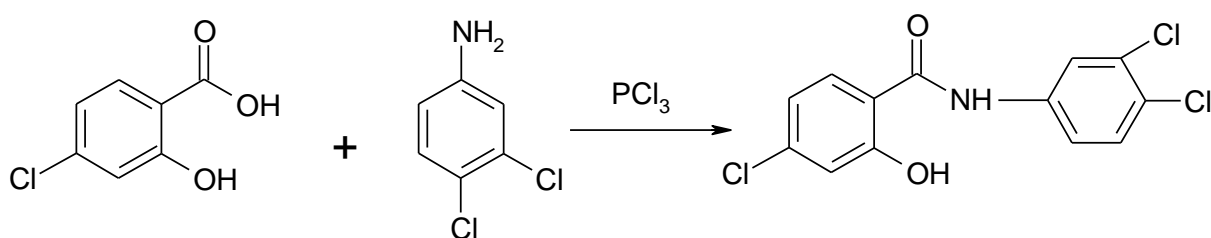
**Praktický výtěžek:** 1,05 g, tj. 64 %

### 5.2.8. Syntéza 3,4,4'-trichlorsalicylanilidu (1h)

**Sumární vzorec:**  $C_{13}H_8Cl_3NO_2$

**Molekulová hmotnost:** 316,57

**Schéma reakce:**



**Pracovní postup:** 1,50 g (0,0087 mol) 4-chlorsalicylvé kyseliny a 1,40 g (0,0087mol) 3,4-dichloranilinu jsem rozpustil v 25 ml chlorbenzenu a přidal jsem 0,4 ml (0,00434 mol) chloridu fosforitého. Směs jsem zahříval v mikrovlnném reaktoru při výkonu 600 W po dobu 20 minut. Průběh reakce jsem sledoval pomocí TLC, jako mobilní fázi jsem používal směs aceton-hexan v poměru 1:4. Po ukončení reakce jsem chlorbenzen oddestiloval za sníženého tlaku. Produkt jsem rekrystalizoval ze směsi ethanol-voda s přidavkem aktivního uhlí.

**Charakteristika produktu:** bílá krystalická látka

**Teplota tání:** 221-223 °C

**Teplota tání uvedená v literatuře:**<sup>78</sup> 221-223 °C

**Teoretický výtěžek:** 2,75 g

**Praktický výtěžek:** 2,22 g, tj. 81%

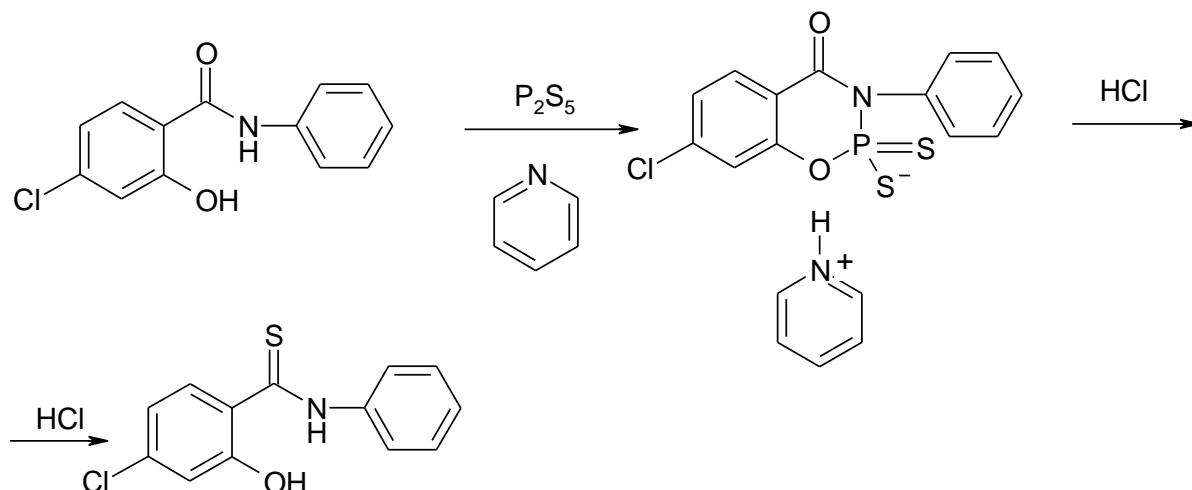
### 5.3. Syntéza 4-chlorthiosalicylanilidů

#### 5.3.1. Syntéza 4-chlorthiosalicylanilidu (2a)

**Sumární vzorec:** C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>ClNOS

**Molekulová hmotnost:** 263,76

**Schéma reakce:**



**Pracovní postup:** 1,00 g (0,0040 mol) 4-chlorsalicylanilidu jsem rozpustil v 7,8 ml pyridinu a přidal 0,90 g (0,0040 mol) sulfidu fosforečného. Reakční směs jsem zahříval 60 minut v mikrovlnném reaktoru při výkonu 600 W. Průběh reakce jsem sledoval pomocí TLC, jako mobilní fázi jsem použil aceton-hexan 1:4. Reakci jsem ukončil nalitím reakční směsi na ledovou tříšť a nechal stát v temnu 24 hodin. Surový pyridinium-7-chlor-3-fenyl-2,4-dithio-3,4-dihydro-1,3,2λ<sup>5</sup>-bezoxazafosfinin-2-thiolát jsem odfiltroval a převedl do směsi 50 ml destilované vody a 50 ml toluenu. Reakční směs jsem okyselil přidávkem 6 ml 35% kyseliny chlorovodíkové. V průběhu reakce jsem ve vodné vrstvě udržoval pH v rozmezí hodnot 1-3. Směs jsem zahříval v mikrovlnném reaktoru 60 minut při výkonu 600 W. Průběh reakce jsem sledoval pomocí TLC, jako mobilní fázi jsem použil směs aceton-petrolether v poměru 1:4 a ethylacetát. Vzorokly pro TLC analýzu jsem odebíral z vodné i organické fáze. Po ukončení reakce jsem od sebe obě fáze oddělil a surový produkt jsem získal z organické fáze oddestilováním toluenu za sníženého tlaku. Čistění produktu jsem provedl sloupcovou chromatografií, jako mobilní fázi jsem použil směs aceton-hexan v poměru 1:9.

**Charakteristika produktu:** žlutá krystalická látka

**Teplota tání:** 152-153 °C

Teplota taní uvedená v literatuře:<sup>80</sup> 155 °C

Teoretický výtěžek: 1,06 g

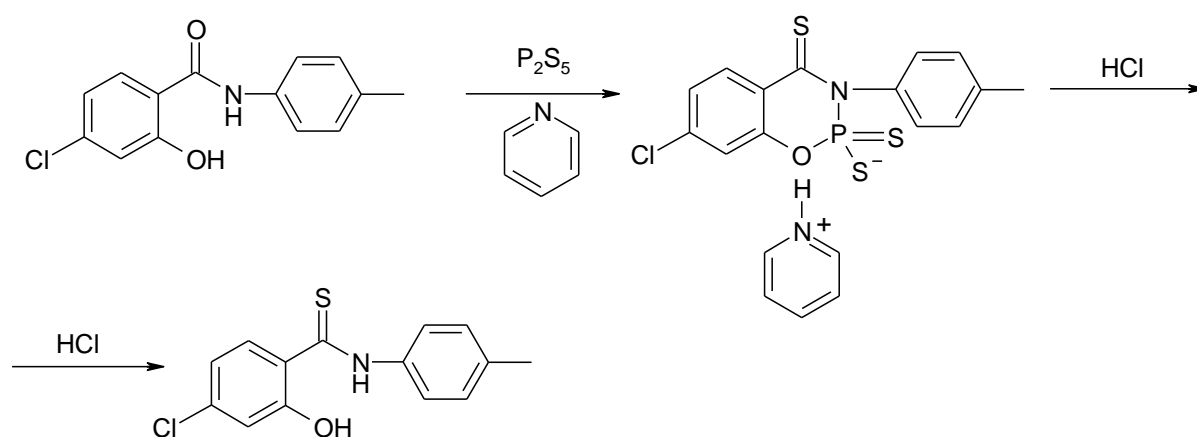
Praktický výtěžek: 0,15 g, tj. 14%

### 5.3.2. Syntéza 4-chlor-4'-methylthiosalicylanilidu (2b)

Sumární vzorec:  $C_{14}H_{12}ClNOS$

Molekulová hmotnost: 277,76

Schéma reakce:



**Pracovní postup:** 1,00 g (0,0038 mol) 4-chlor-4'-methylsalicylanilidu jsem rozpustil v 7,8 ml pyridinu a přidal 0,90 g (0,0038 mol) sulfidu fosforečného. Reakční směs jsem zahříval 60 minut v mikrovlnném reaktoru při výkonu 600 W. Průběh reakce jsem sledoval pomocí TLC, jako mobilní fázi jsem použil aceton-hexan. Reakci jsem ukončil nalitím reakční směsi na ledovou tříšť a nechal stát v temnu 24 hodin. Surový pyridinium-7-chlor-3-(4-methylfenyl)-2,4-dithio-3,4-dihydro-1,3,2λ<sup>5</sup>-bezoxazafosfinin-2-thiolát jsem odfiltroval a převedl do směsi 50 ml destilované vody a 50 ml toluenu. Reakční směs jsem okyselil přidávkem 6 ml 35% kyseliny chlorovodíkové. V průběhu reakce jsem ve vodné vrstvě udržoval pH v rozmezí hodnot 1-3. Směs jsem zahříval v mikrovlnném reaktoru 60 minut při výkonu 600 W. Průběh reakce jsem sledoval pomocí TLC, jako mobilní fázi jsem použil směs aceton-petrolether v poměru 1:4 a ethylacetát. Vzorky pro TLC analýzu jsem odebíral z vodné i organické fáze. Po ukončení reakce jsem od sebe obě fáze oddělil. Surový produkt jsem získal z organické fáze oddestilováním toluenu za sníženého tlaku. Čistění produktu jsem provedl sloupcovou

chromatografií, jako mobilní fázi jsem použil směs aceton-hexan v poměru 1:9.

**Charakteristika produktu:** žlutá krystalická látka

**Teplota tání:** 110-112 °C

**Teplota tání uvedená v literatuře:** není

**Teoretický výtěžek:** 1,06 g

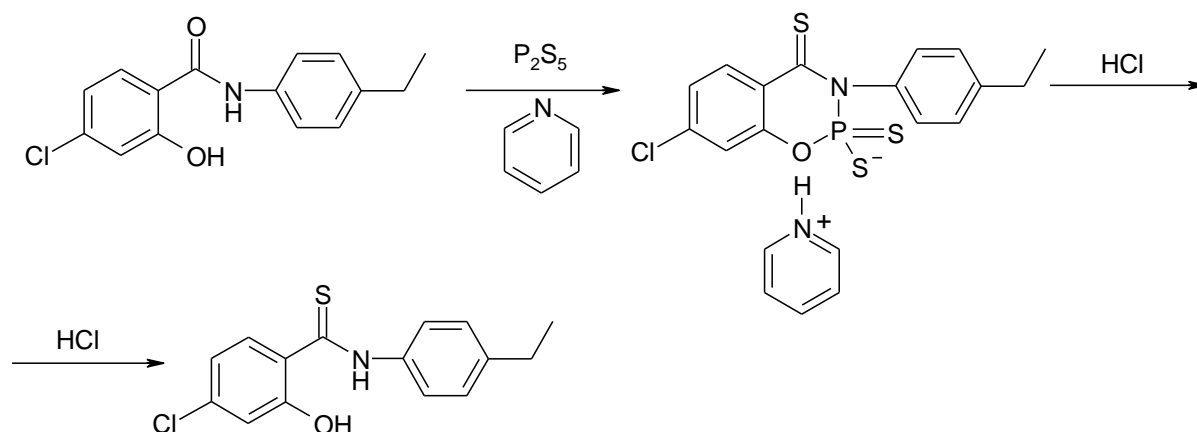
**Praktický výtěžek:** 0,32 g, tj. 30 %

### 5.3.3. Syntéza 4-chlor-4'-ethylthiosalicylanilidu (2c)

**Sumární vzorec:** C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>ClNOS

**Molekulová hmotnost:** 291,78

**Schéma reakce:**



**Pracovní postup:** 1,00 g (0,0036 mol) 4-chlor-4'-ethylsalicylanilidu jsem rozpustil v 7,8 ml pyridinu a přidal jsem 0,90 g (0,0036 mol) sulfidu fosforečného. Reakční směs jsem zahříval 60 minut v mikrovlnném reaktoru při výkonu 600 W. Průběh reakce jsem sledoval pomocí TLC, jako mobilní fázi jsem použil aceton-hexan 1:4. Reakci jsem ukončil nalitím reakční směsi na ledovou tříšť a nechal stát v temnu 24 hodin. Surový pyridinium-7-chlor-3-(4-ethylfenyl)-2,4-dithio-3,4-dihydro-1,3,2λ<sup>5</sup>-bezoxazafosfinin-2-thiolát jsem odfiltroval a převedl do směsi 50 ml destilované vody a 50 ml toluenu. Reakční směs jsem okyselil přidávkem 6 ml 35% kyseliny chlorovodíkové. V průběhu reakce jsem ve vodné vrstvě udržoval pH v rozmezí hodnot 1-3. Směs jsem zahříval v mikrovlnném reaktoru 60 minut při

výkonu 600 W. Průběh reakce jsem sledoval pomocí TLC, jako mobilní fázi jsem použil směs aceton-petrolether v poměru 1:4 a ethylacetát. Vzorčky pro TLC analýzu jsem odebíral z vodné i organické fáze. Po ukončení reakce jsem od sebe obě fáze oddělil a surový produkt jsem získal z organické fáze oddestilováním toluenu za sníženého tlaku. Čistění produktu jsem provedl sloupcovou chromatografií, jako mobilní fázi jsem použil směs aceton-hexan v poměru 1:9.

**Charakteristika produktu:** žlutá krystalická látka

**Teplota tání:** 166-168 °C

**Teplota tání uvedená v literatuře:** není

**Teoretický výtěžek:** 1,06 g

**Praktický výtěžek:** 0,38 g, tj. 36 %

**NMR:**

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO) 1,18 t, 3 H, *J* = 7,6, 2,61 q, 2 H; *J* = 7,6 (ethyl); 6,89-6,97, m, 2 H (H-3, H-5); 7,19 - 7,29 AA' část AA'BB' systému, 2H (H-3', H-5'); 7,58 d, 1 H, *J* = 8,2 (H-6); 7,75 - 7,85 BB' část AA'BB' systému, 2 H (H-2', H-6'); 10,75 bs, 1 H (OH nebo NH); 11,68 s, 1 H (NH nebo OH)

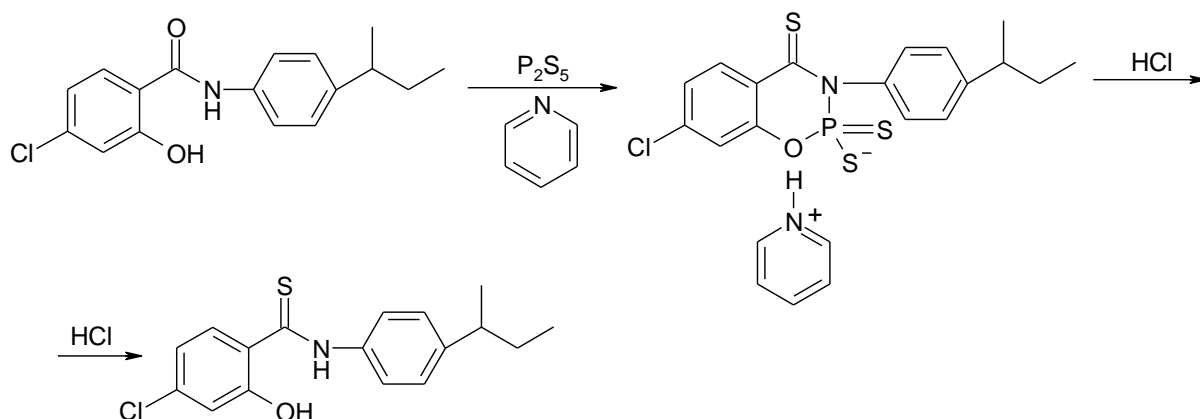
<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO) 15,8; 28,0; 116,0; 119,0; 123,4; 127,9; 129,6; 132,1; 134,8; 137,6; 142,0; 154,0; 193,2

#### 5.3.4. Syntéza 4'-sek-butyl-4-chlorthiosalicylanilidu (2d)

**Sumární vzorec:** C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>ClNOS

**Molekulová hmotnost:** 319,83

**Schéma reakce:**



**Pracovní postup:** 1,00 g (0,0033 mol) 4'-*sek*-butyl-4-chlorsalicylanilidu jsem rozpustil v 6,4 ml pyridinu a přidal jsem 0,73 g (0,0033 mol) sulfidu fosforečného. Reakční směs jsem zahříval 60 minut v mikrovlnném reaktoru při výkonu 600 W. Průběh reakce jsem sledoval pomocí TLC, jako mobilní fázi jsem použil aceton-hexan 1:4. Reakci jsem ukončil nalitím reakční směsi na ledovou tříšť a nechal stát v temnu 24 hodin. Surový pyridinium -3-(4-*sek*-butylfenyl)-7-chlor -2,4-dithio-3,4-dihydro-1,3,2λ<sup>5</sup>-bezoxazafosfinin-2-thiolát jsem odfiltroval a převedl do směsi 50 ml destilované vody a 50 ml toluenu. Reakční směs jsem okyslel přidávkem 6 ml 35% kyseliny chlorovodíkové. V průběhu reakce jsem ve vodné vrstvě udržoval pH v rozmezí hodnot 1-3. Směs jsem zahříval v mikrovlnném reaktoru 60 minut při výkonu 600 W. Průběh reakce jsem sledoval pomocí TLC, jako mobilní fázi jsem použil směs aceton-petrolether v poměru 1:4 a ethylacetát. Vzorky pro TLC analýzu jsem odebíral z vodné i organické fáze. Po ukončení reakce jsem od sebe obě fáze oddělil a surový produkt jsem získal z organické fáze oddestilováním toluenu za sníženého tlaku. Čistění produktu jsem provedl sloupcovou chromatografií, jako mobilní fázi jsem použil směs aceton-hexan v poměru 1:9.

