

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

QSPR A ELEKTROCHEMICKÁ OXIDACE
4-(BENZYLSULFANYL)PYRIDINŮ

Diplomová práce

Studijní obor: Klinická a toxikologická analýza

Praha 2006

Markéta Brožíková

Předmětová hesla: 4-(benzylsulfanyl)pyridiny

Klíčová slova: QSPR, voltametrie, kapalinová chromatografie, preparativní elektrolyza

PROHLÁŠENÍ

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

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

Madeřka Bráňková

V Praze 1. května 2006

OBSAH

	Seznam použitých zkratk a symbolů	6
1	Úvod	8
1.1	Cíl práce	8
1.2	Substituované deriváty pyridinu.....	8
1.2.1	Chemické a fyzikální vlastnosti pyridinu.....	8
1.2.2	Deriváty pyridinu jako potenciální antimykobakteriální sloučeniny	9
1.2.3	Příprava a biologické vlastnosti studovaných látek	10
1.3	Vliv substituentů na fyzikálně-chemické chování látek.....	12
1.3.1	Studium potencionálních antituberkulotik metodou QSAR.....	13
1.3.2	Vliv substituentů na elektrochemické vlastnosti látek	13
1.3.3	Vliv substituentů na chromatografické chování látek	14
1.4	Využití elektrochemických metod při studiu metabolických přeměn.....	15
2	Experimentální část	16
2.1	Studované látky	16
2.2	Použité chemikálie	17
2.3	Použité metody měření a zpracování dat.....	17
2.3.1	DC voltametrie s rotující diskovou elektrodou	17
2.3.2	Molekulová absorpční spektrometrie v UV oblasti.....	18
2.3.3	Kapalinová chromatografie s UV detektorem.....	18
2.3.4	Preparativní elektrolýza.....	18
2.3.5	Plynová chromatografie s hmotnostním detektorem.....	19
2.4	QSAR, regresní a statistické výpočty.....	19

3	Výsledky a diskuse	21
3.1	Vliv substituentů na voltametrické chování studovaných látek	21
3.2	Vliv substituentů na retenční chování studovaných látek	28
3.2.1	UV spektrometrie	28
3.2.2	Kapalinová chromatografie	29
3.3	Produkty elektrochemické oxidace derivátů 4-(benzylsulfanyl)pyridin-2-karbonitrilu	37
4	Závěr.....	39
	Literatura	42

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

a	směrnice lineární regrese	
A	plocha elektrody <i>nebo</i> absorbance	[cm ²]
b	úsek vytčený lineární regresí na ose y	
c	molární koncentrace	[mol dm ⁻³]
DC	direct-current voltametrie	
$E_{1/2}$	půlvlnový potenciál	[V]
$(E_{1/2})_H$	půlvlnový potenciál nesubstituovaného derivátu	[V]
$(E_{1/2})_X$	půlvlnový potenciál substituovaného derivátu	[V]
F	hodnota F -testu	
F_m	průtoková rychlost mobilní fáze	[ml min ⁻¹]
$F_{\alpha,n}$	tabelovaná kritická hodnota F -testu pro n měření na hladině významnosti α	
HOMO	nejvyšší obsazený molekulový orbital	
i	proud	[A]
k	rovnovážná nebo rychlostní konstanta substituovaného derivátu <i>nebo</i> kapacitní poměr	
k^0	rovnovážná nebo rychlostní konstanta nesubstituovaného derivátu	
l	délka absorbující vrstvy	[m]
$\log P_X$	logaritmus rozdělovacího koeficientu substituovaného derivátu	
$\log P_H$	logaritmus rozdělovacího koeficientu nesubstituovaného derivátu	
MIC	minimální inhibiční koncentrace	[μ mol l ⁻¹]
MS	hmotnostní spektrometrie	
n	počet měření <i>nebo</i> počet stupňů volnosti	
P	rozdělovací koeficient oktanol-voda	
QSAR	Quantitative structure-activity relationships	
QSER	Quantitative structure-electrochemistry relationships	

QSPR	Quantitative structure-property relationships	
r	korelační koeficient	
s_y	směrodatná odchylka lineární regrese	
t	čas	[s]
	<i>nebo</i> teplota	[°C]
t_M	mrtvý retenční čas	[s]
t_R	retenční čas	[s]
UV	ultrafialová oblast spektra	
ν	rychlost polarizace elektrody	[V s ⁻¹]
w	objemový zlomek	
α	hladina významnosti	
ϵ_{HOMO}	energie nejvyššího obsazeného molekulového orbitalu	[eV]
λ	vlnová délka	[nm]
π	hydrofobní substituentová konstanta	
σ	Hammettova substituentová σ konstanta	
ρ	Hammettova reakční ρ konstanta	

1 ÚVOD

1.1 CÍL PRÁCE

Cílem předkládané diplomové práce je studium některých vlastností nově syntetizovaných derivátů 4-(benzylsulfanyl)pyridinu. Jedná se o dvě skupiny látek: substituované deriváty 4-(benzylsulfanyl)pyridin-2-karbonitrilu a 4-(benzylsulfanyl)pyridin-2-karbothioamidu.

První část práce se zabývá vlivem substituentů na voltametrické a chromatografické chování studovaných látek (QSPR analýza). Cílem druhé části práce je příprava a identifikace produktů elektrochemické oxidace vybraných studovaných derivátů 4-(benzylsulfanyl)pyridin-2-karbonitrilu.

1.2 SUBSTITUOVANÉ DERIVÁTY PYRIDINU

1.2.1 Chemické a fyzikální vlastnosti pyridinu

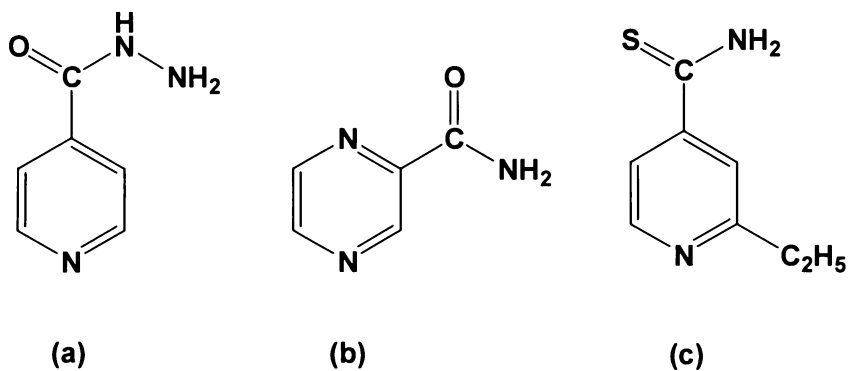
Pyridin patří mezi nenasycené dusíkaté heterocykly¹. Strukturně se jedná o plochou aromatickou molekulu s vazebnými úhly 120° a délkou vazeb 139 pm. Průmyslově se získává destilací uhelného dehtu jako hořlavá páchnoucí kapalina (mez detekce čichem je 0,17 ppm) s teplotou varu 115 °C, používá se jako výtečné rozpouštědlo a fungicid.

Pyridin je velmi toxický, požití 100 ml působí vážné potíže a smrt, inhalace 6–12 ppm působí bolest hlavy a zvracení, na kůži působí bolestivé záněty a spáleniny, nebezpečně napadá oči².

1.2.2 Deriváty pyridinu jako potenciální antimykobakteriální sloučeniny

V současné době se velmi naléhavě hledají nová selektivnější antituberkulotika³, jelikož se celosvětově zvyšuje výskyt tuberkulózy (v souvislosti s HIV, zvyšujícím se zneužíváním omamných látek a imigrací ze zemí, kde je její výskyt běžný). To vede k potřebě syntetizovat stále nové antimykobakteriální látky, neboť původce tuberkulózy, bakterie *Mycobacterium tuberculosis*, se stává multirezistentní na současná antituberkulotika⁴. Navíc vzrůstá i frekvence infekcí způsobených atypickými mykobakteriemi (netuberkuloidní mykobakterie), kde se hlavním problémem jeví *Mycobacterium avium* (způsobující nejběžnější systémovou bakteriální infekci komplikující onemocnění AIDS)⁵, a zároveň se objevuje patogenní charakter u mykobakteriálních kmenů, které byly považovány za nepatogenní⁶.

Antimykobakteriální aktivitu vykazují především heterocyklické sloučeniny, zvláště pak heterocykly dusíkaté⁷, obsahující jeden nebo dva atomy dusíku v heterocyklickém kruhu⁸. Typickými zástupci jsou⁹: Isoniazid, Pyrazinamid, Ethionamid (obr.1.1)

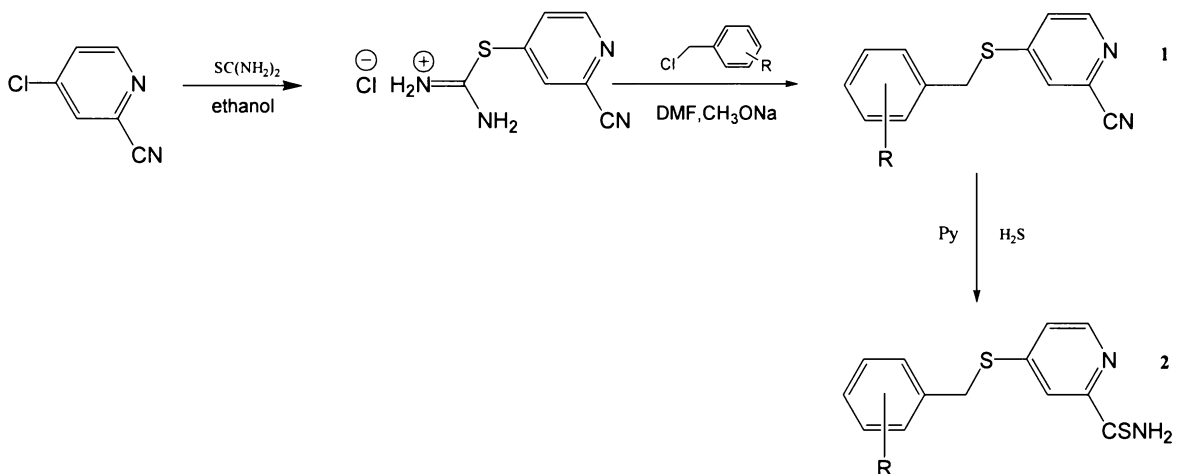


Obr. 1.1. Chemická struktura (a) Isoniazidu, (b) Pyrazinamidu, (c) Ethionamidu.

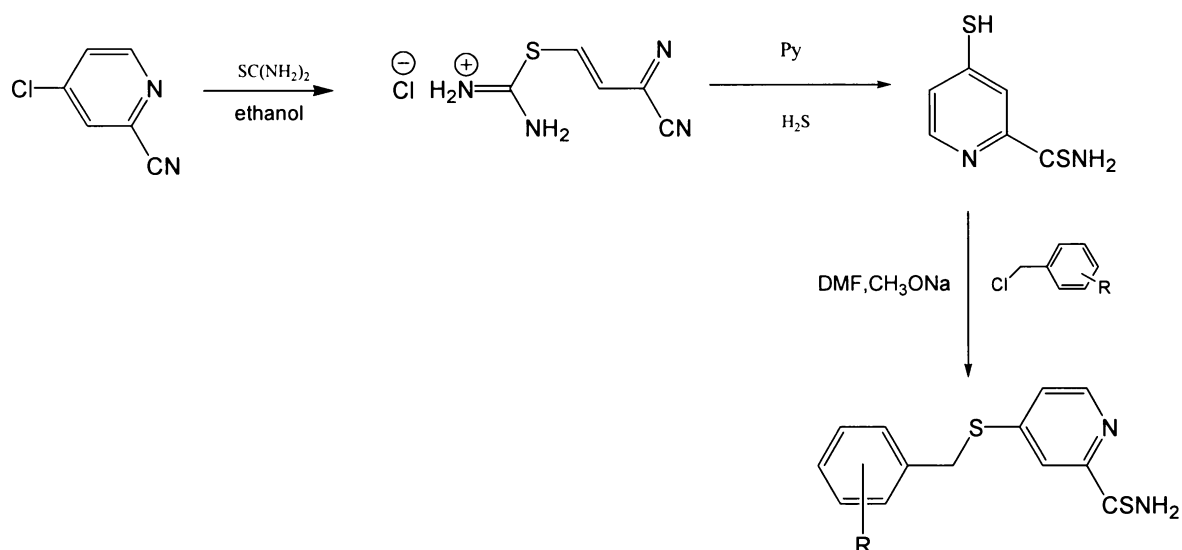
Deriváty pyridinu se v tomto ohledu jeví jako velmi slibná potencionální antituberkulotika¹⁰. U některých derivátů pyridinu obsahujících karbonitrilovou ($-\text{CN}$) skupinu je antimykobakteriální účinnost proti atypickým mykobakteriím dokonce vyšší než u Isoniazidu a dalších konvenčně používaných antituberkulotik¹¹. U skupiny derivátů s karbothioamidovou skupinou ($-\text{CSNH}_2$) je aktivita silně závislá na druhu příslušné atypické mykobakterie¹².

1.2.3 Příprava a biologické vlastnosti studovaných látek

Klíčovou sloučeninou pro syntézu derivátů 4-(benzylsulfanyl)pyridinu je 4-chlorpyridin-2-karbonitril, který vzniká dle reakce popsané v literatuře¹³. Proces přípravy výsledných látek je uveden na obr. 1.2. Deriváty 4-(benzylsulfanyl)pyridin-2-karbothioamidu obsahující ve své molekule nitroskupinu se připravují dle schématu uvedeného na obr. 1.3.



Obr. 1.2. Příprava 4-(benzylsulfanyl)pyridin-2-karbonitrilů (1) a nenitrovaných 4-(benzylsulfanyl)pyridin-2-karbothioamidů (2) (převzato z¹⁴).



Obr. 1.3. Příprava nitrovaných 4-(benzylsulfanyl)pyridin-2-karbothioamidů (převzato z¹⁴).

Antimykobakteriální aktivita studovaných látek byla testována *in vitro* proti *Mycobacterium tuberculosis* CNCTC My 331/81, *M. kansasii* CNCTC My 235/80, *M. kansasii* 509/96 (kmen izolovaný z pacienta), a *M. avium* CNCTC My 330/88 (cit. ¹⁴). Za použití mikrometody byla určena minimální inhibiční koncentrace (MIC). V mnoha případech došlo k nárůstu antimykobakteriální aktivity následkem substituce základního skeletu sloučeniny.

1.3 Vliv substituentů na fyzikálně-chemické chování látek

Chemické a fyzikální vlastnosti sloučeniny jsou jednoznačně určeny strukturou její molekuly^{15, 16}. Tyto vlastnosti lze částečně ovlivňovat změnou druhu a polohy substituentu na základním skeletu sloučeniny. Této skutečnosti se využívá pro studium vzájemných vztahů mezi strukturou a chováním chemických sloučenin. Tímto studiem se zabývá vědní odvětví zvané korelační analýza vztahů mezi strukturou a aktivitou (angl. quantitative structure-activity relationships, QSAR), přičemž pod pojmem aktivita lze zahrnout jak aktivitu chemickou (rychlost reakce, elektrochemické parametry, chromatografické parametry, aj.) tak biologickou (antibiotická účinnost, toxicita aj.). Pro studium vztahů mezi strukturou látek a jejich chemickými vlastnostmi se spíše používá termín QSPR (angl. quantitative structure-property relationships). Cílem QSPR analýzy je pomocí zpracování kvantitativních experimentálních a teoretických dat, a jejich vzájemným porovnáváním pomocí různých matematických modelů a postupů, vyvodit obecnější závěry, zejména umožnit předvídat chování a vlastnosti dosud nestudovaných látek.

Základní rovnici popisující vztahy mezi strukturou a vlastnostmi látky se podařilo najít v roce 1935 americkému chemiku L. P. Hammettovi

$$\log k = \log k^{\circ} + \rho\sigma \quad (1.1)$$

kde k je rovnovážná nebo rychlostní konstanta substituovaného derivátu, k° je rovnovážná nebo rychlostní konstanta nesubstituovaného derivátu, ρ je Hammettova reakční konstanta, která je mírou citlivosti reakce nebo měřené vlastnosti na elektronový efekt substituentů a σ je Hammettova substituentová konstanta popisující elektronový efekt substituentu (kladné hodnoty σ přísluší elektrofilním substituentům, záporné hodnoty pak substituentům nukleofilním).

Dále byla navržena celá řada modifikací jak základní rovnice (1.1), tak substituentových konstant, umožňujících kvantifikovat vliv substituentů na fyzikálně-chemické i biologické chování látek.

1.3.1 Studium potencionálních antituberkulotik metodou QSAR

Při studiu antimykobakteriálních vlastností nově syntetizovaných potenciálních antituberkulotik ze skupiny dusíkatých heterocyklů metodou QSAR bylo zjištěno, že mohou být rozděleny do několika skupin¹⁷. V první skupině lze nalézt korelaci s energetickými parametry, ve druhé pak dochází k nárůstu aktivity se zvyšující se hydrofobicitou látky. Ve třetí skupině jsou vztahy mezi aktivitou a hydrofobicitou parabolické a ve čtvrté skupině nelze najít žádné vztahy mezi aktivitou a hydrofobicitou celých molekul, nicméně v některých případech aktivita koreluje s hydrofobicitou části molekuly.

1.3.2 Vliv substituentů na elektrochemické vlastnosti látek

V elektrochemii si vlivu substituentů na elektrochemické chování látek povšiml již J. Heyrovský. Postupně bylo studováno polarografické resp. voltametrické chování řady substitučních derivátů mnoha látek, přičemž se ukázalo, že mezi půlvalnovými potenciály a Hammettovými konstantami existuje obvykle přímý lineární vztah¹⁸, Hammettova rovnice (1.1) pak přejde do tvaru

$$(E_{1/2})_X = (E_{1/2})_H + \rho\sigma \quad (1.2)$$

neboli Hammettovu rovnici pro půlvalnové potenciály, kde $(E_{1/2})_X$ označuje půlvalnový potenciál substituovaného derivátu, $(E_{1/2})_H$ půlvalnový potenciál nesubstituovaného derivátu, ρ Hammettovu reakční konstantu a σ Hammettovu substituentovou konstantu.

Dosud nejdříve se vlivu substituentů v organické polarografii věnoval P. Zuman¹⁹, jeho práce se však věnují převážně elektrochemickým redukcím. V nedávné době se objevilo pojmenování pro hodnocení vlivu substituentů na elektrochemické chování látek jako QSAR (quantitative structure-electrochemistry relationships)²⁰.

Vzhledem k tomu, že mezi substituentovými konstantami a elektrochemickými vlastnostmi (půlvalnovými potenciály) lze v řadě případů nalézt velmi těsné korelační

závislosti, byly dokonce hledány přímo vztahy mezi elektrochemickými vlastnostmi a biologickými účinky látek. Např. Kurihara et al.²¹ studovali anaerobní degradaci chlorcyklohexenu cytochromem P450 a popsali vztah mezi reakční rychlostí této reakce a půlvalným potenciálem příslušného chlorcyklohexenu.

1.3.3 Vliv substituentů na chromatografické chování látek

Jedním z dalších parametrů určujícím chemické chování látek je lipofilita vyjádřená konstantou rozdělovacího poměru mezi oktanol a vodu (P) a konstantou hydrofobicity (π). Jedná se převážně o experimentální konstanty popisující látku, respektive substituent, z hlediska lipofility. Podobně jako σ konstanta je i π konstanta termodynamickou substituentovou konstantou lineárně závislou na změně Gibbsovy energie. Lze ji vypočítat ze vztahu

$$\pi = \log P_X - \log P_H \quad (1.3)$$

kde P_H je rozdělovací koeficient oktanol/voda nesubstituované látky a P_X je rozdělovací koeficient oktanol/voda pro substituovaný derivát. Obecně bývá jako míra lipofility brán právě rozdělovací koeficient P , který ukazuje poměr koncentrací látky rozpuštěné v oktanolu a ve vodě. Za standard s $\pi = 0$ byl položen vodík (tj. nesubstituovaná látka). Z toho vyplývá, že kladné hodnoty π konstanty nabývají ty substituenty, které mají větší hydrofobní efekt než vodík a záporných hodnot π konstanty naopak substituenty s nižším hydrofobním efektem než vodík. Známe-li tedy P_H pro nesubstituovaný základní skelet, můžeme pomocí π konstanty dopočítat lipofilní parametry pro různě substituované látky ze zkoumané série.

Pro studium hydrofobních vlastností biologicky aktivních látek organické povahy je vhodným nástrojem především vysokoúčinná kapalinová chromatografie²². Studium této problematiky se věnoval zejména Kalistan²³. Pomocí HPLC byly nalezeny korelace mezi retenčními charakteristikami a parametry lipofility. Zjistilo se, že mezi kapacitním poměrem k a rozdělovacím koeficientem, resp. konstantou π je lineární vztah

$$\log P = a \log k + b \quad (1.4a)$$

$$\log \pi = a \log k + b \quad (1.4b)$$

kde a je směrnice a b úsek této závislosti.

Výzkum v této oblasti byl doposud zaměřen především na hledání vhodné stacionární fáze, která by zajišťovala lineární závislost mezi $\log k$ a $\log P$. Nejlepších výsledků bylo dosaženo na C₁₈ silikagelu²⁴.

1.4 VYUŽITÍ ELEKTROCHEMICKÝCH METOD PŘI STUDIU METABOLICKÝCH PŘEMĚN

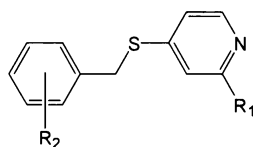
Elektrochemické metody nacházejí své využití při výzkumu farmaceuticky a biologicky aktivních látek nejen jako metody pro analytická stanovení, ale i jako modelová technika pro studium jejich chování. Elektrochemické metody jsou často využívány při simulaci biologické oxidace²⁵. Řada biologických oxidačních reakcí je lokalizována v lipidových membránách, dnes je již známo, že i v tomto prakticky bezvodém prostředí probíhají enzymatické reakce, neboť pro funkci enzymu je dostačující monomolekulární vrstva vody na jeho povrchu²⁶. Studium oxidačních metabolických přeměn *in vivo* je velice složité, proto jsou tyto reakce simulovány elektrooxidačními reakcemi v nevodném prostředí (acetonitril, dimethylformamid). Výsledky elektrochemického studia oxidačních reakcí v nevodném prostředí tak mohou poskytovat řadu užitečných informací o pravděpodobném průběhu biologické oxidace²⁷.

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 STUDOVANÉ LÁTKY

Studované deriváty 4-(benzylsulfanyl)pyridin-2-karbonitrilu a 4-(benzylsulfanyl)pyridin-2-karbothioamidu byly syntetizovány¹⁴ na Katedře anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové. Totožnost a čistota byly stanoveny elementární analýzou, měřením bodu tání a nukleární magnetickou resonancí. Přehled studovaných látek je podán v tab. 2.1.

Tab. 2.1. Struktury a molární hmotnosti studovaných derivátů 4-(benzylsulfanyl)pyridinu



derivát	R ₁	R ₂					M g mol ⁻¹
		2	3	4	5	6	
1	CN						226,29
2	CN	Cl					260,75
3	CN		Cl				260,75
4	CN			Cl			260,75
5	CN	F					244,29
6	CN		F				244,29
7	CN			F			244,29
8	CN		Br				305,19
9	CN			Br			305,19
10	CN		CH ₃				240,33
11	CN			NO ₂			271,29
12	CN	NO ₂		NO ₂			316,29
13	CN	Cl				F	278,73
14	CN	F				NO ₂	289,29
15	CN		Cl	Cl			295,19
16	CN		F	F			262,28
17	CN		NO ₂				271,29
18	CN		NO ₂		NO ₂		316,29
19	CSNH ₂		Cl				294,82
20	CSNH ₂	F					278,03
21	CSNH ₂		F				278,03
22	CSNH ₂		Br				339,28
23	CSNH ₂			NO ₂			305,38
24	CSNH ₂	NO ₂		NO ₂			350,38
25	CSNH ₂	Cl				F	292,40
26	CSNH ₂		OCH ₃				290,41
27	CSNH ₂		Cl	Cl			329,27
28	CSNH ₂		F	F			296,36
29	CSNH ₂		CH ₃	CH ₃			288,43
30	CSNH ₂		NO ₂				305,38
31	CSNH ₂		NO ₂		NO ₂		350,38
32	CSNH ₂		CF ₃		CF ₃		396,38

2.2 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE

Jako prostředí pro elektrochemické i spektrofotometrické studium byl použit acetonitril čistoty pro HPLC (Chromasolv, Riedel de Haën) s obsahem vody nižším než 0,02 obj.%. Jako základní elektrolyt byl použit chloristan sodný, připravený metodou dle Biedermanna²⁸. Ostatní použité chemikálie byly analytické čistoty: aceton (Lachema Brno, ČR), argon (Linde-Technoplyn, ČR), dusičnan stříbrný (Lachema Brno, ČR), chloroform čistoty pro HPLC 99,9% (Chromasolv, Riedel-de Haën) s obsahem vody nižším než 0,02 obj.%, thiomocovina (Sigma Aldrich).

2.3 POUŽITÉ METODY MĚŘENÍ A ZPRACOVÁNÍ DAT

2.3.1 DC voltametrie s rotující diskovou elektrodou

Měření bylo realizováno na přístroji Eko-Tribo Polarograf (Polaro-Sensors, ČR) se sběrem dat softwarem Polar Pro v. 2.0 (Polaro-Sensors, ČR). Zapojení bylo tříelektrodové. Jako pracovní elektroda byla použita rotující disková platinová elektroda o ploše 13,99 mm². Rychlost rotace byla 1226 ot min⁻¹ a rychlost polarizace elektrody byla 10 mV s⁻¹. Referentní elektrodou byl stříbrný plíšek o ploše 1 cm² ponořený do 0,01 mol dm⁻³ roztoku dusičnanu stříbrného v 1 mol dm⁻³ roztoku chloristanu sodného v acetonitrilu. Referentní elektroda byla od pracovního prostoru oddělena meziprostorem s náplní 0,5 mol dm⁻³ roztoku chloristanu sodného v acetonitrilu. Pomocnou elektrodou byl platinový drát o průměru 1 mm a délce 80 mm. Měření probíhalo v třídílné polarografické nádobce²⁹ při laboratorní teplotě 20 ± 1°C. Roztok v pracovním prostoru nádoby byl před každým měřením krátce probubláván argonem.

Z naměřených křivek byly graficky vyhodnoceny hodnoty půlvolných potenciálů $E_{1/2}$ [V].

2.3.2 Molekulová absorpční spektrometrie v UV oblasti

Spektra studovaných derivátů v UV oblasti byla měřena na spektrofotometru HP 8453 (Hewlett Packard) s diodovým polem. Pro eliminaci chyb měření byla připravena ze zásobních roztoků o koncentraci 1×10^{-3} mol dm^{-3} vždy tři nezávislá ředění každého derivátu o výsledné koncentraci 8×10^{-5} mol dm^{-3} . Tyto roztoky byly měřeny v křemenné kyvetě o měrné tloušťce 1 cm v rozsahu vlnových délek 200–400 nm.

2.3.3 Kapalinová chromatografie s UV detektorem

Měření probíhalo na kapalinovém chromatografu HP 1090 L (Hewlett Packard) na koloně RP C-18 ZORBAX délky 150 mm, průměru 4,6 mm a velikosti zrn 5 μm . Průtok byl nastaven na 0,8 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Detekce probíhala při 235 nm. Stanovení mrtvého retenčního času bylo provedeno nástřikem roztoku thiomochoviny ($c = 1$ mg dm^{-3}). K nástřiku byla použita smyčka 10 μl .

Kapacitní poměr k byl vypočítán ze vztahu

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

kde t_R je je retenční čas daného derivátu (s) a t_M je mrtvý retenční čas thiomochoviny (s).

2.3.4 Preparativní elektrolýza

Produkty elektrochemické oxidace vybraných derivátů byly získány pomocí preparativní elektrolýzy, která byla realizována ve skleněné nádobce H-typu³⁰ za použití tří elektrod. Pracovní elektrodou byla Ficherova velkoplošná platinová elektroda, druhá identická Fisherova elektroda sloužila jako elektroda pomocná. Obě elektrody byly ponořeny do 0,1 mol dm^{-3} roztoku chloristanu sodného v acetonitrilu a byly vzájemně odděleny meziprostorem s náplní 0,5 mol dm^{-3} chloristanu sodného v acetonitrilu.

Referentní elektrodou byl stříbrný drát ponořený v $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ roztoku dusičnanu stříbrného a 1 mol dm^{-3} roztoku chloristanu sodného v acetonitrilu, oddělený od pracovního prostoru meziprostorem s náplní $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ roztoku chloristanu sodného v acetonitrilu. Byl použit regulovatelný Potenciostat/Galvanostat Model 273 (EG&G Princeton Applied Research, USA). K odstranění kyslíku byly všechny použité roztoky probublávány 5 minut argonem. Elektrolýza probíhala za laboratorní teploty $20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ za intenzivního míchání. Použité množství vzorku bylo 5 mg.

Po ukončení elektrolýzy byl elektrolyzát odpařen do sucha na vakuové rotační odparce s vodní lázní, jejíž teplota byla $65 \text{ }^\circ\text{C}$. Odpařený elektrolyzát byl třikrát extrahován chloroformem a znovu odpařen do sucha na rotační vakuové odparce.

2.3.5 Plynová chromatografie s hmotnostním detektorem

Připravené elektrooxidační produkty byly analyzovány pomocí plynové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Měření byla realizována na plynovém chromatografu Varian 3400 s kolonou DB5 (5 % difenylsiloxan, 95 % dimethylsiloxan) délky 30 m, vnitřního průměru 0,25 mm, tloušťka filmu 0,012 μm . Injektor byl vyhříván na teplotu $250 \text{ }^\circ\text{C}$. Jako detektor byl použit hmotnostní spektrometr Finnigan MAT INCOS 50 s ionizací nárazem elektronů.

2.4 QSAR, REGRESNÍ A STATISTICKÉ VÝPOČTY

Kvantově-chemické výpočty byly provedeny pomocí programu HyperChem 5.1 (Hypercube, USA). Hodnoty energií HOMO orbitalů byly vypočítány za použití semiempirické kalkulace AM1, po nalezení nejstabilnější konformace pomocí molekulární dynamiky při simulované teplotě 800 K, následované metodou Monte Carlo při simulované teplotě 300 K.

Substituentové Hammettovy σ a hydrofóbní π konstanty byly převzaty z tabulek Hansche, Lea a Hoekmana³¹. Substituentové konstanty pro substituenty v *ortho* poloze byly převzaty z práce Thompsona a Steela³². U látek s více substituenty v molekule byly substituentové konstanty získány součtem substituentových konstant jednotlivých substituentů³³. Výpočty byly provedeny v programu QSAR-PC:PAR (Biosoft, UK).

Výpočty hodnot rozdělovacích koeficientů oktanol-voda byly provedeny pomocí programu CS ChemDraw Ultra 5.0 (CambridgeSoft, Británie) za použití parametrů dle Viswanadhana.

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

Naměřená data byla zpracována běžnými statistickými postupy^{34,35}. Výsledky spektrofotometrického a voltametrického měření jsou mediány z nejméně tří měření. Lineární závislosti dvou proměnných byly zpracovány metodou lineární regrese s vyhodnocením příslušných odchylek a korelačních koeficientů. Výpočty byly realizovány pomocí softwarových programů Microcal Origin 6.0 (Microcal Software, USA) a Microsoft Excel 97 (Microsoft Corporation, USA).

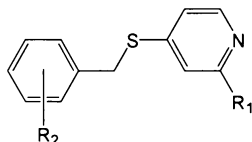
3 VÝSLEDKY A DISKUSE

3.1 VLIV SUBSTITUENTŮ NA VOLTAMETRICKÉ CHOVÁNÍ STUDOVANÝCH LÁTEK

Vliv substituentů na voltametrické chování studovaných derivátů 4-(benzylsulfanyl)pyridinu byl studován metodou DC voltametrie s rotující diskovou elektrodou. Obě skupiny studovaných látek poskytovaly v prostředí 0,1 mol dm⁻³ roztoku chloristanu sodného v acetonitrilu jednu oxidační vlnu. Kalibrační závislosti byly lineární v rozsahu 0,5–5,0×10⁻⁴ mol dm⁻³, půlvlnové potenciály nezávisely na koncentraci látky. Naměřené hodnoty půlvlnových potenciálů, příslušné Hammetovy konstanty, indikátorová konstanta a energie HOMO orbitalů jsou uvedeny v tab. 3.1.

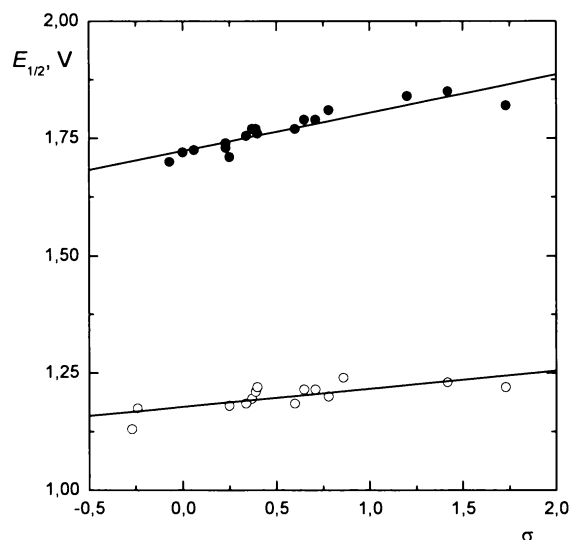
Z naměřených dat je patrné, že hodnota půlvlnového potenciálu studovaných látek je ovlivněna v první řadě substituentem na pyridinu (–CN nebo –CSNH₂ skupina) a dále substituentem na fenylovém kruhu. Obecně lze říci, že deriváty 4-(benzylsulfanyl)pyridin-2-karbonitrilu jsou oxidovány při vyšších potenciálech než je tomu u shodně substituovaných derivátů 4-(benzylsulfanyl)pyridin-2-karbothioamidu. Vliv substituentů na fenylovém kruhu na voltametrické chování studovaných derivátů byl kvantifikován s Hammetovými σ konstantami a energií nejvyšších obsazených molekulových orbitalů (ϵ_{HOMO}). Na obr. 3.1 je znázorněna lineární závislost půlvlnových potenciálů studovaných látek na hodnotě Hammetovy σ konstanty.

Tab. 3.1 Struktury, příslušné indikátorové a Hammetovy konstanty, vypočítané hodnoty energií HOMO orbitalů a naměřené hodnoty půlvolných potenciálů studovaných derivátů 4-(benzylsulfany)pyridinu (půlvolné potenciály byly měřeny v 0,1 mol dm⁻³ NaClO₄ v acetonitrilu, c = 5×10⁻⁴ mol dm⁻³ vs. Ag / 0,01 mol dm⁻³ AgNO₃ / 1 mol dm⁻³ NaClO₄).



derivát	R ₁	R ₂					I	σ	ε _{HOMO} eV	E _{1/2} V
		2	3	4	5	6				
1	CN						1	0,00	-8,85880	1,720
2	CN	Cl					1	0,40	-8,86793	1,760
3	CN		Cl				1	0,37	-8,94920	1,770
4	CN			Cl			1	0,23	-8,95517	1,730
5	CN	F					1	0,25	-8,88874	1,710
6	CN		F				1	0,34	-8,96482	1,755
7	CN			F			1	0,06	-8,95916	1,725
8	CN		Br				1	0,39	-8,95913	1,770
9	CN			Br			1	0,23	-8,97534	1,740
10	CN		CH ₃				1	-0,07	-8,83868	1,700
11	CN			NO ₂			1	0,78	-9,23081	1,810
12	CN	NO ₂		NO ₂			1	1,73	-9,39274	1,820
13	CN	Cl				F	1	0,65	-8,86395	1,790
14	CN	F				NO ₂	1	1,20	-9,04814	1,840
15	CN		Cl	Cl			1	0,60	-9,02537	1,770
16	CN		F	F			1	0,40	-9,06313	1,760
17	CN		NO ₂				1	0,71	-9,17639	1,790
18	CN		NO ₂		NO ₂		1	1,42	-9,44517	1,850
19	CSNH ₂		Cl				0	0,37	-8,56210	1,195
20	CSNH ₂	F					0	0,25	-8,52110	1,180
21	CSNH ₂		F				0	0,34	-8,56300	1,185
22	CSNH ₂		Br				0	0,39	-8,55900	1,210
23	CSNH ₂			NO ₂			0	0,78	-8,69790	1,200
24	CSNH ₂	NO ₂		NO ₂			0	1,73	-8,73400	1,220
25	CSNH ₂	Cl				F	0	0,65	-8,50590	1,215
26	CSNH ₂		OCH ₃				0	-0,27	-8,49310	1,130
27	CSNH ₂		Cl	Cl			0	0,60	-8,51200	1,185
28	CSNH ₂		F	F			0	0,40	-8,61070	1,220
29	CSNH ₂		CH ₃	CH ₃			0	-0,24	- ^a	1,175
30	CSNH ₂		NO ₂				0	0,71	-8,66230	1,215
31	CSNH ₂		NO ₂		NO ₂		0	1,42	-8,77240	1,230
32	CSNH ₂		CF ₃		CF ₃		0	0,86	- ^a	1,240

^a hodnota nebyla výpočtem dostupná



Obr. 3.1 Korelace mezi hodnotami půlvlnových potenciálů a hodnotami příslušných Hammetových σ konstant: pro deriváty 4-(benzylsulfanyl)pyridin-2-karbonitrilu (●) a pro deriváty 4-(benzylsulfanyl)pyridin-2-karbothioamidu (○). Půlvlnové potenciály byly měřeny v $0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaClO}_4$ v acetonitrilu, $c = 5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ vs. Ag / $0,01 \text{ mol dm}^{-3} \text{ AgNO}_3$ / $1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaClO}_4$

Pro závislost mezi hodnotou půlvlnového potenciálu a Hammetovou σ konstantou byla pro deriváty 4-(benzylsulfanyl)pyridin-2-karbonitrilu nalezena následující korelační rovnice

$$E_{1/2} = 0,081 \sigma + 1,724 \quad (3.1)$$

$$n = 18, r = 0,912, s_y = 0,018, F = 78,76 > F_{1, 16, 0,01} = 8,53$$

Vztah mezi půlvlnovým potenciálem a Hammetovou σ konstantou pro deriváty 4-(benzylsulfanyl)pyridin-2-karbothioamidu popisuje rovnice

$$E_{1/2} = 0,036 \sigma + 1,177 \quad (3.2)$$

$$n = 13, r = 0,757, s_y = 0,018, F = 14,76 > F_{1, 11, 0,01} = 9,65$$

Ve skupině derivátů 4-(benzylsulfanyl)pyridin-2-karbothioamidu se nacházejí látky se složitější substitucí na fenylu ($-\text{OCH}_3$, $-\text{CF}_3$) než je tomu u skupiny derivátů 4-(benzylsulfanyl)pyridin-2-karbonitrilu. Tato skutečnost s největší pravděpodobností vysvětluje nižší korelační koeficient rovnice (3.2).

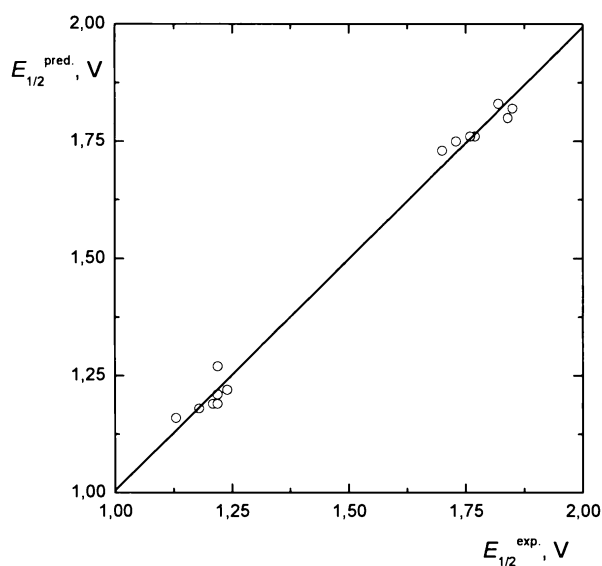
Jak je patrné z obr. 3.1 je vliv substituentu na pyridinu ($-\text{CN}$ nebo $-\text{CSNH}_2$ skupina) u obou druhů derivátů přibližně stejný. Zavedením indikátorové konstanty I ,

charakterizující druh substituentu na pyridinu, definovanou jako $I = 0$ pro karbothioamidovou skupinu resp. $I = 1$ pro karbonitrilovou skupinu, lze zkonstruovat obecnou regresní rovnici platnou pro oba druhy studovaných 4-(benzylsulfanyl)pyridinů. Jako trénovací sada byly zvoleny deriváty označené lichými čísly a z jejich dat byla zkonstruována následující regresní rovnice

$$E_{1/2} = 0,055 \sigma + 0,566 I + 1,171 \quad (3.3)$$

$$n = 16, r = 0,998, s_y = 0,020, F = 1620,12 > F_{2, 13, 0,01} = 6,70$$

Kvalita regresní rovnice (3.3) byla testována pomocí dat derivátů označenými sudými čísly. Na obr. 3.2 je znázorněna závislost mezi půlvlnovými potenciály těchto derivátů vypočítaných z regresní rovnice (3.3) a skutečnými experimentálními hodnotami půlvlnových potenciálů.



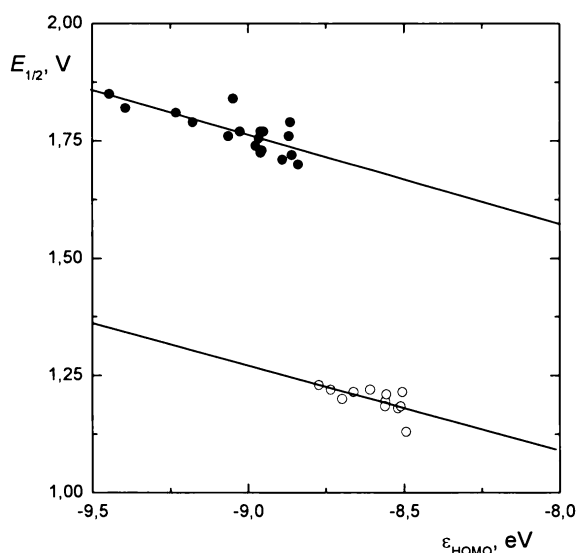
Obr. 3.2 Závislost mezi půlvlnovými potenciály vypočítanými z regresní rovnice (3.3) a skutečnými experimentálními hodnotami půlvlnových potenciálů derivátů 4-(benzylsulfanyl)pyridinu označených sudými čísly ($r = 0, 0,997$)

Z obr. 3.2 je patrné, že regresní rovnice (3.3) je velmi dobře použitelná pro oba druhy studovaných derivátů 4-(benzylsulfanyl)pyridinu. S použitím experimentálních dat všech třiceti dvou studovaných derivátů byla získána výsledná regresní rovnice popisující vliv substituentů na pyridinu a na fenylu na půlvlnový potenciál derivátů 4-(benzylsulfanyl)pyridinu

$$E_{1/2} = 0,060 \sigma + 0,569 I + 1,166 \quad (3.4)$$

$$n = 32, r = 0,997, s_y = 0,022, F = 2405,80 > F_{2, 29, 0,01} = 5,42$$

Hodnota korelačního koeficientu rovnice (3.4) je velmi vysoká, což vystihuje velmi dobré chování studovaných látek ve vztahu k vyšetřovaným parametrům. Navíc došlo k výraznému nárůstu korelačního koeficientu při sloučení obou skupin derivátů 4-(benzylsulfanyl)pyridinu. Z těchto důvodů se další analýza vztahů mezi hodnotami půlvlnových potenciálů a hodnotami energií HOMO orbitalů studovaných látek omezila na hledání společné korelační rovnice pro obě skupiny.



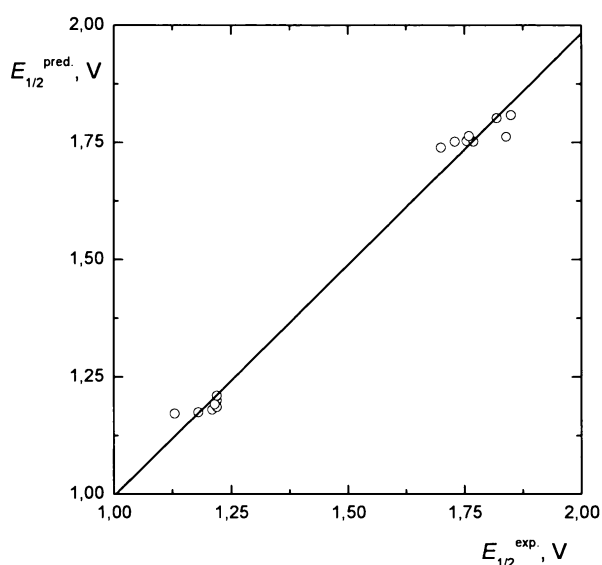
Obr. 3.3 Korelace mezi hodnotami půlvlnových potenciálů a hodnotami energií HOMO orbitalů : pro deriváty 4-(benzylsulfanyl)pyridin-2-karbonitrilu (●) a pro deriváty 4-(benzylsulfanyl)pyridin-2-karbothioamidu (○). Půlvlnové potenciály byly měřeny v $0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaClO}_4$ v acetonitrilu, $c = 5 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ vs. Ag / $0,01 \text{ mol dm}^{-3} \text{ AgNO}_3$ / $1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaClO}_4$

Z obr. 3.3 je patrné, že vliv substituentu na pyridinu má, stejně jako v případě Hametových σ konstant, shodnou tendenci. Opět byla použita indikátorová konstanta I a sestrojena obecná rovnice charakterizující obě skupiny 4-(benzylsulfanyl)pyridinů. Jako trénovací sada byly zvoleny deriváty označené lichými čísly a z jejich dat byla zkonstruována následující regresní rovnice

$$E_{1/2} = -0,114 \varepsilon_{\text{HOMO}} + 0,527I + 0,204 \quad (3.5)$$

$$n = 15, r = 0,993, s_y = 0,037, F = 435,53 > F_{2, 12, 0,01} = 6,93$$

Pro otestování kvality regresní rovnice (3.5) byla použita data derivátů označenými sudými čísly. Na obr. 3.4 je znázorněna závislost mezi půlvolnými potenciály těchto derivátů vypočítaných z regresní rovnice (3.5) a skutečnými experimentálními hodnotami půlvolných potenciálů.



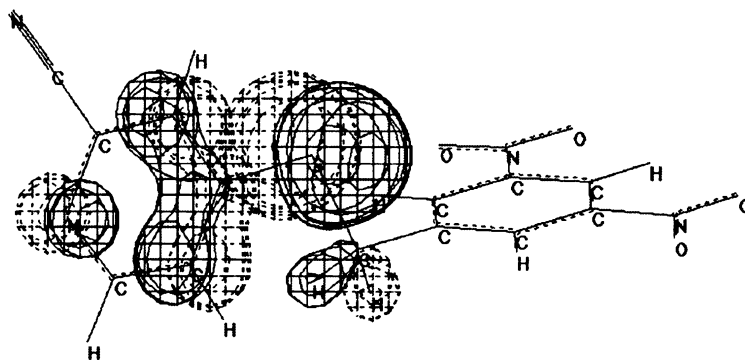
Obr. 3.4 Závislost mezi půlvolnými potenciály vypočítanými z regresní rovnice (3.5) a skutečnými experimentálními hodnotami půlvolných potenciálů derivátů 4-(benzylsulfanyl)pyridinu označených sudými čísly ($r = 0,996$)

Na obr. 3.4 je velmi zřetelně ukázáno, že regresní rovnice (3.5) je velmi dobře použitelná pro oba druhy studovaných derivátů 4-(benzylsulfanyl)pyridinu. Výsledná regresní rovnice popisující vliv substituentů na pyridinu a na fenylu na půlvolný potenciál derivátů 4-(benzylsulfanyl)pyridinu byla vypočítána za použití experimentálních dat všech třiceti studovaných derivátů (u derivátů **29** a **32** nebyla hodnota $\varepsilon_{\text{HOMO}}$ dostupná)

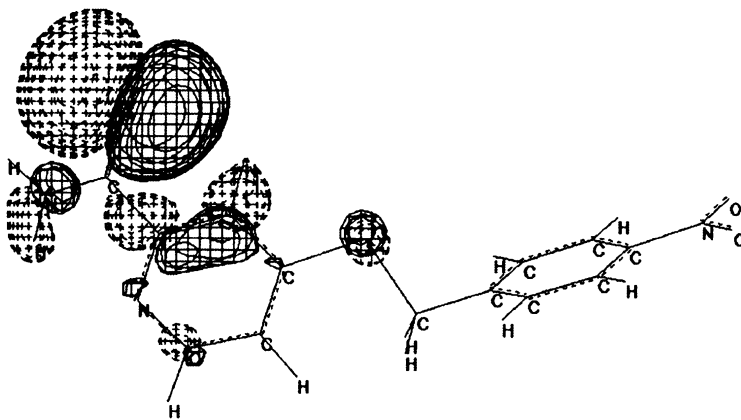
$$E_{1/2} = -0,187 \varepsilon_{\text{HOMO}} + 0,489 I - 0,408 \quad (3.6)$$

$$n = 30, r = 0,996, s_y = 0,026, F = 1781,29 > F_{2, 27, 0,01} = 5,49$$

Z platnosti regresní rovnice (3.6) plyne, že při elektrochemické oxidaci derivátů 4-(benzylsulfanyl)pyridinu je elektron odštěpován z HOMO orbitalu. HOMO orbital je podle kvantově-chemických výpočtů lokalizován pro deriváty 4-(benzylsulfanyl)pyridin-2-karbonitrilu na síře spojující fenylový a pyridinový kruh, zatímco pro deriváty 4-(benzylsulfanyl)pyridin-2-karbothioamidu na síře karbothioamidové skupiny.



(a)



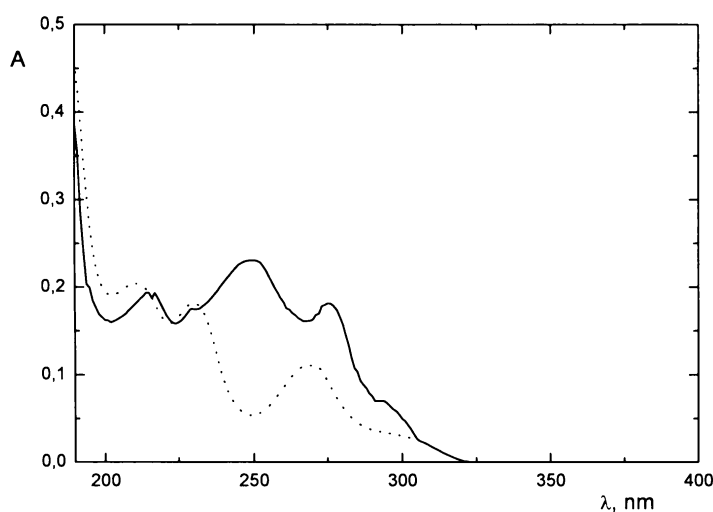
(b)

Obr. 3.5 Rozložení HOMO orbitalů pro (a) 4-(3,5-dinitro-benzylsulfanyl)pyridin-2-karbonitril (derivát 18)
a (b) 4-(4-nitro-benzylsulfanyl)pyridin-2-karbothioamid (derivát 23)

3.2 VLIV SUBSTITUENTŮ NA RETENČNÍ CHOVÁNÍ STUDOVANÝCH LÁTEK

3.2.1 UV spektrometrie

Pro zjištění optimálních podmínek nastavení UV detekce při HPLC byla změřena UV spektra vybraných studovaných látek. U derivátů karbonitrilu se hlavní maximum pohybovalo okolo 230 nm, u karbothioamidů bylo pak posunuto k 240–250 nm. Jako optimální vlnová délka, použitá k detekci při následné HPLC, byla vybrána vlnová délka 235 nm, při které obě skupiny poskytují dobrou absorpci. Na obr. 3.3 jsou uvedena absorpční spektra 2-fluoro derivátů obou skupin studovaných látek.



Obr.3.6 UV spektra 4-(2-fluoro-benzylsulfanyl)pyridin-2-karbonitrilu (derivát **5**, přerušovaná čára)
a 4-(2-fluoro-benzylsulfanyl)pyridin-2-karbothioamidu (derivát **20**; plná čára).
 $c = 1 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, $l = 1 \text{ cm}$

3.2.2 Kapalinová chromatografie

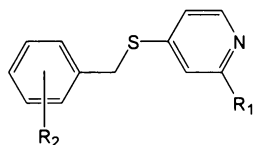
Vliv substituentů na retenční časy derivátů 4-(benzylsulfanyl)pyridinu byl studován metodou HPLC chromatografie na reverzní fázi C-18. Jako mobilní fáze byla použita směs acetonitril-voda s proměnlivým složením acetonitrilu ($w(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,70; 0,65$ a $0,60$). Byly naměřeny retenční časy studovaných derivátů a vypočítány příslušné kapacitní poměry (tab. 3.2).

Bylo zjištěno, že s klesajícím obsahem acetonitrilu v mobilní fázi dochází ke zvyšování retenčního času studovaných derivátů, jak je znázorněno na obr. 3.7 a 3.8.

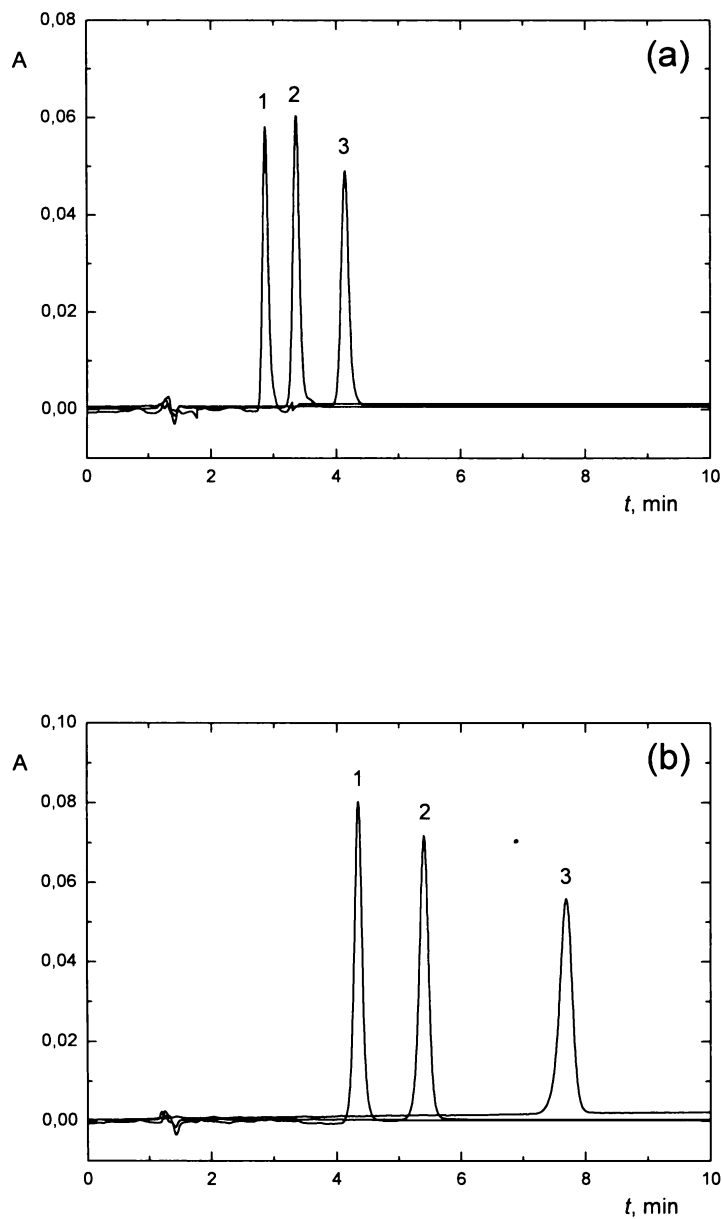
Vliv substituentů na retenční čas je u skupiny karbonitrilů demonstrován na příkladu derivátu nesubstituovaného na fenylu a dále pak derivátů obsahujících na fenylu jeden nebo dva atomy chloru (obr. 3.9). U skupiny karbothioamidů je toto ukázáno opět na derivátech obsahujících na fenylu jeden nebo dva atomy chloru (obr. 3.10).

Tab. 3.2 Struktury, hydrofobní substituentové konstanty, logaritmy rozdělovacího koeficientu oktanol-voda, retenční časy a kapacitní poměry studovaných látek při HPLC na koloně RP C-18 ZORBAX (150 x 4,6 mm), mobilní fáze acetonitril – voda.

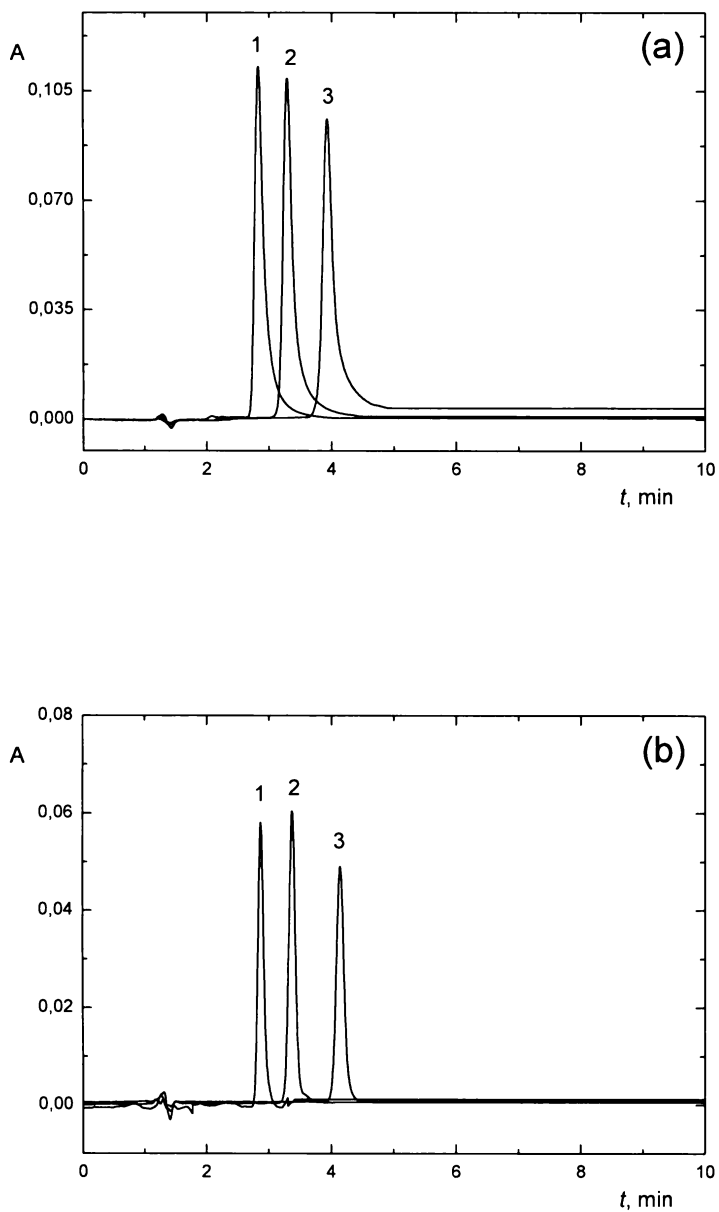
($c = 1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $F_m = 0,8 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, $\lambda = 235 \text{ nm}$, $t_M = 90 \text{ s}$, nástřik $10 \mu\text{l}$)



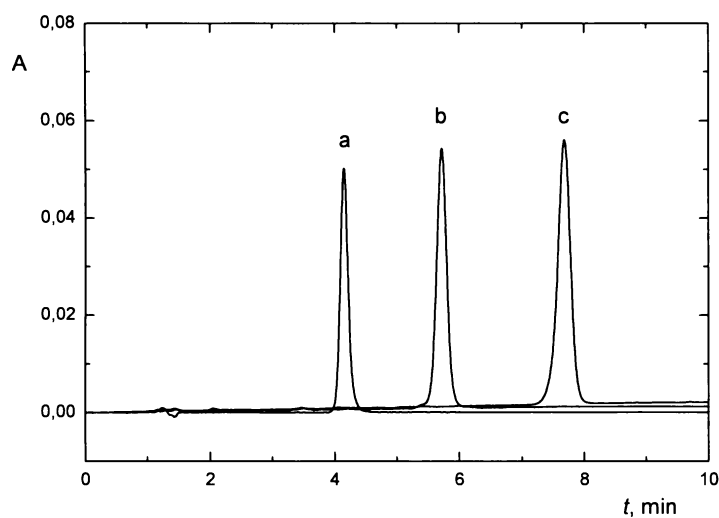
derivát	R ₁	R ₂					I	π	log P	w(CH ₃ CN) = 0,70		w(CH ₃ CN) = 0,65		w(CH ₃ CN) = 0,60	
		2	3	4	5	6				t _{R,S}	k	t _{R,S}	k	t _{R,S}	k
1	CN						1	0,00	3,04	172	0,913	202	1,100	248	1,760
2	CN	Cl					1	0,71	3,55	205	1,273	246	1,563	316	2,513
3	CN		Cl				1	0,71	3,55	208	1,313	253	1,631	325	2,613
4	CN			Cl			1	0,71	3,55	212	1,353	257	1,681	343	2,813
5	CN	F					1	0,14	3,18	170	0,887	197	1,193	247	1,740
6	CN		F				1	0,14	3,18	171	0,900	199	1,075	248	1,753
7	CN			F			1	0,14	3,18	170	0,893	200	1,088	250	1,773
8	CN		Br				1	0,86	3,83	217	1,413	266	1,953	353	2,927
9	CN			Br			1	0,86	3,83	225	1,500	281	1,931	368	3,087
10	CN		CH ₃				1	0,56	3,50	208	1,313	251	1,793	331	2,673
11	CN			NO ₂			1	0,45	2,99	148	0,647	169	0,873	206	1,287
12	CN	NO ₂		NO ₂			1	0,90	2,94	143	0,593	166	0,840	205	1,273
13	CN	Cl				F	1	0,85	3,69	203	1,260	244	1,544	320	2,553
14	CN	F				NO ₂	1	0,59	3,13	148	0,647	169	0,756	205	1,273
15	CN		Cl	Cl			1	1,42	4,07	261	1,900	325	2,613	461	4,127
16	CN		F	F			1	0,28	3,32	173	0,927	203	1,260	261	1,900
17	CN		NO ₂				1	0,45	2,99	148	0,647	168	0,867	208	1,307
18	CN		NO ₂		NO ₂		1	0,90	2,94	145	0,607	167	0,738	205	1,273
19	CSNH ₂		Cl				0	0,71	3,17	212	1,360	259	1,880	329	2,660
20	CSNH ₂	F					0	0,14	2,79	176	0,953	206	1,287	237	1,633
21	CSNH ₂		F				0	0,14	2,79	174	0,933	204	1,267	238	1,647
22	CSNH ₂		Br				0	0,86	3,45	229	1,540	277	2,073	333	2,700
23	CSNH ₂			NO ₂			0	0,45	2,61	149	0,660	172	0,913	204	1,267
24	CSNH ₂	NO ₂		NO ₂			0	0,90	2,56	144	0,600	165	0,833	195	1,167
25	CSNH ₂	Cl				F	0	0,85	3,31	211	1,340	253	1,807	312	2,467
26	CSNH ₂		OCH ₃				0	-0,02	2,40	170	0,887	197	1,193	236	1,620
27	CSNH ₂		Cl	Cl			0	1,42	3,69	277	2,073	335	2,727	424	3,713
28	CSNH ₂		F	F			0	0,28	2,93	181	1,007	208	1,313	248	1,753
29	CSNH ₂		CH ₃	CH ₃			0	1,12	3,59	268	1,973	323	2,593	402	3,467
30	CSNH ₂		NO ₂				0	0,45	2,61	149	0,660	170	0,887	194	1,153
31	CSNH ₂		NO ₂		NO ₂		0	0,90	2,56	143	0,593	163	0,807	188	1,093
32	CSNH ₂		CF ₃		CF ₃		0	1,76	3,96	269	1,993	343	2,813	449	3,993



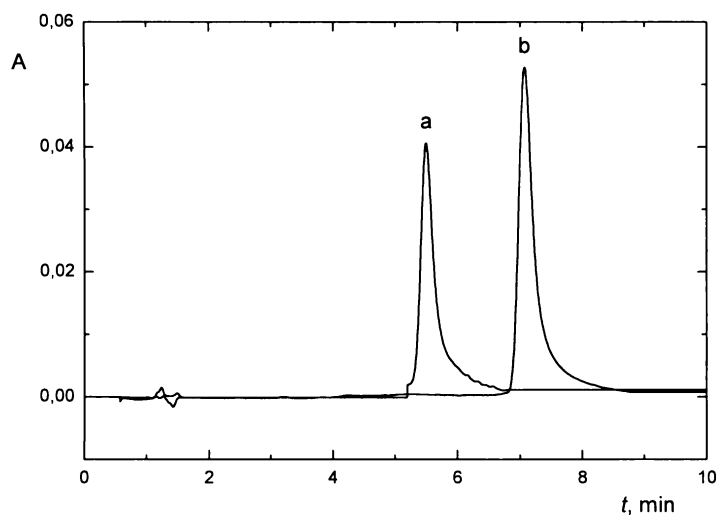
Obr.3.7. Vliv složení mobilní fáze na retenční čas (a) 4-(benzylsulfanyl)pyridin-2-karbonitrilu (derivát **1**), (b) 4-(3,4-dichloro-benzylsulfanyl)pyridin-2-karbonitrilu (derivát **15**) při HPLC na koloně RP C-18 ZORBAX ($150 \times 4,6$ mm), mobilní fáze acetonitril-voda: (1) $w(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,70$, (2) $w(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,65$, (3) $w(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,60$.
($c = 1 \times 10^{-4}$ mol dm^{-3} , $F_m = 0,8$ $\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$, $\lambda = 235$ nm, $t_M = 90$ s, nástřik 10 μl)



Obr.3.8. Vliv složení mobilní fáze na retenční čas (a) 4-(4-methoxy-benzylsulfanyl)pyridin-2-karbothioamidu (derivát **26**),
(b) 4-(3,5-bis-trifluoromethyl-benzylsulfanyl)pyridin-2-karbothioamidu (derivát **32**)
při HPLC na koloně RP C-18 ZORBAX (150 × 4,6 mm),
mobilní fáze acetonitril-voda (1) $w(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,70$, (2) $w(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,65$, (3) $w(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,60$.
($c = 1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $F_m = 0,8 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, $\lambda = 235 \text{ nm}$, $t_M = 90 \text{ s}$, nástřik $10 \mu\text{l}$)



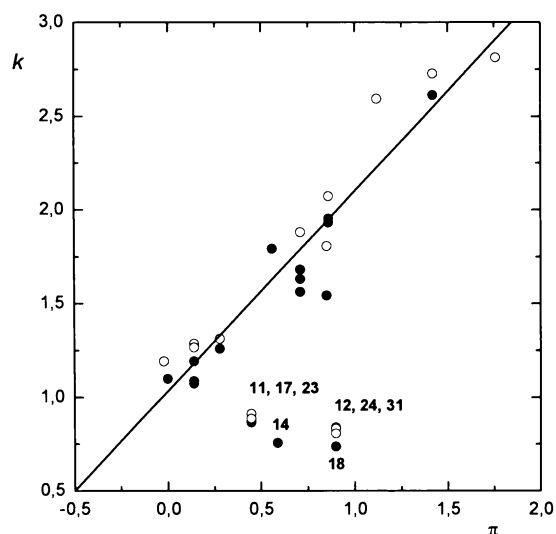
Obr. 3.9. Vliv substituentů na retenční čas karbonitrilů při HPLC na koloně RP C-18 ZORBAX (150 × 4,6 mm), mobilní fáze acetonitril -voda ($w(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,60$): (a) 4-(benzylsulfanyl)pyridin-2-karbonitril (derivát **1**), (b) 4-(4-chloro-benzylsulfanyl)pyridin-2-karbonitril (derivát **4**), (c) 4-(3,4-dichloro-benzylsulfanyl)pyridin-2-karbonitril (derivát **15**).
($c = 1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $F_m = 0,8 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, $\lambda = 235 \text{ nm}$, $t_M = 90 \text{ s}$, nástřik $10 \mu\text{l}$)



Obr.3.10. Vliv substituentů na retenční čas karbothioamidů při HPLC na koloně RP C-18 ZORBAX (150×4,6 mm), mobilní fáze acetonitril-voda ($w(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,60$): (a) 4-(4-methoxy-benzylsulfanyl)pyridin-2-karbothioamid (derivát **26**), (b) 4-(3,5-bis-trifluoromethyl-benzylsulfanyl)pyridin-2-karbothioamid (derivát **32**).
($c = 1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $F_m = 0,8 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, $\lambda = 235 \text{ nm}$, $t_M = 90 \text{ s}$, nástřik $10 \mu\text{l}$)

Vliv struktury na chromatografické chování studovaných skupin látek byl kvantifikován korelací kapacitního poměru s hydrofobními substituentovými π konstantami, hodnotou logaritmu rozdělovacího koeficientu oktanol-voda a složením mobilní fáze.

Na obr. 3.11 je znázorněna závislost kapacitního poměru na hodnotě hydrofobní π substituentové konstanty pro mobilní fázi $w(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,65$. Z obrázku jsou patrné dvě skutečnosti: (a) hodnota kapacitního poměru není závislá na druhu substituentu na pyridinovém kruhu ($-\text{CN}$ nebo $-\text{CSNH}_2$ skupina) a (b) deriváty s jednou nebo dvěma nitroskupinami na fenylu nekorelují s hodnotou hydrofobní π konstanty. Do dalších korelačních výpočtů tedy nebyly zahrnuty nitroderiváty (deriváty **11**, **12**, **14**, **17**, **18**, **23**, **24**, **31**). Rovněž nebylo možné zkonstruovat regresní rovnici zahrnující vliv druhu substituentu na pyridinovém kruhu, pro obě skupiny derivátů byly konstruovány korelační rovnice samostatně.



Obr. 3.11 Korelace mezi hodnotami kapacitních poměrů a hodnotou hydrofobní π konstanty při HPLC na koloně RP C-18 ZORBAX (150×4,6 mm), mobilní fáze acetonitril-voda ($w(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,65$) pro deriváty 4-(benzylsulfanyl)pyridin-2-karbonitrilu (o) a pro deriváty 4-(benzylsulfanyl)pyridin-2-karbothioamidu (•) ($c = 1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $F_m = 0,8 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, $\lambda = 235 \text{ nm}$, $t_M = 90 \text{ s}$, nástřik $10 \mu\text{l}$)

Pro závislost mezi hodnotou kapacitního poměru, hydrofobní π konstantou a složením mobilní fáze byla pro deriváty 4-(benzylsulfanyl)pyridin-2-karbonitrilu nalezena následující korelační rovnice

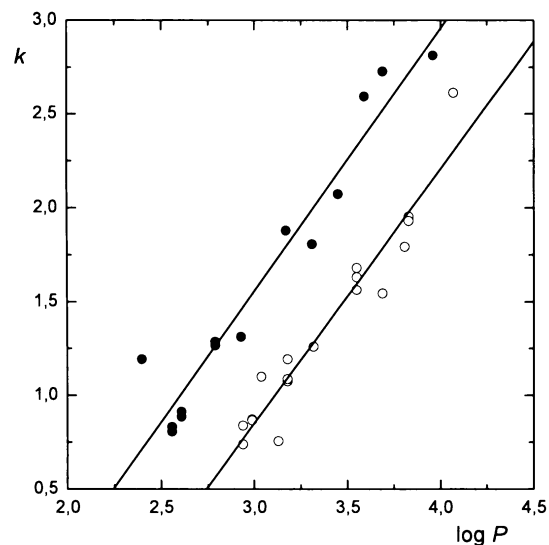
$$k = 1,140 \pi - 12,606 w(\text{CH}_3\text{CN}) + 9,303 \quad (3.7)$$

$$n = 39, r = 0,942, s_y = 0,252, F = 142,86 > F_{2,36,0,01} = 5,18$$

Vztah mezi kapacitním poměrem, hydrofobní π konstantou a složením mobilní fáze pro deriváty 4-(benzylsulfanyl)pyridin-2-karbothioamidu popisuje rovnice

$$k = 1,102 \pi - 11,594 w(\text{CH}_3\text{CN}) + 8,692 \quad (3.8)$$

$$n = 30, r = 0,959, s_y = 0,242, F = 155,87 > F_{2,27,0,01} = 5,49$$



Obr. 3.12 Korelace mezi hodnotami kapacitních poměrů a hodnotou rozdělovacího koeficientu oktanol-voda při HPLC na koloně RP C-18 ZORBAX (150×4,6 mm), mobilní fáze acetonitril-voda ($w(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,65$) pro deriváty 4-(benzylsulfanyl)pyridin-2-karbonitrilu (o) a pro deriváty 4-(benzylsulfanyl)pyridin-2-karbothioamidu (●)
($c = 1 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $F_m = 0,8 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, $\lambda = 235 \text{ nm}$, $t_M = 90 \text{ s}$, nástřik $10 \mu\text{l}$)

Na obr. 3.12 je znázorněna závislost kapacitního poměru na hodnotě rozdělovacího koeficientu oktanol-voda pro mobilní fázi $w(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,65$. Z obrázku je patrná lineární závislost kapacitního poměru na hodnotě logaritmu rozdělovacího koeficientu

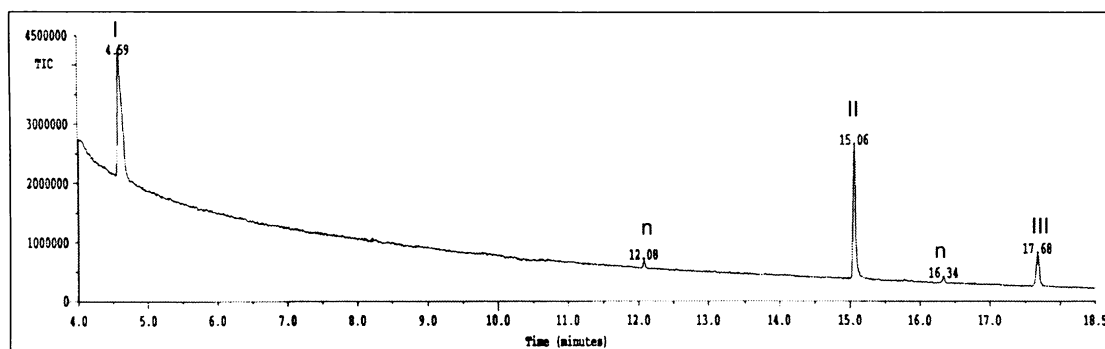
oktanol-voda s rozdílným úsekem pro jednotlivé skupiny derivátů. S použitím indikátorové konstanty I , charakterizující druh substituentu na pyridinu, definovanou jako $I = 0$ pro karbothioamidovou skupinu resp. $I = 1$ pro karbonitrilovou skupinu, byla zkonstruována obecná regresní rovnice platná pro oba druhy studovaných 4-(benzylsulfanyl)pyridinů

$$k = 1,500 \log P - 0,622 I - 10,444 w(\text{CH}_3\text{CN}) + 3,894 \quad (3.9)$$
$$n = 96, r = 0,943, s_y = 0,268, F = 247,19^a$$

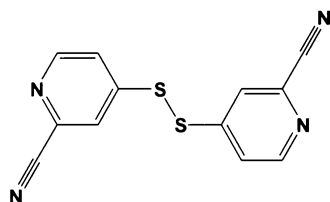
^a Hodnota $F_{\text{krit.}}$ nebyla pro $n = 96$ nalezena.

3.3 PRODUKTY ELEKROCHEMICKÉ OXIDACE DERIVÁTŮ 4-(BENZYLSULFANYL)PYRIDIN-2-KARBONITRILU

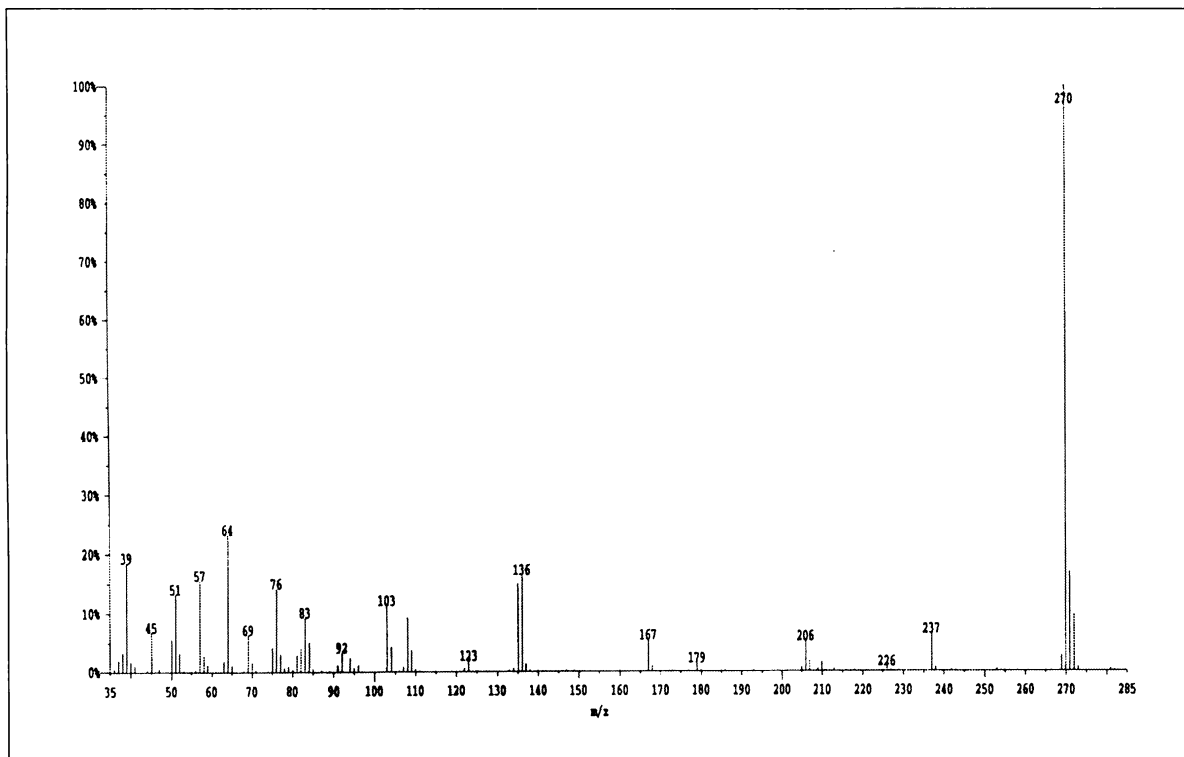
V aparatuře popsané v kap. 2.3.4 bylo ve 40 ml 0,1 mol dm⁻³ roztoku chloristanu sodného v acetonitrilu elektrolyzováno 5 mg 4-(4-chlorbenzylsulfanyl)pyridin-2-karbonitrilu (derivát 4) při potenciálu 2,0 V po dobu 60 minut. Proud v průběhu elektrolýzy poklesl z 3,0 mA na 0,7 mA. Připravené produkty elektrolýzy byly analyzovány metodou GC-MS, získaný chromatogram je uveden na obr. 3.13. V chromatogramu byly identifikovány (kromě zbytků výchozího derivátu 4) dva produkty. Prvním produktem s retenčním časem 4,69 min byl podle hmotnostního spektra 4-chlorbenzaldehyd. Jako druhý produkt (retenční čas 17,68 min) byl podle hmotnostního spektra identifikován 4-[(2-kyanopyridin-4-yl)dithio]pyridin-2-karbonitril (struktura uvedena na obr. 3.14). Hmotnostní spektrum druhého produktu je uvedeno na obr 3.15.



Obr. 3.13 Plynový chromatogram elektrolyzátu 4-(4-chlorbenzylsulfanyl)pyridin-2-karbonitrilu (derivát 4) na koloně DB5 (30 m × 0,25 mm, tloušťka filmu 0,012 μm) při teplotě 250 °C.
Identifikace píků: (I) 4-chlorbenzaldehyd, (II) 4-(4-chlorbenzylsulfanyl)pyridin-2-karbonitril, (III) 4-[(2-kyanopyridin-4-yl)dithio]pyridin-2-karbonitril, (n) – nečistoty.



Obr. 3.14 Chemická struktura 4-[(2-kyanopyridin-4-yl)dithio]pyridin-2-karbonitrilu



Obr. 3.15 Hmotnostní spektrum 4-[(2-kyanopyridin-4-yl)dithio]pyridin-2-karbonitrilu.

Obdobným způsobem byly připraveny elektrooxidační produkty derivátů **6** a **9**. Jako hlavní produkt byl metodou GC-MS identifikován 4-[(2-kyanopyridin-4-yl)dithio]pyridin-2-karbonitril (struktura uvedena na obr. 3.14).

Přehled struktur výchozích derivátů podrobených elektrolýze a identifikovaných elektrooxidačních produktů zachycuje tab. 3.3.

Tab. 3.3 Struktury derivátů 4-(benzylsulfanyl)pyridin-2-karbonitrilu podrobených preparativní elektrolýze a odpovídající identifikované elektrooxidační produkty

derivát	struktura derivátu	identifikované elektrooxidační produkty
4		
6		
9		

^a Předpokládáný 3-fluorobenzaldehyd nebyl, pravděpodobně z důvodu vysoké těkavosti, nalezen.

4 ZÁVĚR

Předkládaná diplomová práce se zaměřila na QSPR studium elektrochemických a chromatografických vlastností nově syntetizovaných derivátů 4-(benzylsulfanyl)pyridinu a na přípravu a identifikaci produktů elektrochemické oxidace derivátů 4-(benzylsulfanyl)pyridin-2-karbonitrilu.

V první části předkládané diplomové práce bylo provedeno studium vlivu substituentů na voltametrické chování studovaných derivátů 4-(benzylsulfanyl)pyridin-2-karbonitrilu a 4-(benzylsulfanyl)pyridin-2-karbothioamidu. Byly naměřeny půlvlnové potenciály a navrženy a otestovány korelační rovnice mezi půlvlnovými potenciály a Hammettovou σ konstantou substituentu na fenylu. Vzhledem ke skutečnosti, že vliv substituentu na pyridinovém kruhu byl u obou derivátů přibližně stejný, bylo možné zavedením indikátorové konstanty I charakterizující druh substituentu na pyridinu ($I = 0$ pro karbothioamidovou skupinu, resp. $I = 1$ pro karbonitrilovou skupinu) zkonstruovat obecnou regresní rovnici platnou pro oba druhy studovaných 4-(benzylsulfanyl)pyridinů

$$E_{1/2} = 0,055 \sigma + 0,566 I + 1,171 \quad (3.3)$$

Podobně byla vypočítána regresní rovnice popisující vztah mezi půlvlnovými potenciály studovaných derivátů a hodnotami energie HOMO orbitalů

$$E_{1/2} = -0,187 \varepsilon_{\text{HOMO}} + 0,489 I - 0,408 \quad (3.6)$$

Z platnosti uvedené rovnice (3.6) plyne, že při elektrochemické oxidaci derivátů 4-(benzylsulfanyl)pyridinu je elektron odštěpován z HOMO orbitalu. HOMO orbital je podle kvantově-chemických výpočtů lokalizován pro deriváty 4-(benzylsulfanyl)pyridin-2-karbonitrilu na síře spojující fenylový a pyridinový kruh,

zatímco pro deriváty 4-(benzylsulfanyl)pyridin-2-karbothioamidu na síře karbothioamidové skupiny.

V druhé části práce byl metodou RP-HPLC studován vliv substituentů na chromatografické chování (kapacitní poměr) studovaných látek. Pomocí QSPR analýzy byla nalezena rovnice kvantifikující vliv substituentů na kapacitní poměr na základě hydrofobních π konstant. Vzhledem ke skutečnosti, že hodnoty kapacitních poměrů nebyly závislé na druhu substituentu na pyridinovém kruhu, bylo nutné konstruovat pro každý druh derivátu korelační rovnici zvlášť. Dále se ukázalo, že deriváty s jednou nebo dvěma nitroskupinami nekorelují a tudíž nemohly být do korelačních výpočtů zahrnuty. Tato skutečnost je pravděpodobně způsobena velkou hydrofobicitou nitroskupiny oproti ostatním substituentům³⁶. Pro závislost mezi hodnotou kapacitního poměru, hydrofobní π konstantou a složením mobilní fáze byla pro deriváty 4-(benzylsulfanyl)pyridin-2-karbonitrilu nalezena následující korelační rovnice

$$k = 1,140 \pi - 12,606 w(\text{CH}_3\text{CN}) + 9,303 \quad (3.7)$$

Vztah mezi kapacitním poměrem, hydrofobní π konstantou a složením mobilní fáze pro deriváty 4-(benzylsulfanyl)pyridin-2-karbothioamidu popisuje rovnice

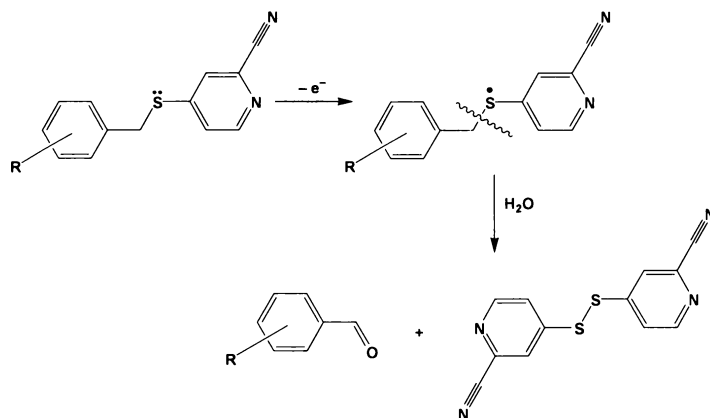
$$k = 1,102 \pi - 11,594 w(\text{CH}_3\text{CN}) + 8,692 \quad (3.8)$$

Vliv hydrofobicity molekuly, charakterizované pomocí vypočítané hodnoty rozdělovacího koeficientu oktanol-voda, na hodnotu kapacitního poměru bylo možno kvantifikovat následující korelační rovnicí

$$k = 1,500 \log P - 0,622 I - 10,444 w(\text{CH}_3\text{CN}) + 3,894 \quad (3.9)$$

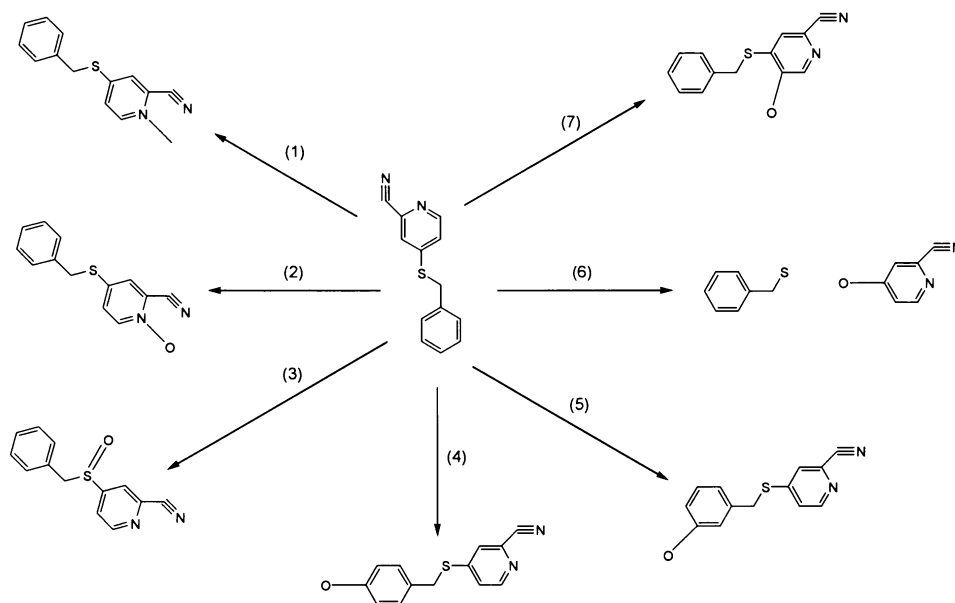
V závěrečné části práce byly připraveny a analyzovány produkty elektrochemické oxidace tří vybraných derivátů 4-(benzylsulfanyl)pyridin-2-karbonitrilu. Jako hlavní produkt byl identifikován 4-[(2-kyanopyridin-4-yl)dithio]pyridin-2-karbonitril a jako vedlejší produkt příslušně substituovaný benzaldehyd (nebo substituovaná benzoová kyselina). Ze získaných produktů elektrolýzy je patrné, že při elektrooxidaci 4-(benzylsulfanyl)pyridin-2-karbonitrilů dochází nejprve ke vzniku radikálu, odtržením jednoho elektronu z volného elektronového páru síry spojující pyridinový a fenylový

kruh. Následně dochází pravděpodobně k reakci se stopami vody za vzniku příslušného substituovaného benzaldehydu a 4-[(2-kyanopyridin-4-yl)dithio]pyridin-2-karbonitrilu. Navržené schéma elektrochemické oxidace derivátů 4-(benzylsulfanyl)pyridin-2-karbonitrilu je uvedeno na (obr. 4.1).



Obr. 4.1 Navržené schéma elektrochemické oxidace derivátů 4-(benzylsulfanyl)pyridin-2-karbonitrilu (vlnovkou naznačen rozpad radikálu)

Z metabolického hlediska by studované deriváty 4-(benzylsulfanyl)pyridin-2-karbonitrilu podléhaly nejpravděpodobněji tzv. S-oxidaci³⁷. Tuto hypotézu podporuje i odhad možných metabolitů provedený programem Pallas 3.1 (obr. 4.2), kde byl jako jeden z možných metabolitů předpovězen 4-fenylmethansulfinyl-pyridin-2-karbonitril.



Obr. 4.2 Odhadnuté metabolické cesty 4-(benzylsulfanyl)pyridin-2-karbonitrilu pomocí programu Pallas 3.1:

- (1) N-methylace na pyridinu, (2) N-oxidace, (3) S-oxidace, (4) *p*-hydroxylace fenylu, (5) *m*-hydroxylace fenylu, (6) hydrolyza thioetheru, (7) hydroxylace pyridinu

Literatura

1. Červinka, O. a kol.: *Chemie organických sloučenin 2. díl*. SNTL, Praha 1987, str. 290.
2. *Dictionary of Substances and Their Effects*. Gangolli, S. (ed.). 3rd Edition. London, Royal Society of Chemistry 2002, p. 357.
3. Duncan, K.: Identification and validation of novel drug targets in tuberculosis. *Current Pharmaceutical Design* 10:26, 3185–3194 (2004).
4. Greenwood, D.: Resistance to antimicrobial agents: a personal view. *Journal of Medicinal Microbiology* 47:9, 751–755 (1998).
5. Ellner, J. J.; Golgberger, M. J.; Parenti, D. M.: Mycobacterium avium infection and AIDS: a therapeutic dilemma in rapid evolution. *Journal of Infection Diseases* 163:6, 1326–1335 (1991).
6. Mitchison, D.A.: Drug resistance in tuberculosis. *European Respiratory Journal* 25:2, 376–379 (2005).
7. Waisser, K.; Drhová, L.: Pokroky ve vývoji nových antituberkulotik ze skupin pětičlenných heterocyklických sloučenin obsahujících jeden druh heteroatomu. *Česká a slovenská farmacie* 48:4, 147–155 (1999).
8. Lüllman, F.; Mohr, K.; Wehling, M.: *Farmakologie a toxikologie*. Avicenum a Grada, Praha 2002, str. 503.
9. Lincová, D.; Farghali, H.: *Základní a aplikovaná farmakologie*. Karolinum a Galén, Praha 2002, str. 461.
10. Klimešová, V.; Svoboda, M.; Waisser, K.; Pour, M.; Kaustová, J.: New pyridine derivatives as potential antimicrobial agents. *Il Farmaco* 54:10, 666–672 (1999).
11. Klimešová, V.; Waisser, K.; Buchta, V.; Odlerová, Ž.: Relationships between the chemical structure of substances and their antimycobacterial activity to atypical strains (VIII.2-alkylthio-4-pyridincarbonitriles). *Folia Pharmaceutica Universitatis Carolinae* 20, 63–66 (1996).

12. Waisser, K.; Klimešová, V.; Odlerová, Ž.: Relationships between the chemical structure of substances and their antimycobacterial activity to atypical strains (VII. 2-alkylthio-4-pyridincarbothioamides). *Folia Pharmaceutica Universitatis Carolinae* 20, 59–62 (1996).
13. Čeladník, M.; Košťálová, Z.; Jíška, S.; Waisser, K.; Kubala, E.; Palát, K.: Antituberkulosní látky XVII. Funkční deriváty 4-halogenpikolinové kyseliny a jejich N-oxidů. 25:5, 181–185 (1976).
14. Klimešová, V.; Svoboda, M.; Waisser, K.; Pour, M.; Kaustová, J.: Synthesis and antimicrobial activity of new 4-(benzylsulfanyl)pyridine derivatives. *Collection of Czechoslovak Chemical Communication* 64:2, 417–434 (1999).
15. Hansch, C.; Leo, A.: *Exploring QSAR. Vol. 1 – Fundamentals and Applications in Chemistry and Biology*. American Chemical Society, Washington 1995.
16. Exner, O.: *Korelační vztahy v organické analýze*. STNL/ALFA, Praha 1981.
17. Waisser, K.: QSAR in drug design: antituberculotics. *Folia Pharmaceutica Universitatis Carolinae* 19, 83–90 (1995).
18. Zuman, P.: *Substituent Effects in Organic Polarography*. Plenum Press, New York 1967.
19. Zuman, P.: *Vplyvy substituentov v organickej polarografii*. Alfa, Bratislava 1970.
20. Tömpe, P.; Clementis, G.; Petneházy, I.; Jászay, Z. M.; Töke, L.: Quantitative structure-electrochemistry relationships of α,β -unsaturated ketones. *Analytica Chimica Acta* 305, 295–303 (1995).
21. Kurihara, N.; Yamakawa, K.; Fujita, T.; Nakajima, M.: Studies on BHC isomers and related compounds. XXVI. Anaerobic degradation of tetra-, penta-, and hexachlorocyclohexene isomers by rat liver microsomal P-450. *Nippon Noyaku Gakkaishi* 5:1, 93–100 (1980). CA 93:232035.
22. Kuchař, M.; Rejholec, W.: *Využití kvantitativních vztahů mezi strukturou a biologickou aktivitou*. Academia, Praha 1987, str.73
23. