

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra anorganické a organické chemie

**Syntéza antimikrobiálních látek na bázi
derivátů salicylové kyseliny**

Diplomová práce

2016

Václav Tvrdý

Tímto bych chtěl poděkovat svému školiteli PharmDr. Mgr. Martinovi Krátkému, Ph.D., za vedení mé diplomové práce a odbornou pomoc. Dále pak poděkování zaslouží Dr. Georgios Paraskevopoulos, Ph.D., za cenné rady a pomoc při řešení experimentální části.

„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 jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne

Václav Tvrdý

Abstrakt

Schiffovy báze mají v dnešní době široké využití jak v technické praxi, tak v oblasti lékařství. Mimo jiné jsou studovány jako potenciální antibakteriální a antifungální léčiva. S rostoucí mírou rezistence na současně používaná léčiva je vývoj nových antimikrobních sloučenin velmi aktuální. Salicylanilidy také vykazující antimikrobiální aktivitu a jsou také intenzivně studovány. Na základě uvedeného jsme se v této práci zabývali syntézou nových Schiffových bází vycházejících ze základní struktury salicylanilidu substituovaného v anilidové části 4-benzylem. Bylo připraveno pět nových sloučenin: 5-chlor-*N*-{4-[fenyl(fenylimino)methyl]fenyl}-2-hydroxybenzamid, 5-brom-*N*-{4-[fenyl(fenylimino)methyl]fenyl}-2-hydroxybenzamid, 5-chlor-*N*-{4-[fenyl(3-chlorfenylimino)methyl]fenyl}-2-hydroxybenzamid, 5-chlor-*N*-{4-[fenyl(4-chlorfenylimino)methyl]fenyl}-2-hydroxybenzamid a 5-brom-*N*-{4-[fenyl(4-chlorfenylimino)methyl]fenyl}-2-hydroxybenzamid. Reakce probíhala při teplotě varu rozpouštědla v přítomnosti katalytického množství *p*-toluensulfonové kyseliny. Většina látek byla popsány pomocí IR, ¹H NMR, ¹³C NMR spekter a teploty tání. Při syntéze Schiffových bází vznikaly oba *E/Z* izomery na dvojně vazbě, což bylo viditelné v NMR spektrech.

Abstract

Schiff bases are widely used both in technical practice and in the field of medicine. For their antimicrobial activities are studied as potential antimicrobial and antifungal drugs. With increasing level of resistance to currently drugs is the development of new substances very intense. Salicylanilides are a group of substances with antimicrobial activity and are also intensively studied. Based on that we were synthesized novel Schiff bases resulting from salicylic acid, respectively salicylanilides. It was concretely prepared five compounds: 5-chloro-N-{4-[phenyl(phenylimino)methyl]phenyl}-2-hydroxybenzamide, 5-bromo-N-{4-[phenyl(phenylimino)methyl]phenyl}-2-hydroxybenzamide, 5-chloro-N-{4-[phenyl(3-chlorophenylimino)methyl]phenyl}-2-hydroxybenzamide, 5-chloro-N-{4-[phenyl(4-chlorophenylimino)methyl]phenyl}-2-hydroxybenzamide, 5-bromo-N-{4-[phenyl(4-chlorophenylimino)methyl]phenyl}-2-hydroxybenzamide. The reaction proceeded at the boiling point of the solvent, with catalytic amount of *p*-toluenesulfonic acid. Most of the compounds were characterized by IR, H^1 NMR, C^{13} NMR and melting point. The prepared compounds showed E/Z isomers on double bond, it is demonstrated on NMR specters, this case is not deal with this problem.

Seznam zkratek

ACP	acyl carrier protein
ATP	adenosintrifosfát
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
DCE	dichlorethan
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EMB, E	ethambutol
FAS	fatty acid synthase, synthasa mastných kyselin
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti
IBX	jodoxybenzoová kyselina
INH, H	isoniazid
IR	infračervený
IUPAC	Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii
LTBI	latentní forma tuberkulózy
MDR-TB	multilékově rezistentní tuberkulóza
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MRSA	methicilin-rezistentní zlatý stafylokok
NMR	nukleární magnetická rezonance
PZA, Z	pyrazinamid
RMP, R	rifampicin
RNA	ribonukleová kyselina
SAR	vztah struktura-účinek
STM, S	streptomycin
TB	tuberkulóza

TDR-TB	totálně rezistentní tuberkulóza
THF- d_8	deuterovaný tetrahydrofuran
TLC	tenkovrstvá chromatografie
WHO	Světová zdravotnická organizace
XDR-TB	extenzivně rezistentní tuberkulóza
XXDR-TB	tuberkulóza s úplnou rezistencí

Obsah

1.	TUBERKULÓZA	9
1.1.	TUBERKULÓZA OBECNĚ	9
1.2.	PŮVODCI TUBERKULÓZY	9
1.2.1	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	9
1.2.2	<i>Atypická mykobakteria</i>	10
1.3.	KLINICKÝ OBRAZ	10
1.4.	TERAPIE	11
1.4.1.	<i>Základní antituberkulotika</i>	11
1.4.2.	<i>Některá rezervní antituberkulotika</i>	14
1.4.3	<i>Nejnovější antituberkulotika</i>	16
1.5.	PREVENCE.....	17
1.6.	REZISTENCE.....	17
2.	SCHIFFOVY BÁZE	19
2.1.	OBECNĚ O SCHIFFOVÝCH BÁZÍCH	19
2.2.	PŘÍPRAVA SCHIFFOVÝCH BÁZÍ.....	19
2.3.	FARMAKOLOGICKÉ ÚČINKY.....	24
2.3.1.	<i>Antibakteriální a antifungální účinky</i>	24
3.	CÍL PRÁCE	31
4.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	32
4.1.	OBECNÁ ČÁST.....	32
4.2.	PRAKTICKÁ ČÁST	34
5.	DISKUZE	46
6.	ZÁVĚR	51
7.	POUŽITÁ LITERATURA	52

1. Tuberkulóza

1.1. Tuberkulóza obecně

Tuberkulóza (TB) je infekční onemocnění způsobené bakteriemi patřícími do komplexu *Mycobacterium tuberculosis*. Toto onemocnění nejčastěji postihuje plíce, ovšem může postihnout i jiné části těla. Původce způsobující tuberkulózu, tedy *Mycobacterium tuberculosis*, byl v roce 1882 popsán Robertem Kochem. Za tento objev Koch obdržel v roce 1905 Nobelovu cenu.^{1,2}

WHO odhaduje, že v roce 2014 celosvětově onemocnělo tuberkulózou 9,6 miliónů lidí, ovšem hlášeno bylo 6 miliónů nově nemocných, tedy necelé dvě třetiny (63 %), celkově 12 % z tohoto počtu bylo HIV pozitivních. Obrovským problémem je zejména v chudých a rozvojových zemích, kde léčba buď není dostupná, nebo je velmi omezená. V celkovém součtu je až 95 % všech úmrtí na TB právě v těchto zemích. TB je nejčastějším důvodem úmrtí lidí s HIV, v roce 2015 každé třetí úmrtí HIV pozitivního člověka měla na svědomí TB. V důsledku nakažení TB zemřelo za rok 2014 celkem 1,5 miliónů osob.^{1,3}

1.2. Původci tuberkulózy

Mykobakterie jsou obligátně aerobní, nepohyblivé, nesporulující, štíhlé tyčinky, které nelze barvit podle Grama, pokud se užívá běžného postupu. To je dáno zejména specifickým složením buněčné stěny. Ta je poměrně složitá, obsahuje vysoké množství lipidů, zejména dlouhé větvené řetězce mykolových kyselin o 60 až 90 uhlíků. Jsou to acidorezistentní mikroorganismy, proto se při barvení používá metoda dle Ziehla-Neelsena. Mykobakterie tvoří malé kolonie se žlutavým zabarvením, některé s drsným povrchem. Jsou velmi odolné vůči vnějším vlivům, vysychání a chemickým látkám.⁴

1.2.1 *Mycobacterium tuberculosis*

Skupina mykobakterií zahrnuje řadu zástupců, kdy nejdůležitější, z pohledu patogenity, je *Mycobacterium tuberculosis*. Spolu s geneticky blízkými *Mycobacterium bovis*, *M.*

africanum a několika dalšími patří do skupiny nazvané *M. tuberculosis* komplex. Jako ostatní mykobakterie jsou vysoce odolné vůči vyschnutí, v prachu vydrží až 10 dnů, ve vyschlém sputu až 8 měsíců. Kultivace *M. tuberculosis* je dlouhodobá z důvodů dlouhé generační doby, 18 až 24 hodin. Kolonie mohou mít květákovitý tvar. *M. tuberculosis* netvoří žádné toxiny, které by se daly považovat za faktory patogenity.⁴

1.2.2 Atypická mykobakteria

Existují desítky různých mykobakterií žijících převážně jako saprofyty. Některá z nich jsou za jistých podmínek patogenní. Označení „atypická“ je v podstatě nesprávné, začalo se používat pouze díky odlišným vlastnostem od druhů klasických. Onemocnění způsobená těmito mykobakteriemi se nazývají mykobakteriózy. Mezi klinicky významné druhy patří *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium kansasii* a další.⁴

1.3. Klinický obraz

Zdrojem tuberkulózní nákazy je zejména infikovaná osoba. K přenosu dochází nejčastěji kapénkově a dýchací trakt je nejčastější branou vstupu infekce, ovšem možný je i přenos při kontaktu s infikovanými předměty. Tato cesta přenosu je zvláště nebezpečná u lidí pracujících s infekčním materiálem. Méně častá je pak cesta přenosu z infikovaného zvířete.⁵

Infekce může probíhat dvěma formami, a to klinicky manifestní, anebo latentní (spící) formou. Nemocných s manifestní formou vůči infikovaným s latentní formou je méně než 10 %. Manifestní TB je aktivní forma onemocnění, dělí se dále na primární a sekundární.

Primární TB je často bezpříznaková a probíhá nejčastěji v dětství, méně pak v dospělosti. Inkubační doba je dlouhá, 2 týdny až 4 roky. Mykobakterie jsou po pomnožení fagocytovány makrofágy v plicích a dochází k tvorbě typického zánětlivého ložiska – tuberkulózního uzlíku – jediná známka po proběhlé primární TB. Bakterie jsou buď zcela eliminovány, nebo zůstávají ve spící formě. U osob po proběhlé primární infekci se může vytvořit buněčná imunita zprostředkovaná paměťovými T-lymfocyty, která se zkouší reakcí na tuberkulin – tuberkulinovým testem. Asi u 5 % nakažených dochází během prvních dvou let po proběhlé primární TB k reaktivaci a propuká sekundární infekce. Dalších 5 % onemocní po dlouhém období latence, i desítkách let, v průběhu života.⁶

Sekundární TB probíhá prakticky výhradně u dospělých. Dochází k erozi plicní tkáně a následně hemoptyse, dále se manifestuje zejména dlouhotrvajícím kašlem s produkcí hlenohnisu, pokašláváním, zvýšenou teplotou, únavou, nechutenstvím, hubnutím.^{4,5,7}

Osoby s latentní formou TB (LTBI), ač jsou infikováni *M. tuberculosis*, nevykazují žádné symptomy onemocnění. Jediným znakem přítomné infekce je pozitivní tuberkulinový test na kůži nebo test krve. Osoby s latentní formou TB nejsou infekční, a tedy nešíří infekci mezi ostatní. Přibližně třetina světové populace má latentní formu TB. Jak bylo uvedeno, latentní forma může přejít do akutní sekundární infekce. Příčiny reaktivace nejsou přesně zcela známy, ale dochází k ní zejména u pacientů při oslabení imunity, např. ve stáří, při infekci HIV, při diabetes mellitus, alkoholismu, malnutrici či onemocnění jater. Nejrizikovější skupinou jsou pacienti s HIV, výskyt TB je zde 26 až 31krát vyšší než u pacientů bez HIV.^{6,8}

1.4. Terapie

Díky zavedení antituberkulotik se dříve využívaná chirurgická léčba aktivní formy TB dnes téměř nepoužívá.⁴ Farmakoterapie TB je založena na podávání antituberkuloticky působících látek v určitém režimu. Mezi základní antituberkulotika patří isoniazid (INH, H), rifampicin (RMP, R), pyrazinamid (PZA, Z), ethambutol (EMB, E) a streptomycin (STM, S). V případech selhání terapie založené na léčivech první volby se přechází na rezervní antituberkulotika, tedy fluorochinolony (levofloxacin, moxifloxacin, ofloxacin), *p*-aminosalicylovou kyselinu, amikacin, kanamycin a další.^{4,9}

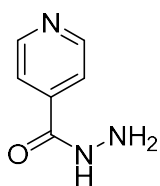
Dříve doporučované schéma vypracované WHO založené na podávání čtyřkombinace isoniazid, rifampicin, pyrazinamid a ethambutol po dobu dvou měsíců a následném podávání dvojkombinace isoniazidu a ethambutolu po dobu šesti měsíců bylo přehodnoceno a upraveno na schéma, kde je rifampicin podáván po dobu 6 měsíců – čtyřkombinace (HRZE) po dobu dvou měsíců a následně čtyři měsíce dvojkombinace (HR). Tato změna vede ke snížení počtu relapsů léčby a počtu recidiv.⁹

1.4.1. Základní antituberkulotika

1.4.1.1. Isoniazid

Isoniazid (Obrázek 1) je chemicky hydrazid kyseliny isonikotinové. První syntéza proběhla již roku 1912, ovšem používat se začal až v roce 1952. Vysoký účinek molekuly

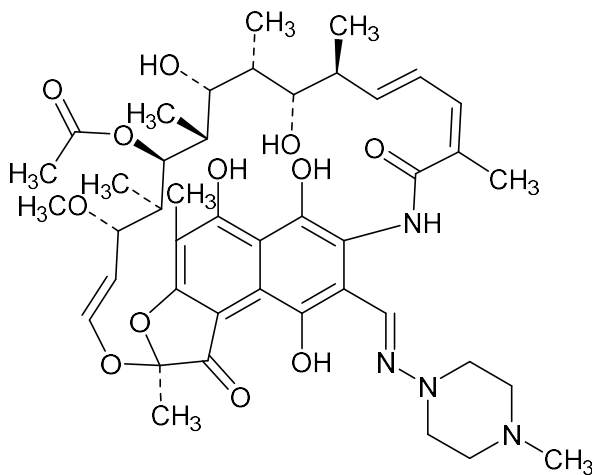
vzbudil zájem o skupinu hydrazidů, ovšem žádná z modifikovaných struktur isoniazid dosud nepřekonal. Funguje jako prolečivo, které po přeměně na aktivní derivát působí baktericidně. V organismu je oxidován na aktivní metabolity pomocí enzymu katalasy-peroxidasy. Mechanismus účinku spočívá v inhibici enzymu InhA (enoyl-ACP reductáza v komplexu FAS), což vede v konečném důsledku k útlumu syntézy mastných kyselin včetně mykolových kyselin. Podává se perorálně v dávkování 5 mg/kg u dospělého, 10-20 mg/kg u dětí jednou denně.^{10,11}



