

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



Diplomová práce
Syntéza tetrazolů a jejich derivátů jako látek
s antimykobakteriálním působením

Petr Vicherek

Školitel: RNDr. Patrik Čonka, Ph.D.

Hradec Králové 2014

Prohlášení o samostatném vypracování práce

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

V Hradci Králové 15.5.2014

Petr Vicherek

Poděkování

Chci velice poděkovat zejména svému školiteli RNDr. Patriku Čonkovi, Ph.D., konzultantovi prof. PharmDr. Alexandru Hrabálkovi, CSc. a PharmDr. Jaroslavu Rohovi, Ph.D. za pomoc, trpělivost a rady pro praktickou i teoretickou stránku práce. Poděkování za vstřícný přístup patří také Mgr. Janu Němečkovi, Ing. Galině Karabanovichevé, dalším členům naší pracovní skupiny a ostatním pracovníkům Katedry anorganické a organické chemie.

Obsah

Obsah	4
Abstrakt	6
Abstract	7
1. Úvod	8
1.1. Tuberkulóza.....	8
1.2. Potenciální nová antituberkulotika.....	9
1.3. Antimykobakteriální potenciál tetrazolů.....	11
2. Cíl práce	13
3. Metodická část	14
3.1. Alkylace 1-aryl-1 <i>H</i> -tetrazol-5-thiolu 3,5-dinitrobenzylchloridem, resp. 3,4,5-trimethoxybenzylchloridem.....	14
3.2. Příprava 3,5-dinitro- <i>N</i> -fenylobenzamidů, resp. <i>N</i> -(3,5-dinitrofenyl)benzamidů, a <i>N</i> -benzyl-3,5-dinitrobenzamidů.....	15
3.3. Syntéza substituovaných 1,5-difenyl-1 <i>H</i> -tetrazolů z odpovídajících benzamidů.....	15
3.3.1. Syntéza substituovaných 1,5-difenyl-1 <i>H</i> -tetrazolů mezifázovou katalýzou z imidochlorklidů výchozích benzamidů.....	16
3.3.2. Syntéza substituovaných 1,5-difenyl-1 <i>H</i> -tetrazolů mezifázovou katalýzou z imidozobenzotriazolů výchozích benzamidů.....	16
3.3.3. Syntéza substituovaných 1,5-difenyl-1 <i>H</i> -tetrazolů z výchozích benzamidů pomocí Mitsunobuovy reakce.....	17
4. Experimentální část	18
4.1. Série substituovaných 1-aryl-5-[(3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl]-1 <i>H</i> -tetrazolů.....	19
4.1.1. Příprava 1-(4-bromfenyl)-5-[(3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl]-1 <i>H</i> -tetrazolu.....	19
4.1.2. Příprava 5-[(3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl]-1-mesityl-1 <i>H</i> -tetrazolu.....	20
4.1.3. Příprava 1-(3,4-dichlorfenyl)-5-[(3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl]-1 <i>H</i> -tetrazolu.....	21
4.1.4. Příprava 5-[(3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl]-1-(2-methoxyfenyl)-1 <i>H</i> -tetrazolu.....	21
4.1.5. Příprava 5-[(3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl]-1-naftyl-1 <i>H</i> -tetrazolu.....	22
4.1.6. Příprava 1-(3-methoxyfenyl)-5-[(3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl]-1 <i>H</i> -tetrazolu.....	23
4.2. Série substituovaných 1-fenyl-5-[(3,4,5-trimethoxybenzyl)sulfanyl]-1 <i>H</i> -tetrazolů.....	24
4.2.1. Příprava 1-(4-nitrofenyl)-5-[(3,4,5-trimethoxybenzyl)sulfanyl]-1 <i>H</i> -tetrazolu.....	24
4.2.2. Příprava 1-fenyl-5-[(3,4,5-trimethoxybenzyl)sulfanyl]-1 <i>H</i> -tetrazolu.....	25
4.2.3. Příprava 1-(4-methoxyfenyl)-5-[(3,4,5-trimethoxybenzyl)sulfanyl]-1 <i>H</i> -tetrazolu.....	26
4.2.4. Příprava 1-(4-bromfenyl)-5-[(3,4,5-trimethoxybenzyl)sulfanyl]-1 <i>H</i> -tetrazolu.....	26
4.3. Série substituovaných 3,5-dinitro- <i>N</i> -fenylobenzamidů.....	27
4.3.1. Příprava 3,5-dinitro- <i>N</i> -fenylobenzamidu.....	27
4.3.2. Příprava 3,5-dinitro- <i>N</i> -(4-nitrofenyl)benzamidu.....	28

4.3.3.	Příprava <i>N</i> -(4-bromfenyl)-3,5-dinitrobenzamidů	29
4.3.4.	Příprava <i>N</i> -(3,4-dichlorfenyl)-3,5-dinitrobenzamidů	29
4.3.5.	Příprava 3,5-dinitro- <i>N</i> -(4-methoxyfenyl)benzamidů	30
4.3.6.	Příprava 3,5-dinitro- <i>N</i> -(3-nitrofenyl)benzamidů	30
4.3.7.	Příprava <i>N</i> -(4-chlorfenyl)-3,5-dinitrobenzamidů	31
4.4.	Série substituovaných <i>N</i> -(3,5-dinitrofenyl)benzamidů	32
4.4.1.	Příprava <i>N</i> -(3,5-dinitrofenyl)benzamidů	32
4.4.2.	Příprava <i>N</i> -(3,5-dinitrofenyl)-4-nitrobenzamidů	32
4.5.	Série substituovaných <i>N</i> -benzyl-3,5-dinitrobenzamidů	33
4.5.1.	Příprava <i>N</i> -(4-chlorbenzyl)-3,5-dinitrobenzamidů	33
4.5.2.	Příprava <i>N</i> -(3,4-dichlorbenzyl)-3,5-dinitrobenzamidů	35
4.5.3.	Příprava 3,5-dinitro- <i>N</i> -[4-(trifluormethyl)benzyl]benzamidů	35
4.6.	Příprava substituovaných 1,5-difenyl-1 <i>H</i> -tetrazolů mezifázovou katalýzou z imidoylbenzotriazolů výchozích benzamidů	36
4.6.1.	Příprava 1,5-difenyl-1 <i>H</i> -tetrazolu	36
4.6.2.	Příprava 1-(4-bromfenyl)-5-(disubst. fenyl)-1 <i>H</i> -tetrazolu	38
4.6.3.	Příprava 1-(4-nitrofenyl)-5-(disubst. fenyl)-1 <i>H</i> -tetrazolu	44
4.6.4.	Příprava 1-(disubst. fenyl)-5-fenyl-1 <i>H</i> -tetrazolu	44
4.6.5.	Příprava 5-(disubst. fenyl)-1-(3-nitrofenyl)-1 <i>H</i> -tetrazolu	44
4.7.	Příprava substituovaných 1,5-difenyl-1 <i>H</i> -tetrazolů mezifázovou katalýzou z imidoylchloridů výchozích benzamidů	44
4.7.1.	Příprava 1,5-difenyl-1 <i>H</i> -tetrazolu	44
4.7.2.	Příprava 1-(4-chlorfenyl)-5-(disubst. fenyl)-1 <i>H</i> -tetrazolu	45
4.8.	Příprava substituovaných 1,5-difenyl-1 <i>H</i> -tetrazolů z výchozích benzamidů pomocí Mitsunobuovy reakce	45
4.8.1.	Příprava 1,5-difenyl-1 <i>H</i> -tetrazolu	45
4.8.2.	Příprava 1-(4-chlorfenyl)-5-(disubst. fenyl)-1 <i>H</i> -tetrazolu	46
5.	Výsledky a diskuse	47
5.1.	Syntéza	47
5.2.	Testování antimykobakteriální aktivity	51
6.	Závěr	55
7.	Seznam použité literatury	56
8.	Seznam použitých zkratk	59

Abstrakt

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

Kandidát: Petr Vicherek
Školitel: RNDr. Patrik Čonka, Ph.D.
Název diplomové práce: **Syntéza tetrazolů a jejich derivátů jako látek s antimykobakteriálním působením**

Přestože od druhé poloviny 20. století nastal v léčbě tuberkulózy významný pokrok díky objevům účinných léčiv, stále se jedná o velice rozšířené a obtížně léčitelné onemocnění. Situace je komplikována narůstajícím výskytem rezistentních kmenů a z tohoto důvodu je stále nutné hledat nová potenciální antituberkulotika. Cílem této práce bylo pokračovat v syntéze antimykobakteriálně účinných struktur na bázi tetrazolu.

Nejprve jsme syntetizovali deriváty 1-aryl-5-[(3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl]-1*H*-tetrazolu metodou Williamsonovy syntézy, při které spolu reagovaly 1-aryl-1*H*-tetrazol-5-thiol s 3,5-dinitrobenzylchloridem. Reakční podmínky byly postupně optimalizovány. Následně jsme připravili stejným způsobem deriváty 1-fenyl-5-[(3,4,5-trimethoxybenzyl)sulfanyl]-1*H*-tetrazolu, což jsou analogy předchozích tetrazolů postrádající elektronakceptorovou 3,5-dinitrosubstituci.

Dále jsme se zaměřili na syntézu substituovaných 1,5-difenyl-1*H*-tetrazolů. Jako výchozí struktury pro tvorbu těchto tetrazolů byly použity substituované *N*-fenylbenzamidy, které jsme připravili z patřičných benzoylchloridů a anilinů. Cílové tetrazoly jsme se poté pokusili připravit třemi různými reakcemi:

1. tvorba imidoylchloridu výchozího benzamidu a jeho následné zacyklení azidem sodným na tetrazol v podmínkách mezifázové katalýzy;
2. tvorba imidoylbenzotriazolu výchozího benzamidu a jeho následné zacyklení azoimidem na tetrazol v podmínkách mezifázové katalýzy;
3. varianta Mitsunobuovy reakce s použitím trimethylsilylazidu.

Druhá zmíněná metoda vedla k zisku dvou substituovaných 1,5-difenyl-1*H*-tetrazolů, množství a čistota výtěžku ovšem nebyly dostačující.

Celkem jsme získali 12 finálních tetrazolů a antimykobakteriální aktivita *in vitro* byla zjišťována u devíti z nich. Spolu s nimi bylo testováno i 9 substituovaných benzamidů a 3 substituované *N*-benzylbenzamidy, které jsme připravili. Některé z těchto látek vykázaly vyšší antimykobakteriální účinnost, než isoniazid. Získané produkty byly charakterizovány ¹H NMR a ¹³C NMR spektroskopii a teplotou tání.

Abstract

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

Candidate: Petr Vicherek
Supervisor: RNDr. Patrik Čonka, Ph.D.
Title of diploma thesis: **Synthesis of tetrazoles as antituberculotics**

Although significant progress in therapy of tuberculosis has been made since effective drugs were discovered in the second half of the 20th century, it is still widespread and refractory curable disease. The situation is complicated with growing appearance of resistant strains and for that reason it is necessary to search for new potential antituberculotics. The aim of this work was to continue with synthesis of antimycobacterial-efficient structures based on tetrazole.

Firstly, we synthesised derivatives of 1-aryl-5-[(3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl]-1*H*-tetrazole by the method of Williamson's synthesis, when the reaction of 1-aryl-1*H*-tetrazol-5-thiol with 3,5-dinitrobenzylchloride was performed. Conditions of the reactions were further optimised. We prepared by the same way derivatives of 1-phenyl-5-[(3,4,5-trimethoxybenzyl)sulfanyl]-1*H*-tetrazole afterwards, as analogues of previous tetrazoles missing the electron withdrawing 3,5-dinitrosubstitution.

Furthermore, we concentrated on synthesis of substituted 1,5-diphenyl-1*H*-tetrazoles. Substituted *N*-phenylbenzamides, prepared from appropriate benzoylchlorides and anilines, were used as the initial structures for formation of these tetrazoles. Then we tried three different pathways for preparation of the final tetrazoles:

1. formation of imidoylchloride of initial benzamide followed by its cyclization with sodium azide on tetrazole in condition of phase-transfer catalysis;
2. formation of imidoylbenzotriazole of initial benzamide followed by its cyclization with azoimide on tetrazole in condition of phase-transfer catalysis;
3. variation of Mitsunobu reaction using trimethylsilylazide.

The second mentioned method led to isolation of two substituted 1,5-diphenyl-1*H*-tetrazoles, but not in sufficient amount and purity.

We obtained 12 final tetrazoles altogether and antimycobacterial activity *in vitro* was investigated in nine of them. 9 substituted *N*-phenylbenzamides and 3 substituted *N*-benzylbenzamides we prepared were tested as well. Some of these compounds shown higher antimycobacterial activity than isoniazid. The products were characterised with ¹H NMR and ¹³C NMR spectroscopy and with melting points.

1. Úvod

1.1. Tuberkulóza

Tuberkulóza (TB) je infekční onemocnění způsobené bakteriemi ze skupiny *Mycobacterium tuberculosis*, které se nejčastěji přenáší vdechnutím kapének od akutně nemocných lidí. Ačkoliv se jedná o celosvětově rozšířenou nemoc, výskyt tuberkulózy v jednotlivých oblastech světa se vzájemně diametrálně liší a souvisí se socioekonomickou, zdravotní a hygienickou úrovní daných lokalit. V rozvinutých zemích je v současnosti tuberkulóza vnímána víceméně již jako exotická záležitost. To však nelze tvrdit o zbylé většině světa. Nejvíce postižené jsou rozvojové země v Asii, Africe a latinské Americe. Právě z těchto oblastí se druhotně (v rámci imigrace) TB dostává i do vyspělých zemí.¹

Dle odhadů WHO (Světová zdravotnická organizace) je nakažena až jedna třetina světové populace. Z celkového počtu infikovaných se však 95 % nachází v latentním stádiu, které je bezpříznakové a neinfekční. Nicméně, dojde-li k oslabení imunitního systému, organismus již nezvládne zadržovat množení patogenu a propukne akutní fáze onemocnění s manifestovanými klinickými příznaky. Nejčastějším postiženým orgánem jsou plíce, ale mykobakterie můžou v těle migrovat a napadat i další orgány. Neléčená tuberkulóza mívá fatální prognózu. Za rok 2012 v jejím důsledku zemřelo asi 1,3 miliónu lidí, z toho 95 % úmrtí připadá na rozvojové země. Jedná se tak o druhou nejčastější příčinu úmrtí v důsledku infekční choroby. Horší statistiku má pouze virus HIV, který je často i důvodem přerodu latentní fáze tuberkulózy v její akutní formu. Tato onemocnění se navzájem negativně ovlivňují a jejich souběh je velice častý.²

Do poloviny dvacátého století neexistovala účinná farmakologická léčba tuberkulózy. Omezené terapeutické možnosti spočívaly v chirurgických zákrocích či pobytech v sanatoriích. V roce 1944 bylo objeveno aminoglykosidové antibiotikum streptomycin, které znamenalo převrat v boji proti tuberkulóze.³ V následujících dvou desetiletích přibyla další antituberkulotika isoniazid, rifampicin, pyrazinamid a ethambutol, která společně se streptomycinem dodnes patří mezi základní léčiva. Pouze sama o sobě však tuberkulózu vyléčit nedokážou a při léčbě je nutná jejich kombinace.⁴

Mykobakterie jsou těžko napadnutelné kvůli atypickému lipidovému složení buněčné stěny a málo aktivnímu metabolismu u latentních forem. Léčivo navíc musí nejprve projít granulomem vytvořeným buňkami nespecifické i specifické imunity v oblasti plicních makrofágů.⁵ Z těchto důvodů je nutná dlouhodobá kombinační léčba trvající obvykle několik měsíců, v závažnějších případech se může ještě prodloužit. Délka terapie a kombinace léčiv zvyšují riziko vzniku závažných vedlejších účinků (nejčastěji hepatotoxicitu), narušují spolupráci pacientů a mohou si vynutit ukončení stávající terapie a nasazení širšího spektra antituberkulotik. Zmíněné faktory přispěly k postupnému nárůstu četnosti kmenů MDR-TB (multirezistentní tuberkulóza), odolných vůči výše zmíněným základním léčivům. Vzniku rezistence napomáhá i nevhodná volba farmakoterapie zdravotnickými pracovníky, která nerespektuje případnou přítomnost rezistence nebo její rozvoj. Hlášeny jsou tak i kmeny

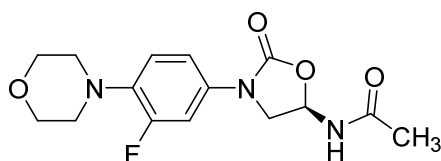
XDR-TB (extenzivně rezistentní tuberkulóza), které odolávají mnohem širšímu spektru léčiv. Bohužel, v poslední době se objevily i případy TDR-TB (totálně rezistentní tuberkulóza), proti kterým v současné době nemáme k dispozici dostatečně účinnou látku.⁶ Problematika rezistence tuberkulózy bude zřejmě v budoucnu narůstat a nelze vyloučit její globalizaci. Proto je nutné se intenzivně zabývat hledáním nových možností boje proti této zákeřné nemoci.¹

1.2. Potenciální nová antituberkulotika

Ačkoliv nejde o oblast výzkumu, která by byla pro farmaceutické firmy ekonomicky atraktivní, je v současné době v různých fázích klinického vývoje deset struktur a v preklinické fázi je zkoušeno osm sloučenin.⁷ Přístupy k nalezení nových antituberkulotik, účinných i proti rezistentním kmenům, se dají shrnout do následujících možností:

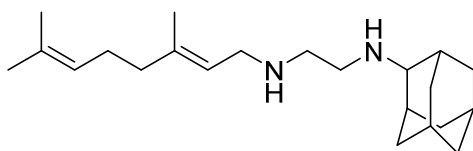
- testování již známých molekul na antimykobakteriální aktivitu.
- strukturní obměna stávajících antituberkulotik.
- hledání účinných látek v přírodních zdrojích.
- syntéza úplně nových sloučenin.