**Charakteristika produktu:** žlutá krystalická látka

**Teplota tání:** 108-110 °C

**Teplota tání uvedená v literatuře:** není

**Teoretický výtěžek:** 1,05 g

**Praktický výtěžek:** 0,26 g, tj. 24%

**NMR:**

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO) 0,77 t, 3 H, *J* = 7,3, 1,18 d, 3 H, *J* = 6,9, 1,55 m, 2 H; 2,60 m, 1 H (*sek*-butyl); 6,87-6,98, m, 2 H (H-3, H-5); 7,18 - 7,28 AA' část AA'BB' systému, 2H (H-3', H-5'); 7,58 d, 1 H, *J* = 8,2 (H-6); 7,77 - 7,87 BB' část AA'BB' systému, 2 H (H-2', H-6'); 10,75 bs, 1 H (OH nebo NH); 11,70 s, 1 H (NH nebo OH)

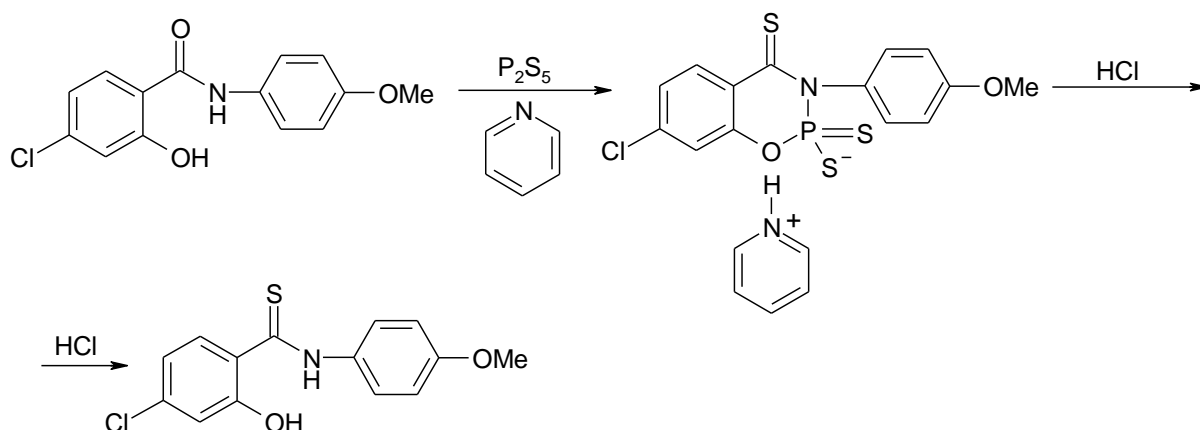
<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO) 12.3; 22.0; 30.7; 40.8; 116.0; 118.9; 123.3; 127.0; 129.6; 132.1; 134.7; 137.7; 145.3; 154.0; 193.1

### 5.3.5. Syntéza 4-chlor-4'-methoxythiosalicylanilidu (2e)

**Sumární vzorec:** C<sub>14</sub>H<sub>12</sub>ClNO<sub>2</sub>S

**Molekulová hmotnost:** 293,76

**Schéma reakce:**



**Pracovní postup:** 1,00 g (0,0036 mol) 4-chlor-4'-methoxysalicylanilidu jsem rozpustil v 7,5 ml pyridinu a přidal jsem 0,73 g (0,0036 mol) sulfidu fosforečného. Reakční směs jsem zahřival 60 minut v mikrovlnném reaktoru při výkonu 600 W. Průběh reakce jsem sledoval pomocí TLC, jako mobilní fázi jsem použil aceton-hexan 1:4. Reakci jsem ukončil nalitím reakční směsi na ledovou tříšť a nechal stát v temnu 24 hodin. Surový pyridinium-7-chlor-3-(4-methoxyfenyl)-2,4-dithioxo-3,4-dihydro-1,3,2λ<sup>5</sup>-benzoxazafosfinin-2-thiolát jsem odfiltroval a převedl do směsi 50 ml destilované vody a 50 ml toluenu. Reakční směs jsem okyselil přidávkem 6 ml 35% kyseliny chlorovodíkové. V průběhu reakce jsem ve vodné vrstvě udržoval pH v rozmezí hodnot 1-3. Směs jsem zahřival v mikrovlnném reaktoru 60 minut při výkonu 600 W. Průběh reakce jsem sledoval pomocí TLC, jako mobilní fázi jsem použil směs aceton-petrolether v poměru 1:4 a ethylacetát. Vzorky pro TLC analýzu jsem odebíral z vodné i organické fáze. Po ukončení reakce jsem od sebe obě fáze oddělil a surový produkt jsem získal z organické fáze oddestilováním toluenu za sníženého tlaku. Čistění produktu jsem provedl sloupcovou chromatografií a preparativní tenkovrstvou chromatografií na silufolu. Jako mobilní fázi jsem použil směs aceton-hexan v poměru 1:9.

**Charakteristika produktu:** žlutá krystalická látka

**Teplota tání:** 159-161 °C

**Teplota tání uvedená v literatuře:** není

**Teoretický výtěžek:** 1,05 g

**Praktický výtěžek:** 0,19 g, tj. 18 %

**NMR:**

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO) 3,76 s, 3 H (CH<sub>3</sub>); 6,89-7,01, m, 4 H (H-3, H-5, H-3', H-5'); 7,59 d, 1 H, *J* = 8,3 (H-6); 7,76 - 7,84 BB' část AA'BB' systému, 2 H (H-2', H-6'); 10,78 bs, 1 H (OH nebo NH); 11,63 s, 1 H (NH nebo OH)



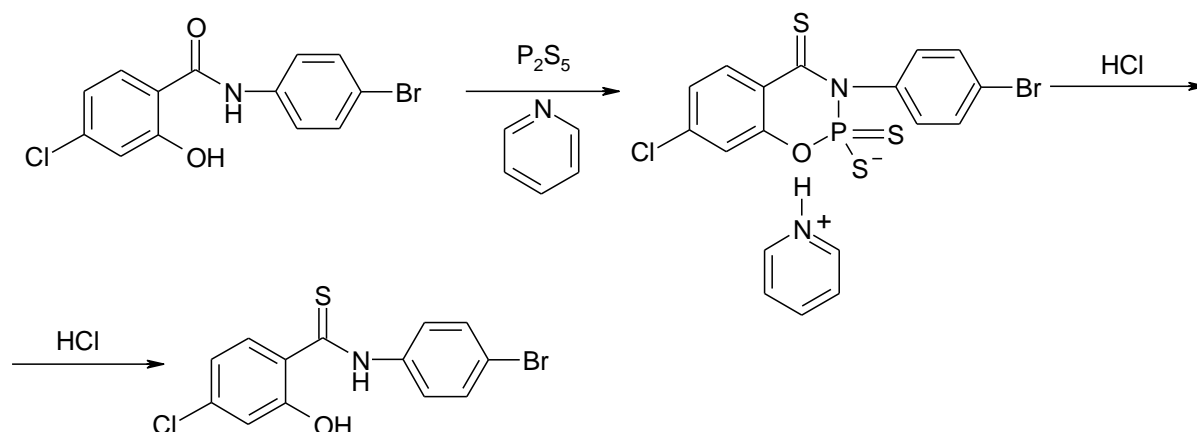
$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO) 55,5; 113,8; 116,1; 118,9; 125,0; 129,3; 132,0; 132,9; 134,7; 154,1; 157,3; 192,6

### 5.3.6. Syntéza 4'-brom-4-chlorthiosalicylanilidu (2f)

Sumární vzorec:  $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{ClBrNO}_2$

Molekulová hmotnost: 342,66

Schéma reakce:



**Pracovní postup:** 1,00 g (0,0031 mol) 4'-brom-4-chlorsalicylanilidu jsem rozpustil v 5,6 ml pyridinu a přidal jsem 0,65 g (0,0031 mol) sulfidu fosforečného. Reakční směs jsem zahřival 60 minut v mikrovlnném reaktoru při výkonu 600 W. Průběh reakce jsem průběžně sledoval pomocí TLC, jako mobilní fázi jsem použil aceton-hexan 1:4. Reakci jsem ukončil nalitím reakční směsi na ledovou tříšť a nechal stát v temnu 24 hodin. Surový pyridinium -3-(4-bromfenyl)-7-chlor-2,4-dithio-3,4-dihydro-1,3,2λ<sup>5</sup>-benzoxazafosfinin-2-thiolát jsem odfiltroval a převedl do směsi 50 ml destilované vody a 50 ml toluenu. Reakční směs jsem okyselil přidávkem 6 ml 35% kyseliny chlorovodíkové. V průběhu reakce jsem ve vodné vrstvě udržoval pH v rozmezí hodnot 1-3. Směs jsem zahřival v mikrovlnném reaktoru 60 minut při výkonu 600 W. Průběh reakce jsem sledoval pomocí TLC, jako mobilní fázi jsem použil směs aceton-petrolether v poměru 1:4 a ethylacetát. Vzorky pro TLC analýzu jsem odebíral z vodné i organické fáze. Po ukončení reakce jsem od sebe obě fáze oddělil a surový produkt jsem získal z organické fáze oddestilováním toluenu za sníženého tlaku. Čistění produktu jsem provedl sloupcovou chromatografií a preparativní tenkovrstvou chromatografií na silufolu. Jako mobilní fázi jsem použil směs aceton-hexan v poměru 1:9.

**Charakteristika produktu:** žlutá krystalická látka

**Teplota tání:** 166-168 °C

**Teplota tání uvedená v literatuře:** není

**Teoretický výtěžek:** 1,05 g

**Praktický výtěžek:** 0,13 g, tj. 12 %

**NMR:**

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO) 6,89-6,98, m, 2 H (H-3, H-5); 7,51 - 7,65 m, 3 H, (H-6, H-2', H-6'); 7,86 - 7,97 BB' část AA'BB' systému, 2H (H-3', H-5'); 10,85 bs, 1 H (OH nebo NH); 11,80 s, 1 H (NH nebo OH)

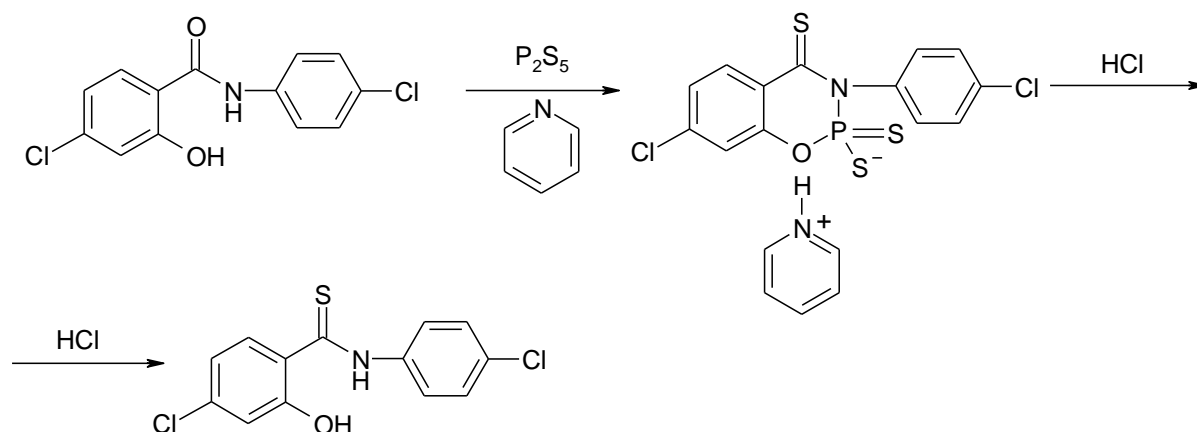
$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO) 116,0; 118,2; 119,0; 125,2; 129,8; 131,6; 132,1; 134,9; 139,2; 153,8; 194,2

### 5.3.7. Syntéza 4,4'-dichlorthiosalicylanilidu (2g)

**Sumární vzorec:**  $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{Cl}_2\text{NOS}$

**Molekulová hmotnost:** 298,18

**Schéma reakce:**



**Pracovní postup:** 1,05 g (0,0037 mol) 4,4'-dichlorsalicylanilidu jsem rozpustil v 7,2 ml pyridinu a přidal jsem 0,83 g (0,0037 mol) sulfidu fosforečného. Reakční směs jsem zahříval 75 minut v mikrovlnném reaktoru při výkonu 600 W. Průběh reakce jsem sledoval pomocí TLC, jako mobilní fázi jsem použil aceton-hexan 1:4. Reakci jsem ukončil nalitím reakční směsi na ledovou tříšť a nechal stát v temnu 24 hodin. Surový pyridinium-7-chlor-3-(4-chlorfenyl)-2,4-dithio-3,4-dihydro-1,3,2λ<sup>5</sup>-benzoxazafosfinin-2-thiolát jsem odfiltroval a převedl do směsi 50 ml destilované vody a 50 ml toluenu. Reakční směs jsem okyselil přidávkem 6 ml 35% kyseliny chlorovodíkové. V průběhu reakce jsem ve vodné vrstvě udržoval pH v rozmezí hodnot 1-3. Směs jsem zahříval v mikrovlnném reaktoru 60 minut při výkonu 600 W. Průběh reakce jsem sledoval pomocí TLC, jako mobilní fázi jsem použil směs

aceton-petrolether v poměru 1:4 a ethylacetát. Vzorky pro TLC analýzu jsem odebíral z vodné i organické fáze. Po ukončení reakce jsem od sebe obě fáze oddělil a surový produkt jsem získal z organické fáze oddestilováním toluenu za sníženého tlaku. Čistění produktu jsem provedl sloupcovou chromatografií a preparativní tenkovrstvou chromatografií na silufolu. Jako mobilní fázi jsem použil směs aceton-hexan v poměru 1:9.

**Charakteristika produktu:** žlutá krystalická látka

**Teplota tání:** 152-155 °C

**Teplota tání uvedená v literatuře:** není

**Teoretický výtěžek:** 1,11 g

**Praktický výtěžek:** 0,19 g, tj. 18 %

**NMR:**

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO) 6,88-6,98, m, 2 H (H-3, H-5); 7,44 - 7,57 AA' část AA'BB' systému, 2H (H-3', H-5'); 7,57 d, 1 H, J = 8,2 (H-6); 7,92 – 8,02 BB' část AA'BB' systému, 2 H (H-2', H-6'); 10,95 s, 1 H (OH nebo NH); 11,85 bs, 1 H (NH nebo OH)

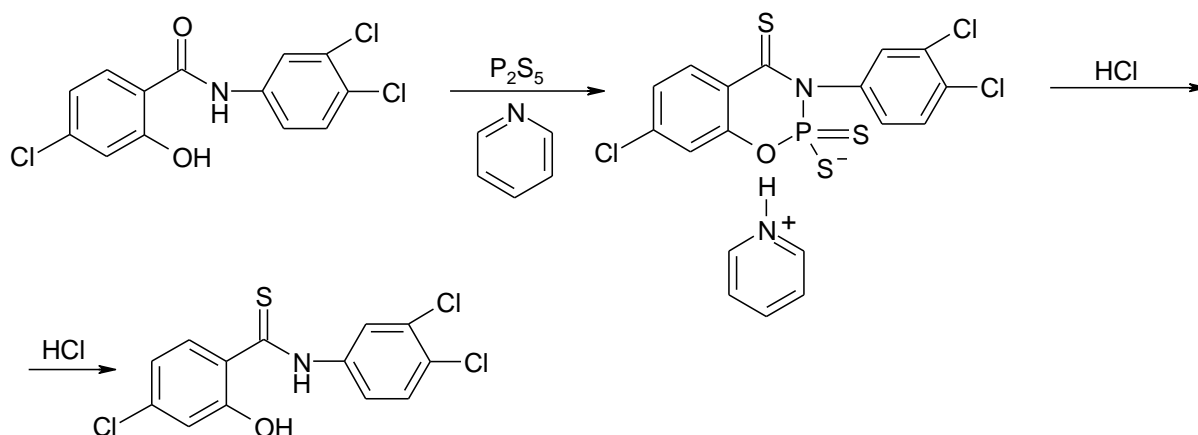
<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO) 116,0; 118,9; 124,9; 128,7; 129,7; 129,9; 132,1; 134,9; 138,8; 154,0; 194,2

### 5.3.8. Syntéza 3',4,4'-trichlorthiosalicylanilidu (2h)

**Sumární vzorec:** C<sub>13</sub>H<sub>8</sub>Cl<sub>3</sub>NOS

**Molekulová hmotnost:** 332,63

**Schéma reakce:**



**Pracovní postup:**

1,00 g (0,0032 mol) 3',4,4'-trichlorsalicylanilidu jsem rozpustil v 6,4 ml pyridinu a přidal jsem 0,73 g (0,0032 mol) sulfidu fosforečného. Reakční směs jsem zahříval 60 minut v mikrovlnném reaktoru při výkonu 600 W. Průběh reakce jsem sledoval pomocí TLC, jako

mobilní fázi jsem použil aceton-hexan. Reakci jsem ukončil nalitím reakční směsi na ledovou tříšť a nechal stát v temnu 24 hodin. Surový pyridinium-7-chlor-3-(3,4-dichlorfenyl)-2,4-dithio-3,4-dihydro-1,3,2λ<sup>5</sup>-bezoxazafosfinin-2-thiolát, který jsem převedl do směsi 50 ml destilované vody a 50 ml toluenu. Reakční směs jsem okyselil přidávkem 6 ml 35% kyseliny chlorovodíkové. V průběhu reakce jsem ve vodné vrstvě udržoval pH v rozmezí hodnot 1-3. Směs jsem zahříval v mikrovlnném reaktoru 60 minut při výkonu 600 W. Průběh reakce jsem sledoval pomocí TLC, jako mobilní fázi jsem použil směs aceton-petrolether v poměru 1:4 a ethylacetát. Vzorokly pro TLC analýzu jsem odebíral z vodné i organické fáze. Po ukončení reakce jsem od sebe obě fáze oddělil a surový produkt jsem získal z organické fáze oddestilováním toluenu za sníženého tlaku. Čistění produktu jsem provedl sloupcovou chromatografií a preparativní tenkovrstvou chromatografií na silufolu. Jako mobilní fázi jsem použil směs aceton-hexan v poměru 1:9.

**Charakteristika produktu:** žlutá krystalická látka

**Teplota tání:** 112-114 °C

**Teplota tání uvedená v literatuře:** není

**Teoretický výtěžek:** 1,05 g

**Praktický výtěžek:** 0,28 g, tj. 27 %

**NMR:**

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO) <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO) 6,89-6,97, m, 2 H (H-3, H-5); 7,56 d, 1 H, *J* = 8,3 (H-6); 7,69 d, 1 H, *J* = 8,8 (H-5'); 7,88 dd, 1 H, *J* = 2,4 a 8,8 (H-6'); 8,44 d, 1 H, *J* = 2,2 (H-2'); 10,75 bs, 1 H (OH nebo NH); 11,91 s, 1 H (NH nebo OH)

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO) 116,0; 119,0; 123,3; 124,2; 127,8; 129,9; 130,7; 130,8; 132,1; 135,1; 139,8; 153,8; 194,9

## 6. VÝSLEDKY A DISKUZE

Předkládaná diplomová práce byla zaměřena na syntézu 4-chlorthiosalicylanilidů jako látek s předpokládanou významnou biologickou aktivitou.

V teoretické části jsem shrnul poznatky o biologické aktivitě 2-hydroxybenzanilidů (salicylanilidů) a jejich thioanalog. Salicylanilidy jsou sloučeniny se širokým spektrem biologické aktivity. Protože halogenované salicylanilidy používané v praxi vyvolávaly fotokontaktní dermatitidy, byly postupně stahovány z používání. V posledních letech se však salicylanilidy začaly těšit znovu větší pozornosti v souvislosti s tím, že jejich biologická aktivita byla ve většině případů objasněna na molekulové úrovni. Staly se modelovými strukturami pro vývoj nových typů hlavně antivirotik, cytostatik a antimikrobních léčiv. Jsou také vyvíjeny nové postupy pro syntézu salicylanilidů s využitím moderních technologií, např. syntéza v mikrovlnném reaktoru.

Antifungální aktivita thiosalicylanilidů je známa již řadu let. Specifickou aktivitu vykazují proti *Absidia corymbifera*, která je rezistentní na všechna antimykotika kromě amfotericinu B. Thiosalicylanilidy jsou proti *A. corymbifera* in vitro účinnější než AmB. Substituce chlorem v poloze 5 a disubstituce v polách 3 a 5 aktivitu proti *A. corymbifera* dále zvyšují. Významná antifungální aktivita byla v posledních letech nalezena také u 2,4-dihydroxythiobenzanilidů.

Vzhledem k přítomnosti amidové, resp. thioamidové funkční skupiny byla u salicylanilidů, thiosalicylanilidů a podobných látek v uplynulých letech studována také herbicidní a antialgální aktivita.

V praktické části diplomové práce jsem se zabýval optimalizací metodiky syntézy thiosalicylanilidů v mikrovlnném reaktoru a s využitím nově nalezené cesty syntézy thiosalicylanilidů jsem připravil sérii 4-chlorthiosalicylanilidů a sledoval jsem vliv substituce chlorem v poloze 4 na biologickou aktivitu. Metoda syntézy thiosalicylanilidů nalezená na KAOCH je dvoustupňová syntéza bez nutnosti izolace meziprojektu. Je založená na reakci salicylanilidů se sulfidem fosforečným v prostředí pyridinu a následné hydrolýze vzniklých meziprojektů za vzniku thiosalicylanilidů. Výchozí 4-chlorsalicylanilidy jsem připravil reakcí 4-chlorsalicylové kyseliny a různě substituovaných anilinů za přítomnosti chloridu fosforitého v chlorbenzenu v mikrovlnném reaktoru, s výtěžky 62–96 %. 4-Chlorsalicylanilidy jsem dále zahříval se sulfidem fosforečným v pyridinu. 4-Chlorthiosalicylanilidy jsem získával kyselou hydrolýzou pyridinium-7-chlor-3-fenyl-2,4-dithio-3,4-dihydro-1,3,2λ<sup>5</sup>-benzoxazafosfinin-

2-thiolátů. Surové produkty jsem čistil sloupcovou nebo tenkovrstvou chromatografií na silikagelu, jako mobilní fázi jsem používal směs aceton-hexan 1:9. Výtěžky čistých thiosalicylanilidů se pohybovaly od 12 do 36 % (vztaženo na výchozí salicylanilidy). Všechny stupně syntézy probíhaly v mikrovlnném reaktoru. Využitím této metody se podařilo zkrátit reakční čas z několika hodin na několik desítek minut.

Připravil jsem osm 4-chlorsalicylanilidů a osm 4-chlorthiosalicylanilidů. Všechny 4-chlorthiosalicylanilidy jsem předal k hodnocení antifungální a antimykobakteriální aktivity. Antifungální aktivitu 4-chlorthiosalicylanilidů testoval Doc. RNDr. V. Buchta, CSc. (FaF UK, Hradec Králové), antimykobakteriální aktivitu testovala MUDr. J. Kaustová (Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě).

Antifungální aktivita byla testována mikrodiluční bujonovou metodou *in vitro* proti *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *Trichosporon beigeli*, *Aspergillus fumigatus*, *Absidia corymbifera* a *Trichophyton mentagrophytes*. U všech testovaných látek byla nalezena velmi vysoká účinnost specifická proti *A. corymbifera* z řádu *Mucorales*, do kterého patří původci těžkých systémových mukormykóz. 4-Chlorthiosalicylanilidy v aktivitě proti *A. corymbifera* překonávaly amfotericin B a výrazně překonávaly ketokonazol, které byly použity jako standardy. Z testovaných thiosalicylanilidů byly nejúčinnější 2c ( $R^1 = 4\text{-Cl}$ ;  $R^2 = 4\text{-C}_2\text{H}_5$ ) a 2h ( $R^1 = 4\text{-Cl}$ ;  $R^2 = 3,4\text{-Cl}_2$ ) s hodnotou MIC 0,24  $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ . 4-Chlorthiosalicylanilidy byly účinnější nebo stejně účinné jako odpovídající 5-chlorthiosalicylanilidy. Dále byla u 4-chlorthiosalicylanilidů a nalezena nižší nebo srovnatelná aktivita s 3,5-dichlorthiosalicylanilidy stejně substituovanými v anilidové části molekuly. Žádná z testovaných látek však nepřekonala v aktivitě proti *A. corymbifera* dosud nejúčinnější 3,5-dichlor-4'-ethylthiosalicylanilid. Byla nalezena také vysoká aktivita 4-chlorthiosalicylanilidů vůči *T. mentagrophytes*, kde byly naopak ve většinou aktivnější než 3,5-dichlorthiosalicylanilidy a méně účinné než 5-chlorderiváty. V porovnání s aktivitou 4-methylthiosalicylanilidů dosahují 4-chlorthiosalicylanilidy většinou vyšší nebo srovnatelné aktivity proti *A. corymbifera* i *Trichophyton mentagrophytes*.<sup>70</sup> Celkově lze tedy říci, že substituce thiosalicylanilidů chlorem v poloze 4 je výhodná pro antifungální aktivitu proti *A. corymbifera*.

Hodnocení antimykobakteriální aktivity 4-chlorthiosalicylanilidů *in vitro* na Šulově půdě proti *M. tuberculosis*, *M. avium* a *M. kansasii* dosud probíhá.

## 7. ZÁVĚR

Diplomová práce je příspěvkem k výzkumu thiosalicylanilidů, který probíhá na KAOCH v rámci grantu GAUK 312/2005 B CH a výzkumného záměru MŠMT č. MSM 0021620822.