Obrázek 1 Isoniazid

1.4.1.2. Rifampicin

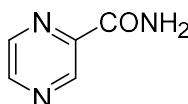
Rifampicin (Obrázek 2) je prvním terapeuticky využívaným léčivem ze skupiny ansamycinových antibiotik. Stejně jako isoniazid se začal používat v roce 1952. Dodnes patří k nejdůležitějším léčivům proti TB. Mechanismus účinku spočívá v inhibici DNA-dependentní RNA polymerasy v mykobakteriích. Podává se orálně či intravenózně v jednotlivé denní dávce 10 mg/kg. Ve světě jsou komerčně dostupné i fixní kombinace s ostatními antituberkulotiky.^{11,12}



Obrázek 2 Rifampicin

1.4.1.3. Pyrazinamid

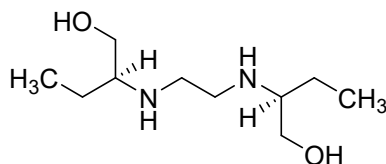
Pyrazinamid (Obrázek 3) je chemicky amid kyseliny pyrazin-2-karboxylové. V buňkách *M. tuberculosis* dochází k jeho metabolické přeměně pomocí enzymu nikotinamidasy/pyrazinamidasy. Pyrazinamid se metabolizuje na pyrazin-2-karboxylovou kyselinu, což je aktivní forma léčiva, účinná pouze v mírně kyselém prostředí.^{11,13} Mechanismus účinku není úplně přesně znám. Předpokládalo se, že hlavní cíl působení je syntasa mastných kyselin FAS I¹⁴, některá literatura tento mechanismus vyvrací¹⁵, jiné zdroje uvádí, že mechanismus je komplexní a zasahuje na úrovni produkce energie, trans-translace a dalších místech mykobakterií.¹⁶ Nejnovější poznatky ukazují, že mechanismus účinku spočívá také v inhibici aspartátdekarboxylázy.¹⁷ Užívá se perorálně jednou denně v dávce 20-25 mg/kg nebo třikrát týdně v dávce 50-70 mg/kg.¹³



Obrázek 3 Pyrazinamid

1.4.1.4. Ethambutol

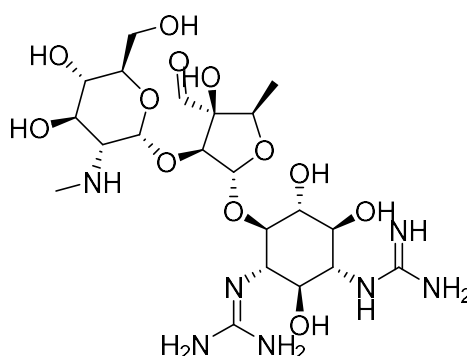
Jedná se o opticky aktivní sloučeninu typu aminoalkoholu (Obrázek 4) se dvěma izolovanými chirálními centry, účinná je pouze pravotočivá forma, (*S,S*)-(+)-izomer. Mechanismus účinku spočívá v inhibici arabinofuranosyltransferasy, která je nezbytná při tvorbě mykobakteriální stěny. Podání je perorální v dávce 15 mg/kg denně nebo 30 mg/kg třikrát týdně.^{11,18}



Obrázek 4 Ethambutol

1.4.1.5. Streptomycin

Streptomycin (Obrázek 5) patří do skupiny aminoglykosidových antibiotik, je produkován mikroorganismy *Streptomyces griseus*. Pro jeho silnější bazické vlastnosti se používá ve formě síranu, který je velmi dobře rozpustný ve vodě. Mechanismus účinku je založen na inhibici proteosyntézy bakteriálních buněk na 30S podjednotce ribozomu. Podává se intravenózně nebo intramuskulárně v dávce 1g denně.^{11,19}

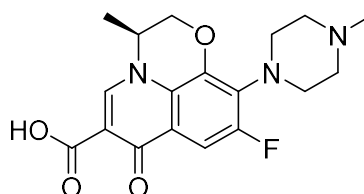


Obrázek 5 Streptomycin

1.4.2. Některá rezervní antituberkulotika

1.4.2.1. Ofloxacin a levofloxacin

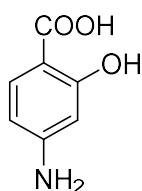
Ofloxacin patří do druhé generace (fluoro)chinolonových antibiotik. Je to chirální sloučenina, která se používá buď jako racemická směs (ofloxacin), nebo jako čistý (*S*)-(-)-enantiomer – levofloxacin (Obrázek 6). Mechanismus účinku odpovídá obecně chinolonům, tedy inhibice ATP-dependentních enzymů topoisomerázy II (DNA-gyrázy) a topoisomerázy IV. Aplikace je perorální v dávce 500-1000 mg denně.^{11,20}



Obrázek 6 Levofloxacin

1.4.2.2. Kyselina *p*-aminosalicylová

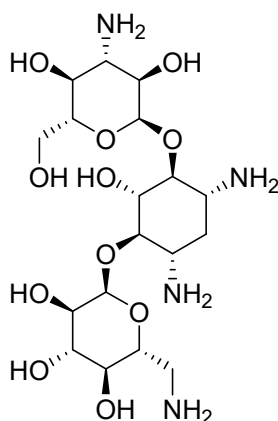
Kyselina *p*-aminosalicylová (Obrázek 7), jedno z nejstarších antituberkulotik, je látka velmi jednoduché struktury. Dříve se předpokládáno, že mechanismus účinku spočívá v chelataci iontů železa, a tedy zabránění jejich přenosu sideroforem mykobaktinem. Nejnovější stav poznání předpokládá, že mechanismus účinku spočívá v metabolické konverzi enzymy dihydrofolát reduktasou a dihydrofolát synthasou na antimetabolit hydroxyl-dihydrofolát, který zpětně inhibuje dihydrofolát reduktázu.²¹ Výhodou této látky je její jednoduchost a cena. Nevýhodou je nízká účinnost a s tím nutnost podávání enormních terapeutických dávek (denně 12-16 g) a dále vysoké riziko vzniku rezistence.^{11,22}



Obrázek 7 Kyselina *p*-aminosalicylová

1.4.2.3. Kanamycin

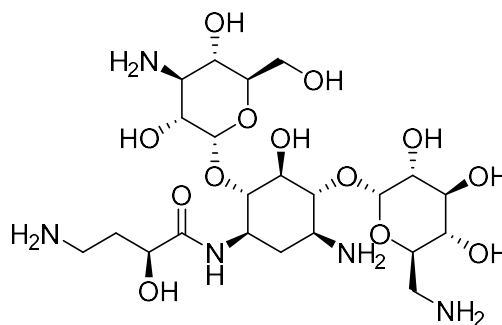
Kanamycin (Obrázek 8) patří, stejně jako streptomycin, do skupiny aminoglykosidových antibiotik. Poprvé byl izolován v roce 1957 ze *Streptomyces kanamyceticus*. Podobně jako streptomycin se pro své bazické vlastnosti používá ve formě síranu. Mechanismus je obdobný jako u ostatních aminoglykosidových antibiotik, viz streptomycin (1.4.1.5). Cesta podání je intravenózní nebo intramuskulární v dávce 1 g denně.^{11,23}



Obrázek 8 Kanamycin

1.4.2.4. Amikacin

Amikacin (Obrázek 9) je polosyntetický derivát kanamycinu. Úpravou molekuly kanamycinu se dosáhlo sterického bránění v místě zásahu inaktivujících bakteriálních enzymů. Výhodou je tedy delší biologický poločas a širší spektrum účinku, ovšem s nižší antibakteriální aktivitou, jsou tedy nutné vyšší dávky. Mechanismus účinku je stejný jako u ostatních aminoglykosidových antibiotik, viz streptomycin (1.4.1.5).^{11,24}

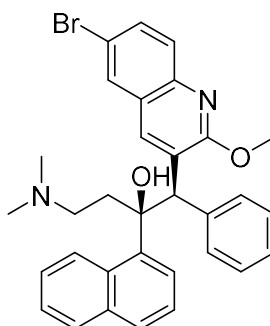


Obrázek 9 Amikacin

1.4.3 Nejnovější antituberkulotika

1.4.3.1 Bedachilin

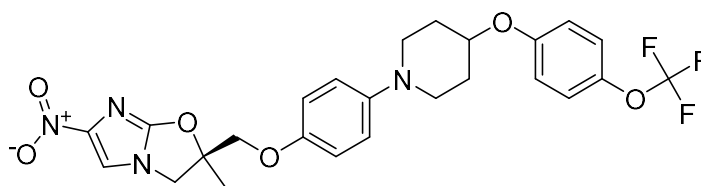
Bedachilin (Obrázek 10) je chemicky diarylchinolin, během testování byl označován jako TMC207. Mechanismus spočívá v inhibici podjednotky c protonové pumpy, tj. ATP-synthasy, což vede k zablokování syntézy ATP. Působí jak proti senzitivním, tak proti rezistentním kmenům *M. tuberculosis*. Je indikován do kombinované léčby při rezistentní formě TB. Doporučené dávkování je obvykle v režimu 4 tablety 1x denně po dobu prvních dvou týdnů, pak 2 tablety 3x týdně po dobu 22 týdnů.^{25,26,27}



Obrázek 10 Bedachilin

1.4.3.2 Delamanid

Delamanid (Obrázek 11) je chemicky derivát nitroimidazooxazolidinu. Při vývoji a testování nesl označení OPC-67683. Funguje jako proléčivo, kdy je metabolizován na aktivní metabolit nitroreduktázou. Aktivní forma inhibuje syntézu methoxy- a ketomykolových kyselin, důležitých komponent buněčné stěny mykobakterií. Je účinný jak proti senzitivním, tak proti rezistentním kmenům. Je indikován do kombinační léčby při rezistentní formě onemocnění.²⁸



Obrázek 11 Delamanid

1.5. Prevence

Prevence v České republice je prováděna ve smyslu vakcinace novorozenců a léčby LTBI u infikovaných s rizikem rozvoje manifestní TB. Plošné očkování bylo ukončeno 1. 11. 2010. Od této doby jsou očkovaní pouze novorozenci s vysokým rizikem vzniku a rozvoje infekce. Jako rizikový se novorozenec chápe v situaci, kdy jeden nebo oba z rodičů nebo sourozenec nebo člen domácnosti má aktivní formu onemocnění, dále když dítě nebo člen domácnosti se narodil/o nebo soustavně pobýval/o na území s výskytem TB větším, než 40/100 000 obyvatel, dále pak když bylo dítě v kontaktu s nemocným s TB. V těchto případech je očkování hrazeno ze zdravotního pojištění. V ostatních případech, kdy zákonný zástupce dítěte požádá o jeho očkování, hradí náklady v plné výši očkování sám. K imunizaci se používá vakcína BCG, což je oslabený živý kmen *Mycobacterium bovis*. Ovšem ani očkování nezaručí stoprocentní ochranu proti TB.^{5,29,30}

1.6. Rezistence

Rostoucí množství rezistentních kmenů *M. tuberculosis* je v poslední době velmi závažným problémem. Multilékově rezistentní tuberkulóza (multidrug-resistant tuberculosis – MDR-TB) je odolná vůči dvěma nejúčinnějším antituberkulotikům první volby isoniazidu a rifampicinu. Prognosticky závažnější typ rezistence je extenzivně rezistentní tuberkulóza (XDR-TB) necitlivá vůči isoniazidu a rifampicinu, dále vůči jakémukoliv fluorochinolonu a

jednomu ze tří injekčních léčiv druhé volby (amikacin, kanamycin, kapreomycin).^{31,32} Hlavním nebezpečím tohoto typu infekce je jeho velmi málo efektivní léčba, daná i nízkou adharencí k léčbě ze strany pacienta – nutnost podávání více potentních léčiv s sebou nese zvýšené množství nežádoucích účinků. Úspěšnost léčby u XDR-TB je nízká, často je neléčitelná. V roce 2014 bylo 480 000 nových případů MDR-TB. Z toho zachyceno a ohlášeno bylo 123 000 případů, tedy přibližně čtvrtina. XDR-TB je poměrně vzácná, nicméně do konce roku 2015 byl ve 105 zemích hlášen výskyt alespoň jednoho případu XDR-TB, ve 14 z těchto zemí pak bylo hlášeno 10 a více případů této rezistentní formy. Přibližně 9 % pacientů s MDR-TB má XDR-TB.^{32,33}

Dalším typem tuberkulózy je TDR-TB (totally drug-resistant TB), občas se označuje jako XXDR-TB (extremely drug-resistant TB). Tento typ tuberkulózy je rezistentní vůči všem léčivům první i druhé řady. To z tohoto typu TB dělá prakticky neléčitelné onemocnění. Výskyt není běžný, celosvětově v jednotkách za posledních 10 let, nicméně prognosticky je tato forma extrémně závažná.^{34,35}

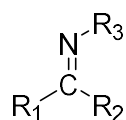
Mechanismus vzniku rezistence spočívá ve změně cílových míst, v jejich nadprodukci, v přítomnosti efluxních transportérů, ve zvýšeném metabolismu léčiva. Do jisté míry přispívá k primární rezistenci zvláštní stavba buněčné stěny mykobakterií, pro vysoký obsah mykolových kyselin je stěna značně lipofilní a tvoří špatně propustnou bariéru. Sekundární rezistence vychází zejména ze selekce přirozeně se vyskytujících rezistentních zmutovaných kmenů.^{31,36}

Tuberkulóza je v kontextu počtu nemocných, ročně umírajících, počtu osob s latentní formou a rizikem rozvoje akutní infekce tedy velmi aktuálním a vážným problémem trápící celé lidstvo. Postupný nárůst rezistence žádá intenzivní vývoj nových léčiv působících na odlišných místech a jiným mechanismem, léčiv s nižší toxicitou a vyšší účinností.

2. Schiffovy báze

2.1. Obecně o Schiffových bázích

Schiffovy báze, sloučeniny pojmenovány po německém chemikovi Hugo Schiffovi, byly tímto chemikem poprvé syntetizovány v roce 1864. Podle IUPAC Gold Book jsou definovány jako *N*-substituované iminové deriváty (Obrázek 12), strukturně vycházející z ketonů a aldehydů, kdy je karbonylová skupina nahrazena imino- neboli azomethinovou skupinou $R_2-C=N-R'$ ($R' \neq H$).^{37,38,39} Hlavní cestou přípravy je kondenzace primárního aminu s aldehydem nebo ketonem při specifických podmínkách, podrobněji viz kapitola (2.2).⁴⁰ Využití těchto látek je široké jak v technické praxi, jako například katalyzátory⁴¹, analytická činidla k chelataci iontů kovů⁴², meziprodukty organických syntéz⁴³, tak i v oblasti medicíny pro jejich biologickou aktivitu, podrobněji v kapitole (2.3).

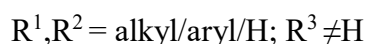
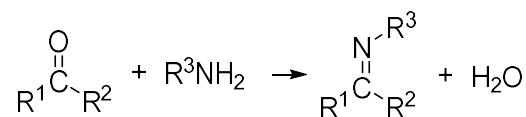


Obrázek 12 Obecná struktura Schiffovy báze

2.2. Příprava Schiffových bází

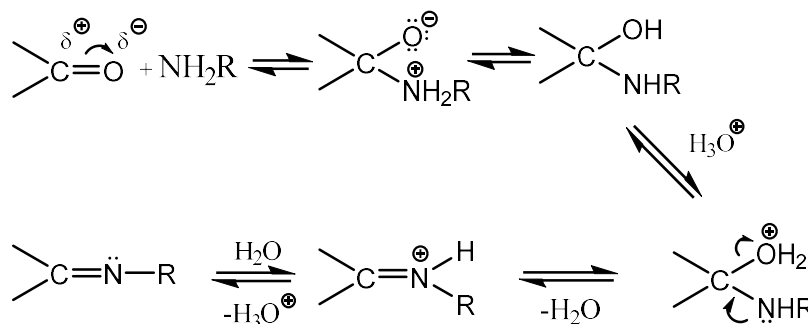
2.2.1. Kondenzace aminu s ketonem (aldehydem)

Příprava Schiffových bází se nejčastěji provádí kondenzací aldehydu (respektive ketonu) a primárního aminu za eliminace molekuly vody (Reakční schéma 1). Tato reakce může být urychlena přidáním kyselých katalyzátorů a zahříváním reakční směsi. Mezi nejpoužívanější katalyzátory patří silné minerální kyseliny jako kyselina sírová nebo kyselina chlorovodíková, organické kyseliny jako například *p*-toluensulfonová kyselina nebo pyridinium *p*-toluensulfonát, dále pak Lewisovy kyseliny jako $ZnCl_2$, $TiCl_4$.⁴⁴ Dále mohou být podmínky upraveny ve smyslu různého dodání energie reakci. V praxi se používá infračervené a mikrovlnné záření a ultrazvuk.⁴⁵



Reakční schéma 1 Obecná rovnice vzniku Schiffovy báze

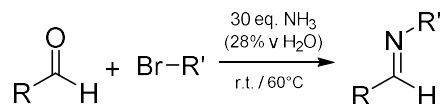
Princip reakce spočívá v adičně-eliminačním mechanismu (Reakční schéma 2). Karbonylová skupina je skupinou polární, kdy elektronegativní kyslík k sobě přitahuje vazebné elektrony násobné vazby, tím se stává částečně záporně nabitým, atom uhlíku pak nese parciální kladný náboj a má tedy elektrofilní charakter a váže nukleofilní činidla. Primární amin svým nukleofilním charakterem napadá parciálně kladně nabité místo a dává reakci s karbonylovým uhlíkem. Jak již bylo uvedeno, reaktivitu karbonylu je možné zvýšit kyselým prostředím. Reakce je ovšem citlivá na pH, pokud je příliš nízké, dochází k protonizaci aminu, čímž se ztrácí jeho nukleofilní charakter.⁴⁶ Jak je možno vidět z reakčního mechanismu, reakce je vratná a voda může podporovat hydrolýzu na výchozí látku, proto se používají metody k odstranění vody během reakce, zejména použití molekulových sít⁴⁷, dále pak dehydratačních činidel jako síran sodný, tetramethyl-orthosilikát (tetramethoxysilan), či triethyl-orthoformiát (1,1,1-triethoxymethan)^{48,49}. V případě že *N*-substituent je alifatického charakteru, výsledné produkty snadno polymerizují, případně dávají aldolové kondenzační produkty. V případě aromatického charakteru substituentu jsou produkty stálejší.⁴⁶



Reakční schéma 2 Mechanismus reakce – kondenzace vedoucí ke vzniku Schiffovy báze

2.2.2. Reakce aromatických aldehydů s alkylbromidy a roztokem amoniaku

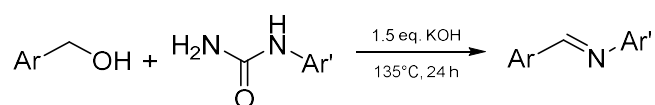
Reakcí aromatických aldehydu s alkylbromidy a vodným roztokem amoniaku jako zdrojem dusíku lze připravit Schiffovy báze (Reakční schéma 3).⁵⁰



Reakční schéma 3 Reakce aromatických aldehydů s alkylbromidy a roztokem amoniaku

2.2.3. Zásadou katalyzovaná syntéza Schiffových bází z alkoholu a N-arylmočoviny

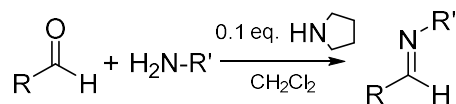
Vedle konvenčních metod je možné použít zásadou katalyzovanou syntézu bez použití rozpouštědel, za přístupu vzduchu (Reakční schéma 4), dávající dobré výtěžky.⁵¹



Reakční schéma 4 Zásadou katalyzovaná syntéza Schiffových bází z alkoholu a N-arylmočoviny

2.2.4. Použití pyrrolidinu jako organokatalyzátoru

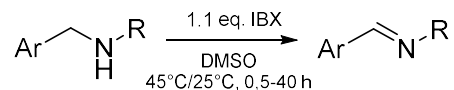
Pyrrolidin jako organokatalyzátor usnadňuje reakci mezi aldehydem a látkou s aminoskupinou (Reakční schéma 5). Jako nukleofilní katalyzátor umožňuje reakci bez použití kyselin nebo kovů. Metoda může být použita k syntéze N-sulfinyl, N-sulfonyl, N-alkyl a N-aryl iminů, tedy i Schiffových bází.⁵²



Reakční schéma 5 Použití pyrrolidinu jako organokatalyzátoru

2.2.5. Oxidace sekundárního aminu pomocí IBX

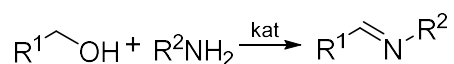
Schiffovy báze se dají připravit ze sekundárních aminů oxidací pomocí IBX (2-iodoxybenzoová kyselina) (Reakční schéma 6).⁵³



Reakční schéma 6 Oxidace sekundárního aminu pomocí IBX

2.2.6. Oxidační syntéza z alkoholu a aminu

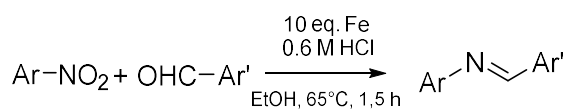
Aldehydy a ketony jsou často připravovány oxidací odpovídajících alkoholů oxidačním procesem, toho se dá využít při syntéze iminů z aminů a alkoholů, za použití oxidačních katalyzátorů (Reakční schéma 7).⁵⁴



Reakční schéma 7 Oxidační syntéza iminů z aminů a alkoholů

2.2.7. Redukční syntéza z nitroarenů a benzaldehydů

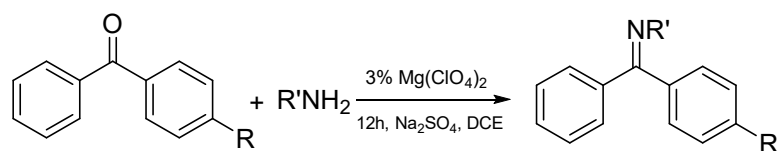
Příprava Schiffových bází redukční syntézou z nitroarenů a benzaldehydů se provádí v přítomnosti práškového železa a zředěné kyseliny (Reakční schéma 8).⁵⁵



Reakční schéma 8 Redukční syntéza z nitroarenů a benzaldehydů

2.2.8. Syntéza využívající chloristan hořečnatý

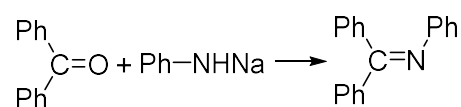
Chloristan hořečnatý byl použitý jako efektivní katalyzátor při syntéze prochirálních iminů z asymetrických aromatických ketonů. Pro zvýšení reaktivity bylo použito zahřívání pod zpětným chladičem za teploty varu rozpouštědla a sušícího média pro odstranění vody (Reakční schéma 9). Nejvhodnější rozpouštědlo je dichlorethan, autor neuvádí, který izomer.⁵⁶



Reakční schéma 9 Syntéza prochirálních Schiffových bází za katalýzy chloristanem hořečnatým

2.2.9. Reakce amidů alkalických kovů

Adiční reakce mezi amidy alkalických kovů a aromatickými ketony vede k přípravě *N*-substituovaných ketiminů (Reakční schéma 10).⁴⁴



Reakční schéma 10 Reakce amidů alkalických kovů s aromatickými ketony

2.3. Farmakologické účinky

Schiffovy báze jsou v oblasti medicíny a farmacie důležitou a intenzivně studovanou skupinou látek pro jejich širokou biologickou aktivitu, zejména pak antibakteriální⁵⁷, antifungální⁵⁷, antimalarické⁵⁸, antiproliferativní⁵⁹, protizánětlivé⁶⁰, analgetické⁶⁰ a antimykobakteriální účinky.^{61,62}

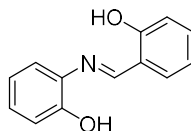
Bylo prokázáno, že pro účinnost těchto sloučenin je nutná přítomnost iminové vazby, mechanismy účinku se u jednotlivých typů sloučenin liší, vztah mezi strukturou a aktivitou (SAR – structure-activity relationship) nebyl ještě podrobně prozkoumán.⁶³

Dále budou v textu podrobněji shrnuty pouze antibakteriální a antifungální účinky různých Schiffových bází, z důvodu předpokládané antibakteriální a antifungální aktivity připravovaných látek v experimentální části práce.

2.3.1. Antibakteriální a antifungální účinky

Rostoucí úmrtnost na infekční onemocnění přímo souvisí s rostoucím výskytem bakterií, které vykazují vysokou rezistenci vůči zavedeným antibiotikům. Vývoj nových účinných antibakteriálních látek s odlišnými mechanismy účinku je tedy akutní a závažná problematika.⁶⁴

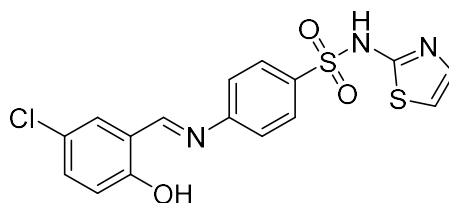
Schiffovy báze jsou velmi širokou skupinou látek vykazující slibnou antibakteriální aktivitu. De Souza a kolektiv⁶¹ syntetizovali a otestovali antimikrobiální aktivitu například (*E*)-2-[(2-hydroxybenzyliden)amino]fenolu (Obrázek 13), který vykazuje vysokou aktivitu proti *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv (MIC – minimální inhibiční koncentrace 8 µg/ml).



Obrázek 13 (*E*)-2-[(2-Hydroxybenzyliden)amino]fenol

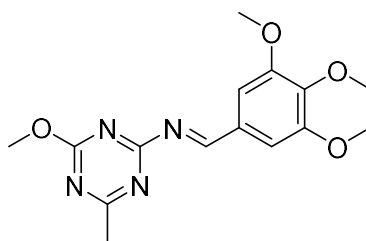
Krátký a kolektiv⁶⁵ syntetizovali a následně testovali Schiffovy báze připravené ze čtyř sulfonamidů (sulfamethoxazol, sulfadiazin, sulfathiazol, sulfamethazin) a 5-chlor-2-

hydroxybenzaldehydu. Připravené látky byly testovány proti Gram-pozitivním bakteriím *Staphylococcus aureus*, methicilin-resistentnímu kmeni *S. aureus* (MRSA), Gram-negativním bakteriím, *M. tuberculosis* 331/88, *M. avium* 330/88, *M. kansasii* 235/80 a *M. kansasii* 6509/96. Nejvyšší aktivitu proti mykobakteriím (MIC 32-62,5 $\mu\text{mol/l}$) a velmi dobrou proti Gram-pozitivním bakteriím (31.25 $\mu\text{mol/l}$) vykazoval derivát sulfathiazolu (*E*)-4-[(5-chlor-2-hydroxybenzyliden)amino]-*N*-(thiazol-2-yl)benzensulfonamid (Obrázek 14).



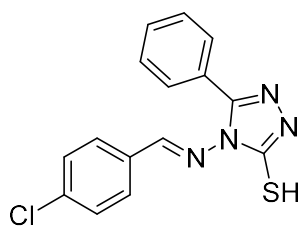
Obrázek 14 (*E*)-4-[(5-Chlor-2-hydroxybenzyliden)amino]-*N*-(thiazol-2-yl)benzensulfonamid

Avupati a kolektiv⁶⁶ se zabývali syntézou a biologickým testováním nových Schiffových bazí odvozených od 1,3,5-triazinu. Připravené látky testovali na biologickou aktivitu proti *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv. 4-Methoxy-6-methyl-*N*-(3,4,5-trimethoxybenzyliden)-1,3,5-triazin-2-amin (Obrázek 15) byl nejúčinnější sloučeninou s MIC 3,125 $\mu\text{g/ml}$.



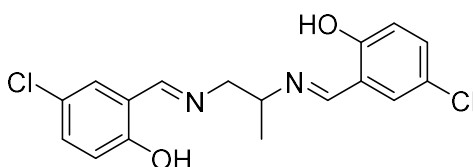
Obrázek 15 4-Methoxy-6-methyl-*N*-(3,4,5-trimethoxybenzyliden)-1,3,5-triazin-2-amin

Gupta a Jain⁶⁷ testovali biologickou aktivitu nově připravených 1,2,4-triazolových derivátů. Testovány byly na houbách *Candida albicans*, *Aspergillus niger* a *Microsporium gypseum* a na bakteriích *Escherichia coli* a *S. aureus*. Nejvyšší aktivitu vykazovala látka 4-[(4-chlorbenzyliden)amino]-5-fenyl-4*H*-1,2,4-triazol-3-thiol (Obrázek 16) s MIC proti *S. aureus* a *M. gypseum* ve shodných hodnotách 6,25 $\mu\text{g/ml}$.



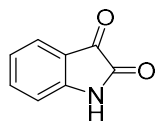
Obrázek 16 4-[(4-Chlorbenzyliden)amino]-5-fenyl-4H-1,2,4-triazol-3-thiol

Shi a kolektiv⁶⁸ připravili sérii látek vzniklých kondenzací 5-chlorsalicylaldehydu a 26 různě substituovaných primárních aminů. Antimikrobiální aktivita byla testována proti dvěma Gram-negativním bakteriím (*Pseudomonas fluorescence*, *E. coli*) a dvěma Gram-positivním bakteriím- *Bacillus subtilis* a *S. aureus*. Jednotlivé látky vykazovaly vůči kmenům různou účinnost inhibice růstu. Nejpotentnějším derivátem byl 2,2'-{(1*E*,1'*E*)-[propan-1,2-diylbis(azanylyliden)]bis(methanylyliden)}bis(4-chlorfenol) (Obrázek 17): MIC vůči *B. subtilis* 1,8 µg/ml, vůči *E. coli* 4,9 µg/ml a vůči *P. fluorescence* 3,6 µg/ml.