Mezi léčiva, která původně k terapii tuberkulózy určena nebyla a nyní se s úspěchem používají v případě kmenů MDR-TB, patří fluorochinolony. Nicméně ani tyto látky nejsou stoprocentně účinné, o čemž svědčí existence kmenů XDR-TB.⁸ Je možné následně vyzkoušet další antibakteriálně účinná léčiva, jejich přínos ovšem bývá sporný a obvykle vede k ještě většímu prohloubení rezistence. Existují však výjimky.⁶ Linezolid ze skupiny oxazolidinonů (obr. 1) je již používaným léčivem při infekcích rezistentními G+ bakteriemi a momentálně je prověřován na antituberkulotickou aktivitu v druhé fázi klinických studií.⁹ Dva další zástupci oxazolidinonů, sutezolid (PNU-100480) a AZD5847, jsou zcela nové sloučeniny a obě rovněž úspěšně prošly do druhé klinické fáze.⁷



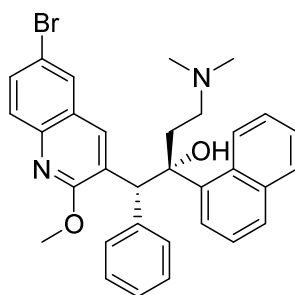
Obr. 1. Struktura linezolidu

Syntetickými obměnami již známých antituberkulotik se k žádným novým látkám v poslední době nedospělo. Struktura ethambutolu však byla inspirací pro syntézu nových látek s ethylendiaminovým uskupením. Zde se řadí i derivát SQ-109 (obr. 2), který vykazuje účinnost proti MDR-TB i XDR-TB a momentálně se nachází již ve druhé fázi klinických zkoušek.¹⁰



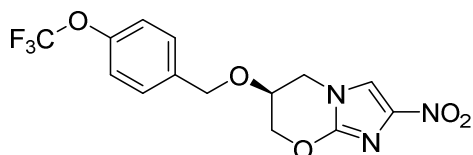
Obr. 2. Struktura SQ-109

Jsou prověřovány extrakty z léčivých rostlin, které jsou používány v tradiční terapii tuberkulózy v různých oblastech světa. Jejich efektivita bývá sice potvrzena, látky (či směsi látek) zodpovědné za požadovaný účinek je ovšem teprve nutné izolovat a identifikovat.^{11, 12} Naopak syntéza nových struktur je v současnosti jednoznačně nejnadějnějším přístupem, vzhledem k problematice rezistence na již známá chemoterapeutika. V prosinci roku 2012 schválil FDA (Úřad pro kontrolu potravin a léčiv, Spojené státy americké) látku ze skupiny diarylchinolonů bedaquilin (TMC-207, obr. 3) pro léčbu dospělých nakažených MDR-TB. Po více než čtyřiceti letech se tak jedná o první zcela novou strukturu, určenou výhradně pro léčbu tuberkulózy.¹³

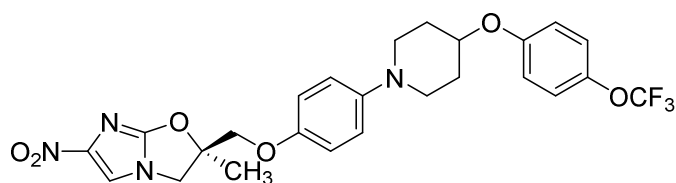


Obr. 3. Struktura bedaquilinu (TMC-207)

Veliké naděje jsou vkládány do sloučenin na bázi bicyklických nitroimidazolů. Derivát nitroimidazo[2,1-b][1,3]oxazinu PA-824 (obr. 4) je momentálně testován ve druhé fázi klinických studií, a to jak samotný, tak v kombinaci s moxifloxacinem a pyrazinamidem.¹⁴ Předpokládá se, že zde je za účinek zodpovědná nitroskupina, která se po průniku do mykobakterie redukuje pomocí deazaflavin-dependentních enzymů na inhibitory syntézy mykolové kyseliny, která je obsažená v mykobakteriální buněčné stěně. Tento mechanismus má navíc tu výhodu, že napadá i nedělicí se latentní bakterie TB.¹⁵ Ještě dále dospěla molekula delamanidu (OPC-67683, obr. 5) ze skupiny nitroimidazo[2,1-b]oxazolů, která se nyní nachází ve třetí fázi klinického vývoje.^{7, 14}

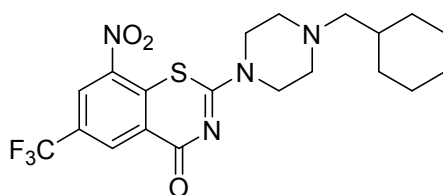


Obr. 4. Struktura PA-824



Obr. 5. Struktura delamanidu (OPC-67683)

V preklinickém výzkumu se právě nachází látka PBTZ169 ze skupiny benzothiazonů (obr. 6), jejíž účinek je rovněž dán *in vivo* redukcí nitroskupiny, tvorby nitrosometabolitů a následnou inhibicí enzymu DprE1 (dekaprenylfosforyl- β -D-ribose 2'-epimeráza). Ten je zodpovědný za syntézu arabinanů, nezbytné složky buněčné stěny mykobakterií.¹⁶ Podobným mechanismem účinkují i struktury dinitrobenzamidů.¹⁷



Obr. 6. Struktura PBTZ169

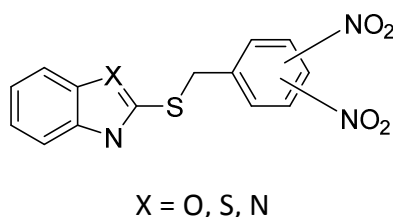
V laboratořích po celém světě je jistě mnoho dalších sloučenin, které vykazují výraznou antimykobakteriální účinnost. To je ale pouze nutná, nikoliv postačující podmínka pro to, aby se účinná látka mohla jednou stát léčivem. Sloučenina musí specificky napadat jen bakterie TB (případně i jiné patogeny), a přitom nesmí závažně poškozovat buňky lidského organismu. Z chemického hlediska musí být struktura antituberkulotika dostatečně rozpustná ve vodě pro administraci a pohyb v krevním řečišti, na druhé straně být zároveň schopná proniknout přes bariéru z imunitních buněk a konečně lipofilní buněčnou strukturou mykobakterií. Sjednotit všechny tyto požadavky v jedné molekule je velice obtížné a právě bezpečnostní profil je nejčastěji tím hlediskem, pro které je vývoj jinak nadějných látek předčasně ukončen. Proto je nutné neustále hledat další vhodné struktury, což je i snahou této práce.

1.3. Antimykobakteriální potenciál tetrazolů

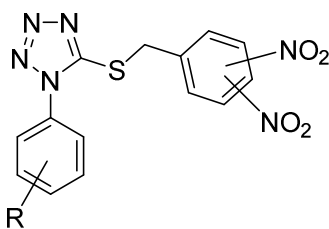
Z chemického hlediska je tetrazolový cyklus izosterní s karboxylovou skupinou nebo některými jejími funkčními deriváty (např. estery, amidy), oproti ní má však výhodu v mnohem nižší reaktivitě a větší stabilitě vůči metabolizaci. Již dnes je přítomen v několika rozličných léčivech, např. v antagonistech receptoru pro angiotensin AT₁ losartanu, valsartanu, kandesartanu či irbesartanu, antileukotrienu pranlukastu či cefalosporinových antibioticích první generace. Existuje však ještě mnoho jiných farmakodynamicky účinných látek s tetrazolovým uskupením, jež mají potenciál stát se léčivy.¹⁸

V roce 1993 byla na naší katedře připravena a antimykobakteriálně otestována série substituovaných bis(1-aryl-1*H*-tetrazol-5-yl)disulfidů. Výsledky byly vyjádřeny jako MIC (minimální inhibiční koncentrace) v $\mu\text{mol/l}$ ve srovnání s isoniazidem, a to jak vzhledem k standardním, tak i k méně běžným kmenům *Mycobacterium tuberculosis*. Tyto látky byly účinné zejména proti méně obvyklým TB kmenům odolným vůči isoniazidu. Aktivita byla přímo úměrná lipofilitě sloučenin, přičemž dominoval bis[1-(4-chlorfenyl)-1*H*-tetrazol-5-yl]disulfid. To vedlo k formulaci hypotézy, že strukturální motiv tetrazolu je sám o sobě antituberkuloticky účinný.¹⁹

Pracovníci katedry dále v roce 1995 publikovali práci zabývající se syntézou a antimykobakteriálním hodnocením série heterocyklických sloučenin, které měly na elektrondeficitní atom uhlíku v heterocyklu navázanou substituovanou alkylsulfanylovou skupinu.²⁰ Výraznější antituberkulotickou aktivitu vykazovaly deriváty obsahující elektronakceptorové skupiny na aromatické části benzylového fragmentu. Původně připravené deriváty pyridinu^{21A-E} vedly k obměně základního heterocyklu, kde dominovaly zejména pak benzazoly s 2,4- nebo 3,5-dinitrobenzylsulfanylovou skupinou (obr.7).^{22A-D} Analogy na bázi triazolu se neosvědčily²³, jako významnou sérií se však ukázaly být 1-substituované 5-(dinitrobenzyl)sulfanyl-1*H*-tetrazoly (obr. 8).²⁴ Ty jsou v současnosti v centru pozornosti pracovní skupiny katedry zabývající se tetrazolovou chemií.



Obr. 7. Struktura benzazolů s 2,4- nebo 3,5-dinitrobenzylsulfanylovou skupinou



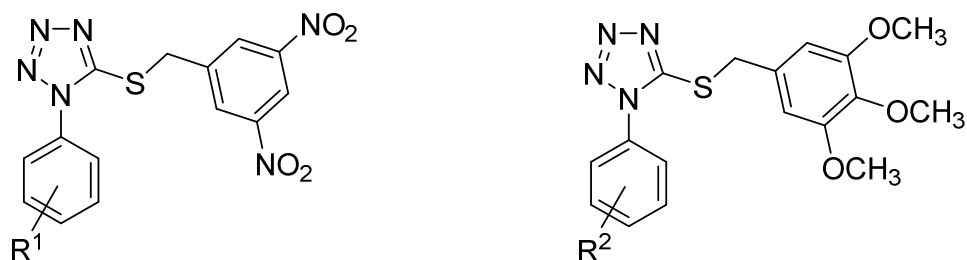
Obr. 8. Struktura 1-substituovaných 5-(dinitrobenzyl)sulfanyl-1*H*-tetrazolů

Nepublikované výsledky pracovní skupiny naznačují, že jak tetrazolový cyklus, tak dinitrofenylový fragment (který je součástí i několika klinicky testovaných látek zmíněných výše) jsou skutečně nositeli antituberkulotické aktivity. Obecným nedostatkem dosud připravených sloučenin na této bázi zatím zůstává jejich nízká rozpustnost ve vodě a částečná cytotoxicita vůči lidským buňkám. Nadále jsou intenzivně syntetizovány a vyhodnocovány nové sloučeniny, které v různých modifikacích kombinují oba strukturální motivy ve snaze objevit optimálně antituberkuloticky účinnou látku, s příznivými farmakokinetickými i farmakodynamickými vlastnostmi a bezpečnostním profilem. Snaha přispět k tomuto úsilí je i smyslem této diplomové práce.

2. Cíl práce

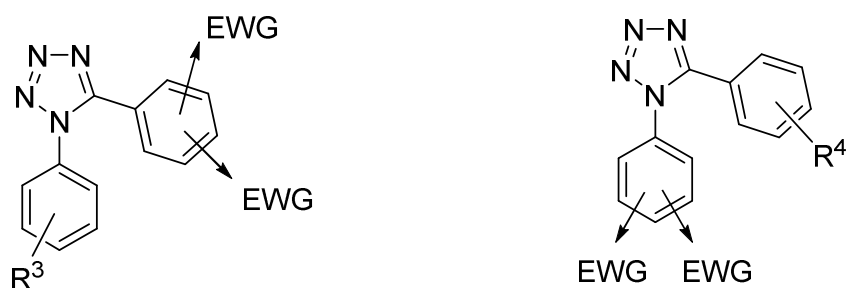
Úkolem první částí mé diplomové práce je syntéza šesti derivátů 1-aryl-5-[(3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl]-1*H*-tetrazolu s obměnou aromatické části v poloze N-1 tetrazolu. Následně připravíme čtyři deriváty 1-fenyl-5-[(3,4,5-trimethoxybenzyl)sulfanyl]-1*H*-tetrazolu, které představují analogy předchozích látek postrádající v poloze C-5 tetrazolu aromatický zbytek se sníženou elektronovou hustotou (obr. 9.). Oba typy sloučenin budou následně odeslány na testování antimykobakteriální účinnosti *in vitro*.

Mým druhým úkolem je příprava substituovaných 1,5-difenyl-1*H*-tetrazolů, které oproti předešlým tetrazolům mají oba aromatické substituenty navázané přímo, bez spojovacího řetězce. Je zde vždy přítomen fenyl disubstituovaný EWG (elektronakceptorová skupina), ať už v poloze C-5 nebo v poloze N-1 tetrazolu (obr. 10). Samotné syntéze těchto cílových tetrazolů bude předcházet příprava jejich prekurzorů benzamidů, které budou coby izosterní analogy tetrazolu rovněž testovány na antimykobakteriální aktivitu. Spolu s nimi budou připraveny a otestovány substituované benzamidy mající methylenový spojovací můstek mezi amidickým dusíkem a substituovanou aromatickou částí.



R¹ = 4-Br; 2,4,6-triMe; 3,4-diCl; 2-MeO; 1-naftyl; 3-MeO R² = 4-NO₂; 4-H; 4-MeO; 4-Br

Obr. 9. Struktura cílových derivátů 1-aryl-5-[(3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl]-1*H*-tetrazolu, resp. 1-fenyl-5-[(3,4,5-trimethoxybenzyl)sulfanyl]-1*H*-tetrazolu



R³ = H; 4 NO₂; 4-Br; 3,4-diCl; 4-MeO; 3-NO₂; 4-Cl

R⁴ = 4-H; 4-NO₂

Obr. 10. Struktura cílových substituovaných 1,5-difenyl-1*H*-tetrazolů

3. Metodická část

Jak pro přípravu 1-aryl-5-[(3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl]-1*H*-tetrazolů, tak jejich 5-(3,4,5-trimethoxybenzyl)sulfanyl analogů jsme použili jako výchozí látky již na katedře syntetizované 1-aryl-1*H*-tetrazol-5-thioly, které na principu Williamsonovy syntézy reagovaly s 3,5-dinitrobenzylchloridem, resp. 3,4,5-trimethoxybenzylchloridem za vzniku požadovaných sloučenin.

V druhé části práce byly výchozí benzamidy připraveny reakcí odpovídajících benzoylchloridů s příslušnými substituovanými aniliny, resp. benzylaminy. Zmíněné sloučeniny jsou běžně komerčně dostupné. V dalším kroku jsme se snažili připravené benzamidy převést na odpovídající tetrazoly, kdy byly vyzkoušeny celkem tři druhy reakcí (vždy nejprve na snadno dostupném a levném benzanilidu):

1. tvorba imidoylchloridu z benzamidu a jeho přímé převedení mezifázově katalyzovanou reakcí s azidem sodným na tetrazol;
2. stabilizace imidoylchloridu reakcí s 1*H*-benzo[d][1,2,3]triazolem za vzniku imidoylbenzotriazolu, a po jeho izolaci mezifázová cyklizace na tetrazol;
3. modifikace Mitsunobuovy reakce za použití trimethylsilylazidu.

3.1. Alkylace 1-aryl-1*H*-tetrazol-5-thiolu 3,5-dinitrobenzylchloridem, resp. 3,4,5-trimethoxybenzylchloridem

Princip reakce spočívá ve Williamsonově syntéze, sloužící k přípravě asymetrických etherů či sulfidů. Při této reakci dochází ke vzniku thiolátu výchozího tetrazolu, který je následně napaden nukleofilním benzylchloridem. Na naší katedře byla tato reakce již prováděna buď v podmínkách mezifázové katalýzy s hydroxidem sodným a tetrabutylamonium-bromidem (TBAB) jako katalyzátorem mezifázového přenosu, či za pomoci triethylaminu. V této práci jsme však použili pro vznik thiolátu ethanolát sodný, který vytvoří z tetrazol-5-thiolu jeho sodný thiolát za uvolnění vodíku. Následně s benzylchloridem vzniká cílový 1-aryl-5-benzylsulfanyl-1*H*-tetrazol. Tato reakce probíhá kvantitativně (Schéma 1).

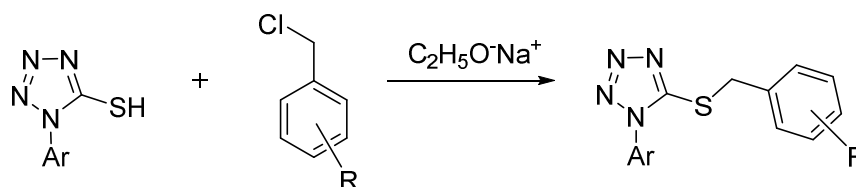


Schéma 1. Varianta Williamsonovy syntézy využívající sodné soli 1-aryl-1*H*-tetrazol-5-thiolu

3.2. Příprava 3,5-dinitro-*N*-fenylbenzamidů, resp. *N*-(3,5-dinitrofenyl)benzamidů, a *N*-benzyl-3,5-dinitrobenzamidů

K získání zmíněných benzamidů byla použita kondenzační reakce chloridu benzoové nebo 3,5-dinitrobenzoové kyseliny s různě substituovanými aniliny, resp. benzylaminy. Reakce probíhala spontánně již za laboratorní teploty. Jako rozpouštědlo jsme použili pyridin, který zároveň váže uvolňující se chlorovodík. Tato reakce rovněž probíhá prakticky kvantitativně (Schéma 2).