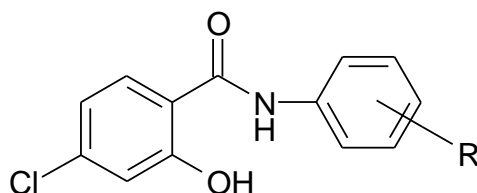
Celkem jsem připravil osm 4-chlorsalicylanilidů (z toho jeden dosud nepopsaný) a osm 4-chlorthiosalicylanilidů (z toho sedm dosud nepopsaných). 4-Chlorthiosalicylanilidy jsem syntetizoval novou metodou vyvinutou na KAOCH. Všechny kroky této syntézy jsem převedl do mikrovlnného reaktoru, což umožnilo podstatně zkrátit reakční časy (na několik desítek minut). Pro izolaci a čištění finálních produktů se osvědčila sloupcová chromatografie na silikagelu s použitím směsi aceton–hexan 1:9 jako mobilní fáze. Látky byly hodnoceny na antifungální a antimykobakteriální aktivitu.

U všech 4-chlorthiosalicylanilidů byla nalezena velmi vysoká antifungální účinnost specifická proti *Absidia corymbifera* z řádu *Mucorales*. Látky výrazně překonávaly amfotericin B a ketokonazol použitý jako standard. Byly sice poněkud méně účinné než 3,5-dichlorthiosalicylanilidy, ale účinnější nebo stejně účinné jako 5-chlorthiosalicylanilidy. Významná účinnost byla u nich nalezena ještě vůči *T. mentagrophytes*. Proti ostatním testovaným kmenům byly podstatně méně aktivní nebo neúčinné. Při porovnání s jinými sériemi thiosalicylanilidů vyplývá, že substituce chlorem v poloze 4 thioacylové části molekuly má kladný vliv na jejich antimykotickou aktivitu.

Hodnocení antimykobakteriální aktivity 4-chlorthiosalicylanilidů in vitro na Šulově půdě proti *M. tuberculosis*, *M. avium* a *M. kansasii* dosud probíhá.

## 9. PŘÍLOHA

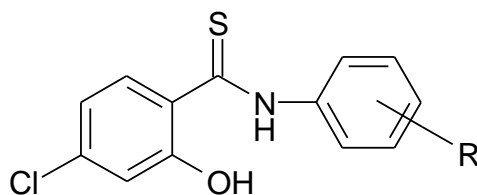
### PŘÍLOHA 1.: Připravené 4-chlorsalicylanilidy



ČÍSLO LÁTKY	R	SUMÁRNÍ VZOREC $M_R$	VÝTĚŽEK %	$\nu$ (C=O) $CM^{-1}$	T. TÁNÍ T. TÁNÍ <sup>LIT.</sup> (°C)
<b>1a</b>	H	$C_{13}H_{10}ClNO_2$ 247,70	70	1634	217-219 218-220 <sup>78</sup>
<b>1b</b>	4-CH <sub>3</sub>	$C_{14}H_{12}ClNO_2$ 261,70	66	1628	221-223 220-222 <sup>Chyba!</sup> Záložka není definována.
<b>1c</b>	4-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	$C_{15}H_{14}ClNO_2$ 275,72	96	1612	192-194 196 <sup>79</sup>
<b>1d</b>	4- <i>sek</i> - C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	$C_{17}H_{18}ClNO_2$ 303,77	62	1621	197-200 -
<b>1e</b>	4-OCH <sub>3</sub>	$C_{14}H_{12}ClNO_3$ 277,70	68	1618	203-205 205-207 <sup>78</sup>
<b>1f</b>	4-Br	$C_{13}H_9ClBrNO_2$ 326,60	80	1606	169-171 220-222 <sup>78</sup>
<b>1g</b>	4-Cl	$C_{13}H_9Cl_2NO_2$ 282,12	64	1610	221-223 222-223 <sup>78</sup>
<b>1h</b>	3,4-Cl <sub>2</sub>	$C_{13}H_8Cl_3NO_2$ 316,57	81	1607	221-223 221-223 <sup>78</sup>



**PŘÍLOHA 2.: Připravené 4-chlorthiosalicylanilidy**



ČÍSLO LÁTKY	R	SUMÁRNÍ VZOREC $M_R$	VÝTĚŽEK %	T. TÁNÍ T. TÁNÍ <sup>LIT.</sup> (°C)
2a	H	$C_{13}H_{10}ClNOS$ 263,76	14	152-153 155 <sup>80</sup>
2b	4-CH <sub>3</sub>	$C_{14}H_{12}ClNOS$ 277,76	30	110-112 -
2c	4-C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	$C_{15}H_{14}ClNOS$ 291,78	36	166-168 -
2d	4- <i>sek</i> -C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	$C_{17}H_{18}ClNOS$ 320,45	24	108-110 -
2e	4-OCH <sub>3</sub>	$C_{14}H_{12}ClNO_2S$ 293,76	18	159-161 -
2f	4-Br	$C_{13}H_9ClBrNOS$ 342,66	12	166-168 -
2g	4-Cl	$C_{13}H_9Cl_2NOS$ 298,12	18	152-155 -
2h	3,4-Cl <sub>2</sub>	$C_{13}H_8Cl_3NOS$ 332,63	27	112-114 -

**PŘÍLOHA 3.: Antifungální aktivita připravených 4-chlorthiosalicylanilidů  
in vitro - MIC ( $\mu\text{mol.dm}^{-3}$ )**

Číslo látky	CA 24h/48h	CT 24h/48h	CK 24h/48h	CG 24h/48h	TB 24h/48h	AF 24h/48h	AC 24h/48h	TM 72h/120 h
2a	62,5	125	31,25	125	62,5	62,5	0,48	3,91
	62,5	125	31,25	125	62,5	62,5	0,48	7,81
2b	15,62	15,62	3,91	15,62	15,62	7,81	0,48	1,95
	31,25	31,25	15,63	31,25	15,62	7,81	0,48	1,95
2c	125	>125	62,5	>125	>125	31,25	0,24	3,91
	>125	>125	>125	>125	>125	31,25	0,24	3,91
2d	125	62,56	62,26	>250	>250	7,81	0,97	1,95
	125	62,56	>250	>250	>250	7,81	1,95	1,95
2e	62,56	62,56	62,56	62,56	62,56	31,25	0,97	7,81
	62,56	>250	62,56	>250	>250	31,25	0,97	15,62
2f	15,62	31,25	7,81	15,62	7,81	15,62	0,97	1,95
	15,62	31,25	7,81	31,25	15,62	7,81	0,97	1,95
2g	15,62	15,62	7,81	15,62	15,62	15,62	0,48	1,95
	15,62	31,25	7,81	15,62	32,25	15,62	0,48	1,95
2h	15,62	15,62	3,91	15,62	7,81	3,91	0,24	1,95
	15,62	31,25	7,81	31,25	15,62	3,91	0,24	1,95
AmB	1	2	2	2	0,25	0,25	2	1
	2	4	4	2	0,25	0,5	4	1
ketoko nazol	0.061	1.95	1.95	0.49	0.061	7.81	15.63	0.49
	0.122	3.91	3.91	1.95	0.122	7.81	31.25	1.95

<b>CA</b>	–	<i>Candida albicans</i> ATCC 44859
<b>CT</b>	–	<i>Candida tropicalis</i> 156
<b>CK</b>	–	<i>Candida krusei</i> E28
<b>CG</b>	–	<i>Candida glabrata</i> 20/I
<b>TB</b>	–	<i>Trichosporon beigelii</i> 1188
<b>AF</b>	–	<i>Aspergillus fumigatus</i> 231
<b>AC</b>	–	<i>Absidia corymbifera</i> 272
<b>TM</b>	–	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> 445
<b>AmB</b>	–	amfotericin B

## 8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

---

- 1 Haber, J., Čermák, J., Indrák, K., Klener, P., Marešová, V., Starý, J., Ryska, M., Švihovec, J., Vorlíček, J.: Stanovisko odborných společností k indikaci a použití antimykotik se systémovým účinkem. *Klin. Mikrobiol. Inf. Lék.* 9(6), 294–300 (2003).
- 2 Pappas, G. P.: *Clin. Infect. Dis.* 40 Suppl. 6, S379–S380 (2005).
- 3 Lochmann, O.: *Vademekum antiinfekční terapií.* Triton. Praha, 20–60 (2005).
- 4 Lobovská, A.: *Infekční nemoci.* Karolinum. Praha, 59–60 (2002).
- 5 Herbrecht et al.: Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. *New. Engl. J. Med.* 347,408–415 (2002).
- 6 <http://uuhsc.utah.edu/pharmacy/bulletins/micafungin.html>
- 7 Kubicová, L., Waisser, K.: Biologická aktivita salicylanilidů. *Českoslov. Farm.* 41, 208–216 (1992).
- 8 Harber, L. C., Bickers, D. R.: Drug induced photosensitivity (phototoxic and photoallergic drug reactions). In: *Photosensitivity Diseases*, 2nd ed. Marcel Dekker (Toronto), 160–202 (1989).
- 9 Smith, S. Z., Epstein, J. H.: Photocontact dermatitis to halogenated salicylanilides and related compounds. *Arch. Dermatol.* 113, 1372–1374 (1977).
- 10 Harber, L. C., Targovnik, S. E., Baer, R. L.: Contact photosensitivity patterns to halogenated salicylanilides, in man and guinea pigs. *Arch. Dermatol.* 96, 646–656 (1967).
- 11 Wilkinson, J. D., Rycroft, R. J. G.: Photocontact Dermatitis. In: *Textbook of Dermatology*, 5th ed. Champion, R., H., et al., Eds. Blackwell (Oxford), 693–696 (1992).
- 12 Food and Drug Administration, USA: List of drug products that have been withdrawn or removed from the market for reasons of safety or effectiveness. *Federal Register* 64(44), 10944–10947 (1999).
- 13 Miracle, G. S., Hiler, G. D., Kitko, D. J.: PCT Int. Appl. WO 2004026821 (2004).
- 14 Doyle, M. J., Hunter-Rinderle, S. J., Glandorf, W. M., White, D. J.: U.S. Pat. Appl. 2003206874 (2003).
- 15 Haught, J. Ch., Miracle, G. S., Convents, A. Ch.: PCT Int. Appl. WO 2001060157 (2001).
- 16 Zhang, X. W., Yap, Y. L.: Old drugs as lead compounds for a new disease? Binding analysis of SARS coronavirus main proteinase with HIV, psychotic and parasite drugs. *Bioorg. Med. Chem.* 12, 2517 (2004).

- 
- 17 Liechti, Ch., Séguin, U., Bold, G., Furet, P., Meyer, T., Traxler, P.: Salicylanilides as inhibitors of the protein tyrosine kinase epidermal growth factor receptor. *Eur. J. Med. Chem.* 39, 11–26 (2004).
- 18 Storey, B. T., Wilson, D. F., Bracey, A., Rosen, S. L., Stephenson, S.: Steric and electronic effects on the uncoupling activity of substituted 3,5 dichlorosalicylanilides. *FEBS Lett.* 49, 338–341 (1975).
- 19 Nicolaou, K. C., Pfefferkorn, J. A., Schuler, F., Roecker, A. J., Cao, G.-Q., Casida, J. E.: Combinatorial synthesis of novel and potent inhibitors of NADH: ubiquinone oxidoreductase. *Chem. Biol.* 12, 979 (2000).
- 20 Macielag, M. J., Demers, J. P., Frago-Spano, S. A., Hlasta, D. J., Johnson, S. G., Kanojia, R. M., Russell, R. K., Sui, Z., Weidner-Wells, A., Werblood, H., Foleno, B. D., Goldschmidt, R. M., Loeloff, M. J., Webb, G. C., Barrett, J. F.: Substituted salicylanilides as inhibitors of two-component regulatory systems in bacteria. *J. Med. Chem.* 41, 2939–2945 (1998).
- 21 Kauppi, A. M., Nordfelth, R., Hagglund, U., Wolf-Watz, H., Elofsson, M.: Salicylanilides are potent inhibitors of type III secretion in *Yersinia*. *Adv. Exp. Med. Biol.* 97, 529 (2003).
- 22 Waisser, K., Kubicová, L., Gregor J., Budřová, J., Andrlová, A., Dršata, J., Odlerová, Ž.: Vztahy mezi chemickou strukturou látek a jejich antimykobakteriální aktivitou vůči atypickým kmenům. XIII. Thiosalicylanilidy. *Česk. Farm.* 47, 84–86 (1998).
- 23 Šustr, M., Hrnčiarová, D., Látalová, M., Pravda, M., Kubicová, L.: Biological activity of *N*-substituted thiobenzamides and related compounds. *Folia Pharm. Univ. Carol.* 29, 39–54 (2003).
- 24 Waisser, K., Kubicová, L.: Biologické účinky látek podobných salicylanilidům. 3-Aryl-2*H*,4*H*-benz[e][1,3]oxazin-2,4-diony a thiosalicylanilidy. *Českoslov. Farm.* 42, 218–222 (1993).
- 25 Kuneš, J., Balšánek, V., Pour, M., Waisser, K., Kaustová, J.: On the relationship between the substitution pattern of thiobenzanilides and their antimycobacterial activity. *Farmaco* 57, 777–782 (2002).
- 26 Kolář, P., Foltýn, M., Látalová, M., Šustr, M., Kubicová, L., Kaustová, J.: Antimykobakteriální aktivita thioantranilamidů. *Chem. Listy* 96, 418 (2002).
- 27 Kubicová, L., Šustr, M., Macháček, M., Waisser, K., Buchta, V., Kubanová, P., Kaustová, J., Králová, K.: Synthesis of 5-chloro-2-hydroxythiobenzanilides and their

- 
- antimycobacterial, antifungal, and photosynthesis-inhibiting activity. 5-th Int. Elect. Conf. Synth. Org. Chem. <http://www.mdpi.org/ecsoc-5.htm>. C0010. Basel (2001).
- 28 Šustr, M., Kubicová, L., Kaustová, J., Waisser, K.: Antimykobakteriální 3,5-dichlorsalicylanilidy. Chem. Listy 96, 417 (2002).
- 29 Waisser, K., Odlerová, Ž.: Antituberculotics LXXI. Differences in the antituberculous activities of drugs in the evaluation of in vitro and in vivo activities. Folia Pharm. Univ. Carol. 18, 35–40 (1995).
- 30 Kubicová, L., Šustr, M., Pravda, M., Waisser, K.: Biological activity of 2-hydroxythiobenzanilides and related compounds. Cent. Eur. J. Publ. Health 12 Suppl., S56–S58 (2004).
- 31 Waisser, K., Kubicová, L., Kaustová, J., Bartsch, H., Erker, T., Hanuš, V.: Some antimycobacterial thiolactams. Sci. Pharm. 67, 123 (1999).
- 32 Waisser, K., Gregor, J., Kubicová, L., Klimešová, V., Kuneš, J., Macháček, M., Kaustová, J.: New groups of antimycobacterial agents: 6-chloro-3-phenyl-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazine-2(3H)-ones and 6-chloro-3-phenyl-2H-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-dithiones. Eur. J. Med. Chem. 35, 733 (2000).
- 33 Šustr, M., Macháček, M., Kubicová, L., Kubanová, P.: Aktivita chlorthiosalicylanilidů proti *Absidia corymbifera*. Chem. Listy 95, 760 (2001).
- 34 Kubicová, L., Kráľová, K., Šeršeň, F., Gregor, J., Waisser, K.: Effects of substituted salicylanilides on the photosynthetic apparatus of spinach chloroplasts. Folia Pharm. Univ. Carol. 25, 89–96 (2000).
- 35 [www.biochemie.upol.cz/stranky/vyuka/robc/3.ppt](http://www.biochemie.upol.cz/stranky/vyuka/robc/3.ppt)
- 36 Kubicová, L., Kráľová, K., Hrnčiarová, D., Pravda, M.: 3-Methylthiosalicylanilidy – inhibitory Hillovy reakce. Chem. Listy 97, 1122 (2003).
- 37 Hanusek, J., Šustr, M., Kubanová, P., Buchta, V., Sedlák, M.: Biological activity of substituted 2-aminothiobenzamides and quinazolin-4-thiones. Folia Pharm. Univ. Carol. 29/30, 55–64 (2003).
- 38 Šustr, M., Kráľová, K., Kubicová, L., Waisser, K.: Synthesis and herbicidal activity of thiosalicylanilides. Chem. Listy 94, 937 (2000).
- 39 Waisser, K., Kubicová, L., Dostál, H.: Biological effects of substances similar to salicylanilides: Thiobenzanilides. Folia Pharm. Univ. Carol. 23, 59 (1998).
- 40 Moloney, B. A., Riordan, P. D., West, P. J.: PCT Int. Appl. WO 9710228 (1997).

- 
- 41 Kubicová, L., Buchta, V., Kuneš, J., Macháček, M., Waisser, K.: 3- and 4-Fluorothiobenzanilides as antifungal substances. *Folia Pharm. Univ. Carol.* 23 Suppl., 150–151 (1998)
- 42 Kráľová, K., Šeršeň, F., Kubicová, L., Waisser, K.: Inhibition of photosynthetic electron transport in spinach chloroplasts by 3- and 4- halogeno substituted benzanilides and thiobenzanilides. *J. Trace Microprobe Techn.* 18, 251–256 (2000).
- 43 Kuneš, J., Balšánek, V., Pour, M., Waisser, K., Kaustová, J.: On the relationship between the substitution pattern of thiobenzanilides and their antimycobacterial activity. *Farmaco* 57, 777 (2002).
- 44 Balzarini, J., Brouwer, W. G., Dao, D. C., Osika, E. M., De Clercq, E.: Identification of novel thiocarboxanilide derivatives that suppress a variety of drug-resistant mutant human immunodeficiency virus type 1 strains at a potency similar to that for wild-type virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40, 1454–1466 (1996).
- 45 Esnouf, R. M., Start, D. I., De Clercq, E., Schwarz, E., Balzarini, J.: Models which explain the inhibition of reverse transcriptase by HIV-1-specific (thio)carboxanilide derivatives. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 234, 458–464 (1997).
- 46 Yu, K.-L., Torri, A. F., Luo, G., Cianci, Ch., Grant-Young, K., Danetz, S., Tiley, L., Krystal, M., Meanwell, N. A.: Structure-activity relationships for a series of thiobenzamide influenza fusion inhibitors derived from 1,3,3-trimethyl-5-hydroxycyclohexylmethylamine. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12, 3379–3382 (2002).
- 47 Matysiak, J., Niewiadomy, A., Macik-Niewiadomy, G., Kornilowicz, T.: Dependence of fungistatic activity of 2,4-dihydroxythiobenzanilides on the structure and lipophilic nature of the compounds. *Eur. J. Med. Chem.* 35, 393–404 (2000).
- 48 Matysiak, J., Niewiadomy, A., Macik-Niewiadomy, G.: In vitro inhibition properties of a new group of thiobenzanilides in relation to yeasts. *Eur. J. Pharm. Sci.* 10, 119–123 (2000).
- 49 Niewiadomy, A., Matysiak, J., Macik-Niewiadomy, G.: In vitro evaluation of 2,4-dihydroxythiobenzanilides against various moulds. *Eur. J. Pharm. Sci.* 13, 243–248 (2001).
- 50 Legocki, J., Matysiak, J., Niewiadomy, A., Kostecka, M.: Synthesis and fungistatic activity of new groups of 2,4-dihydroxythiobenzoyl derivatives against phytopathogenic fungi. *Agric. Food Chem.* 51, 362–368 (2003).

- 
- 51 Jozwiak, K., Szumilo, H., Senczyna, B., Niewiadomy, A.: Use of reversed-phase high-performance liquid chromatography in QSAR analysis of 2,4-dihydroxythiobenzanilide analogues. SAR QSAR Environ. Res. 10, 509–532 (1999).
- 52 Rozylo, J. K., Niewiadomy, A., Zabinska, A., Matysiak, J.: RPTLC investigation of the hydrophobicity and biological activity of new fungicidal compounds. J. Planar. Chrom. 11, 450–456 (1998).
- 53 Jozwiak, K., Szumilo, H.: Correlation of fungostatic activity with log P and sigma parameters in the group of thiobenzanilides. Acta Pol. Pharm. 57(Suppl.), 82–84 (2000).
- 54 Matysiak, J., Krajewska-Kulak, E., Karczewski, J., Niewiadomy, A.: *N*-heterocyclic derivatives of 2,4-dihydroxybenzcarbothioamide as antimycotic agents. J. Agric. Food Chem. 49, 5251–5257 (2001)
- 55 Krajewska-Kulak, E., Niewiadomy, A., Lukaszuk, C., Matysiak, J., Kostecka, M.: In vitro antifungal activity of *N,N*-phenyl-1,2,3,4-thiatriazole-5-yl-2,4-resorcylicarbothioamide. Arzneim.-Forsch. 53, 668 (2003).
- 56 Niewiadomy, A., Matysiak, J., Macik-Niewiadomy, G.: The antibacterial activity of some 2,4-dihydroxythiobenzanilides substituted in the *N*-aryl ring. Pestycydy (3-4), 43–51 (2000).
- 57 Stauffer, S. R., Sun, J., Katzenellenbogen, B. S., Katzenellenbogen, J. A.: Acyclic amides as estrogen receptor ligands: synthesis, binding, activity and receptor interaction. Bioorg. Med. Chem. 8, 1293–1316 (2000).
- 58 Kleinrok, Z., Niewiadomy, A., Matysiak, J.: Evaluation of toxic activity of 2,4-dihydroxythiobenzanilides. Pharmazie 57, 198–200 (2002).
- 59 Kowalska-Pylka, H., Majer-Dziedzic, B., Niewiadomy, A., Matysiak, J.: Evaluation of the toxicity of substituted benzthioanilides by using in vitro tests. ATLA-Altern. Lab. Anim. 29, 547 (2001).
- 60 Takasaki, M., Konoshima, T., Kozuka, M., Yoneyama, K., Yoshida, S., Tokuda, H., Nishino, H., Iwashima, A.: Inhibitors of skin-tumor promotion. 13. Inhibitory effects of euglobins and their related-compounds on Epstein-Barr virus activation and on 2-stage carcinogenesis of mouse-skin tumors. Biol. Pharm. Bull. 18, 288–294 (1995).
- 61 Kubicová, L. et al.: ČR pat. přihl. PV 2005-337 (2005).
- 62 Yde, B., Lawesson, S. O.: Studies on organophosphorus compounds. Tetrahedron 40, 2047–2052 (1984).

- 
- 63 Scheibye, S., Pedersen, B. S., Lawesson, S. O.: Studies on organophosphorus compounds. XXIII. Synthesis of salicylthioamides and 4H-1,3,2-benzoxazaphosphorine derivatives from the dimer of p-methoxyphenylthionophosphine sulfide and salicylamides. *Bull. Soc. Chim. Belg.* 87, 299–306 (1978).
- 64 Olson, R., Hansen, H. C.: Micro-wave-assisted solvent-free parallel synthesis of thioamids. *Tetrahedron Lett.* 41, 7947–7950 (2000).
- 65 Friedmann, A., Gattermann, L.: Über die Einwirkung von Senfölen auf aromatische Kohlenwasserstoffe. *Ber. Deut. Chem. Ges.* 25, 3525–3528 (1892).
- 66 Desai, R. D.: Some new observations on the Friedel-Crafts reaction. *J. Indian Chem. Soc.* 3, 193–199 (1968).
- 67 Rivier, H., Kunz, S.: De l'action du phénylsénévol sur phénols en présence de chlorure d'aluminium. *Helv. Chim. Acta* 15, 376–380 (1932).
- 68 Jančevska, M., Prisaganec, B., Lazarevič, M.: Synthesis of some (5-bromosalicyl)thiobenzanilides. *Godisen Zbornik Prir. Prir. Mat. Fak. Univ. Skopje A: Mat. Fyz. Chem.* 24, 65 (1974).
- 69 Wagner, G., Singer, G.: Zur Darstellung von 2-Hydroxy-thiobenzaniliden und 3-Mono- und -Dithionbenzoxazinen-(1,3). *Z. Chem.* 4, 148–149 (1963).
- 70 Šustr, M.: Biologicky aktivní thiosalicylanilidy a jejich analoga. *Disertační práce. Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové* (2005).
- 71 Pravda, M.: Syntéza a biologická aktivita sloučenin odvozených od salicylanilidů III (syntéza). *Diplomová práce. Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové* (2003).
- 72 Petřík, M.: Syntéza a vlastnosti biologicky aktivních 2-hydroxybenzanilidů a 2-hydroxythiobenzanilidů. *Diplomová práce. Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové* (2004).
- 73 Wanstrat: *Chem. Ber.* 6, 336 (1873); citováno podle Beilstein CrossFire by Beilsteins Informationssysteme GmbH, Frankfurt, Germany.
- 74 Kupferberg: *J. Prakt. Chem.* 16, 442 (1877); citováno podle Beilstein CrossFire by Beilsteins Informationssysteme GmbH, Frankfurt, Germany.
- 75 Kótai, A., Szókán, G.: Új szalicilamid számatékok II. A 4-dimetilamino-szalicilsav szubsztituált amidjának, hidrazidjának és további számatékainak előallítása. *Acta Pharm. Hungarica* 40, 108–115 (1970); citováno podle Beilstein CrossFire by Beilsteins Informationssysteme GmbH, Frankfurt, Germany.



- 
- 76 Balduzzi, G., Bigi, F., Casiraghi, G., Casnati, G., Sartori, G.: Unusual Friedel-Crafts reactions.5. Synthesis of salicylanilides via ortho-aminocarbonylation of phenols with phenyl isocyanate. *Synthesis* 10, 879–888 (1982).
- 77 Veverkova, E., Meciariova, M., Toma, S., Balko, J.: Synthesis of substituted salicylanilides under microwave irradiation. *Monatsh. Chem.* 134, 1215–1219 (2003).
- 78 Waissner, K., Bureš, O., Holý, P., Kuneš, J., Oswald, R., Jirasková, L., Pour, M., Klimešová, V., Kubicová, L., Kaustová, J.: Relationship between the structure and antimycobacterial activity of substituted salicylanilides. *Arch. Pharm.* 336, 53–71 (2003).
- 79 Kuhnt, D., Jelich, K., Haug, M., Stenzel, K., Dehne, H. W., Erdelen, Ch.: Preparation of 4-chlorobenzamides as pesticides. *Ger. Offen.* 4428381 (1996).
- 80 Gonnert, R., Schraufstatter, E.: Compounds for gastropod control. *Ger. Offen.* 1045717 (1958).