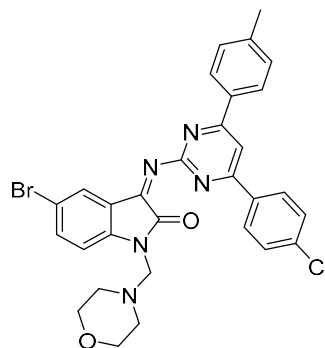


Obrázek 17 2,2'-{(1*E*,1'*E*)-[Propan-1,2-diylbis(azanylyliden)]bis(methanylyliden)}bis(4-chlorfenol)

Pandeya a kolektiv⁶⁹ testovali Schiffovy baze připravené z isatinu (Obrázek 18) na 28 klinicky významných bakteriích. Derivát s nejvyšší aktivitou byl (*Z*)-5-brom-3-{[4-(4-chlorfenyl)-6-(*p*-tolyl)pyrimidin-2-yl]imino}-1-(morfolinmethyl)indolin-2-on (Obrázek 19) účinný vůči *E. coli* NCTC 10418 (MIC 2,4 µg/ml), *Vibrio cholerae* (0,3 µg/ml), *Enterococcus faecalis* (1,2 µg/ml), *Proteus shigelloides* (4,9 µg/ml). Pro porovnání, MIC referenčního sulfamethoxazolu je v rozmezí 312-5000 µg/ml.

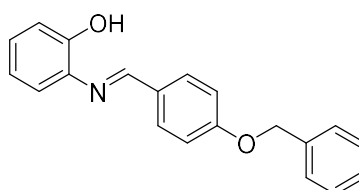


Obrázek 18 Isatin



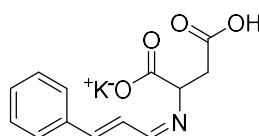
Obrázek 19 (*Z*)-5-Brom-3-{[4-(4-chlorfenyl)-6-(*p*-tolyl)pyrimidin-2-yl]imino}-1-(morfolinmethyl)indolin-2-on

Aysenem a kolektivem⁷⁰ byly syntetizovány a testovány deriváty 4-benzyloxybenzaldehydu s 2-aminofenolem a 2-aminopyridinem. Látky vykazovaly slabší antimikrobiální aktivitu oproti standardu cefazolinu. Nejvyšší biologickou aktivitu vykazoval derivát (*E*)-2-{{4-(benzyloxy)benzyliden}amino}fenol (Obrázek 20). Aktivita se testovala proti *Bacillus cereus* RSKK (1122), *E. coli* RSKK (340), *B. subtilis* RSKK (246), *Streptococcus mutans* RSKK (676) a *S. aureus* RSKK (96090). MIC byly stanoveny v rozmezí 62,5-250 µg/ml.



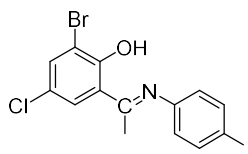
Obrázek 20 (*E*)-2-{{4-(Benzyloxy)benzyliden}amino}fenol

Wang a kolektiv⁷¹ se zabývali syntézou a biologickou aktivitou Schiffových bazí cinnamaldehydu a aminokyselin. Testovány byly proti kmenům hub *A. niger* a *Penicillium citrinum* a bakterií *E. coli* a *S. aureus*. V porovnání s flukonazolem velmi dobrou antifungální aktivitu vykazovala látka 2-{{(1*Z*,2*E*)-3-fenylallyliden}amino}-3-karboxy-propanoát draselný (Obrázek 21).



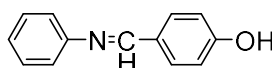
Obrázek 21 2-{{(1*Z*,2*E*)-3-Fenylallyliden}amino}-3-karboxy-propanoát draselný

Karmunge a kolektiv⁵⁷ nasyntetizovali a otestovali Schiffovy báze odvozené od halogenhydroxyacetofenonu a 4-jodanilinu, 4-chloranilinu a 4-methylanilinu. Antimikrobiální aktivita byla testována proti bakteriím (*E. coli*, *Salmonella typhi*, *S. aureus* a *B. subtilis*) a houbám (*A. niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Fusarium moniliforme* a *Aspergillus flavus*). Jako standardy pro porovnání byly použity penicilin a griseofulvin. Testované látky vykazovaly mírnou antimikrobiální aktivitu. Nejaktivnější byl (*E*)-2-brom-4-chlor-6-{{1-[(4-jodfenyl)imino]ethyl}fenol (Obrázek 22).



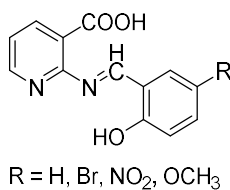
Obrázek 22 (E)-2-Brom-4-chlor-6-{1-[(4-jodfenylo)imino]ethyl}fenol

Tantaru a kolektiv⁶³ popsali antimikrobiální aktivitu Schiffových bází připravených kondenzací anilinu s různě substituovanými benzaldehydy. Testování bylo provedeno proti kmenům *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 a *C. albicans* ATCC 10231. 4-[(Fenylimino)methyl]fenol (Obrázek 23) vykazoval nejvyšší antimikrobiální aktivitu srovnatelnou s ampicilinem vůči *E. coli*, respektive nystatinem vůči *C. albicans*.

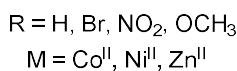
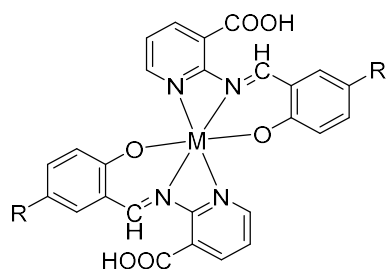


Obrázek 23 4-[(Fenylimino)methyl]fenol

Předmětem zájmu jsou v poslední době i koordinační komplexy Schiffových bází. Jejich přípravou a studiem antimikrobiální aktivity se zabývá mnoho prací, některé navíc srovnávají biologickou aktivitu s volnými (nekomplexovanými) Schiffovými bázemi. Chohan a kolektiv⁷² připravili, otestovali a porovnali Schiffovy báze odvozené od nikotinové kyseliny (Obrázek 24) a jejich komplexy s ionty kovů – Ni^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} (Obrázek 25). Jako standard sloužil sulfadiazin a sulfathiazol. Komplexy Schiffových bází vykazovaly 64-100% účinnost vůči standardu a 2-3x vyšší aktivitu než volné formy.

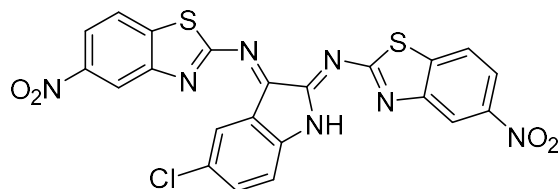


Obrázek 24 Volná forma Schiffovy báze odvozené od kyseliny 2-aminonikotinové

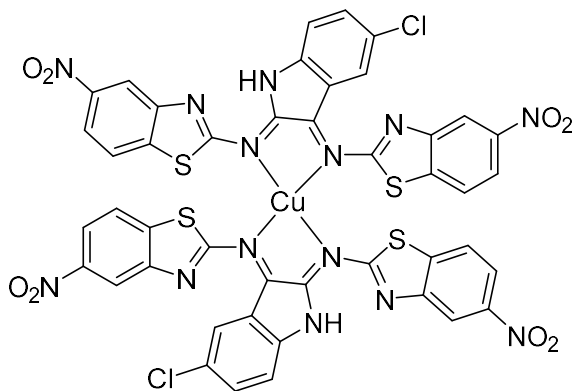


Obrázek 25 Komplex Schiffovy báze odvozené od kyseliny 2-aminonikotinové

Shakir a kolektiv⁷³ se zabývali Schiffovými bázemi připravenými z 5-chlorisatinu a 5-nitro-2-amino(benzo)thiazolu (Obrázek 26) a jejich komplexy s měďnatými a zinečnatými ionty. Testování se provádělo proti Gram-negativním (*E. coli*, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa* a *Vibrio cholerae*) a Gram-pozitivním kmenům (*S. aureus* a *Listeria monocytogenes*). Volné formy Schiffových bází nevykazovaly příliš přesvědčivou antimikrobiální aktivitu, komplexy už ovšem aktivitu poměrně vysokou. Velmi slibnou aktivitu do jisté míry srovnatelnou se standardem ciprofloxacinem vykazoval měďnatý komplex (2*Z*,3*E*)-5-chlor-*N*²,*N*³-bis(5-nitrobenzo[*d*]thiazol-2-yl)indolin-2,3-diiminu (Obrázek 27).

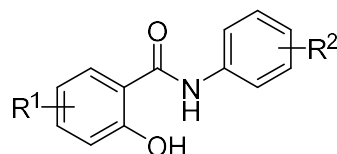


Obrázek 26 (2*Z*,3*E*)-5-Chlor-*N*²,*N*³-bis(5-nitrobenzo[*d*]thiazol-2-yl)indolin-2,3-diimin



Obrázek 27 Cu^{II} komplex (2*Z*,3*E*)-5-chlor-*N*²,*N*³-bis(5-nitrobenzo[*d*]thiazol-2-yl)indolin-2,3-diiminu

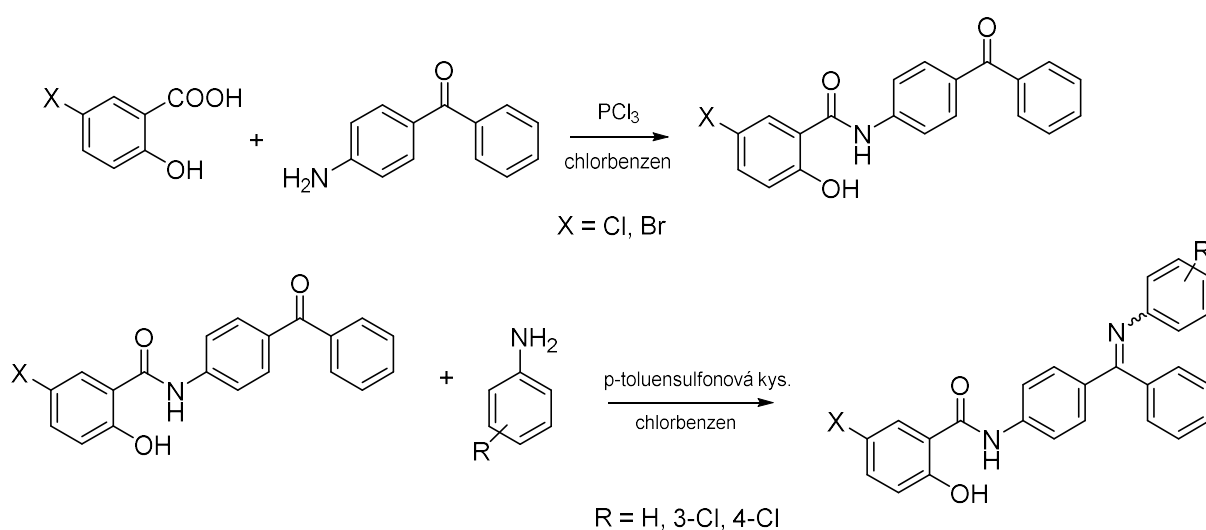
Salicylanilidy jsou látky vykazující významnou antibakteriální (i antimykobakteriální) a antifungální aktivitu. Chemicky to jsou amidy kyseliny salicylové a anilinu (Obrázek 28). Skupina prof. J. Vinšové se dlouhodobě zabývá studiem těchto látek.^{65,74,75,76} Spojením fragmentu salicylanilidu a Schiffovy báze by potenciálně mohla vzniknout látka s vystupňovanou antibakteriální a antifungální aktivitou.



Obrázek 28 Obecná struktura salicylanilidů

3. Cíl práce

Cílem této práce je syntéza Schiffových bází (Reakční schéma 11) vycházejících z kyseliny salicylové jako potenciálně antimikrobiálně působících látek. Navazuje tak na snahu prozkoumání antimikrobiální aktivity derivátů kyseliny salicylové skupinou prof. J. Vinšové. Cílové látky strukturně vycházejí ze dříve připravených a charakterizovaných salicylanilidů se slibnou antibakteriální aktivitou⁷⁷. Hlavním cílem je příprava derivátů s vystupňovanou aktivitou vzniklých zakomponováním dvou částí s antimikrobiální aktivitou do jedné molekuly – salicylanilidový fragment a část obsahující Schiffovu bázi.



Reakční schéma 11 Schéma dvoukrokové přípravy Schiffových bází

4. Experimentální část

4.1. Obecná část

Při syntézách byly použity komerčně dostupné chemické látky a rozpouštědla firem Sigma-Aldrich a Penta Chemicals. Přečištění před použitím nebylo většinou provedeno, pouze nesubstituovaný anilin byl před použitím přečištěn destilací.

K monitorování průběhu syntéz sloužila tenkovrstvá chromatografie. Jako stacionární fáze sloužily destičky s 0,2 mm vrstvou silikagelu 60F254 od firmy Merck. Mobilní fáze se používaly různé v závislosti na charakteru látky. Při prvním kroku syntézy – přípravě salicylanilidů se používala soustava toluen:ethyl-acetát 4:1, při syntéze Schiffových bazí byla vyhodnocena jako nejlepší a následně pak používána soustava hexan:ethyl-acetát 6:1. Detekce se prováděla pod UV při vlnových délkách 254 a 366 nm.

Teplota tání (T_t) byla měřena v otevřené kapiláře v přístroji BÜCHI melting point B-540 bez další korekce.

IR spektra byla měřena pomocí metody ATR (attenuated total reflectance) spektrofotometrem Nicolet 6700 FT-IR v rozmezí 400-4000 cm^{-1} . Měření zajišťovala Katedra anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové Univerzity Karlovy, paní Iva Vencovská.

NMR spektra byla měřena na přístroji Varian VNMRS500 při laboratorní teplotě. Hodnoty chemického posunu δ [ppm] v ^1H spektrech jsou vztaženy k tetramethylsilanu jako vnitřnímu standardu. Uhlíkové posuny byly stanoveny podle centrální linie signálu rozpouštědla. Používaná rozpouštědla byla variabilní, v závislosti na charakteru látky (DMSO- d_6 , THF- d_8) Interakční konstanta J je uvedena v Hz. Měření opět zajišťovala Katedra anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové Univerzity Karlovy, konkrétně doc. PharmDr. Jiří Kuneš, CSc.

Čistota připravených látek byla chromatografická (TLC), ověřená pomocí NMR spektroskopie a teploty tání.

Při některých syntézách byl používán mikrovlnný reaktor MicroSYNTH Milestone 530W na Katedře anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové Univerzity Karlovy.

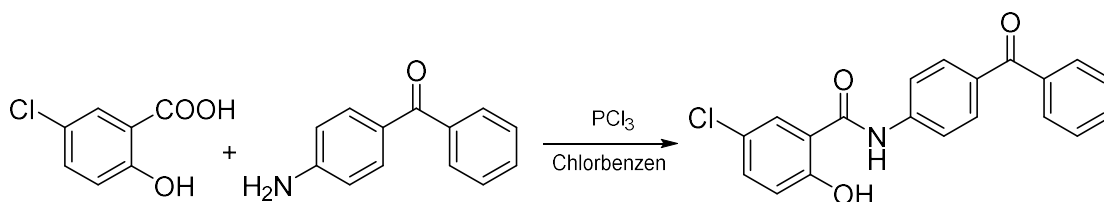
Názvy sloučenin byly generovány programem ChemDraw Professional 15.1 a následně přeloženy podle pravidel českého chemického názvosloví. Pro tvorbu chemických vzorců, reakčních schémat a výpočtu $\log P$ byl použit tentýž program.

4.2. Praktická část

4.2.1. Příprava salicylanilidů

Příprava salicylanilidů, které sloužily jako meziprodukt, byla popsána v publikaci⁷⁷. K získání těchto látek byl postup opakován. Všechny tyto syntetizované sloučeniny byly plně charakterizovány v publikaci^{77,78}

4.2.1.1. *N*-(4-Benzoylfenyl)-5-chlor-2-hydroxybenzamid



Reakční schéma 12 Příprava *N*-(4-benzoylfenyl)-5-chlor-2-hydroxybenzamidů

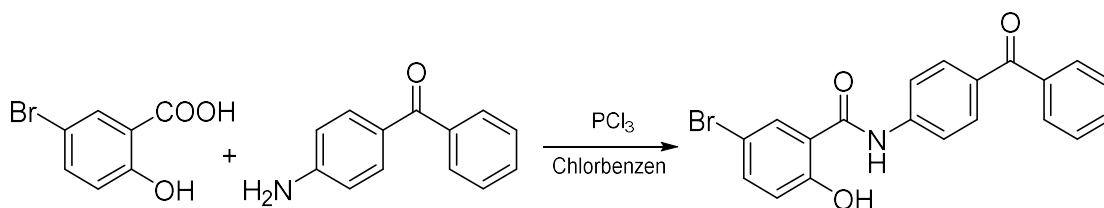
10 mmol (1,72 g) 5-Chlorsalicylové kyseliny bylo suspendováno ve 100 ml chlorbenzenu, přidán 4-aminobenzofenon (10 mmol; 1,97 g) a 0,5 ekvivalentu PCl_3 (0,69 g, 0,44 ml). Reakce probíhala v mikrovlnném reaktoru (530 W) za teploty varu rozpouštědla po dobu 22 min. Ještě horká směs byla zfiltrována a filtrát byl uložen na 12 hodin při +4 °C. Vyloučené krystaly byly zfiltrovány a filtrát zahuštěn na polovinu. Krystaly vyloučené při zahušťování se opět zfiltrovaly. Jednotlivé frakce krystalů byly spojeny a rekrystalizovány z ethanolu. Výtěžek reakce byl 1,49 a 1,19 g *N*-(4-benzoylfenyl)-5-chlor-2-hydroxybenzamidů, tj. 42 a 34 %.

Tento postup byl jednou modifikován, kdy nebylo použito mikrovlnného reaktoru, nýbrž reakce probíhala za varu rozpouštědla pod zpětným chladičem po dobu 7 hodin. Výtěžek byl 27 %.

$$T_{\text{t}}(\textit{N}\text{-}(4\text{-benzoylfenyl})\text{-}5\text{-chlor-}2\text{-hydroxybenzamid}) = 212,6\text{-}214,6 \text{ } ^\circ\text{C}$$

$$\log P_{\text{t}}(\textit{N}\text{-}(4\text{-benzoylfenyl})\text{-}5\text{-chlor-}2\text{-hydroxybenzamid}) = 4,22$$

4.2.1.2. *N*-(4-Benzoylfenyl)-5-brom-2-hydroxybenzamid



Reakční schéma 13 Příprava *N*-(4-benzoylfenyl)-5-brom-2-hydroxybenzamidu

10 mmol (2,17 g) 5-Bromsalicylové kyseliny bylo suspendováno ve 100 ml chlorbenzenu, přidán 4-aminobenzofenon (10 mmol; 1,97 g) a 0,5 ekvivalentu PCl_3 (0,69 g, 0,44 ml). Reakce probíhala v mikrovlnném reaktoru (530 W) za teploty varu rozpouštědla po dobu 22 min. Ještě horká směs byla zfiltrována a filtrát byl uložen na 12 hodin při +4 °C. Vyloučené krystaly byly zfiltrovány a filtrát zahuštěn na polovinu. Krystaly vyloučené při zahušťování se opět zfiltrovaly. Jednotlivé frakce krystalů byly spojeny a rekrystalizovány z ethanolu. Výtěžek reakce byl 2,24 a 1,91 g *N*-(4-benzoylfenyl)-5-brom-2-hydroxybenzamid, tj. 57 a 48 %.

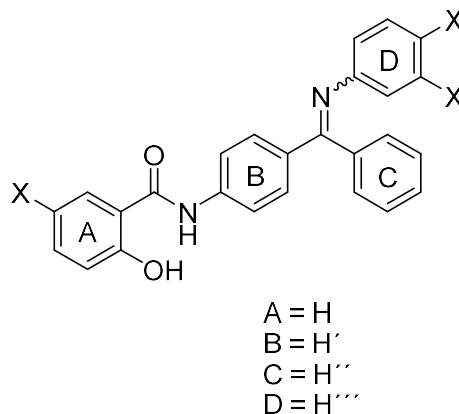
Tento postup byl jednou modifikován, kdy nebylo použito mikrovlnného reaktoru, nýbrž reakce probíhala za varu rozpouštědla pod zpětným chladičem po dobu 7 hodin. Výtěžek byl 32%.

$$T_{\text{t}}(\textit{N}-(4\text{-benzoylfenyl})\text{-5-brom-2-hydroxybenzamid}) = 225,3\text{-}226,3 \text{ } ^\circ\text{C}$$

$$\log P(\textit{N}-(4\text{-benzoylfenyl})\text{-5-brom-2-hydroxybenzamid}) = 4,49$$

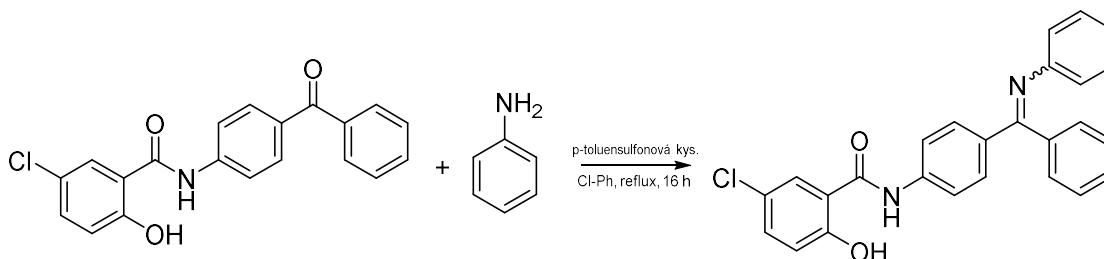
4.2.2. Příprava Schiffových bází

Obecné schéma pro přiřazení H k jednotlivým aromatickým kruhům při hodnocení ^1H NMR (Obrázek 29).



Obrázek 29 Schéma pro přiřazení H k aromatickým kruhům při hodnocení ^1H NMR

4.2.2.1. 5-Chlor-*N*-{4-[fenyl(fenylimino)methyl]fenyl}-2-hydroxybenzamid



Reakční schéma 14 Příprava 5-chlor-*N*-{4-[fenyl(fenylimino)methyl]fenyl}-2-hydroxybenzamidu

0,5 mmol (0,18) *N*-(4-Benzoylfenyl)-5-chlor-2-hydroxybenzamidu bylo rozpuštěno v 5 ml vroucího chlorbenzenu a přidáno katalytické množství (0,01 ekvivalentu, 0,0095 g) monohydrátu kyseliny *p*-toluensulfonové. Poté byl přidán 1 mmol (0,93 g, tj. 0,91 ml) čerstvě předestilovaného anilinu. Reakční směs byla míchána pod zpětným chladičem při teplotě varu rozpouštědla po dobu 16 hod. Reakce byla monitorována pomocí TLC. Po skončení reakce byla provedena sloupcová chromatografie, jako mobilní fáze byla použita směs hexan:ethyl-acetát 6:1. Výtěžek reakce byl 92,5 mg 5-chlor-*N*-{4-[fenyl(fenylimino)methyl]fenyl}-2-hydroxybenzamidu, tj. 43 %.

$R_f = 0,28$

$T_{\text{t}}(5\text{-chlor-}N\text{-}\{4\text{-[fenyl(fenylimino)methyl]fenyl}\}\text{-2-hydroxybenzamid)} = 159,5\text{-}161,5\text{ }^{\circ}\text{C}$

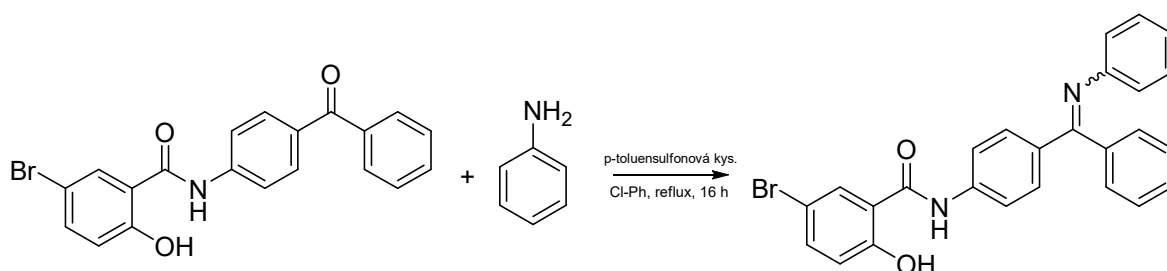
$\log P(5\text{-chlor-}N\text{-}\{4\text{-[fenyl(fenylimino)methyl]fenyl}\}\text{-2-hydroxybenzamid)} = 6,34$

IR: 3063, 1651 (C=O, amid I), 1590 (C=O, amid II), 1528 (C=N, imin), 1483, 1408, 1332, 1283, 1206, 1142, 1108, 1073, 1026, 961, 915, 822, 781, 695, 625 cm^{-1} .

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, THF- d_8): δ 11.94 (1H, s, OH), 9.92 a 9.79 (1H, s, NH, poměr velikosti píkú (integrál ploch pod křivkou) 60:37), 7.98 a 7.91 (1H, d, $J = 2.6$ Hz, H6), 7.82-7.78 (3H, m, H-Ar), 7.69-7.66 (1H, m, H-Ar), 7.48-7.38 (2H, m, H-Ar), 7.29-7.26 (2H, m, H-Ar), 7.17-7.06 (4H, m, H-Ar), 6.95 (1H, t, $J = 9.2$ Hz, H4''), 6.88-6.82 (1H, m, H-Ar), 6.71-6.65 (2H, m, H-Ar).

$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, THF- d_8): δ 168.14 a 167.88, 167.72 a 167.37, 160.98 a 160.75, 152.70 a 152.57, 141.21 a 140.66, 139.23 a 137.34, 136.59, 134.72 a 134.61, 133.30 a 131.30, 131.01 a 130.67, 130.16 a 130.07, 129.09 a 129.07, 128.96, 128.77 a 128.71, 127.94 a 127.92, 124.07 a 124.04, 123.52 a 123.47, 121.61 a 121.53, 120.95 a 120.93, 120.46 a 120.40, 117.87 a 117.75.

4.2.2.2. 5-Brom-*N*-{4-[Fenyl(fenylimino)methyl]fenyl}-2-hydroxybenzamid



Reakční schéma 15 Příprava 5-brom-*N*-{4-[fenyl(fenylimino)methyl]fenyl}-2-hydroxybenzamid

0,5 mmol (0,20 g) *N*-(4-Benzoylfenyl)-5-brom-2-hydroxybenzamid bylo rozpuštěno v 5 ml vroucího chlorbenzenu a přidáno katalytické množství (0,01 ekvivalentu, 0,0095 g) monohydrátu kyseliny *p*-toluensulfonové. Poté byl přidán 1 mmol (0,93 g, 0,91 ml) čerstvě předestilovaného anilinu. Reakční směs byla míchána při teplotě varu rozpouštědla po dobu 16 hod. Reakce byla monitorována pomocí TLC. Po skončení reakce byla provedena sloupcová chromatografie, jako mobilní fáze byla použita směs hexan:ethyl-acetát 6:1. Výtěžek reakce byl 82,6 mg 5-brom-*N*-{4-[fenyl(fenylimino)methyl]fenyl}-2-hydroxybenzamid, tj. 35 %.

$R_f = 0,28$

$T_m(5\text{-brom-}N\text{-}\{4\text{-[fenyl(fenylimino)methyl]fenyl}\}\text{-2-hydroxybenzamid}) = 179,2\text{-}181,9\text{ }^\circ\text{C}$

$\log P(5\text{-brom-}N\text{-}\{4\text{-[fenyl(fenylimino)methyl]fenyl}\}\text{-2-hydroxybenzamid}) = 6,61$

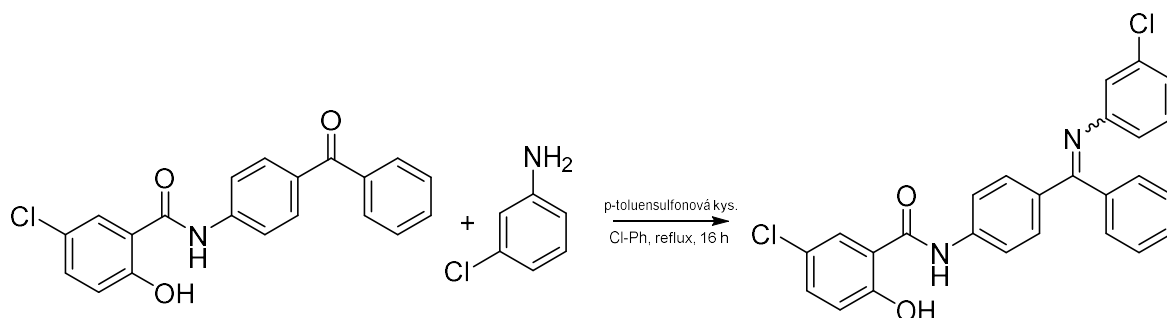
IR: 3318 (N-H), 2949, 1673 (C=O, amid I), 1590 (C=O, amid II), 1529 (C=N, imin), 1485, 1415, 1320, 1287, 1214, 1184, 1149, 1139, 1071, 1026, 970, 919, 843, 816, 783, 772, 698, 679 cm^{-1} .

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, THF- d_8): δ 11.99 (1H, s, OH), 9.92 a 9.79 (1H, s, NH, poměr velikosti píků (integrál ploch pod křivkou) 60:39), 8.11 a 8.04 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H6), 7.81-7.77 (3H, m, H-Ar), 7.69-7.65 (1H, m, H-Ar), 7.57-7.51 (1H, m, H-Ar), 7.48-7.38 (1H, m, H-Ar), 7.29-7.26 (2H, m, H-Ar), 7.17-7.05 (4H, m, H-Ar), 6.93-6.82 (2H, m, H-Ar), 6.70-6.65 (2H, m, H-Ar).