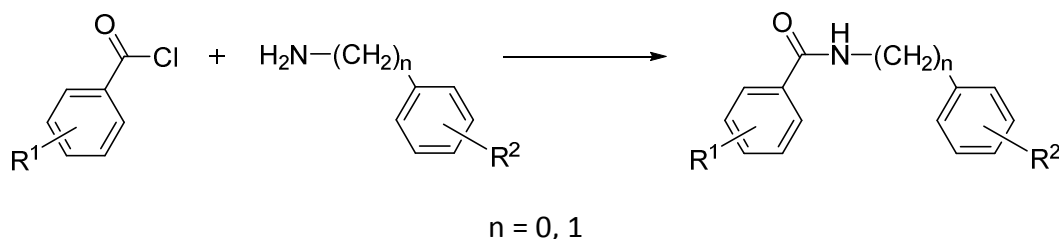


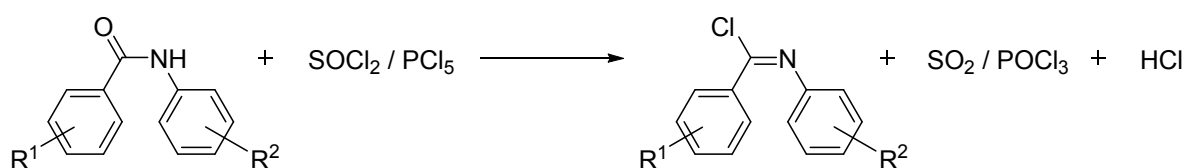
Schéma 2. Kondenzační reakce benzoylchloridu a anilinu/benzylaminu za vzniku benzamidu

3.3. Syntéza substituovaných 1,5-difenyl-1*H*-tetrazolů z odpovídajících benzamidů

Způsobů, jakým lze benzamidy převést na tetrazoly, je v literatuře popsáno několik.^{25, 26, 27, 28} Podstatou je vždy tvorba reaktivnějšího derivátu z výchozího benzamidu, který poté reaguje s anorganickým či organickým azidem, resp. azoimidem. Reaktivním intermediátem nejčastěji bývá imidoylchlorid, tento meziprodukt je však nestabilní a je nutné s ním okamžitě pracovat.²⁵ Tento problém se dá vyřešit tvorbou imidoylbenzotriazolů, které jsou stabilní, izolovatelné a zároveň dostatečně reaktivní pro závěrečnou cyklizační reakci.^{26, 27} Specifickým případem je pak varianta Mitsunobuovy reakce.²⁸

3.3.1. Syntéza substituovaných 1,5-difenyl-1*H*-tetrazolů mezifázovou katalýzou z imidoylchloridů výchozích benzamidů

V prvním kroku je nutné vytvořit z výchozího benzamidu jeho imidoylchlorid, což je možné varem v prostředí thionylchloridu či tavením s chloridem fosforečným. Ze získaného imidoylchloridu následně v podmínkách mezifázové katalýzy vzniká požadovaný tetrazol. Reakce probíhá za laboratorní teploty a účastní se jí azid sodný a TBAB jako katalyzátor mezifázového přenosu (Schéma 3).²⁵



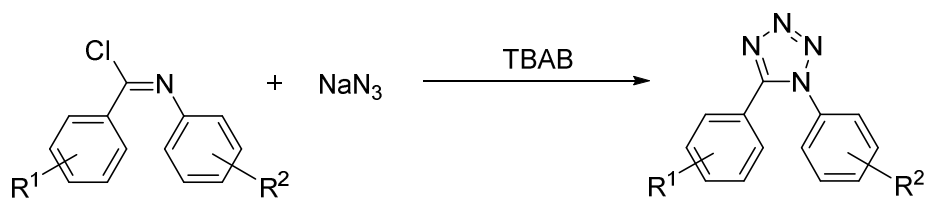


Schéma 3. Tvorba substituovaných 1,5-difenyl-1*H*-tetrazolů z imidoylchloridů

Důsledkem značné reaktivity imidoylchloridu je však jeho částečná hydrolyzá ve vodném prostředí na výchozí benzamid.

3.3.2. Syntéza substituovaných 1,5-difenyl-1*H*-tetrazolů mezifázovou katalýzou z imidoylbenzotriazolů výchozích benzamidů

Metoda se od předchozí liší tvorbou stabilního meziprojektu pomocí 1*H*-benzo[d][1,2,3]triazolu. Imidoylchlorid, vzniklý opět reakcí benzamidu s thionylchloridem, je nukleofilně napaden benzotriazolem za odstoupení chlorovodíku. Reakce probíhá za zvýšené teploty a lze ji rychle provést v mikrovlánném reaktoru²⁶, nicméně je možný i konvenční ohřev. Po izolaci produktu opět následuje mezifázově katalyzovaná reakce, kdy imidoylbenzotriazol kvantitativně reaguje s azoimidem (generovaným kyselinou trifluoroctovou z azidu sodného) za vzniku patřičného tetrazolu. Jako katalyzátor na mezifázi slouží TBAB, reakce probíhá za laboratorní teploty (Schéma 4).²⁷

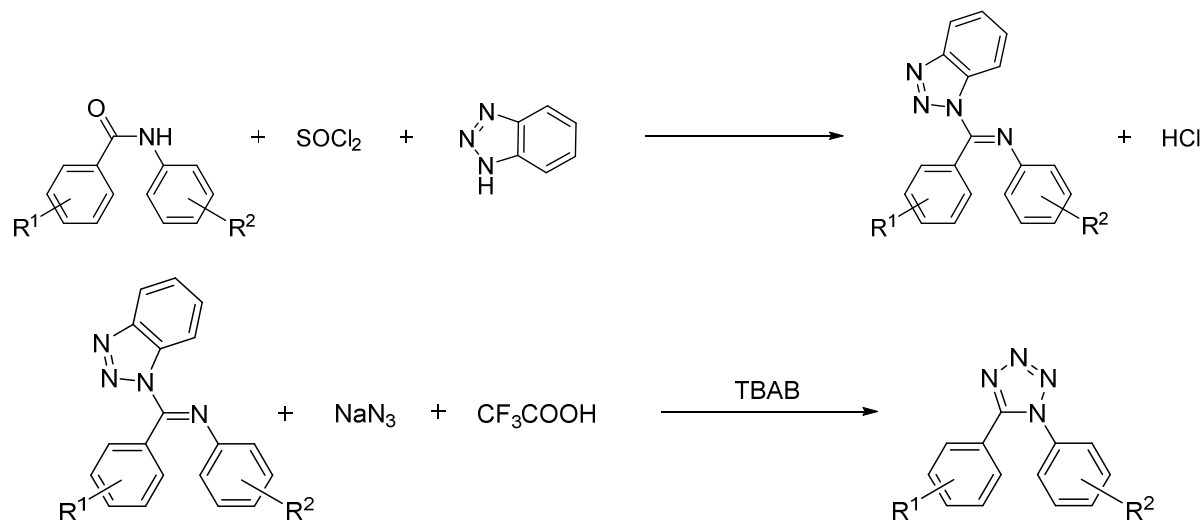


Schéma 4. Tvorba substituovaných 1,5-difenyl-1*H*-tetrazolů z imidoylbenzotriazolů

3.3.3. Syntéza substituovaných 1,5-difenyl-1*H*-tetrazolů z výchozích benzamidů pomocí Mitsunobuovy reakce

Mitsunobuova reakce obvykle slouží k stereoselektivní substituci hydroxyly jinými nukleofily. Kromě hydroxyly je jí však možné použít pro substituci celé řady dalších funkčních skupin, které umožňují být napadeny nukleofilem. Byla popsána rovněž práce, zabývající se právě tvorbou 1,5-disubstituovaných tetrazolů přímo z amidů.²⁸ K roztoku či suspenzi výchozího amidu v tetrahydrofuranu je přidán diisopropyl azodikarboxylát (DIAD) a trifenyfosfin. Volný elektronový pár trifenyfosfinu napojením na jeden z dusíků DIAD spontánně vytváří silně bazický komplex, který odtrhne následně přidanému trimethylsilylazidu (TMSA) jeho alifatickou část za uvolnění azidového aniontu. Výchozí benzamid je pak aktivován vazbou svého karbonylového kyslíku na fosfoniový kationt, a tím je k dispozici pro nukleofilní atak azidových aniontů. Ve výsledku tak vzniká cílový tetrazol, trifenyfosfinoxid a diisopropyl 1-(trimethylsilyl)hydrazin-1,2-dikarboxylát. Reakce probíhá v bezvodém prostředí a argonové atmosféře a její výhodou je tvorba tetrazolu v jediném reakčním kroku (Schéma 5).^{28, 29}

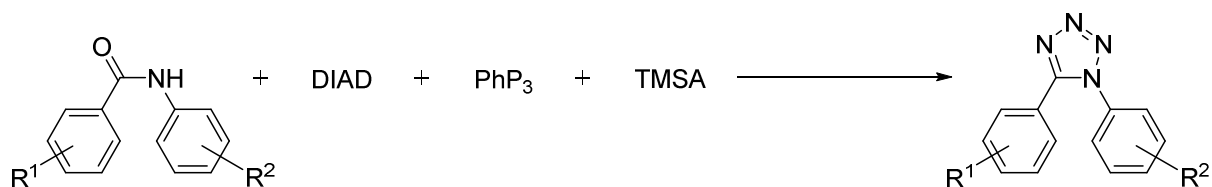


Schéma 5. Syntéza substituovaných 1,5-difenyl-1*H*-tetrazolů Mitsunobuovou reakcí

4. Experimentální část

Použité chemikálie byly zakoupeny u společnosti Sigma-Aldrich a nebyly dále čištěny. Rozpouštědla použitá při reakcích nebo jako součást mobilních fází pocházely od firem Sigma-Aldrich a Lach-Ner Neratovice.

Použité 1-aryl-1*H*-tetrazol-5-thioly byly připraveny a náležitě charakterizovány v rámci jiných diplomových prací provedených na Katedře anorganické a organické chemie.

NMR spektra získaných látek byla měřena na přístrojích Varian pracujících při 300 a 500 MHz pro ^1H a 75 a 125 MHz pro ^{13}C . Chemické posuny byly měřeny jako hodnoty δ v ppm (pars per milion) a byly nepřímo vztaženy k tetramethylsilanu jako standardu.

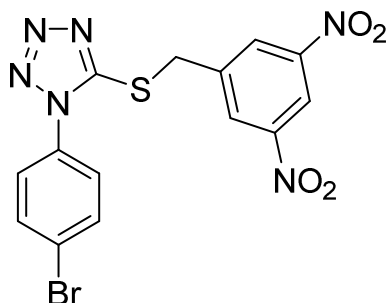
Hmotnostní spektrometrie s APCI ionizací byla měřena použitím přístroje Agilent 500 Ion Trap LC/MS (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA).

Teploty tání byly měřeny pomocí bodotávku Büchi B-545 od společnosti Büchi Switzerland.

Tenkvrstvé chromatografie byly prováděny na deskách od společnosti Merck (Silica gel 60 F254, aluminium back). Při sloupcových chromatografiích byl jako stacionární fáze používán Kieselgel 60 (0,040-0,063 mm) firmy Merck.

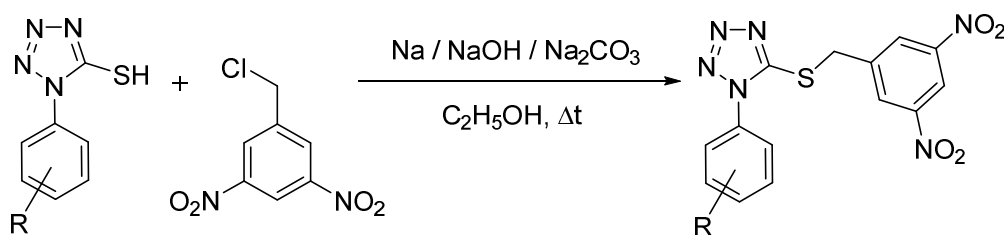
4.1. Série substituovaných 1-aryl-5-[(3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl]-1H-tetrazolů

4.1.1. Příprava 1-(4-bromfenyl)-5-[(3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl]-1H-tetrazolu (1)



1

Obecné schéma:



R = 4-Br; 2,4,6-triMe; 3,4-diCl; 2-MeO; 1-naftyl; 3-MeO

Obecný postup:

V 50 ml baňce se zaobleným dnem jsme rozpustili ve 20 ml absolutního ethanolu 0,330 g (1,28 mmol) 1-(4-bromfenyl)-1H-tetrazol-5-thiolu, poté jsme přidali 0,030 g (1,28 mmol) sodíku. Po vzniku sodné soli výchozího tetrazolthiolu jsme přidali 0,250 g (1,16 mmol) 3,5-dinitrobenzylchloridu a reakční směs jsme zahřívali na 80 °C pod zpětným chladičem po dobu 45 minut. Reakci jsme monitorovali pomocí TLC (tenkovrstvé chromatografie), za použití MP (mobilní fáze) hexan/ethylacetát 4:1. Po vymizení 3,5-dinitrobenzylchloridu z reakční směsi jsme reakci ukončili a rozpouštědlo vakuově odpařili. Produkt reakce jsme rozpustili v 10 ml chloroformu a filtrací se zbavili vyloučeného chloridu sodného. Filtrát jsme poté extrahovali 5% vodným roztokem uhličitanu sodného (3×50 ml), organickou vrstvou vysušili pomocí bezvodého síranu sodného a následná TLC (MP hexan/ethylacetát 4:1) vykazovala jedinou skvrnu. Produkt jsme rekrystalizovali ze směsi chloroform/ether a nechali stát přes noc v lednici. Vyloučené krystaly jsme odsáli.

Teoretický výtěžek: 0,511 g

Praktický výtěžek: 0,382 g [82 %]

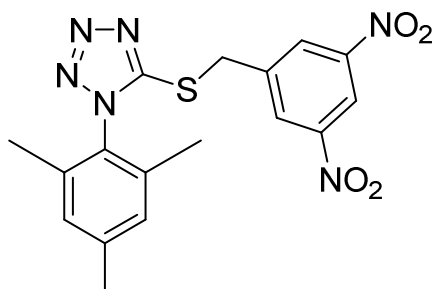
^1H NMR (300 MHz, DMSO): δ 8.82 – 8.75 (m, 2H), 8.74 – 8.69 (m, 1H), 7.84 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.58 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 4.82 (s, 2H)

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO): δ 153.74, 147.03, 141.89, 133.15, 132.30, 129.934, 126.85, 124.08, 117.99, 35.17

Teplota tání: 168,5-170 °C (CHCl_3)

Výše uvedený postup byl použit i při přípravě dalších pěti substituovaných 1-aryl-5-[(3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl]-1*H*-tetrazolů. Případné úpravy a změny od obecného postupu jsou uvedeny u konkrétních látek.

4.1.2. Příprava 5-[(3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl]-1-mesityl-1*H*-tetrazolu (2)



2

Viz *Postup 4.1.1.*, s následujícími změnami:

- přidáním 3,5-dinitrobenzylchloridu došlo ke vzniku intenzivně fialového zbarvení,
- po extrakci uhličitanem sodným zbarvení přešlo do vodné vrstvy, organickou vrstvu jsme přečistili povařením s aktivním uhlím. Následná TLC prokázala již jen jedinou skvrnu.

Teoretický výtěžek: 0,547g (z 0,330 g výchozího tetrazolthiolu)

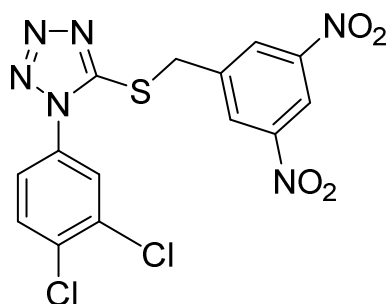
Praktický výtěžek: 0,375 g [69%]

^1H NMR (300 MHz, DMSO): δ 8.80 – 8.77 (m, 2H), 8.75 – 8.71 (m, 1H), 7.13 (s, 2H), 4.86 (s, 2H), 2.32 (s, 3H), 1.75 (s, 6H)

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO): δ 155.04, 148.08, 141.85, 141.66, 135.205, 129.72, 128.12, 118.11, 34.33, 20.89, 16.71

Teplota tání: 188-189 °C (CHCl_3)

4.1.3. Příprava 1-(3,4-dichlorfenyl)-5-[(3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl]-1H-tetrazolu (3)



3

Viz *Postup 4.1.2.*, s tím rozdílem, že rekrystalizace byla provedena ze směsi chloroform/hexan.

Teoretický výtěžek: 0,500 g (z 0,316 g výchozího tetrazolthiolu)

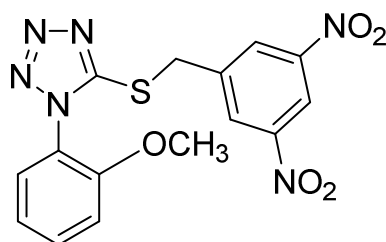
Praktický výtěžek: 0,385 g [77%]

^1H NMR (500 MHz, DMSO): δ 8.79 – 8.74 (m, 2H), 8.74 – 8.70 (m, 1H), 8.04 – 7.97 (m, 1H), 7.91 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 7.70 – 7.60 (m, 1H), 4.79 (s, 2H)

^{13}C NMR (125 MHz, DMSO): δ 153.95, 148.00, 141.89, 133.85, 132.63, 132.49, 132.03, 129.92, 127.05, 125.34, 117.94, 35.35

Teplota tání: 149-151 °C (CHCl_3)

4.1.4. Příprava 5-[(3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl]-1-(2-methoxyfenyl)-1H-tetrazolu (4)



4

Viz *Postup 4.1.3.*

Teoretický výtěžek: 0,454 g (z 0,267 g výchozího tetrazolthiolu)

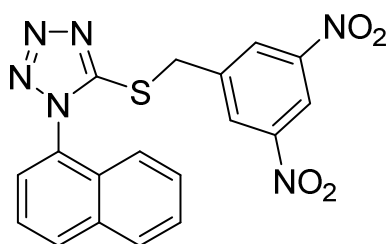
Praktický výtěžek: 0,268 g [59%]

^1H NMR (500 MHz, DMSO): δ 8.81 – 8.68 (m, 3H), 7.68 – 7.59 (m, 1H), 7.51 – 7.41 (m, 1H), 7.37 – 7.29 (m, 1H), 7.18 – 7.09 (m, 1H), 4.77 (s, 2H), 3.76 (s, 3H)

^{13}C NMR (125 MHz, DMSO): δ 155.22, 153.69, 148.06, 142.05, 133.33, 129.75, 128.21, 121.25, 120.98, 118.07, 113.34, 56.28, 34.80

Teplota tání: 183-184 °C (CHCl_3)

4.1.5. Příprava 5-[(3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl]-1-naftyl-1H-tetrazolu (5)



5

Viz *Postup 4.1.1.*, s následujícími úpravami:

- místo sodíku jsme použili 0,051 g (1,28 mmol) hydroxidu sodného, ekvimolárně k výchozímu 1-naftyl-1H-tetrazol-5-thiolu.
- reakci jsme nechali probíhat čtyři hodiny; k fialovému zbarvení nedochází.
- produkt reakce před extrahováním roztokem uhličitanu sodného byl rozpuštěn ve 100 ml chloroformu. Organickou vrstvu jsme pak přečistili aktivním uhlím.
- rekrystalizaci jsme provedli ze směsi chloroform/hexan a nechali stát přes noc v lednici.

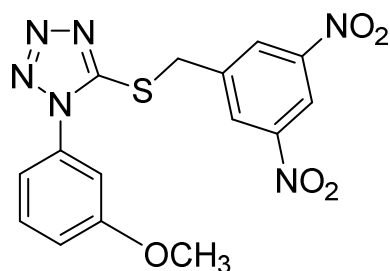
Teoretický výtěžek: 0,477 g (z 0,292 g výchozího tetrazolthiolu)

Praktický výtěžek: 0,215 g [45%]

^1H NMR (500 MHz, DMSO): δ 8.78 – 8.59 (m, 3H), 8.33 – 8.06 (m, 2H), 7.90 – 7.40 (m, 4H), 7.06 – 6.90 (m, 1H), 4.77 (s, 2H)

Teplota tání: 204-205 °C (CHCl_3)

4.1.6. Příprava 1-(3-methoxyfenyl)-5-[(3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl]-1H-tetrazolu (6)



6

Viz *Postup 4.1.1.*, s následujícími úpravami:

- místo sodíku jsme použili 0,183 g (0,64 mmol) dekahydrátu uhličitanu sodného, v polovičním molárním množství vzhledem k výchozímu 1-(3-methoxyfenyl)-1H-tetrazol-5-thiolu.
- reakci jsme nechali probíhat dvě hodiny; pozorovali jsme fialové zabarvení reakční směsi po přidání 3,5-dinitrobenzylchloridu (přečištěno aktivním uhlím).
- rekrystalizaci jsme provedli ze směsi chloroform/hexan a nechali stát přes noc v lednici.

Teoretický výtěžek: 0,454 g (z 0,267 g výchozího tetrazolthiolu)

Praktický výtěžek: 0,320 g [70%]

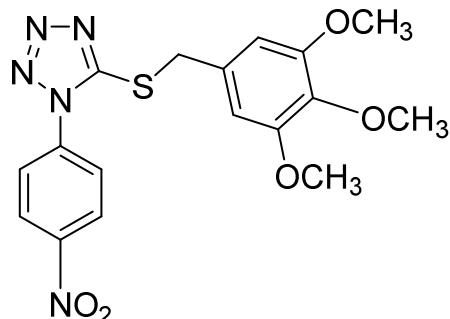
^1H NMR (500 MHz, DMSO): δ 8.97 – 8.55 (m, 3H), 7.52 (s, 1H), 7.37 – 6.94 (m, 3H), 4.81 (s, 2H), 3.80 (s, 3H)

^{13}C NMR (125 MHz, DMSO): δ 160.17, 153.71, 148.03, 141.94, 134.00, 131.06, 129.92, 117.97, 116.67, 116.55, 110.54, 55.89, 35.06

Teplota tání: 153-154 °C (CHCl_3)

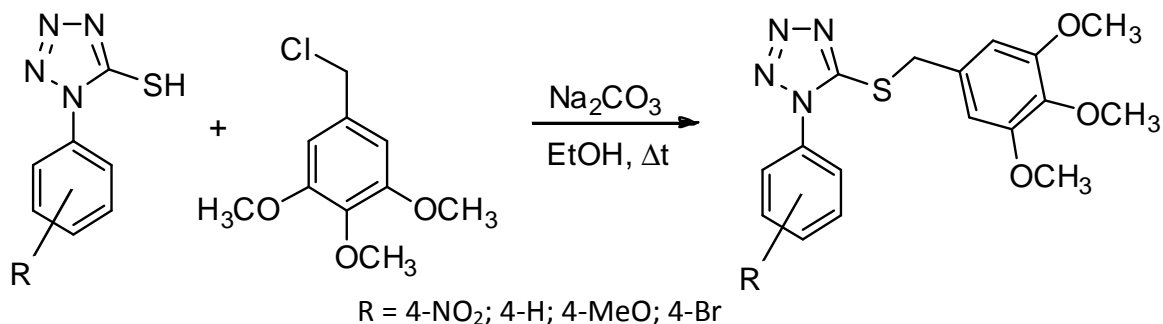
4.2. Série substituovaných 1-fenyl-5-[(3,4,5-trimethoxybenzyl)sulfanyl]-1H-tetrazolů

4.2.1. Příprava 1-(4-nitrofenyl)-5-[(3,4,5-trimethoxybenzyl)sulfanyl]-1H-tetrazolu (7)



7

Obecné schéma:



Obecný postup:

V 50 ml baňce se zaobleným dnem jsme rozpustili ve 20 ml etanolu 0,100 g (0,45 mmol) 1-(4-nitrofenyl)-1H-tetrazol-5-thiolu a poté jsme přidali 0,064 g (0,24 mmol) dekahydrátu uhličitanu sodného. Po vzniku sodné soli výchozího tetrazolthiolu jsme přidali 0,088 g (0,41 mmol) 3,4,5-trimethoxybenzylchloridu a reakční směs jsme zahřívali pod zpětným chladičem po dobu 2 hodin při 50 °C. Došlo k okamžitému intenzivně fialovému zbarvení. Průběh reakce jsme monitorovali pomocí TLC (MP hexan/ethylacetát 4:1). Po jejím skončení jsme vakuově odpařili rozpouštědlo, produkt reakce rozpustili v 10 ml ethylacetátu a extrahovali 5% vodným roztokem uhličitanu sodného (3×50 ml). Organickou vrstvou jsme vysušili pomocí Na₂SO₄ a přečistili ji aktivním uhlím. Provedli jsme rekrystalizaci ze směsi etanol/voda, nechali stát přes noc v lednici a vyloučené krystaly poté odsáli.

Teoretický výtěžek: 0,164 g

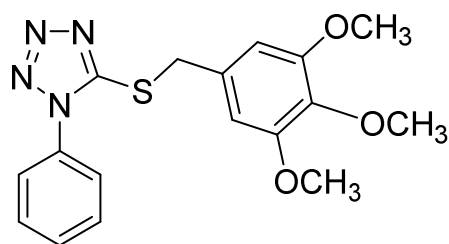
Praktický výtěžek: 0,109 g [66 %]

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 8.41 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.82 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 6.64 (s, 2H), 4.62 (s, 2H), 3.83 (s, 6H), 3.82 (s, 3H)

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ 154.07, 153.45, 147.96, 138.33, 138.90, 130.19, 125.26, 124.06, 106.31, 60.83, 56.17, 38.64

Uvedený postup byl použit i při přípravě dalších tří substituovaných 1-fenyl-5-[(3,4,5-trimethoxybenzyl)sulfanyl]-1*H*-tetrazolů. Případné úpravy a změny od obecného postupu jsou uvedeny u konkrétních látek.

4.2.2. Příprava 1-fenyl-5-[(3,4,5-trimethoxybenzyl)sulfanyl]-1*H*-tetrazolu (8)



8

Viz *Postup 4.2.1.*, nedošlo však k fialovému zabarvení reakce. Reakční doba činila pouze 1 hodinu a produkt nebylo nutné dále přečišťovat aktivním uhlím.

Teoretický výtěžek: 0,183 g (z 0,100 g výchozího tetrazolthiolu)

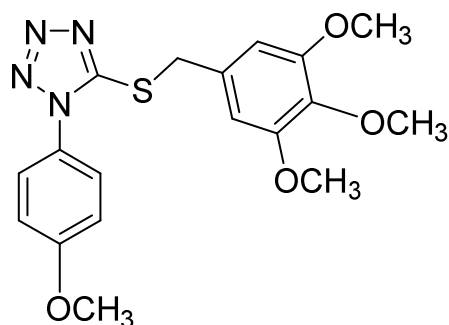
Praktický výtěžek: 0,140 g [77 %]

^1H NMR (500 MHz, DMSO): δ 7.65 – 7.59 (m, 3H), 7.59 – 7.54 (m, 2H), 6.72 (s, 2H), 4.52 (s, 2H), 3.70 (s, 6H), 3.62 (s, 3H)

^{13}C NMR (125 MHz, DMSO): δ 154.04, 153.00, 137.27, 133.21, 131.59, 130.78, 130.11, 124.69, 106.65, 60.15, 56.01, 37.56

Teplota tání: 103-104 °C (EtOH)

4.2.3. Příprava 1-(4-methoxyfenyl)-5-[(3,4,5-trimethoxybenzyl)sulfanyl]-1H-tetrazolu (9)



9

Viz *Postup 4.2.1.*, nedošlo však k fialovému zabarvení reakce; reakční doba činila 45 minut. Vznikl olejovitý produkt, krystaly se nevytvořily ani po dvou letech stání.

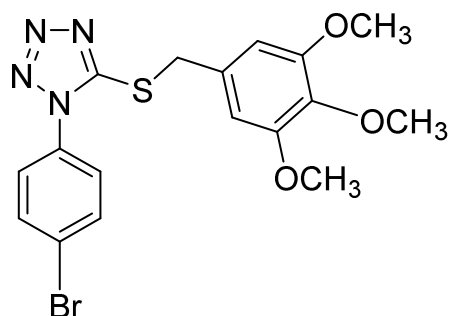
Teoretický výtěžek: 0,169 g (z 0,100 g výchozího tetrazolthiolu)

Praktický výtěžek: 0,121 g [72 %]

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7.39 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.01 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 6.62 (s, 2H), 4.53 (s, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.83 (s, 6H), 3.82 (s, 3H)

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 160,75, 153.35, 137.83, 131.46, 130.88, 126.22, 125.52, 114.79, 106.19, 60.81, 56.12, 55.634, 38.15

4.2.4. Příprava 1-(4-bromfenyl)-5-[(3,4,5-trimethoxybenzyl)sulfanyl]-1H-tetrazolu (10)



10

Viz *Postup 4.2.1.*, nedošlo však k fialovému zabarvení reakce; reakční doba činila 45 minut. Nebylo nutné látku přečišťovat aktivním uhlím.

Teoretický výtěžek: 0,154 g (z 0,100 g výchozího tetrazolthiolu)

Praktický výtěžek: 0,111 g [72 %]

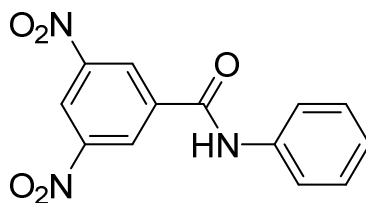
^1H NMR (300 MHz, CD_3OD): δ 7.72 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H), 7.40 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H), 6.63 (s, 2H), 4.47 (s, 2H), 3.75 (s, 6H), 3.71 (s, 3H)

^{13}C NMR (75 MHz, CD_3OD): δ 155.34, 154.56, 138.86, 134.05, 133.98, 133.16, 127.26, 125.36, 107.46, 61.07, 56.56, 39.39

Teplota tání: 106,5-107,5 °C (EtOH)

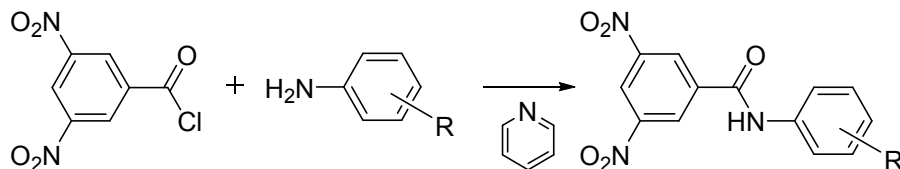
4.3. Série substituovaných 3,5-dinitro-*N*-fenylbenzamidů

4.3.1. Příprava 3,5-dinitro-*N*-fenylbenzamidů (11)



11

Obecné schéma:



R = H; 4 NO₂; 4-Br; 3,4-diCl; 4-MeO; 3-NO₂; 4-Cl

Obecný postup:

Do 100 ml varné baňky jsme navázili 0,202 g (2,17 mmol) anilinu a rozpustili jsme jej ve 20 ml pyridinu. Poté jsme přidali 0,500 g (2,17 mmol) 3,5-dinitrobenzoylchloridu a nechali reagovat za laboratorní teploty po dobu jedné hodiny. Reakci jsme ukončili nalitím směsi do 80 ml 2,5 % roztoku kyseliny chlorovodíkové. Vysrážený produkt jsme odsáli a přímo na Büchnerově nálevce promyli destilovanou vodou (3×50 ml), 5 % roztokem uhličitanu sodného (3×50 ml) a na závěr opět destilovanou vodou (3×50 ml). Vlhkou hmotu jsme vysušili ve vakuové sušárně.

Část produktu (0,100 g) byla pro účely analýzy a antimykobakteriálního testování rekrystalizována ze směsi ethanol/voda, ponechána přes noc v lednici a následně odsáta.

Teoretický výtěžek: 0,623 g

Praktický výtěžek: 0,346 g [55 %]

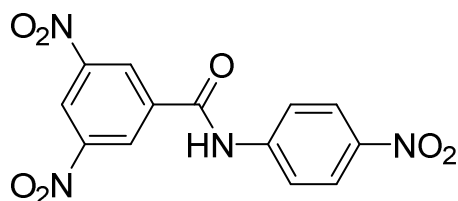
^1H NMR (300 MHz, DMSO): δ 10.82 (s, 1H), 9.16 (d, $J = 2.1$ Hz, 2H), 9.00 – 8.96 (m, 1H), 7.80 – 7.74 (m, 2H), 7.44 – 7.35 (m, 2H), 7.20 – 7.12 (m, 1H)

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO): δ 161.42, 148.29, 138.47, 137.60, 128.97, 128.21, 124.73, 121.28, 120.90

Teplota tání: 236-237 °C (EtOH)

Následujících šest benzamidů bylo připraveno stejným způsobem, případné změny jsou uvedeny u konkrétního zástupce.

4.3.2. Příprava 3,5-dinitro-*N*-(4-nitrofenyl)benzamidů (12)



12

Viz *Postup 4.3.1.*; pro reakci použito jen 15 ml pyridinu.

Teoretický výtěžek: 0,721 g (z 0,300 g výchozího anilinu)

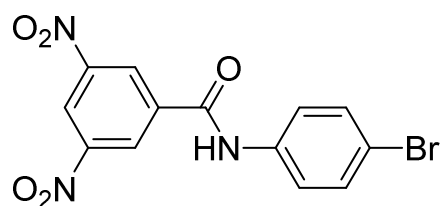
Praktický výtěžek: 0,297 g [41 %]

^1H NMR (300 MHz, DMSO): δ 11.31 (s, 1H), 9.17 (d, $J = 2.1$, 2H), 9.08 – 8.98 (m, 1H), 8.31 (d, $J = 9.3$ Hz, 2H), 8.06 (d, $J = 9.3$ Hz, 2H)

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO): δ 162.35, 148.32, 144.71, 143.30, 137.00, 128.48, 125.06, 121.76, 120.61

Teplota tání: 279-280 °C (EtOH)

4.3.3. Příprava *N*-(4-bromfenyl)-3,5-dinitrobenzamidů (13)



13

Viz *Postup 4.3.2.*

Teoretický výtěžek: 0,794 g (z 0,369 g výchozí látky)

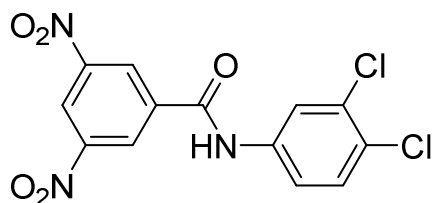
Praktický výtěžek: 0,462 g [58 %]

^1H NMR (500 MHz, DMSO): δ 9.19 – 9.11 (m, 2H), 9.00 – 8.95 (m, 1H), 7.75 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.56 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H)

^{13}C NMR (125 MHz, DMSO): δ 161.61, 148.27, 138.43, 137.75, 131.76, 128.24, 122.92, 121.26, 116.31

Teplota tání: 250-251 °C (EtOH)

4.3.4. Příprava *N*-(3,4-dichlorfenyl)-3,5-dinitrobenzamidů (14)



14

Viz *Postup 4.3.2.*, s následujícími rozdíly:

- pro účely testování a analýzy byl surový produkt po vysušení přečištěn kolonovou chromatografií (CC), za použití SP (stacionární fáze) silikagelu a MP hexan/ethylacetát 4:1.
- takto získanou látku jsme rekrystalizovali ze směsi aceton/voda.

Teoretický výtěžek: 0,773 g (z 0,352 g výchozího anilinu)

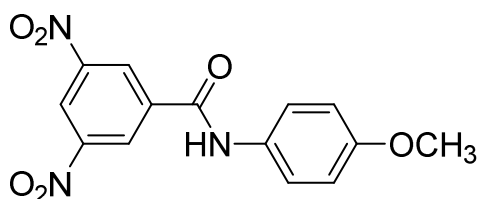
Praktický výtěžek: 0,420 g [54 %]

^1H NMR (300 MHz, DMSO): δ 11.02 (s, 1H), 9.14 (d, $J = 2.1$ Hz, 2H), 9.02 – 8.98 (m, 1H), 8.11 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 7.75 (dd, $J = 8.8, 2.4$ Hz, 1H), 7.65 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H)

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO): δ 161.76, 148.32, 138.60, 136.98, 131.20, 130.94, 128.24, 126.29, 122.04, 121.58, 120.76

Teplota tání: 259-260 °C (aceton)

4.3.5. Příprava 3,5-dinitro-*N*-(4-methoxyfenyl)benzamidů (15)



15

Viz *Postup 4.3.1.*, reakce však probíhala v 25 ml srdčité baňce a pouze v 5 ml pyridinu.

Teoretický výtěžek: 0,668 g (z 0,267 g výchozího anilinu)

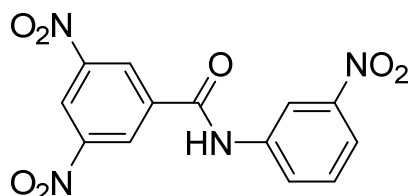
Praktický výtěžek: 0,493 g [72%]

^1H NMR (500 MHz, DMSO): δ 10.71 (s, 1H), 9.16 – 9.13 (m, 2H), 8.98 – 8.95 (m, 1H), 7.67 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 6.95 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 3.75 (s, 3H)

^{13}C NMR (125 MHz, DMSO): δ 160.89, 156.30, 148.28, 137.67, 131.43, 128.04, 122.44, 121.09, 114.05, 55.38

Teplota tání: 238-239 °C (EtOH)

4.3.6. Příprava 3,5-dinitro-*N*-(3-nitrofenyl)benzamidů (16)



16

Viz *Postup 4.3.5.*; s tím rozdílem, že pro reakci jsme použili 4 ml pyridinu a reakční směs jsme nalili do 200 ml 5 % roztoku kyseliny chlorovodíkové.

Teoretický výtěžek: 1,080 g (z 0,539 g výchozího anilinu)

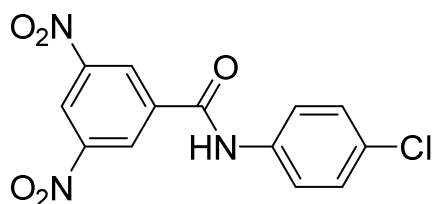
Praktický výtěžek: 0,936 g [87 %]

^1H NMR (300 MHz, DMSO): δ 11.21 (s, 1H), 9.18 (d, $J = 2.1$ Hz, 2H), 9.04 – 8.99 (m, 1H), 8.76 – 8.71 (m, 1H), 8.25 – 8.18 (m, 1H), 8.05 – 7.99 (m, 1H), 7.74 – 7.66 (m, 1H)

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO): δ 162.00, 148.37, 148.07, 139.67, 136.92, 130.51, 128.300, 126.70, 121.68, 119.17, 114.99

Teplota tání: 209-210 °C (EtOH)

4.3.7. Příprava *N*-(4-chlorfenyl)-3,5-dinitrobenzamidů (17)



17

Viz *Postup 4.3.5.* s tím rozdílem, že reakce probíhala v 50 ml varné baňce s 6,5 ml pyridinu.

Teoretický výtěžek: 2,413 g (z 1,148 g výchozího anilinu)

Praktický výtěžek: 2,210 g [92%]

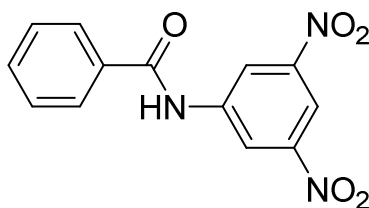
^1H NMR (300 MHz, DMSO): δ 10.94 (s, 1H), 9.15 (d, $J = 2.1$ Hz, 2H), 9.01 – 8.98 (m, 1H), 7.81 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.46 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H)

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO): δ 161.56, 148.30, 137.43, 137.34, 128.91, 128.40, 128.22, 122.43, 121.40

Teplota tání: 236-237 °C (EtOH)

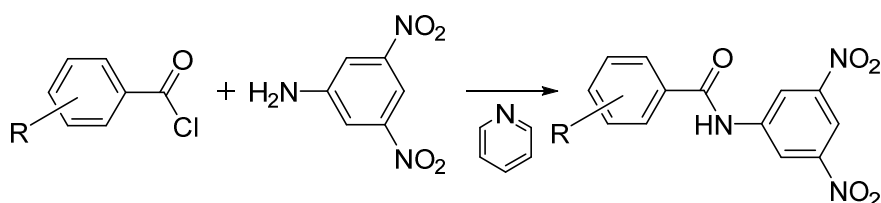
4.4. Série substituovaných *N*-(3,5-dinitrofenyl)benzamidů

4.4.1. Příprava *N*-(3,5-dinitrofenyl)benzamidů (18)



18

Obecné schéma:



R= 4-H; 4-NO₂

Obecný postup:

Do 25 ml srdčité baňky jsme navážili 1,000 g (5,46 mmol) 3,5-dinitroanilinu a rozpustili jsme jej v 5 ml pyridinu. Poté jsme přidali 0,76 ml (6,55 mmol) benzoylchloridu a směs nechali reagovat za laboratorní teploty po dobu 45 minut. Reakci jsme ukončili nalitím směsi do 200 ml 5 % roztoku kyseliny chlorovodíkové. Vysrážený produkt jsme odsáli a přímo na Büchnerově nálevce promyli destilovanou vodou (3×50 ml), dále 5 % roztokem uhličitanu sodného (3×50 ml) a na závěr opět destilovanou vodou (3×50 ml). Vlhkou hmotu jsme vysušili ve vakuové sušárně.

Část produktu (0,100 g) byla pro účely analýzy a antimykobakteriálního testování čištěna rekrystalizací ze směsi voda/ethanol, ponechána přes noc v lednici a následně odsáta.

Teoretický výtěžek: 1,568 g

Praktický výtěžek: 1,534 g [92 %]

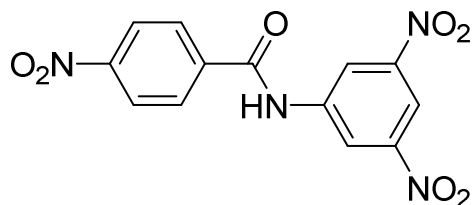
¹H NMR (300 MHz, DMSO): δ 11.04 (s, 1H), 9.11 (d, *J* = 2.1 Hz, 2H), 8.54 – 8.51 (m, 1H), 8.04 – 7.98 (m, 2H), 7.69 – 7.54 (m, 3H)

¹³C NMR (75 MHz, DMSO): δ 166.48, 148.31, 141.52, 133.63, 132.72, 128.83, 128.03, 119.58, 112.81.

Teplota tání: 255-256 °C (EtOH)

Stejným způsobem byl připraven i druhý příslušný benzamid, s uvedením případných změn v postupu.

4.4.2. Příprava *N*-(3,5-dinitrofenyl)-4-nitrobenzamidů (19)



19

Viz *Postup 4.4.1*, ovšem se 6 ml pyridinu. Rekrytalizace části produktu byla provedena ze směsi aceton/voda.

Teoretický výtěžek: 0,907 g (z 0,500 g výchozího anilinu)

Praktický výtěžek: 0,882 g [97 %]

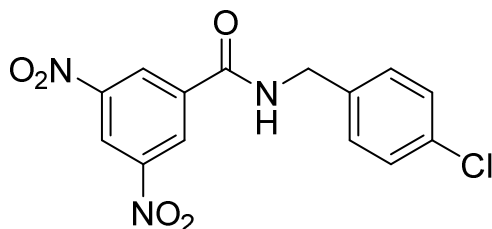
^1H NMR (300 MHz, DMSO): δ 11.33 (s, 1H), 9.09 (d, $J = 2.1$ Hz, 2H), 8.59 – 8.56 (m, 1H), 8.42 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 8.24 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H)

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO): δ 164.90, 149.87, 148.36, 141.029, 139.23, 129.63, 124.00, 419.86, 113.39

Teplota tání: 215-216 °C (aceton)

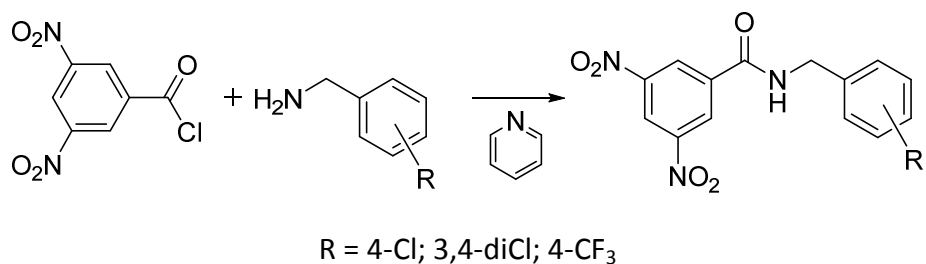
4.5. Série substituovaných *N*-benzyl-3,5-dinitrobenzamidů

4.5.1. Příprava *N*-(4-chlorbenzyl)-3,5-dinitrobenzamidů (20)



20

Obecné schéma:



Obecný postup:

Do 25 ml srdčité baňky jsme navážili 0,675 g (4,77 mmol) 4-chlorbenzylaminu a rozpustili jsme jej v 3 ml pyridinu. Poté jsme přidali 1,000 g (4,34 mmol) 3,5-dinitrobenzoylchloridu a směs nechali reagovat za laboratorní teploty po dobu jedné hodiny. Reakci jsme ukončili nalitím směsi do 200 ml 1M roztoku kyseliny chlorovodíkové. Vysrážený produkt jsme odsáli a přímo na Büchnerově nálevce promyli destilovanou vodou (3×50 ml), 5 % roztokem uhličitanu sodného (3×50 ml) a na závěr opět destilovanou vodou (3×50 ml). Vlhkou hmotu jsme vysušili ve vakuové sušárně.

Část produktu (0,100 g) byla pro účely analýzy a antimykobakteriálního testování čištěna rekrystalizací ze směsi voda/ethanol, ponechána přes noc v lednici a následně odsáta.

Teoretický výtěžek: 1,544 g

Praktický výtěžek: 1,424 g [92 %]

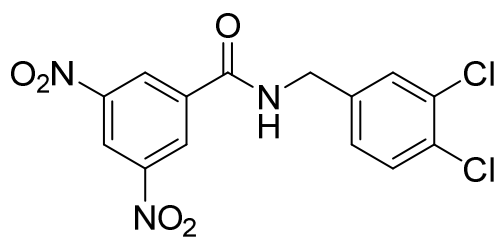
¹H NMR (300 MHz, DMSO): δ 9.75 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 9.08 (d, *J* = 2.1 Hz, 2H), 8.97 – 8.94 (m, 1H), 7.42 – 7.34 (m, 4H), 4.53 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H)

¹³C NMR (75 MHz, DMSO): δ 162.38, 148.42, 137.98, 136.85, 131.84, 129.63, 128.53, 127.80, 121.14, 42,71

Teplota tání: 199-200 °C (EtOH)

Takto byly připraveny i následující dva benzamidy, s uvedením případných změn v postupu.

4.5.2. Příprava *N*-(3,4-dichlorbenzyl)-3,5-dinitrobenzamidů (21)



21

Viz Postup 4.5.1.

Teoretický výtěžek: 1,606 g (z 0,840 g výchozího benzylaminu)

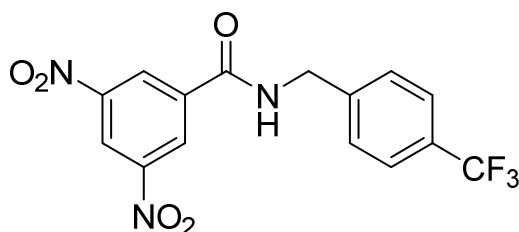
Praktický výtěžek: 1,485 g [92 %]

^1H NMR (300 MHz, DMSO): δ 9.76 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 9.08 (d, $J = 2.1$ Hz, 2H), 8.98 – 8.94 (m, 1H), 7.65 – 7.55 (m, 2H), 7.35 (dd, $J = 8.3, 2.0$ Hz, 1H), 4.54 (d, $J = 5.7$ Hz, 2H)

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO): δ 162.47, 148.39, 140.16, 136.68, 131.14, 130.76, 129.80, 129.75, 128.12, 127.83, 121.17, 42.33

Teplota tání: 232-233 °C (EtOH)

4.5.3. Příprava 3,5-dinitro-*N*-[4-(trifluormethyl)benzyl]benzamidů (22)



22

Viz Postup 4.5.1.

Teoretický výtěžek: 1,603 g (z 0,835 g výchozího benzylaminu)

Praktický výtěžek: 1,451 g [91 %]

^1H NMR (500 MHz, DMSO): δ 9.82 (t, $J = 5.7$ Hz, 1H), 9.09 (d, $J = 1.9$ Hz, 2H), 8.98 – 8.95 (m, 1H), 7.70 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.58 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 4.63 (d, $J = 5.7$ Hz, 2H)

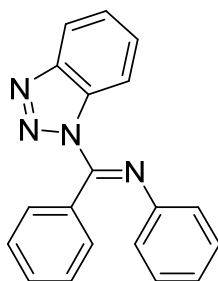
^{13}C NMR (125 MHz, DMSO): δ 162.48, 148.39, 143.75 (q, $J = 1.2$ Hz), 136.74, 128.35, 127.76, 125.42 (q, $J = 3.8$ Hz), 124.46 (q, $J = 272.0$ Hz), 121.15, 42.98

Teplota tání: 210-211 °C (EtOH)

4.6. Příprava substituovaných 1,5-difenyl-1*H*-tetrazolů mezifázovou katalýzou z imidoylbenzotriazolů výchozích benzamidů

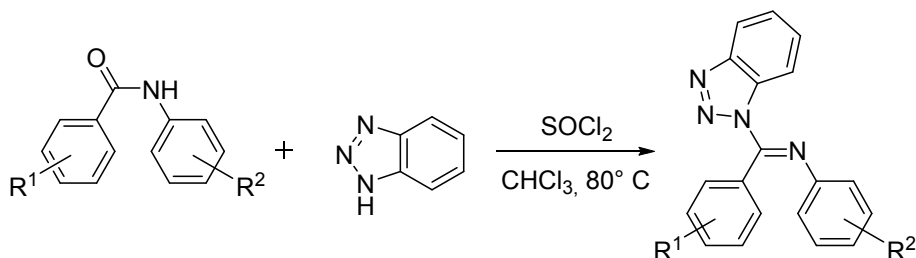
4.6.1. Příprava 1,5-difenyl-1*H*-tetrazolu (23)

4.6.1.1. Příprava 1-(1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazol-1-yl)-*N*,1-difenylmethaniminu (I)



I

Obecné schéma:



$\text{R}^1 = 4\text{-H}; 3,5\text{-elektronakceptorová substituce}$

$\text{R}^2 = 4\text{-H}; 4\text{-Br}; 4\text{-NO}_2; 3\text{-NO}_2; 3,5\text{-elektronakceptorová substituce}$

Obecný postup:

V 50 ml varné baňce jsme rozpustili 2,440 g (20,5 mmol) 1*H*-benzo[*d*][1,2,3]triazolu v 10 ml chloroformu a následně přidali 0,77 ml (10,5 mmol) thionylchloridu. Po rozpuštění obou látek jsme přidali (5,0 mmol) 0,990 g benzanilidu a směs zahřívali pod zpětným chladičem při teplotě lázně 80 °C. Reakci jsme průběžně monitorovali pomocí TLC (MP hexan/ethylacetát 4:1) a po 4 hodinách, kdy již k žádné změně v soustavě nedocházelo, ji ukončili. Reakční směs jsme poté zfiltrovali a předpokládaný produkt jsme

z chloroformového filtrátu izolovali pomocí sloupcové chromatografie (SP silikagel, MP hexan/ethylacetát 7:1).

Teoretický výtěžek: 1,490 g

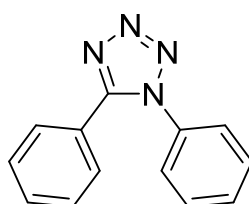
Praktický výtěžek: 0,290 g [19 %]

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 8.53 – 8.46 (m, 1H), 8.20 – 8.13 (m, 1H), 7.64 (ddd, $J = 8.3, 7.0, 1.1$ Hz, 1H), 7.52 (ddd, $J = 8.2, 7.1, 1.1$ Hz, 1H), 7.46 – 7.34 (m, 5H), 7.22 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H), 7.09 – 7.00 (m, 1H), 6.89 – 6.82 (m, 2H)

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 153.77, 146.93, 146.42, 132.02, 130.34, 130.27, 130.15, 129.26, 128.82, 128.19, 125.55, 124.18, 121.45, 119.98, 115.33

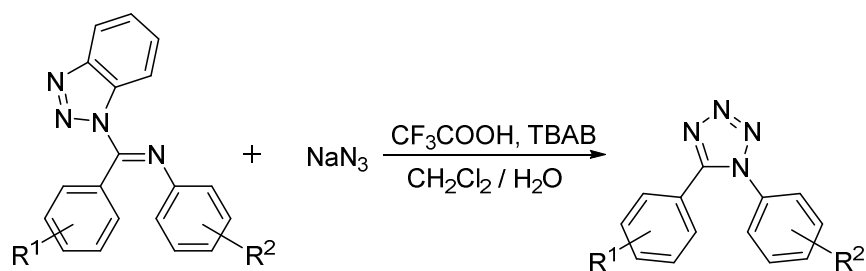
Analogicky jsme postupovali při přípravě ostatních příslušných látek. Případné změny v postupu jsou zmíněny u konkrétní sloučeniny.

4.6.1.2. Příprava 1,5-difenyl-1H-tetrazolu (**23**)



23

Obecné schéma:



$\text{R}^1 = 4\text{-H}; 3,5\text{-elektronakceptorová substituce}$

$\text{R}^2 = 4\text{-H}; 4\text{-Br}; 4\text{-NO}_2; 3\text{-NO}_2; 3,5\text{-elektronakceptorová substituce}$

Obecný postup:

Do 10 ml varné baňky s plochým jsme nalili 10 ml dichlormethanu a 10 ml vody, a do této heterogenní soustavy jsme přidali v následujícím pořadí: 0,104 g (0,35 mmol) výchozí látky (**I**), 0,046 g (0,70 mmol) azidu sodného a 0,022 g (0,07 mmol) TBAB. Po rozpuštění všech složek jsme na závěr přidali 0,041 g (0,35 mmol) trifluoroctové kyseliny a za stálého míchání při laboratorní teplotě nechali směs hodinu reagovat. Na základě sledování průběhu reakce pomocí TLC (MP hexan/ethylacetát 4:1) jsme pozorovali výrazný úbytek výchozí látky (**I**) a reakci poté ukončili. Organickou vrstvou jsme oddělili, protřepali s destilovanou vodou (3×20 ml) a následně ji vysušili bezvodým síranem sodným. Zbylé rozpouštědlo jsme odpařili.

Teoretický výtěžek: 0,077 g

Praktický výtěžek: 0,068 g [88%]

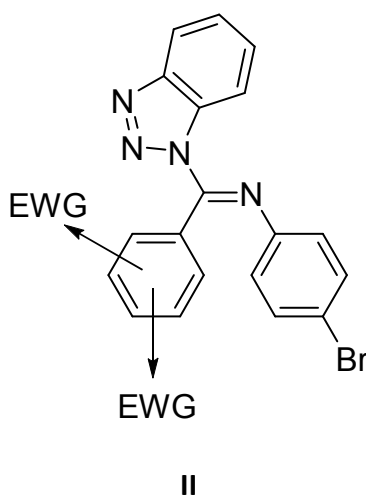
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7.59 – 7.45 (m, 6H), 7.43 – 7.35 (m, 4H)

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 153.56, 134.50, 131.24, 130.37, 129.86, 128.94, 128.87, 125.23, 123.51

Analogicky jsme postupovali při přípravě ostatních tetrazolů. Případné změny v postupu jsou zmíněny u konkrétní sloučeniny.

4.6.2. Příprava 1-(4-bromfenyl)-5-(disubst. fenyl)-1H-tetrazolu (**24**)

4.6.2.1. Příprava 1-(1H-benzo[d]1,2,3][triazol-1-yl)-N-(4-bromfenyl)-1-(disubst. fenyl)methaniminu (**II**)



Viz Postup 4.6.1.1., s těmito rozdíly:

- reakce provedena v 25 ml varné baňce.

- po třech hodinách reakce a kontroly průběhu TLC (MP hexan/ethylacetát 4:1) přidáno ještě 0,335 g (2,28 mmol) benzotriazolu a 0,21 ml (2,88 mmol) thionylchloridu. Celkový reakční čas pak činil 11 hodin.
- reakční směs po filtraci přečišťována sloupcovou chromatografií (SP silikagel, MP hexan/ethylacetát 7:1) celkem dvakrát.
- struktura produktu byla potvrzena NMR spektrem i MS, jsou však přítomny nečistoty, patrně olejovitého charakteru.

Teoretický výtěžek: 0,640 g (z 0,500 g výchozího benzamidu)

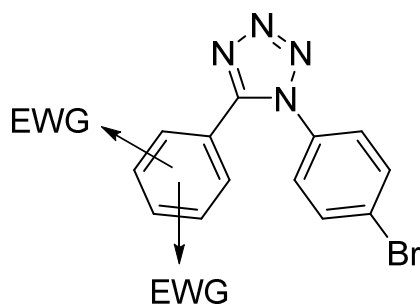
Praktický výtěžek: 0,137 g [21%]

^1H NMR (300 MHz CDCl_3): δ 9.14 – 9.09 (m, 1H), 8.60 – 8.50 (m, 3H), 8.23 – 8.16 (m, 1H), 7.79 – 7.71 (m, 1H), 7.65 – 7.57 (m, 1H), 7.40 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 6.74 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H)

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 149.39, 148.32, 146.57, 144.32, 133.37, 132.68, 131.34, 130.44, 129.92, 126.65, 122.70, 120.48, 120.36, 118.73, 115.20

LRMS m/z (APCI): 441,2 (100 %; $\text{M}+\text{H}^+$), 439,3 (95 %; $\text{M}+\text{H}^+$)

4.6.2.2. Příprava 1-(4-bromfenyl)-5-(disubst. fenyl)-1H-tetrazolu (**24**)



24

Viz Postup 4.6.1.2, s následujícími změnami:

- na základě monitorování reakce pomocí TLC (MP hexan/ethylacetát 4:1) jsme k reakční směsi postupně ještě 4× přidali: jeden molární ekvivalent NaN_3 , TBAB a trifluoroctové kyseliny (reakci jsme vždy poté za hodinu zkontrolovali), dokud veškerá výchozí látka (**II**) nezreagovala.
- produkt byl na závěr přečištěn sloupcovou chromatografií (SP silikagel, MP hexan/ethylacetát 4:1).
- strukturu produktu NMR potvrdila, jsou však stále patrné nečistoty olejovitého charakteru, které ani další přečištění nedokázalo plně odstranit, aby bylo látku možno otestovat na antimykobakteriální aktivitu.

Teoretický výtěžek: 0,095 g (z 0,113 g výchozí látky (**II**))

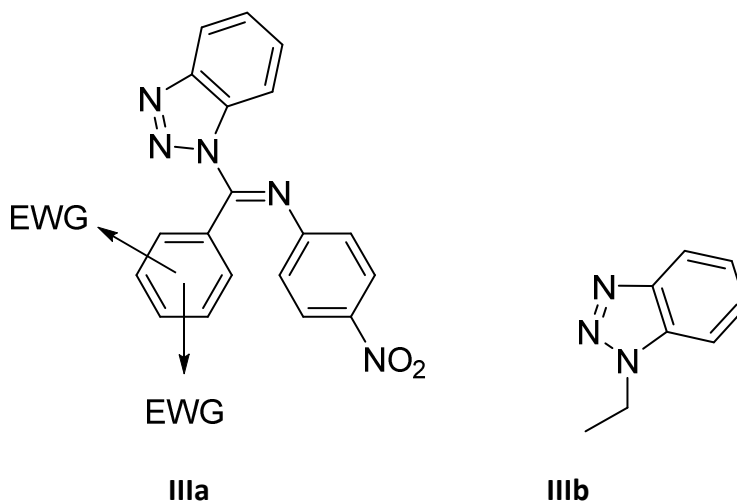
Praktický výtěžek: 0,044 g [46 %]

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 9.21 – 9.15 (m, 1H), 8.82 – 8.76 (m, 2H), 7.79 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.34 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H)

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 150.25, 148.95, 134.05, 132.16, 128.50, 126.99, 126.73, 126.27, 121.08

4.6.3. Příprava 5-(disubst. fenyl)-1-(4-nitrofenyl)-1H-tetrazolu (**25**)

4.6.3.1. Příprava 1-(1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-yl)-1-(disubst. fenyl)-N-(4-nitrofenyl)methaniminu (**IIIa**)



Viz Postup 4.6.2.1., s těmito rozdíly:

- k reakci jsme po 4 hodinách znovu přidali původní navážku benzotriazolu a thionylchloridu, čas reakce dohromady činil 8 hodin.
- reakční směs po filtraci přečišťována sloupcovou chromatografií (SP silikagel, MP chloroform).
- na základě analýzy NMR spektra jsme zjistili, že získaná látka nebyl požadovaný produkt (**IIIa**). Zřejmě jde o 1-ethyl-1H-benzo[d][1,2,3]triazol (**IIIb**).

Teoretický výtěžek: 0,594 g (z 0,455 g výchozího benzamidu)

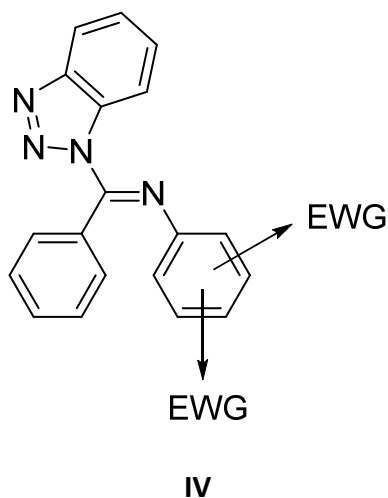
Praktický výtěžek: produkt nebyl izolován; vedlejšího produktu získáno 0,041 g [7%]

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 8.10 – 8.00 (m, 1H), 7.58 – 7.41 (m, 2H), 7.34 (dd, $J = 8.3$, 6.4 Hz, 1H), 4.67 (q, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.61 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H)

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 145.91, 132.50, 127.06, 123.75, 119.87, 109.22, 43.18, 14.90

4.6.4. Příprava 1-(disubst. fenyl)-5-fenyl-1H-tetrazolu (26)

4.6.4.1. Příprava 1-(1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-yl)-N-(disubst. fenyl)-1-fenylmethaniminu (IV)



Viz Postup 4.6.1.1., s těmito rozdíly:

- reakce provedena v 50 ml varné baňce.
- na základě TLC (MP hexan/ethylacetát 4:1) jsme přidali po 4 hodinách reakce 0,5 molárního ekvivalentu benzotriazolu a thionylchloridu; totéž jsme provedli po 4 hodinách znovu.
- po celkem 10 hodinách reakce jsme přidali 0,25 molárního ekvivalentu benzotriazolu a 0,5 molárního ekvivalentu thionylchloridu. Po 5 hodinách jsme to samé ještě jednou zopakovali. Monitorování reakční směsi již další změny neukázalo a tak jsme reakci ukončili (celkem po 20 hodinách).
- reakční směs po filtraci jsme přečistili sloupcovou chromatografií (SP silikagel, MP hexan, ethylacetát 7:1).
- struktura produktu na základě NMR potvrzena, jsou však opět přítomny nečistoty alifatického charakteru.

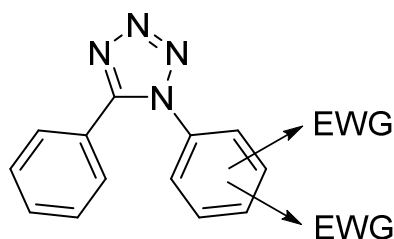
Teoretický výtěžek: 0,813 g (z 0,600 g výchozího benzamidu)

Praktický výtěžek: 0,074 g [9%]

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 8.73 – 8.67 (m, 1H), 8.44 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 8.21 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 8.04 – 7.97 (m, 2H), 7.77 – 7.67 (m, 1H), 7.65 – 7.33 (m, 6H)

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ 157.65, 149.79, 148.72, 146.63, 131.55, 130.13, 129.87, 128.97, 128.60, 126.39, 122.04, 120.55, 115.16, 113.92

4.6.4.2. Příprava 1-(disubst. fenyl)-5-fenyl-1*H*-tetrazolu (**26**)



26

Viz *Postup 4.6.2.2*, s následujícími změnami:

- k reakční směsi jsme na základě TLC (MP hexan/ethylacetát 4:1) přidali celkem 3× jeden molární ekvivalent: NaN₃, TBAB a TFA (vždy v odstupu jedné hodiny) a na závěr ještě dva molární ekvivalenty zmíněných reaktantů; poté výchozí látka (**IV**) vymizela.
- struktura produktu potvrzena, nebyl však získán v dostatečném množství a čistotě pro antimykobakteriální testování.

Teoretický výtěžek: 0,049 g (z 0,061 g výchozí látky (**IV**))

Praktický výtěžek: 0,046 g [94 %]

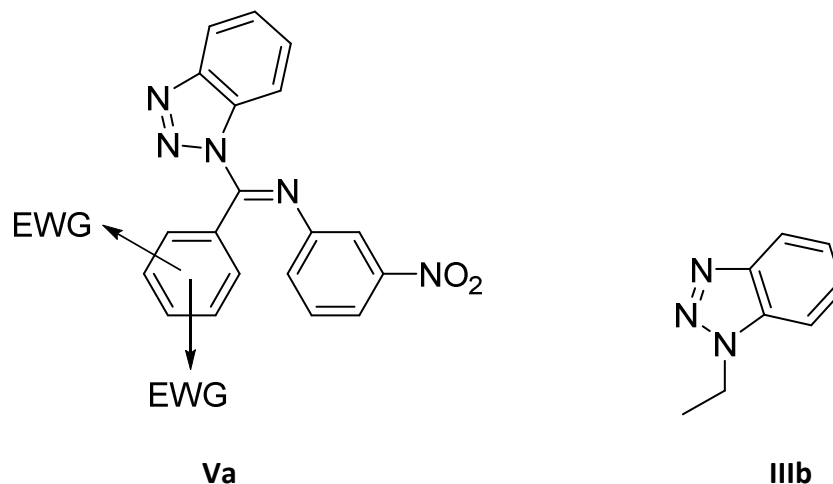
¹H NMR (500 MHz, CD₃COCD₃): δ 9.17 – 9.14 (m, 1H), 8.95 (d, *J* = 2.0 Hz, 2H), 7.71 – 7.68 (m, 2H), 7.62 – 7.58 (m, 1H), 7.53 – 7.48 (m, 2H)

¹³C NMR (125 MHz, CD₃COCD₃): δ 155.18, 149.95, 137.30, 132.41, 130.09, 129.98, 127.23, 124.09, 120.83

Teplota tání: 187-190 °C (CHCl₃)

4.6.5. Příprava 5-(disubst. fenyl)-1-(3-nitrofenyl)-1H-tetrazolu (27)

4.6.5.1. Příprava 1-(1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-yl)-1-(disubst. fenyl)-N-(3-nitrofenyl)methaniminu (**Va**)



Viz Postup 4.6.4.1., s těmito rozdíly:

- na základě TLC (MP hexan/ethylacetát 4:1) jsme přidali po 2,5 hodinách reagování jeden molární ekvivalent benzotriazolu a thionylchlorodi, a po šesti hodinách ještě jeden ekvivalent thionylchloridu; žádnou další změnu v reakční směsi jsme po vyvolání TLC (ve stejné soustavě MP) již nepozorovali.
- reakční směs po filtraci jsme přečistili sloupcovou chromatografií (SP silikagel, MP hexan/ethylacetát 9:1 (zpočátku), po 1200 ml proteklé MP zrychleno na 7:1 a po dalších 750 ml až na 5:1).
- na základě analýzy NMR spektra jsme zjistili, že získaná látka opět nebyl požadovaný produkt (**Va**). Zřejmě jde o 1-ethyl-1H-benzo[d][1,2,3]triazol (**IIIb**), podobně jako v případě 4.6.3.1.

Teoretický výtěžek: 0,652 g (z 0,500 g výchozího benzamidu)

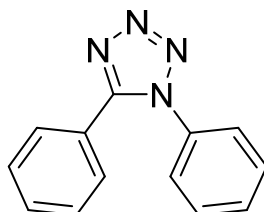
Praktický výtěžek: požadovaný produkt neizolován; zisk vedlejšího produktu 0,184 g [28%]

^1H NMR (500 MHz CDCl_3): δ 8.08 – 8.04 (m, 1H), 7.56 – 7.52 (m, 1H), 7.48 (ddd, $J = 8.2, 6.9, 0.9$ Hz, 1H), 7.37 (ddd, $J = 7.8, 6.7, 0.9$ Hz, 1H), 4.69 (q, $J = 7.4$ Hz, 2H), 1.63 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H)

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): δ 145.58, 132.56, 127.23, 124.02, 119.81, 109.28, 43.30, 14.87

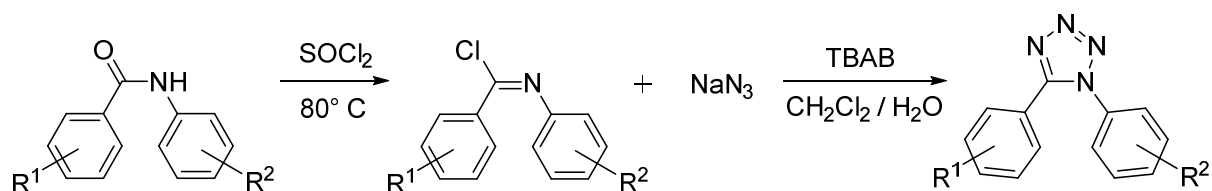
4.7. Příprava substituovaných 1,5-difenyl-1*H*-tetrazolů mezifázovou katalýzou z imidoylchloridů výchozích benzamidů

4.7.1. Příprava 1,5-difenyl-1*H*-tetrazolu (**23**)



23

Obecné schéma:



R¹ = 4-H; 3,5-elektronakceptorová substituce

R² = 4-H; 4-Cl

Obecný postup:

Do 25 ml varné baňky jsme nasypali 1,20 g (6,1 mmol) benzanilidu, přidali jsme 2,015 ml (27,7 mmol) thionylchloridu a směs jsme za míchání zahřívali při 80 °C pod zpětným chladičem po dobu jedné hodiny. Přebytný SOCl₂ jsme odpařili, získaný imidoylchlorid rozpustili v dichlormethanu a tento roztok jsme pomalu přikapali z dělicí nálevky do dvojfázové soustavy o následujícím složení: 10 ml dichlormethanu, 20 ml vody, 0,52 g (8,0 mmol) azidu sodného a 0,10 g (0,03 mmol) TBAB. Směs jsme míchali za laboratorní teploty po jednu hodinu, poté od sebe jednotlivé fáze oddělili a organickou vrstvou promyli vodou (3×30 ml). Následně jsme ji vysušili bezvodým síranem sodným a přebytečné rozpouštědlo odpařili. Produkt jsme dále nepřečišťovali, jeho přítomnost jsme ověřili pomocí TLC (MP hexan/ethylacetát 4:1) a standardu látky (**23**) z reakce 4.1.1.1.

Teoretický výtěžek: 1,356 g

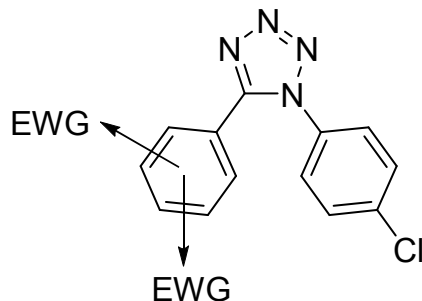
Praktický výtěžek: 0,331 g [24%]

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.59 – 7.46 (m, 6H), 7.45 – 7.37 (m, 4H)

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): 153.58, 134.57, 131.27 130.34, 129.89, 128.99, 128.92, 125.29, 123.60

Stejný postup byl použit i v případě následující sloučeniny.

4.7.2. Příprava 1-(4-chlorfenyl)-5-(disubst. fenyl)-1H-tetrazolu (28)



28

Viz Postup 4.7.1, s těmito rozdíly:

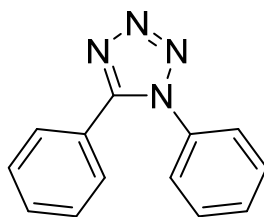
- vycházeli jsme z 0,965 g výchozího benzamidu, po ukončení druhého kroku (mezifázová katalýza) získáváme 0,155 g hrubého produktu.
- provedli jsme TLC (MP - hexan/ethylacetát 4:1) a ta až po trojnásobném vyvolání ukázala dvě skvrny, kdy jedna odpovídá R_f (retenční faktor) výchozí látky a druhá je přítomna jen o něco níž.
- získanou směs jsme se pokoušeli oddělit sloupcovou chromatografií pomocí jiné mobilní fáze (SP silikagel, MP chloroform), ale neúspěšně.

Teoretický výtěžek: 1,040 g (z 0,965 g výchozího benzamidu)

Praktický výtěžek: produkt nebyl neizolován

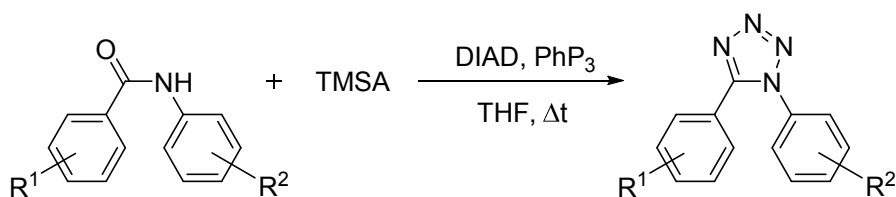
4.8. Příprava substituovaných 1,5-difenyl-1H-tetrazolů výchozích benzamidů pomocí Mitsunobuovy reakce

4.8.1. Příprava 1,5-difenyl-1H-tetrazolu (23)



23

Obecné schéma:



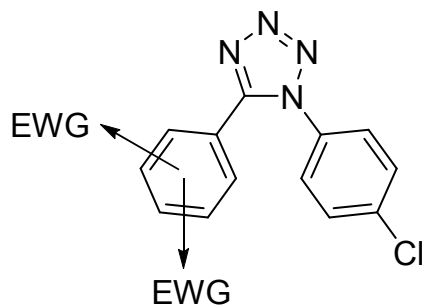
R¹ = 4-H; 3,5-elektronakceptorová substituce

R² = 4-H; 4-Cl

Obecný postup:

K roztoku 0,069 g (0,35 mmol) benzanilidu a 0,230 g (0,88 mmol) trifenylofosfinu v 1,5 ml bezvodého tetrahydrofuranu jsme přidali 0,176 ml (0,88 mmol) 98 % DIAD. Po pěti minutách následoval přidavek 0,121 ml (0,88 mmol) TMSA. Reakční směs jsme míchali a zahřívali po dobu šesti hodin při teplotě 65°C v argonové atmosféře. Průběh reakce jsme monitorovali pomocí TLC (MP hexan/ethylacetát 4:1) a standardu látky (**23**) získaného reakcí 4.6.1.1. Zjistili jsme, že prakticky veškerá výchozí látka zreagovala. Produkt jsme dále neizolovali a reakci jsme ukončili.

4.8.2. Příprava 1-(4-chlorfenyl)-5-(disubst. fenyl)-1H-tetrazolu (**28**)



28

Viz *Postup 4.8.1.*; po sedmi hodinách reakce za stejných podmínek a stejného způsobu monitorování pomocí TLC však nezaznamenáváme úbytek výchozí látky. Ani MS neodhaluje přítomnost žádaného produktu. Reakci ukončujeme.

5. Výsledky a diskuse

5.1. Syntéza

V první části této diplomové práce jsme syntetizovali šest derivátů 1-aryl-5-[(3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl]-1*H*-tetrazolu (**1-6**) metodou Williamsonovy syntézy. Potřebné thioláty výchozích tetrazolthiolů jsme připravili pomocí ethanolátu sodného (generovaný z absolutního ethanolu kovovým sodíkem) v případě čtyř látek (**1-4**). Výsledné produkty byly získány ve výtěžcích mezi 60-80 %. Při použití hydroxidu sodného místo sodíku u tetrazolthiolu (**5**) byl výtěžek o něco nižší (45 %), provedení reakce však bylo jednodušší. Jako postačující k vytvoření thiolátu se ukázal být i uhličitan sodný, který byl použit u (**6**), s výtěžkem 70 %. Postup s uhličitanem sodným byl aplikován i u série čtyř derivátů 1-aryl-5-[(3,4,5-trimethoxybenzyl)sulfanyl]-1*H*-tetrazolu (**7-10**), výtěžky se pohybovaly rovněž v průměru okolo 70 %. Všechny výše zmíněné reakce obecně probíhaly velice snadno a kvantitativně, což umocnila ještě náhrada sodíku jeho hydroxidem a následně uhličitanem. Stejně tak bylo možné snížit teplotu zahřívání i dobu trvání reakce ze čtyř hodin na pouhou jednu hodinu. U všech látek s výjimkou (**1**) a (**5**) docházelo ihned po přidání příslušného benzylchloridu ke vzniku temně fialového zbarvení, a to nezávisle na použitém činidle pro vznik thiolátu. Vedlejší produkty byly vždy účinně odstraněny vytřepáváním s roztokem uhličitanu sodného, případně povařením s aktivním uhlím. Cílové tetrazoly byly následně přečištěny rekrystalizací. Ani v jednom případě nebylo nutné přistoupit ke kolonové chromatografii.

Takto byly připraveny následující sloučeniny:

- 1-(4-bromfenyl)-5-[(3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl]-1*H*-tetrazol (**1**).
- 5-[(3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl]-1-mesityl-1*H*-tetrazol (**2**).
- 1-(3,4-dichlor)-5-[(3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl]-1*H*-tetrazol (**3**).
- 5-[(3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl]-1-(2-methoxyfenyl)-1*H*-tetrazol (**4**).
- 5-[(3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl]-1-naftyl-1*H*-tetrazol (**5**).
- 5-[(3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl]-1-(3-methoxyfenyl)-1*H*-tetrazol (**6**).

a podobně:

- 1-(4-nitrofenyl)-5-[(3,4,5-trimethoxybenzyl)sulfanyl]-1*H*-tetrazol (**7**).
- 1-fenyl-5-[(3,4,5-trimethoxybenzyl)sulfanyl]-1*H*-tetrazol (**8**).
- 1-(4-methoxyfenyl)-5-[(3,4,5-trimethoxybenzyl)sulfanyl]-1*H*-tetrazol (**9**).
- 1-(4-bromfenyl)-5-[(3,4,5-trimethoxybenzyl)sulfanyl]-1*H*-tetrazol (**10**).

Záměrem druhé části práce bylo získat substituované 1,5-difenyl-1*H*-tetrazoly, přičemž jeden z aromatických substituentů měl vždy obsahovat EWG disubstituci. Nejprve bylo nutné přistoupit k syntéze výchozích benzamidů (**11-19**), které byly získány reakcí přírodních benzoylchloridů se substituovanými aniliny v prostředí pyridinu za laboratorní

teploty. Reakce probíhala prakticky okamžitě a produkt byl snadno izolován vysrážením v 1M roztoku kyseliny chlorovodíkové a následnou filtrací. Výtěžky byly zpočátku u prvních čtyř benzamidů (**11-14**) překvapivě nízké, v rozmezí od 41-58 %. To si však vysvětlujeme používáním nadbytečného množství pyridinu jako rozpouštědla, ze kterého pak nemohl být produkt i po přidání 1M roztoku kyseliny chlorovodíkové úplně vysrážen. Při použití jen několika mililitrů rozpouštědla se již výtěžky pohybovaly okolo 90 %. Obdobně byla připravena i série tří substituovaných *N*-benzyl-3,5-dinitrobenzamidů (**20-22**), všechny ve výtěžcích přes 97 %. Vzhledem k primárnímu určení těchto benzamidů pro další syntézy byla přečišťována jen malá část z jejich výtěžku, z důvodu relativní ztrátovosti těchto postupů. V případě benzamidu (**14**) bylo nutné produkt přečistit sloupcovou chromatografií, v ostatních případech plně postačovalo použití aktivního uhlí a rekrystalizace (nejčastěji ze směsi ethanol/voda).

Byly připraveny následující sloučeniny:

- 3,5-dinitro-*N*-fenylbenzamid (**11**).
- 3,5-dinitro-*N*-(4-nitrofenyl)benzamid (**12**).
- *N*-(4-bromfenyl)-3,5-dinitrobenzamid (**13**).
- *N*-(3,4-dichlorfenyl)-3,5-dinitrobenzamid (**14**).
- 3,5-dinitro-*N*-(4-methoxyfenyl)benzamid (**15**).
- 3,5-dinitro-*N*-(3-nitrofenyl)benzamid (**16**).
- *N*-(4-chlormethyl)-3,5-dinitrobenzamid (**17**).

dále:

- *N*-(3,5-dinitrofenyl)benzamid (**18**).
- *N*-(3,5-dinitrofenyl)-4-nitrobenzamid (**19**).

a na závěr:

- *N*-(4-chlorbenzyl)-3,5-dinitrobenzamid (**20**).
- *N*-(3,4-dichlorbenzyl)-3,5-dinitrobenzamid (**21**).
- 3,5-dinitro-*N*-[(4-trifluormethyl)benzyl]benzamid (**22**).

Následně jsem se pokusil připravit z některých uvedených benzamidů (**12, 13, 16, 17** a **18**) finální tetrazoly (**24-27**). Využil jsem tři různé metody přípravy, vždy nejprve s benzanilidem jako snadno dostupnou a nejjednodušší modelovou strukturou s očekávaným vznikem produktu (**23**). Jako první způsob jsem zvolil přípravu imidoylbenzotriazolu (**I**), jeho izolaci a následné zacyklení na tetrazol v podmínkách mezifázové katalýzy. Nevýhodou byl relativně nízký zisk imidoylbenzotriazolu (**I**) z důvodu obtížné separace od výchozího benzanilidu. Následná cyklizační reakce na tetrazol (**23**) však již probíhala kvantitativně a jeho izolace nebyla zatížena přítomností původního benzanilidu. Stejným způsobem jsme se pokusili o přípravu látek (**24-27**). V prvním kroku požadovaný methanimin vznikal poměrně neochotně, proto jsme přidávali do reakce další přídatky thionylchloridu a benzotriazolu. Očekávané meziproducty (**II-V**) měly sice dostatečný rozdíl R_f oproti výchozím benzamidům

(**12**, **13**, **16** a **18**) v MP hexan/ethylacetát 7:1, 8:1 a 9:1, ovšem i při použití velkých chromatografických kolon bylo vzájemné oddělení látek jen částečné. Takto byly získány nízké výtěžky imidoylbenzotriazolů (**II**) a (**IV**), 21 % a 9 %. V případě benzamidů obsahující nitroskupinu (**12** a **16**) byly získané látky nakonec identifikovány jako 1-ethyl-1*H*-benzo[d][1,2,3]triazol (**IIIb**) a očekávané produkty (**IIIa** a **Va**) se nepodařilo izolovat. Na první pohled zarážející přítomnost ethylového zbytku má nejspíše původ v 1 % ethanolu, kterým je stabilizován komerčně dodávaný chloroform. Ten byl použit v reakci jako rozpouštědlo v dostatečném, aby v něm obsažený ethanol mohl reakcí s thionylchloridem alkylovat část 1*H*-benzo[d][1,2,3]triazolu.

Dokázali jsme tedy připravit pouze cílové tetrazoly (**24**) a (**26**) z imidoylbenzotriazolů (**II**) a (**IV**). Tyto mezifázově katalyzované reakce za použití azidu sodného, trifluoroctové kyseliny a TBAB coby katalyzátoru fázového přenosu probíhaly již kvantitativně, i když bylo třeba několika přídavek azidu a trifluoroctové kyseliny. Vzhledem k nízkým výtěžkům z předchozí reakce a olejovitým nečistotám v hexanu jako mobilní fázi, nebylo možné získané tetrazoly zaslat na testování antimykobakteriální aktivity. K dalšímu přečišťování produktu jsme se pro jistotu neuchýlili, z obavy ztráty již tak malého množství látky. Struktura produktů nicméně byla potvrzena pomocí NMR analýzy, kde jako klíčový prvek na odlišení od jinak velmi podobného spektra výchozích benzamidů (**13**) a (**18**) posloužila nepřítomnost amidického vodíku a karbonylového uhlíku. Látky si byly podobné i svými R_f v MP hexan/ethylacetát 4:1, kdy byly vzájemně rozlišitelné až po trojnásobném vyvolání v mobilní fázi. Výhodou zmíněné metody tedy bylo, že odpadal problém obtížné izolace cílového tetrazolu od výchozího amidu pomocí kolonové chromatografie. Na druhé straně je zde velice nízký výsledný výtěžek tetrazolu vzhledem k výchozímu benzamidu.

Rozhodli jsme se tedy vyzkoušet i přímou tvorbu tetrazolu z imidoylchloridů, nejprve na jednoduché struktuře benzanilidu. Reakce probíhala s thionylchloridem, s následnou mezifázově katalyzovanou cyklizací imidoylchloridu na tetrazol za použití azidu sodného a TBAB jakožto katalyzátoru mezifázového přenosu. Výsledek reakce jsme odhadovali na základě TLC reakční směsi za použití již získaného standardu (**23**) z reakce 4.6.1.2. Byl patrný výrazný úbytek výchozí látky ve prospěch vzniku očekávaného produktu, potvrzeným následnou NMR analýzou. Reakci jsme tedy provedli i s benzamidem (**17**) pro vznik tetrazolu (**28**). Již po varu s thionylchloridem však bylo zřejmé, že velká část výchozí látky vůbec nezreagovala, protože byla obtížně rozpustná v dichlormethanu a provedené TLC ukázalo shodnost R_f se standardem výchozího benzamidu. Po proběhnutí mezifázově katalyzované cyklizační reakce byl sice na TLC patrný vznik dalšího produktu, v reakční směsi však převažoval původní benzamid (**17**). R_f obou látek byly navíc v MP hexan/ethylacetát 4:1 velice podobné, k jejich rozdělení docházelo pouze v chloroformu. V této soustavě se látky od sebe nepodařilo izolovat. Nicméně, tento reakční postup je sám o sobě jednoduchý a zvolením silnějšího chloračního činidla (např. tavením s chloridem fosforečným) a delší reakční doby by podíl vznikajícího imidoylchloridu mohl být vyšší. Svůj vliv může mít i volba katalyzátoru mezifázového přenosu.²⁵ Následnou obtížnou chromatografickou dělitelnost by bylo možné vyřešit kvantitativním rozkladem výchozího benzamidu hydroxidem sodným (případně vzniklý tetrazol by v tomto prostředí měl zůstat stabilní).

Jako třetí postup jsme se rozhodli vyzkoušet variantu Mitsunobuovy reakce, která vede k přímému vzniku tetrazolu a její provedení je ještě snadnější, než předchozí reakce. V případě benzanilidu šlo opět o prakticky kvantitativní reakci, za vzniku (**23**) (na základě hodnocení TLC reakční směsi). Užití stejných podmínek u benzamidu (**17**) však žádoucí proměnu na tetrazol (**28**) nepřineslo. Tomu napovídala jak provedená TLC, tak i analýza MS, která nezaznamenala přítomnost očekávaného tetrazolu.

Byly tedy připraveny tyto substituované 1,5-difenyl-1*H*-tetrazoly:

- 1,5-difenyl-1*H*-tetrazol (**23**),

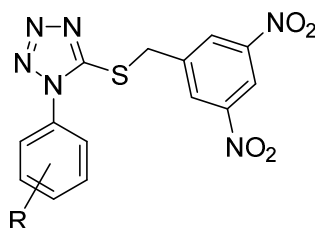
a zejména pak cílové tetrazoly:

- 1-(4-bromfenyl)-5-(disubst. fenyl)-1*H*-tetrazol (**24**),
- 1-(disubst. fenyl)-5-fenyl-1*H*-tetrazol (**26**).

5.2. Testování antimykobakteriální aktivity

Biologická účinnost *in vitro* byla zjišťována celkem u 21 připravených sloučenin proti čtyřem různým kmenům *Mycobacterium tuberculosis*, konkrétně: *Mycobacterium tuberculosis* CNCTC My 331/88, *Mycobacterium avium* CNCTC My 220/88, *Mycobacterium kansasii* CNCTC My 235/80 a *Mycobacterium kansasii* CNCTC My 6509/96. První tři kmeny byly poskytnuty ČNSTK (Česká národní sbírka typových kultur), poslední jmenovaný je klinickým izolátem. Samotné testování provedlo Oddělení bakteriologie a mykologie Zdravotního ústavu se sídlem v Ostravě. Zkoumané látky byly rozpuštěny v DMSO (dimethylsulfoxid) a nanoseny na naočkovanou Šulovu půdu (SEVAC, Praha) v odstupňovaných koncentracích 100, 500, 250, 62.5, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25 a 0.125 $\mu\text{mol/l}$. Vzorky byly inkubovány při 37 °C a účinnost sloučenin byla vyjádřena jako MIC. Tato hodnota udává nejnižší nanosenou koncentraci látky v $\mu\text{mol/l}$, která ještě inhibuje růst mykobakterií a byla odečítána po 14 a 21 dnech u *M. tuberculosis* a *M. avium* a po 7, 14 a 21 dnech u *M. kansasii* (Tabulka 1-5). Standardem byl vždy isoniazid (INH).

Tabulka 1. Výsledky antimykobakteriální aktivity šesti připravených 1-aryl-5-[(3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl]-1*H*-tetrazolů vyjádřené jako MIC [$\mu\text{mol/l}$]

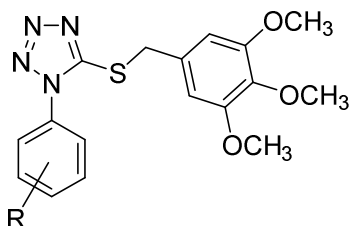


R = 4-Br (**1**); 2,4,6-triMe (**2**); 3,4-diCl (**3**); 2-MeO (**4**); 1-naftyl (**5**); 3-MeO (**6**)

Číslo testované látky	<i>M. tuberculosis</i> My 331/88	<i>M. avium</i> My 330/88	<i>M. kansasii</i> My 235/80	<i>M. kansasii</i> 6509/96
	14 / 21 dní		7 / 14 / 21 dní	
1	1 / 1	>125 / 125	1 / 2 / 2	2 / 4 / 4
2	125 / 125	125 / 125	125 / 125 / 125	125 / 125 / 125
3	1 / 1	8 / 16	1 / 1 / 2	1 / 2 / 4
4	125 / 125	125 / 125	125 / 125 / 125	125 / 125 / 125
5	125 / 125	125 / 125	125 / 125 / 125	125 / 125 / 125
6	2 / 4	125 / 125	125 / 125 / 125	125 / 125 / 125
INH	0,5 / 1	250 / 250	250 / 250	4 / 8

Významnější aktivitu, která předčila i standard INH, prokázaly látky (**1**) a (**3**), obě s halogenovanými aromatickými jádry. Deriváty s výraznou lipofilní substitucí (**2**) a (**5**) naopak neúčinkovaly vůbec. Zajímavý je případ struktur (**4**) a (**6**), kdy jinak nefunkční substituce methoxyskupinou měla v poloze 3 oproti poloze 2 účinek aspoň vůči běžnému kmenu *M. tuberculosis*.

Tabulka 2. Výsledky antimykobakteriální aktivity tří připravených derivátů 1-fenyl-5-[(3,4,5-trimethoxybenzyl)sulfanyl]-1*H*-tetrazolů vyjádřené jako MIC [$\mu\text{mol/l}$]

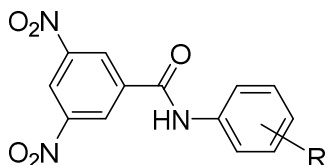


R = 4-NO₂ (**7**); 4-H (**8**); 4-Br (**10**)

Číslo testované látky	<i>M. tuberculosis</i> My 331/88	<i>M. avium</i> My 330/88	<i>M. kansasii</i> My 235/80	<i>M. kansasii</i> 6509/96
	14 / 21 dní		7 / 14 / 21 dní	
7	125 / 125	125 / 125	125 / 125 / 125	125 / 125 / 125
8	250 / 250	125 / 125	125 / 125 / 125	125 / 125 / 125
10	62,5 / 62,5	250 / 250	125 / 250 / 250	125 / 250 / 250
INH	0,5 / 1	250 / 250	250 / 250	4 / 8

V souladu s našimi předpoklady, žádná ze struktur nevykázala signifikantní antimykobakteriální aktivitu.

Tabulka 3. Výsledky antimykobakteriální aktivity sedmi připravených derivátů *N*-fenyl-3,5-dinitrobenzamidů vyjádřené jako MIC [$\mu\text{mol/l}$]

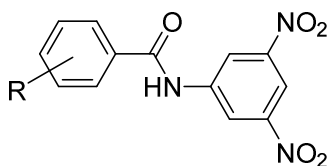


R = 4-H (**11**); 4-NO₂ (**12**); 4-Br (**13**); 3,4-diCl (**14**); 4-MeO (**15**); 3-NO₂ (**16**); 4-Cl (**17**)

Číslo testované látky	<i>M. tuberculosis</i> My 331/88	<i>M. avium</i> My 330/88	<i>M. kansasii</i> My 235/80	<i>M. kansasii</i> 6509/96
	14 / 21 dní		7 / 14 / 21 dní	
11	8 / 8	32 / 32	32 / 62,5 / 62,5	16 / 32 / 32
12	4 / 4	250 / 250	250 / 250 / 250	250 / 250 / 250
13	2 / 2	8 / 8	4 / 4 / 8	8 / 8 / 16
14	1 / 1	8 / 16	8 / 16 / 16	8 / 16 / 16
15	4 / 4	250 / 250	8 / 16 / 32	16 / 32 / 62,5
16	4 / 4	8 / 16	16 / 32 / 32	16 / 32 / 32
17	4 / 4	16 / 16	2 / 4 / 4	8 / 16 / 16
INH	0,5 / 1	250 / 250	250 / 250	4 / 8

Antimykobakteriální účinnost substituovaných 3,5-dinitrobenzamidů již byla zkoumána a prokázána, a tedy i očekávána.¹⁷ Opět se jako relativně nejnadějnější ukázaly být struktury (13), (14) a (17), které všechny mají halogenovou substituci. V případě nitroskupiny v poloze 3 fenylu (16) zde rovněž byla určitá aktivita, jeho 4-izomer (12) však již vykázal účinnost pouze proti standardnímu kmenu *Mycobacterium tuberculosis*.

Tabulka 4. Výsledky antimykobakteriální aktivity dvou připravených derivátů *N*-(3,5-dinitrofenyl)benzamidů vyjádřené jako MIC [$\mu\text{mol/l}$]

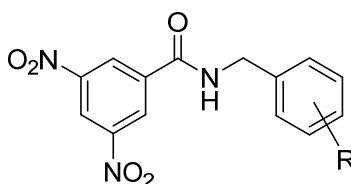


R = 4-H (18); 4-NO₂ (19)

	<i>M. tuberculosis</i> My 331/88	<i>M. avium</i> My 330/88	<i>M. kansasii</i> My 235/80	<i>M. kansasii</i> 6509/96
	14 / 21 dní		7 / 14 / 21 dní	
18	250 / 250	250 / 250	125 / 250 / 250	250 / 250 / 250
19	8 / 8	250 / 250	250 / 250 / 250	250 / 250 / 250
INH	0,5 / 1	250 / 250	250 / 250	4 / 8

V tomto případě jde vlastně o analogy struktur (11) a (12), které ukázaly horší, resp. žádnou účinnost.

Tabulka 5. Výsledky antimykobakteriální aktivity tří připravených derivátů *N*-benzyl-3,5-dinitrobenzamidů vyjádřené jako MIC [$\mu\text{mol/l}$]



R = 4-Cl (20); 3,4-diCl (21); 4-CF₃ (22)

	<i>M. tuberculosis</i> My 331/88	<i>M. avium</i> My 330/88	<i>M. kansasii</i> My 235/80	<i>M. kansasii</i> 6509/96
	14 / 21 dní		7 / 14 / 21 dní	
20	1 / 1	4 / 8	1 / 1 / 1	1 / 1 / 1
21	1 / 1	8 / 8	1 / 1 / 1	1 / 1 / 1
22	1 / 1	2 / 4	1 / 1 / 1	1 / 1 / 1
INH	0,5 / 1	250 / 250	250 / 250	4 / 8

Struktury (20) a (21) jsou homology látek (17) a (14), a spolu s (22) se ze všech námi testovaných látek ukázaly jako antimykobakteriálně nejúčinnější.

Bohužel, žádný ze dvou připravených substituovaných 1,5-difenyl-1*H*-tetrazolů nemohl být otestován z důvodu nedostatečné kvantity i kvality.

6. Závěr

Mezi první cíle mé práce patřila syntéza šesti derivátů 1-aryl-5-[(3,5-dinitrobenzyl)sulfanyl]-1*H*-tetrazolu (**1-6**) a čtyř analogických struktur derivátů 1-fenyl-5-[(3,4,5-trimethoxybenzyl)sulfanyl]-1*H*-tetrazolu (**7-10**), u kterých jsme následně nechali vyhodnotit jejich *in vitro* antimykobakteriální aktivitu. Z první skupiny bylo všech šest látek otestováno a dvě sloučeniny (**1** a **3**) prokázaly významnou účinnost. Ze čtyř 3,4,5-trimethoxybenzyl analogů byly testovány tři krystalické látky (**7**, **8** a **10**), ty ovšem jakoukoliv aktivitu postrádaly. Potvrdila se tak důležitost 3,5-dinitrofenylového uskupení pro antimykobakteriální účinek.

Další částí mé práce přecházela příprava *N*-fenylbenzamidů obsahující na jednom z fenylů vždy 3,5-dinitrosubstituci, jako prekurzorů pro tvorbu substituovaných 1,5-difenyl-1*H*-tetrazolů. Dohromady tak bylo připraveno devět látek (**11-19**) a všechny byly odeslány na antimykobakteriální otestování *in vitro*. Jak z důvodu očekávané účinnosti (danou 3,5-dinitrosubstitucí), tak pro srovnání s případnými odpovídajícími substituovanými 1,5-difenyl-1*H*-tetrazoly. Vedle toho byly připraveny a otestovány i tři *N*-benzyl-3,5-dinitrobenzamidy (**19-22**) jako homology předchozích benzamidů. Vezmeme-li v potaz i výsledky z první části práce, jako nejúčinnější se ukázala být substituce druhého fenylového jádra halogeny. Konkrétně bromem/chlorem v poloze 4 fenylu nebo dichlorsubstitucí v polohách 3 a 4. Účinná byla i trifluormethylová substituce v poloze 4 benzyly u látky (**22**).

Hlavním úkolem pak bylo připravit substituované 1,5-difenyl-1*H*-tetrazoly z dříve připravených benzamidů (**11-19**). Tyto reakce jsme stihli provést jen s některými benzamidy (**12**, **13**, **16**, **17** a **18**). Vyzkoušel jsem tři různé metody (1. příprava tetrazolu z imidoylbenzotriazolu, 2. přímá tvorba tetrazolu z imidoylchloridu a 3. varianta Mitsunobuovy reakce s použitím trimethylsilylazidu), vždy nejprve s benzanilidem jako jednoduchou modelovou strukturou za vzniku látky (**23**). První zmíněný způsob sice vedl k syntéze dvou žádaných tetrazolů (**24** a **26**), nicméně s malým výsledným výtěžkem a nedostatečným množstvím pro antimykobakteriální testování. Jejich struktura však byla potvrzena NMR analýzou. Další dvě metody se osvědčily pouze v případě jednoduchého tetrazolu (**23**), cílový tetrazol (**28**) se ale nepodařilo izolovat. Pro budoucí práci však stojí za úvahu modifikovat způsob tvorby imidoylchloridu, která je klíčový pro zmíněné reakce 1. a 2. a ve výsledku i pro výtěžnost cílových substituovaných 1,5-difenyl-1*H*-tetrazolů. Nesnáze s izolací těchto tetrazolů od jejich výchozích benzamidů by mohly být řešitelné rozkladem benzamidů pomocí hydroxidu sodného.

7. Seznam použité literatury

- 1 Glaziou, P.; Falzon, D.; Floyd, K.; Raviglione, M., *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, **2013**, 34 (1), 3-16.
- 2 Tuberculosis. In: WHO.int [on-line], [vid. 7. dubna 2014]. Dostupný z: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/>
- 3 Daniel, T. M., *Respiratory Medicine*, **2006**, 100 (11), 1862-1870.
- 4 Keshavjee, S.; Farmer, P. E., *The New England Journal of Medicine*, **2012**, 367 (10), 931-936.
- 5 Bermudez, L. E.; Goodman, J., *Infection and Immunity*, 1996, 64 (4), 1400-1406.
- 6 Matteelli, A.; Roggi, A.; Carvalho, A. C. C., *Clinical Epidemiology*, **2014**, 6, 111-118.
- 7 Drug Pipeline. In: Working Group on New TB Drugs.org [on-line], [vid. 8. dubna 2014]. Dostupný z: <http://www.newtbdrugs.org/pipeline.php>
- 8 Takiff, H.; Guerrero, E., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2011**, 55 (12), 5421-5429.
- 9 Lee, M.; Lee, J.; Carroll, M. W.; Choi, H.; Min, S.; Song, T.; Via, L. E.; Goldfeder, L. C.; Kang, E.; Jin, B.; Park, H.; Kwak, H.; Kim, H.; Jeon, H. S.; Jeong, I.; Joh, J. S.; Chen, R. Y.; Olivier, K. N.; Shaw, P. A.; Follmann, D.; Song, S. D.; Lee, J. K.; Lee, D.; Kim, C. T.; Dartois, V.; Park, S. K.; Cho, S. N.; Barry, C. E. 3rd, *The New England Journal of Medicine*, **2012**, 367 (16), 1508-1518.
- 10 Sacksteder, K. A.; Protopopova, M.; Barry, C. E. 3rd; Andries, K.; Nacy, C. A., *Future Microbiology*, **2012**, 7 (7), 823-837.
- 11 Gemechu, A.; Giday, M.; Worku, A.; Ameni, G., *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **2013**, 13, 291. (<http://www.biomedcentral.com/1472-6882/13/291>)
- 12 Robles-Zepeda, R.E.; Coronado-Aceves, E.W.; Velázquez-Contreras, C.A.; Ruiz-Bustos, E.; Navarro-Navarro, M.; Garibay-Escobar, A., *BMC Complementary and Alternative Medicine*, **2013**, 13, 329. (<http://www.biomedcentral.com/1472-6882/13/329>)
- 13 Mahajan, R., *International Journal of Applied & Basic Medical Research*, **2013**, 3 (1), 1-2.

- 14 Sloan, D. J.; Davies, G. R.; Khoo, S. H., *Current Respiratory Medicine Reviews*, **2013**, 9 (3), 200-210.
- 15 Singh, R.; Manjunatha, U.; Boshoff, H. I. M.; Ha, Y. H.; Niyomrattanakit, P.; Ledwidge, R.; Dowd, C. S.; Lee, I. Y.; Kim, P.; Zhang, L.; Kang, S.; Keller, T. H.; Jiricek, J.; Barry, C. E. 3rd, *Science*, **2008**, 322 (5906), 1392-1395.
- 16 Makarov, V.; Manina, G.; Mikusova, K.; Mollmann, U.; Ryabova, O.; Saint-Joanis, B.; Dhar, N.; Pasca, M. R.; Buroni, S.; Lucarelli, A. P.; Milano, A.; De Rossi, E.; Belanova, M.; Bobovska, A.; Dianiskova, P.; Kordulakova, J.; Sala, C.; Fullam, E.; Schneider, P.; McKinney, J. D.; Brodin, P.; Christophe, T.; Waddell, S.; Butcher, P.; Albrethsen, J.; Rosenkrands, I.; Brosch, R.; Nandi, V.; Bharath, S.; Gaonkar, S.; Shandil, R. K.; Balasubramanian, V.; Balganes, T.; Tyagi, S.; Grosset, J.; Riccardi, G.; Cole, S. T., *Science*, **2009**, 324 (5928), 801-804.
- 17 Christophe, T.; Jackson, M.; Jeon, H. K.; Fenistein, D.; Contreras-Dominguez, M.; Kim, J.; Genovesio, A.; Carralot, J. P.; Ewann, F.; Kim, E. H.; Lee, S. Y.; Kang, S.; Seo, M. J.; Park, E. J.; Skovierova, H.; Pham, H.; Riccardi, G.; Nam, J. Y.; Marsollier, L.; Kempf, M.; Joly-Guillou, M. L.; Oh, T.; Shin, W. K.; No, Z.; Nehrbass, U.; Brosch, R.; Cole, S. T.; Brodin, P., *PLOS Pathogens*, **2009**, 5 (10), e1000645. (<http://www.plospathogens.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.ppat.1000645>)
- 18 Ostrovskij, V. A.; Trifonov, R. E.; Popova, E. A., *Russian Chemical Bulletin*, **2012**, 61 (4), 768-780.
- 19 Waisser, K.; Kuneš, J.; Hrabálek, A.; Odlerová, Ž., *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, **1994**, 59 (1), 234-238.
- 20 Waisser, K.; Klimešová, V.; Odlerová, Ž., *Folia Pharmaceutica Universitatis Carolinae*, **1995**, 18, 31-34.
- 21 a) Klimešová V.; Svoboda, M.; Waisser, K.; Kaustová, J.; Buchta, V.; Králová, K., *European Journal of Medicinal Chemistry*, **1999**, 34 (5), 433-440. b) Waisser, K.; Klimešová, V.; Buchta, V.; Odlerová, Ž., *Scientia Pharmaceutica*, **1997**, 65, 271-276. c) Klimešová, V.; Svoboda, M.; Waisser, K.; Macháček, M.; Buchta, V.; Odlerová, Ž., *Archiv der Pharmazie*, **1996**, 329 (10), 438-442. d) Klimešová, V.; Svoboda, M.; Waisser, K.; Pour, M.; Kaustová, J., *Il Farmaco*, **1999**, 54 (10), 666-672. e) Klimešová, V.; Svoboda, M.; Waisser, K.; Pour, M.; Kaustová, J., *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, **1999**, 64 (2), 417-434.
- 22 a) Klimešová, V.; Kočí, J.; Pour, M.; Stachel, J.; Waisser, K.; Kaustová, J., *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2002**, 37 (5), 409-418. b) Klimešová, V.; Kočí, J.; Waisser, K.; Kaustová, J., *Il Farmaco*, **2002**, 57 (4), 259-265. c) Klimešová, V.; Kočí, J.; Waisser, K.; Kaustová, J.; Möllmann, U., *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2009**, 44 (5), 2286-2293. d) Kočí, J.; Klimešová, V.; Waisser, K.;

- Kaustová, J.; Dahse, H.M.; Möllmann, U., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2002**, *12* (9), 3275-3278.
- 23 Klimešová, V.; Zahajská, L.; Waisser, K.; Kaustová, J.; Möllmann, U., *Il Farmaco*, **2004**, *59* (4), 279-288.
- 24 Adamec, J.; Waisser, K.; Kuneš, J.; Kaustová, J., *Archiv der Pharmazie*, **2005**, *338* (8), 385-389.
- 25 Artamonova, T. V.; Zhivich, A. B.; Dubinskii, M. Y.; Koldobskii, G. I., *Synthesis*, **1996**, *12*, 1428-1430.
- 26 Katritzky, A. R.; Chunming, C.; Sandeep, K. S., *Journal of Organic Chemistry*, **2006**, *71* (9), 3375-3380.
- 27 Katritzky, A. R.; Cai, C.; Meher, N. K., *Synthesis*, **2007**, *8*, 1204-1208.
- 28 Athanassopoulos, C. M.; Garnelis, T.; Vahliotis, D.; Papaioannou, D., *Organic Letters*, **2005**, *7* (4), 561-564.
- 29 Kumara Swamy, K. C.; Bhuvan Kumar, N. N.; Balaraman, E.; Pavan Kumar, K. V. P., *Chemical Reviews*, **2009**, *109* (6), 2551-2651.

8. Seznam použitých zkratek

CC	kolonová chromatografie
ČNSTK	Česká národní sbírka typových kultur
DIAD	diisopropyl azodikarboxylát
DMSO	dimethylsulfoxid
DprE1	dekaprenylfosforyl- β -D-ribose 2'-epimeráza
EMA	Evropská léková agentura
EWG	elektronakceptorová skupina
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv, Spojené státy americké
INH	isoniazid
MDR-TB	multirezistentní tuberkulóza
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MP	mobilní fáze
MS	hmotnostní spektrometrie
NMR	nukleární magnetická rezonance
R _f	retenční faktor
SP	stacionární fáze
TB	tuberkulóza
TBAB	tetrabutylamonium-bromid
TDR-TB	totálně rezistentní tuberkulóza
TLC	tenkovrstvá chromatografie
TMSA	trimethylsilylazid
WHO	Světová zdravotnická organizace
XDR-TB	extenzivně rezistentní tuberkulóza