$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, THF- d_8): δ 168.12 a 167.86, 167.72 a 167.37, 161.48 a 161.25, 152.70 a 152.57, 141.20 a 140.65, 139.22 a 137.34, 137.61 a 137.51, 136.59 a 133.32, 131.30 a 131.01,

130.88 a 130.86, 130.66, 130.16 a 130.07, 129.10 a 129.07, 128.77 a 128.71, 123.52 a 123.47,
121.60 a 121.54, 120.97 a 120.95, 120.88 a 120.81, 118.42 a 118.29, 111.02 a 110.99.

4.2.2.3. 5-Chlor-*N*-{4-[fenyl(3-chlorfenylimino)methyl]fenyl}-2-hydroxybenzamid



Reakční schéma 16 Příprava 5-chlor-*N*-{4-[fenyl(3-chlorfenylimino)methyl]fenyl}-2-hydroxybenzamidu

0,5 mmol (0,18 g) *N*-(4-Benzoylfenyl)-5-chlor-2-hydroxybenzamidu bylo rozpuštěno v 5 ml vroucího chlorbenzenu a přidáno katalytické množství (0,01 ekvivalentu, 0,0095 g) monohydrátu kyseliny *p*-toluensulfonové. Poté byl přidán 1 mmol (1,27 g, 1,05 ml) 3-chloranilinu. Reakční směs byla míchána při teplotě varu rozpouštědla po dobu 16 hod. Reakce byla monitorována pomocí TLC. Po skončení reakce byla provedena sloupcová chromatografie, jako mobilní fáze byla použita směs hexan:ethyl-acetát 6:1. Výtěžek reakce byl 19,4 mg 5-chlor-*N*-{4-[fenyl(3-chlorfenylimino)methyl]fenyl}-2-hydroxybenzamid, tj. 8 %.

$R_f = 0,28$

$T_{i(5\text{-chlor-}N\text{-}\{4\text{-[fenyl(3-chlorfenylimino)methyl]fenyl}\}-2\text{-hydroxybenzamid})} = \text{nezměřeno}$

$\log P_{(5\text{-chlor-}N\text{-}\{4\text{-[fenyl(3-chlorfenylimino)methyl]fenyl}\}-2\text{-hydroxybenzamid})} = 6,9$

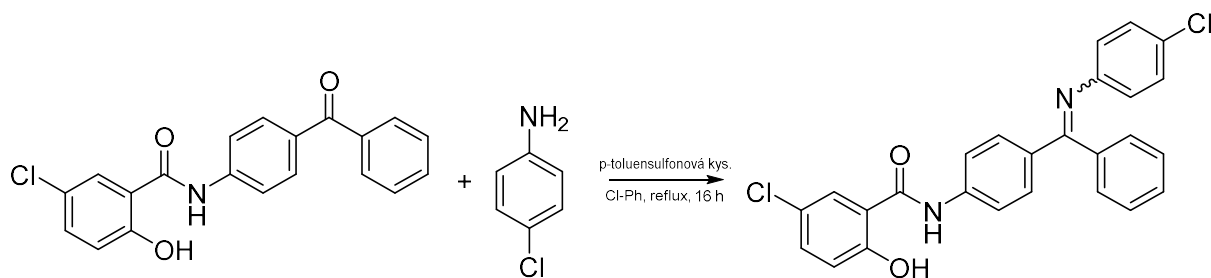
IR: nezměřeno

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, THF- d_8): δ 9.96 a 9.84 (1H, s, NH, poměr velikosti píků (integrál ploch pod křivkou) 60:36), 7.98 a 7.93 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H6), 7.86-7.75 (3H, m, H-Ar), 7.73-7.69 (1H, m, H-Ar), 7.50-7.39 (2H, m, H-Ar), 7.34-7.29 (2H, m, H-Ar), 7.21-7.15 (2H, m, H-Ar), 7.11-7.03 (1H, m, H-Ar), 6.95 (1H, t, $J = 8.7$ Hz, H4'''), 6.91-6.84 (1H, m, H-Ar), 6.79-6.73 (1H, m, H-Ar), 6.63-6.55 (1H, m, H-Ar).

$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, THF- d_8) δ 168.89 a 168.51, 167.99 a 167.78, 160.81 a 160.63, 154.05 a 153.93, 141.48 a 140.05, 139.41 a 136.74, 135.89, 134.63 a 134.58, 134.52 a 134.47, 132.64,

131.57, 130.80 a 130.73, 130.30, 130.17 a 130.08, 129.89 a 129.32, 128.76 a 127.88, 123.94,
123.33 a 123.29, 121.62 a 121.51, 120.95 a 120.83, 120.35 a 120.29, 119.84 a 119.80.

4.2.2.4. **5-chlor-*N*-{4-[fenyl(4-chlorfenylimino)methyl]fenyl}-2-hydroxybenzamid**



Reakční schéma 17 Příprava 5-chlor-*N*-{4-[fenyl(4-chlorfenylimino)methyl]fenyl}-2-hydroxybenzamidu

0,5 mmol (0,18 g) *N*-(4-benzoylphenyl)-5-chlor-2-hydroxybenzamidu bylo rozpuštěno v 5 ml vroucího chlorbenzenu a přidáno katalytické množství (0,01 ekvivalentu, 0,0095 g) monohydrátu kyseliny *p*-toluensulfonové. Poté byl přidán 1 mmol (1,27 g) 4-chloranilinu. Reakční směs byla míchána při teplotě varu rozpouštědla po dobu 16 hod. Reakce byla monitorována pomocí TLC. Po skončení reakce byla provedena sloupcová chromatografie, jako mobilní fáze byla použita směs hexan:ethyl-acetát 6:1. Výtěžek reakce byl 173,3 mg 5-chlor-*N*-{4-[fenyl(4-chlorfenylimino)methyl]fenyl}-2-hydroxybenzamidu, tj. 75 %.

$R_f = 0,28$

$T_t(5\text{-chlor-}N\text{-}\{4\text{-[fenyl(4-chlorfenylimino)methyl]fenyl}\}\text{-2-hydroxybenzamid}) = 183\text{-}185\text{ }^\circ\text{C}$

$\log P(5\text{-chlor-}N\text{-}\{4\text{-[fenyl(4-chlorfenylimino)methyl]fenyl}\}\text{-2-hydroxybenzamid}) = 6,9$

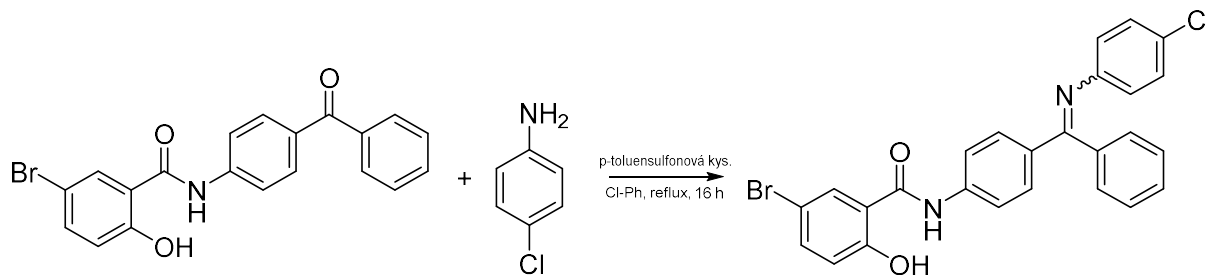
IR: 3318 (N-H), 3065, 1622 (C=O, amid I), 1609, 1588 (C=O, amid II), 1550 (C=N, imin), 1526, 1481, 1422, 1319, 1296, 1221, 1178, 1138, 1108, 1089, 1010, 959, 914, 852, 834, 820, 778, 726, 700, 688, 676, 655 cm^{-1} .

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, THF- d_8): δ 9.93 a 9.82 (1H, s, NH, poměr velikosti píků (integrál ploch pod křivkou) 60:37), 7.98 a 7.93 (1H, d, $J = 2.5$ Hz, H6), 7.83-7.77 (3H, m, H-Ar), 7.73-7.69 (1H, m, H-Ar), 7.50-7.46 (1H, m, H-Ar), 7.44-7.39 (1H, m, H-Ar), 7.33-7.30 (2H, m, H-Ar), 7.18-7.07 (4H, m, H-Ar), 6.98-6.93 (1H, m, H-Ar), 6.70-6.63 (2H, m, H-Ar).

$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, THF- d_8) δ 168.71 a 168.32, 168.12 a 167.88, 160.93 a 160.70, 151.41 a 151.28, 141.48, 140.32 a 139.49, 137.01 a 136.21, 134.74 a 134.64, 132.91, 131.57, 130.96

a 130.77, 130.14 a 130.07, 129.38, 129.22 a 129.12, 128.90 a 128.85, 128.78 a 128.75, 128.00
a 127.96, 124.11 a 124.07, 123.20 a 123.15, 121.07 a 120.95, 120.46 a 120.40, 117.90 a 117.77.

4.2.2.5. **5-brom-*N*-{4-[fenyl(4-chlorfenylimino)methyl]fenyl}-2-hydroxybenzamid**



Reakční schéma 18 Příprava 5-brom-*N*-{4-[fenyl(4-chlorfenylimino)methyl]fenyl}-2-hydroxybenzamidu

0,5 mmol (0,20 g) *N*-(4-benzoylfenyl)-5-brom-2-hydroxybenzamid bylo rozpuštěno v 5 ml vroucího chlorbenzenu a přidáno katalytické množství (0,01 ekvivalentu, 0,0095 g) monohydrátu kyseliny *p*-toluensulfonové. Poté byl přidán 1 mmol (1,27 g) 4-chloranilinu. Reakční směs byla míchána při teplotě varu rozpouštědla po dobu 16 hod. Reakce byla monitorována pomocí TLC. Po skončení reakce byla provedena sloupcová chromatografie, jako mobilní fáze byla použita směs hexan:ethyl-acetát 6:1. Výtěžek reakce byl 152,4 mg 5-brom-*N*-{4-[fenyl(4-chlorfenylimino)methyl]fenyl}-2-hydroxybenzamid, tj. 60 %.

$$R_f = 0,28$$

$$T_t(5\text{-brom-}N\text{-}\{4\text{-[fenyl(4-chlorfenylimino)methyl]fenyl}\}\text{-2-hydroxybenzamid}) = 178,9\text{-}181,3\text{ }^\circ\text{C}$$

$$\log P(5\text{-brom-}N\text{-}\{4\text{-[fenyl(4-chlorfenylimino)methyl]fenyl}\}\text{-2-hydroxybenzamid}) = 7,17$$

IR: 3319 (N-H), 3061, 1622(C=O, amid I), 1608, 1582 (C=O, amid II), 1549(C=N, imin), 1481, 1419, 1319, 1295, 1220, 1179, 1138, 1089, 1010, 980, 958, 913, 851, 832, 818, 777, 725, 700, 683, 675 cm⁻¹.

¹H NMR (500 MHz, THF-*d*₈): δ 9.95 a 9.84 (1H, s, NH, poměr velikosti píků (integrál ploch pod křivkou) 60:39), 8,11 a 8,05 (1H, d, *J* = 2.5 Hz, H₆), 7.83-7.77 (3H, m, H-Ar), 7.72-7.69 (1H, m, H-Ar), 7.57-7.52 (1H, m, H-Ar), 7.50-7.46 a 7,43-7,39 (1H, m, H-Ar), 7.33-7.30 (2H, m, H-Ar), 7.18-7.07 (4H, m, H-Ar), 6.92-6.88 (1H, m, H-Ar), 6.70-6.64 (2H, m, H-Ar).

¹³C NMR (126 MHz, THF-*d*₈) δ 168.71 a 168.32, 168.08 a 167.84, 161.42 a 161.19, 151.41 a 151.28, 141.48, 139.63 a 139.53, 137.01 a 136.21, 132.91, 131.57, 130.96 a 130.92, 130.76,

130.14 a 130.07, 129.38, 129.21 a 129.12, 128.90 a 128.85, 128.78 a 128.73, 123.20 a 123.16,
121.09 a 120.97, 120.87 a 120.81, 118.46 a 118.33, 111.05 a 111.01.

5. Diskuze

Cílem této diplomové práce byla příprava Schiffových bází vycházejících z amidů kyseliny salicylové (salicylanilidů). Připraveno bylo celkem 5 finálních derivátů, v přehledu:

- 5-chlor-*N*-{4-[fenyl(fenylimino)methyl]fenyl}-2-hydroxybenzamid
- 5-brom-*N*-{4-[fenyl(fenylimino)methyl]fenyl}-2-hydroxybenzamid
- 5-chlor-*N*-{4-[fenyl(3-chlorfenylimino)methyl]fenyl}-2-hydroxybenzamid
- 5-chlor-*N*-{4-[fenyl(4-chlorfenylimino)methyl]fenyl}-2-hydroxybenzamid
- 5-brom-*N*-{4-[fenyl(4-chlorfenylimino)methyl]fenyl}-2-hydroxybenzamid

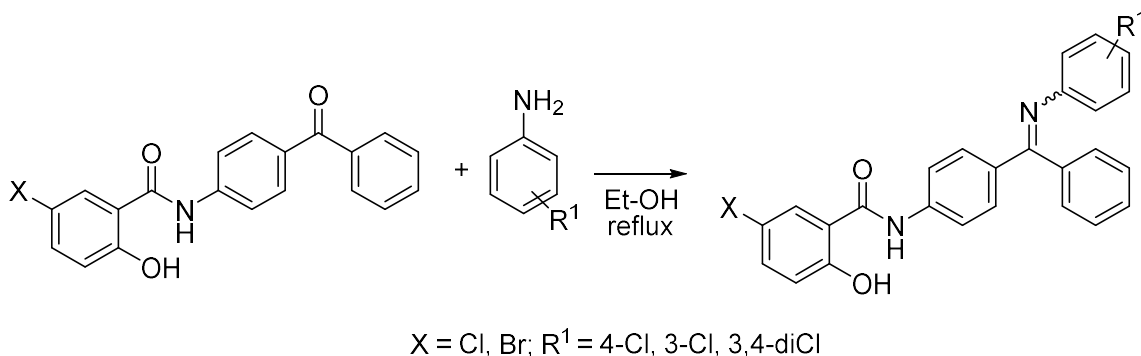
Tyto sloučeniny byly charakterizovány pomocí teploty tání, infračervené spektroskopie a NMR. Testy antimikrobiální aktivity nebyly provedeny z důvodu pozdní přípravy sloučenin a nízkého výtěžku některých z nich, v brzké budoucnosti by ovšem otestovány být měly.

Cílené Schiffovy báze byly připravovány ze dvou dříve popsaných salicylanilidů nesoucích karbonylovou skupinu, *N*-(4-benzoylfenyl)-5-chlor-2-hydroxybenzamid a *N*-(4-benzoylfenyl)-5-brom-2-hydroxybenzamid.

Syntéza salicylanilidů z 5-chlorsalicylové / 5-bromsalicylové kyseliny a 4-aminobenzofenonu nebyla nikterak problémová, ovšem musela být opakována z důvodu nižších výtěžků (5-brom derivát 48 a 57 % a 5-chlor derivát 42 a 34 %) a spotřebování látek jako meziproductů pro další syntézy. Použití mikrovlnného reaktoru při syntéze není nezbytně nutné, avšak mikrovlnné provedení reakce dává vyšší výtěžky (5-brom derivát 57 % a 5-chlor derivát 42 % oproti 32 %, respektive 27 % bez použití mikrovlnného reaktoru) a značně urychluje její průběh. Pro nemožnost mikrovlnné syntézy z technických důvodů byla syntéza výchozích salicylanilidů (*N*-(4-benzoylfenyl)-5-chlor-2-hydroxybenzamid a *N*-(4-benzoylfenyl)-5-brom-2-hydroxybenzamid) jednou provedena při teplotě varu rozpouštědla, doba reakce byla prodloužena na 7 h a výtěžek byl zhruba poloviční oproti reakci v mikrovlnném reaktoru. Izolace produktu byla provedena krystalizací a filtrací, čištění pak rekrystalizací z ethanolu, čistota byla ověřena pomocí TLC, NMR a teploty tání.

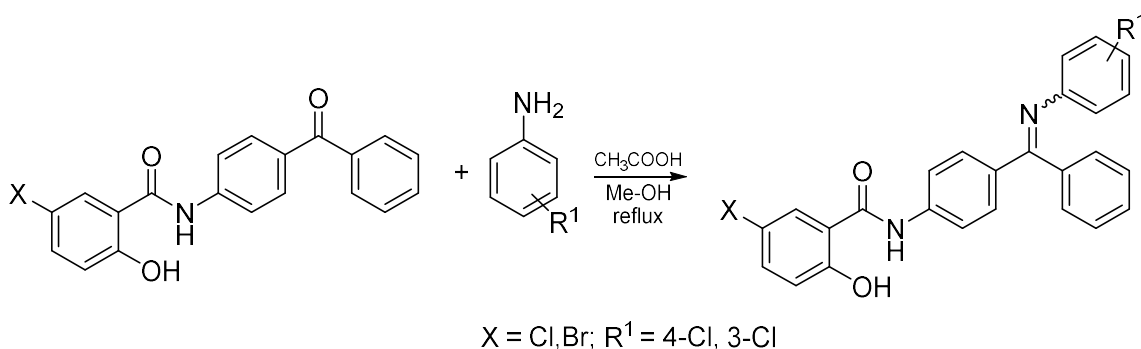
Nalezení použitelného postupu přípravy Schiffových bází bylo značně komplikované. Předpoklad dostatečné reaktivity bez katalyzátoru se nenaplnil a proto postup, kdy bylo po rozpuštění příslušného salicylanilidu v ethanolu přidáno ekvimolární množství 3-chloranilinu, 4-chloranilinu a 3,4-dichloranilinu, a při teplotě varu rozpouštědla se ponechalo

reagovat po dobu 6 hodin, se neosvědčil (reakce neprobíhala). Postup byl vyzkoušen jedenkrát s každým s každým uvedeným anilinem a každým salicylanilidem.



Reakční schéma 19 Navržená příprava Schiffových bází bez katalyzátoru

Pro velmi nízkou reaktivitu bylo do syntézy zařazeno použití katalyzátoru, iniciálně koncentrované kyseliny octové. Jako rozpouštědlo byl použit methanol, ovšem používané salicylanilidy jsou v něm málo rozpustné, proto bylo nutné množství rozpouštědla oproti ethanolu zdvojnásobit. Po rozpuštění reaktantu a přidavku katalytického množství (3 kapky) koncentrované kyseliny octové a za varu byla směs ponechána reagovat 7 hodin. Tento postup pro syntézu 3-chlor a 4-chlor derivátů byl vyzkoušen jedenkrát a opět neosvědčil, reakce neprobíhala.

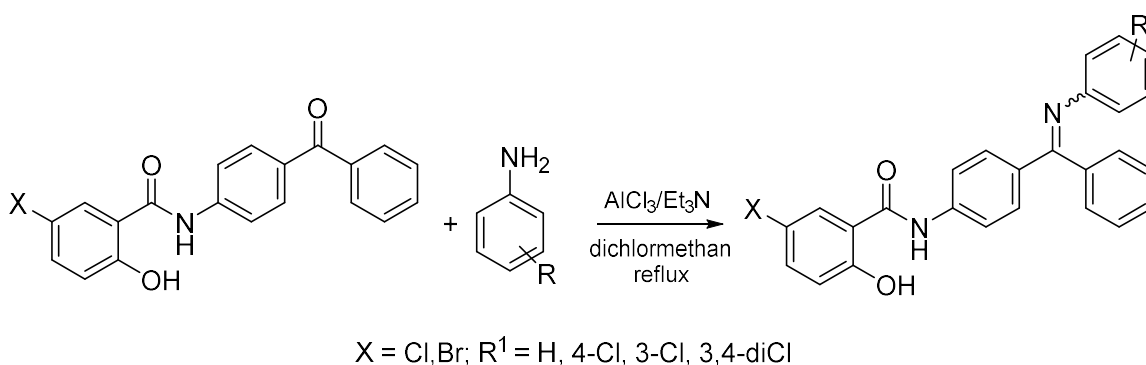


Reakční schéma 20 Předpokládaná příprava Schiffových bází za katalýzy CH₃COOH

Nízká reaktivita salicylanilidových meziproductů nabízela možnost použití mikrovlnného reaktoru pro reakci. Reakční směs příslušného salicylanilidu, (substituovaného) anilinu a katalytického množství koncentrované kyseliny octové v methanolu byla vařena pod zpětným chladičem v mikrovlnném reaktoru po dobu 30 min. Ani tento postup ovšem nevedl

k požadovanému produktu (vyzkoušeno jedenkrát s 3-chloranilinem a 4-chloranilinem). Změna methanolu za rozpouštědlo s vyšší teplotou varu (toluen) nevedla k progresu.

Na základě literatury byl vyzkoušen postup za katalýzy AlCl_3 v přítomnosti Et_3N a s chloroformem jako rozpouštědlem⁷⁹. Pro špatnou rozpustnost výchozích salicylanilidů v chloroformu bylo však používáno dichlormethanu. Literatura⁷⁹ upozorňuje na velmi nízkou reaktivitu a obtížnou syntézu diarylketonů s arylaminy. Chlorid hlinitý jako Lewisova kyselina má aktivovat karbonylový uhlík a zvýšit jeho reaktivitu, triethylamin pak měl vyvézt komplex HO-AlCl_3 z vazby na karbonylový uhlík, celou reakci usnadnit a zabránit zvratu reakce zpět na výchozí látku. Reakce byla monitorována pomocí TLC. Produkt v průběhu času (až 48 hod při teplotě varu rozpouštědla) podle TLC vznikal, limitujícím krokem se ukázala být izolace produktu. Po ukončení reakce bylo nutno reakční směs vytřepat se 4M roztokem hydroxidu sodného (tento krok byl modifikován a k vytřepání se použil 10% roztok uhličitanu sodného) pro odstranění nadbytku AlCl_3 . K samotné izolaci byla používána krystalizace. Jak se ukázalo později, produkty jsou velmi labilní a citlivé na přítomnost stopy vody za hydrolyzy na výchozí látku. Při vytřepávání a krystalizaci z roztoku se nejspíš produkty ve velké míře hydrolyzovaly, tedy nebylo možno produkt izolovat v dostatečném množství.



Reakční schéma 21 Příprava Schiffových bází pomocí AlCl_3 a Et_3N

Logickým vysvětlením nízké reaktivity příslušných salicylanilidů s aniliny je sterické bránění. Objemné aromatické substituenty navázané na karbonylovém uhlíku musí nutně hrát roli v reaktivitě daných látek.

Dalším problémem, který je zmíněn výše, je vysoká labilita produktů při laboratorní teplotě a za přítomnosti vlhkosti (i vzdušné). Tím se dá částečně vysvětlit častý neúspěch při izolaci produktu po reakci. Už při 12 hod stání při laboratorní teplotě a přístupu vzduchu izolovaného produktu v pevném stavu se podle TLC začala objevovat výchozí látka. Po 72 hod se orientačně

(podle intenzity skvrn na TLC) rozložilo až 20-30 % produktu. Skladování při -15 °C při současném zajištění nepřístupu vzduchu je tedy nezbytné. Stabilita (respektive čistota) byla namátkově ověřena po 14 dnech skladování při uvedených podmínkách, sloučeniny byly po tuto dobu podle TLC chromatogramu stabilní. Vysoká nestabilita výrazně komplikuje případné následné testy biologické aktivity.

U 5-chlor-*N*-{4-[fenyl(3-chlorfenylimino)methyl]fenyl}-2-hydroxybenzamidu nebylo změřeno IR spektrum a T_m . Z důvodu nízkého výtěžku bylo veškeré množství získaného derivátu odesláno na změření NMR, během manipulace a následného skladování však došlo k jeho částečné degradaci na výchozí látky. Tento derivát je tedy charakterizován pouze NMR spektrem.

Schiffovy báze jsou schopny existovat jako *E/Z* izomery (Obrázek 30, Obrázek 31) na dvojné vazbě iminu ($C=N$)⁵². Izomerie *E/Z* na dvojné vazbě iminu je možná i přes to, že je substituovaná pouze třemi substituenty, čtvrtý „substituent“ představuje volný elektronový pár dusíku. Izomerie *E/Z* byla popsána u podobného typu látek v literatuře.⁸⁰ Připravené látky vykazovaly na NMR spektrech zdvojené signály. Toto zdvojení připisujeme právě *E/Z* izomerii na dvojné vazbě iminu ($-C=N-$). Izomery vznikaly v poměrech (vypočteno z poměrů ploch integrálů pod křivkou):

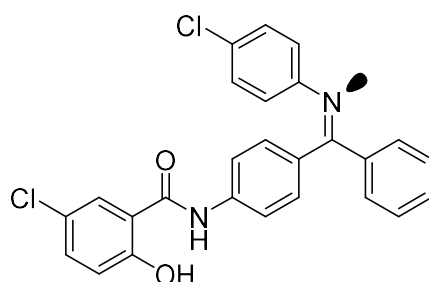
5-chlor-*N*-{4-[fenyl(fenylimino)methyl]fenyl}-2-hydroxybenzamid 60:37

5-brom-*N*-{4-[fenyl(fenylimino)methyl]fenyl}-2-hydroxybenzamid 60:39

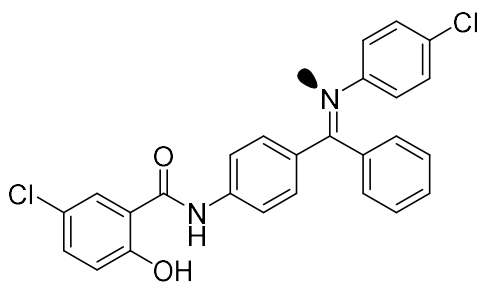
5-chlor-*N*-{4-[fenyl(3-chlorfenylimino)methyl]fenyl}-2-hydroxybenzamid 60:36

5-chlor-*N*-{4-[fenyl(4-chlorfenylimino)methyl]fenyl}-2-hydroxybenzamid 60:37

5-brom-*N*-{4-[fenyl(4-chlorfenylimino)methyl]fenyl}-2-hydroxybenzamid 60:39.



Obrázek 30 (*Z*)-*N*-{4-[Fenyl(fenylimino)methyl]fenyl}-5-chlor-2-hydroxybenzamid



Obrázek 31 (E)-N-{4-[Fenyl(fenylimino)methyl]fenyl}-5-chlor-2-hydroxybenzamid

6. Závěr

V této diplomové práci bylo připraveno celkem 5 doposud nepopsaných sloučenin. Strukturně tyto látky vycházejí ze salicylanilidů a chemicky patří do skupiny Schiffových bází. Látky byly připraveny kondenzací salicylanilidů, které obsahují karbonylovou skupinu, se (substituovanými) aniliny za katalýzy stopovým množstvím *p*-toluensulfonové kyseliny. Výtěžek reakcí se pohyboval v rozmezí 8-75 %, toto rozpětí je dáno zejména nižší reaktivitou látek a postupem izolace a čištění. Všechny látky byly izolovány v chromatografické čistotě (ověřeno T_r , NMR, TLC), identifikovány byly pomocí ^1H NMR, ^{13}C NMR a IR spektroskopie.

7. Použitá literatura – citováno dle normy ISO 690

- ¹ [Online] WHO, Fact sheet, Tuberculosis
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/> (cit. 15. 07. 2016)
- ² [Online] Nobelprize.org, The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1905
http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1905/ (cit. 15. 07. 2016)
- ³ [Online] WHO, Global Tuberculosis report 2015
http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/191102/1/9789241565059_eng.pdf?ua=1 (cit. 15. 07. 2016)
- ⁴ Votava M., Černohorská L., Heroldová M., Holá V., Mejzlíková L., Ondrovčík P., Růžička F., Dvořáčková M., Woznicová V., Zahradníček O., Lékařská mikrobiologie speciální. 1. vyd. Brno: Neptun 2003. s 159-167.
- ⁵ Vašáková M., Tuberkulóza v České republice. Současný stav. Diagnóza, léčba, prevence. *Vnitřní Lékařství*, 2013, 59(4), 284-289.
- ⁶ [Online] WHO, Tuberculosis and HIV.
<http://www.who.int/hiv/topics/tb/en/> (cit. 21. 8. 2016)
- ⁷ Buchta V., Jílek P., Horáček J., Horák V., Základy mikrobiologie a parazitologie pro farmaceuty. 1. vyd. Praha: Karolinum 1998. s 113.
- ⁸ [Online] Centers for disease control and prevention, The Difference Between Latent TB Infection and TB Disease
<http://www.cdc.gov/tb/publications/factsheets/general/ltbiandactivetb.htm> (cit. 10. 8. 2016)
- ⁹ [Online] WHO, Treatment of tuberculosis guidelines fourth edition
http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44165/1/9789241547833_eng.pdf?ua=1&ua=1 (cit. 1. 8. 2016)
- ¹⁰ Isoniazid. *Tuberculosis*, 2008, 88(2), 112-116.
- ¹¹ Hartl J., Doležal M., Miletín M., Opletalová V., Zimčík P., Farmaceutická chemie IV. 1. vyd. Praha: Karolinum 2006.
- ¹² Rifampin. *Tuberculosis*, 2008, 88(2), 151-154.
- ¹³ Pyrazinamide. *Tuberculosis*, 2008, 88(2), 141-144.
- ¹⁴ [Online] Drug Bank, Pyrazinamide
<http://www.drugbank.ca/drugs/DB00339> (cit. 11. 8. 2016)
- ¹⁵ Boshoff H., Mizrahi V., Barry C. E., Effects of pyrazinamide on fatty acid synthesis by whole mycobacterial cells and purified fatty acid synthase I. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184(8), 2167-2172
- ¹⁶ Zhang Y., Shi W., Zhang W., Mitchinson D., Mechanisms of Pyrazinamide Action and Resistance. *Microbiology Spectrum*, 2014, 2(4), MGM2-0023-2013.
- ¹⁷ Shi W., Chen J., Feng J., Cui P., Zhang S., Weng X., Zhang W., Zhang Y., Aspartate decarboxylase (PanD) as a new target of pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerging Microbes & Infections*, 2014, 3(8), e58.
- ¹⁸ Ethambutol. *Tuberculosis*, 2008, 88(2), 102-105.
- ¹⁹ Streptomycin. *Tuberculosis*, 2008, 88(2), 162-163.
- ²⁰ Levofloxain. *Tuberculosis*, 2008, 88(2), 119-121.
- ²¹ Zheng J., Rubin E. J., Bifani P., Mathys V., Lim V., Au M., Jang J., Nam J., Dick T., Walker J. R., Pethe K., Camacho L. R., *para*-Aminosalicylic acid is a prodrug targeting dihydrofolate reductase in *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(32), 23447-23456.
- ²² *Para*-aminosalicylic acid. *Tuberculosis*, 2008, 88(2), 137-138.

-
- ²³ Kanamycin. *Tuberculosis*, 2008, 88(2), 117-118.
- ²⁴ Amikacin. *Tuberculosis*, 2008, 88(2), 87-88.
- ²⁵ Mahajan R., Bedaquiline: First FDA-approved tuberculosis drug in 40 years. *International Journal of Applied and Basic Medical Research*, 2013, 3(1), 1-2.
- ²⁶ Matteelli A., Carvalho A. C. C., Dooley K. E., Kritski A., TMC207: the first compound of a new class of potent anti-tuberculosis drugs. *Future Microbiology*, 2010, 5(6), 849-858.
- ²⁷ [Online] EMA EUROPA, Souhrn údajů o přípravku SIRTURO
http://www.ema.europa.eu/docs/cs_CZ/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002614/WC500163209.pdf (cit. 5. 9. 2016)
- ²⁸ Xavier A. S., Lakshmanan M., Delamanid: A new armor in combating drug-resistant tuberculosis. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*, 2014, 5(3), 222-224.
- ²⁹ [Online] Ministerstvo zdravotnictví ČR, Metodika očkování proti TBC v ČR
http://www.mzcr.cz/verejne/obsah/metodika-ockovani-proti-TBC-v-cr_2546_5.html (cit. 2. 8. 2016)
- ³⁰ [Online] Všeobecná zdravotní pojišťovna, Metodika k provádění pravidelného očkování proti tuberkulóze (TBC) v ČR
<https://www.vzp.cz/poskytovatele/informace-pro-praxi/ockovani/metodika-k-provadeni-pravidelneho-ockovani-proti-tuberkuloze-tbc-v-cr> (cit. 2. 8. 2016)
- ³¹ Krátký M., Vinšová J., Pokroky ve vývoji antituberkulotik působících na multilékové rezistentní kmeny. *Chemické Listy*, 2010, 104, 998-1005.
- ³² [Online] WHO, Drug-resistant TB: XDR-TB FAQ
<http://www.who.int/tb/areas-of-work/drug-resistant-tb/xdr-tb-faq/en/> (cit. 12. 8. 2016)
- ³³ [Online] Centers for disease control and prevention, Fact Sheet, Extensively Drug-Resistant Tuberculosis (XDR TB)
<http://www.cdc.gov/tb/publications/factsheets/drtb/xdrtb.htm> (cit. 12. 08. 2016)
- ³⁴ Velayati A. A., Farnia P., Masjedi M. R., The totally drug resistant tuberculosis (TDR-TB). *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 2013, 6(4), 307-309.
- ³⁵ [Online] TBFACTS.ORG, Totally drug resistant TB – or Extremely, XXDR, TDR
<http://www.tbfacts.org/xxdr-tb/> (cit. 3. 9. 2016)
- ³⁶ Da Silva P. E. A., Palomino J. C., Molecular basis and mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: classical and new drugs. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, (2011), 66 (7), 1417-1430.
- ³⁷ [Online] https://en.wikipedia.org/wiki/Schiff_base. (cit. 1. 7. 2016)
- ³⁸ Hussain Z., Yousif E., Ahmed A., Altaie A., Synthesis and characterization of Schiff's bases of sulfamethoxazole. *Organic and Medicinal Chemistry Letters*, 2014, 4, 1.
- ³⁹ [Online] IUPAC Gold Book, Schiff bases (Schiff's bases)
<http://goldbook.iupac.org/S05498.html> (cit. 12. 08. 2016)
- ⁴⁰ Da Silva C. M., Da Silva D. L., Modolo L. V., Alves R. B., De Resende M. A., Martins C. V. B., De Fatima A., Schiff bases: A short review of their antimicrobial activities. *Journal of Advanced Research*, 2011, 2(1), 1-8.
- ⁴¹ Gupta K. C., Sutar A. K., Catalytic activities of Schiff base transition metal complexes. *Coordination Chemistry Reviews*, 2008, 252(12-14), 1420-1450.

-
- ⁴² Memon S. Q., Memon N., Mallah A., Soomro R., Khuhawar M. Y., Schiff Bases as Chelating Reagents for Metal Ions Analysis. *Current Analytical Chemistry*, 2014, 10(3), 393-417.
- ⁴³ Liu X. L., Liu Y. H., Shi Y. C., Jian P. M., Application of Schiff's bases in organic synthesis. *Chinese Journal of Organic Chemistry*, 2002, 22(7), 482-488.
- ⁴⁴ Qin W. L., Long S., Panunzio M., Biondi S., Schiff Bases: A Short Survey on an Evergreen Chemistry Tool. *Molecules*, 2013, 18(10), 12264-12289.
- ⁴⁵ Ali E., Naimi-Jamal M. R., Dekamin M. G., Highly efficient and rapid synthesis of imines in the presence of nano-ordered MCM-41- SO₃H heterogeneous catalyst. *Scientia Iranica*, 2013, 20(3), 592-597.
- ⁴⁶ Hrabálek A., Kubicová L., Kuneš J., Pour M., Vinšová J., Laboratorní cvičení z organické chemie pro farmaceuty. 2. vyd, Praha: Karolinum 2011.
- ⁴⁷ Westheimer F. H., Taguchi K., Catalysis by molecular sieves in the preparation of ketimines and enamines. *The Journal of Organic Chemistry*, 1971, 36, 1570-1572.
- ⁴⁸ Love B. E., Ren J., Synthesis of sterically hindered imines. *The Journal of Organic Chemistry*, 1993, 58, 5556-5557.
- ⁴⁹ Look G. C., Murphy M. M., Campbell D. A., Gallop M. A., Trimethylorthoformate: A mild and effective dehydrating reagent for solution and solid phase imine formation. *Tetrahedron Letters*, 1995, 36(17), 2937-2940.
- ⁵⁰ Huang J. M., Zhang J. F., Dong Y., Gong W., An Effective Method To Prepare Imines from Aldehyde, Bromide/Epoxide, and Aqueous Ammonia. *The Journal of Organic Chemistry*, 2011, 76(9), 3511-3514.
- ⁵¹ Yadav D. K. T., Bhanage B. M., Base-Mediated Synthesis of Imines and Amines from *N*-Phenylureas and Alcohols. *Synlett*, 2014, 25(11), 1611-1615.
- ⁵² Morales S., Guijarro F. G., Ruano J. L. G., Cid M. B., A General Aminocatalytic Method for the Synthesis of Aldimines. *Journal of the American Chemical Society*, 2014, 136(3), 1082-1089.
- ⁵³ Nicolaou K. C., Mathison C. J. N., Montagnon T., New Reactions of IBX: Oxidation of Nitrogen- and Sulfur-Containing Substrates To Afford Useful Synthetic Intermediates. *Angewandte Chemie International*, 2003, 42(34), 4077-4082.
- ⁵⁴ Jiang L., Jin L., Tian H., Yuan X., Yu X., Xu Q., Direct and mild palladium-catalyzed aerobic oxidative synthesis of imines from alcohols and amines under ambient conditions. *Chemical Communications*, 2011, 47(38), 10833-10835.
- ⁵⁵ Korich A. L., Hughes T. S., A Facile, One-Pot Procedure for Forming Diarylimines from Nitroarenes and Benzaldehydes. *Synlett*, 2007, 16, 2602-2604.
- ⁵⁶ Amezcua-Valencia M., Suarez-Ortiz G. A., Cabrera A., Synthesis of Prochiral Imines from Aromatic Ketones Using Magnesium Perchlorate as Catalytic Promotor. *Synthetic Communications*, 2013, 43(14), 1947-1954.
- ⁵⁷ Karamunge K. G., Vibhute Y. B., Synthesis and Antimicrobial activity of some new Schiff bases. *Journal of Physics*, 2013, 423.
- ⁵⁸ Harpstrite S. E., Collins S. D., Oksman A., Goldberg D. E., Sharma V., Synthesis, Characterization, and Antimalarial Activity of Novel Schiff-Base-Phenol and Naphthalene-Amine Ligands. *Medicinal Chemistry*, 2008, 4(4), 392-395.

-
- ⁵⁹ Cheng L. X., Tang J. J., Luo H., Jin X. L., Dai F., Yang J., Qian Y. P., Li X. Z., Zhou B., Antioxidant and antiproliferative activities of hydroxyl-substituted Schiff bases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2010, 20(8), 2417-2420.
- ⁶⁰ Venugopala K. N., Jayashree B. S., Synthesis and Characterization of Schiff Bases of Aminothiazolylbromo Coumarin for Their Analgesic and Anti-inflammatory Activity. *Asian Journal of Chemistry*, 2004, 16(1), 407-411.
- ⁶¹ De Souza A. O., Galetti F. C. S., Silva C. L., Bicalgo B., Parma M. M., Fonseca S. F., Marsaioli A. J., Trindade A. C. L. B., Freitas Gil R. P., Bezerra F. S., Andrade-Neto M., De Oliveira M. C. F., Antimycobacterial and cytotoxicity activity of synthetic and natural compounds. *Quimica Nova*, 2007, 30(7), 1563-1566.
- ⁶² Patole J., Shingnapurkar D., Padhye S., Ratledge C., Schiff base conjugates of *p*-aminosalicylic acid as antimycobacterial agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2006, 16(6), 1514-1517.
- ⁶³ Tantarú G., Martin L., Vieriu M., Panainte A. D., Poiata A., Apostu M., Bibire N., The Influence of Structure on Antibacterial Activity of Some New Aniline Derived Schiff Bases. *Revista de chimie*, 2015, 66(12), 1965-1967.
- ⁶⁴ Bassetti M., Merelli M., Temperoni Ch., Astilean A., New antibiotics for bad bugs: where are we? *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 2013, 12(1), 22.
- ⁶⁵ Krátly M., Vinšová J., Volková M., Buchta V., Trejtnar F., Stolaříková J., Antimicrobial activity of sulfonamides containing 5-chloro-2-hydroxybenzaldehyde and 5-chloro-2-hydroxybenzoic acid scaffold. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2012, 50, 433-440.
- ⁶⁶ Avupati V. R., Yejella R. P., Parala V. R., Killari K. N., Papasani V. M. R., Cheepurupalli P., Gavalapu V. R., Boddeda B., Synthesis, characterization and in vitro biological evaluation of some novel 1,3,5-triazine-Schiff base conjugates as potential antimycobacterial agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2013, 23(21), 5968-5970.
- ⁶⁷ Gupta D., Jain D. K., Synthesis, antifungal and antibacterial activity of novel 1,2,4-triazole derivatives. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 2015, 6(3), 141-146.
- ⁶⁸ Shi L., Ge H. M., Tan S. H., Li H. Q., Song Y. Ch., Zhu H. L., Tan R. X., Synthesis and antimicrobial activities of Schiff bases derived from 5-chloro-salicylaldehyde. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2007, 42(4), 558-564.
- ⁶⁹ Pandeya S. N., Sriram D., Nath G., De Clercq E., Synthesis and antimicrobial activity of Schiff and Mannich bases of isatin and its derivatives with pyrimidine. *Il Farmaco*. 1999, 54(9), 624-628.
- ⁷⁰ Aysen D. M., Birol O., Bedrettin M., Synthesis and antibacterial activity of schiff base derivatives. *International Journal of Drug Development and Research*, 2010, 2(1), 102-107.
- ⁷¹ Wang H., Yuan H., Li S., Li Z., Jiang M., Synthesis, antimicrobial activity of Schiff base compounds of cinnamaldehyde and amino acids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2016, 26(3), 809-813.
- ⁷² Chohan Z. H., Rau A., Noreen S., Scozzafava A., Supuran C. T., Antibacterial cobalt(II), nickel(II) and zinc(II) complexes of nicotinic acid-derived Schiff-bases. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2002, 17(2), 101-106.
- ⁷³ Shakir M., Hanif S., Sherwani A., Mohammad O., Azam M., Al-Resayes S. I., Pharmacophore hybrid approach of new modulated bis-diimine Cu^{II}/Zn^{II} complexes based on 5-chloro Isatin Schiff base derivatives: Synthesis, spectral studies and comparative biological assessment. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2016, 157, 39-56.

-
- ⁷⁴ Krátký M., Vinsova J., Buchta V., Horvati K., Bosze S., Stolarikova J., New amino acid esters of salicylanilides active against MDR-TB and other microbes. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2010, 45(12), 6106-6113.
- ⁷⁵ Krátký M., Vinsova J., Novotna E., Stolarikova J., Salicylanilide pyrazinoates inhibit in vitro multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains, atypical mycobacteria and isocitrate lyase. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2014, 53, 1-9.
- ⁷⁶ Krátký M., Vinšová J., Salicylanilide ester prodrugs as potential antimicrobial agents--a review. *Current pharmaceutical design*, 2011, 17(32), 3494-3505.
- ⁷⁷ Baranyai Z., Krátký M., Vinšová J., Szabó N., Senoner Z., Horváti K., Stolaříková J., Dávid S., Bősze S., Combating highly resistant emerging pathogen *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium tuberculosis* with novel salicylanilide esters and carbamates. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2015, 101, 692-704.
- ⁷⁸ Mook Jr. R. A., Wang J., Ren X. R., Chen M., Spasojevic I., Barak L. S., Lyerly H. K., Chen W., Structure-activity studies of Wnt/ β -catenin inhibition in the Niclosamide chemotype: Identification of derivatives with improved drug exposure. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2015, 23(17), 5829-5838.
- ⁷⁹ Liu Y., Yang Q., Hao D., Zhang W., Facile Synthesis of Triarylmethanimine Promoted by a Lewis Acid-Base Pair: Theoretical and Experimental Studies. *Australian Journal of Chemistry*. 2012, 65(10), 1390-1395.
- ⁸⁰ Vavrikova E., Polanc S., Kocevar M., Kosmrlj J., Horvati K., Bosze S., Stolarikova J., Imramovsky A., Vinsova J., New series of isoniazid hydrazones linked with electron-withdrawing substituents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2011, 46(12), 5902-5909.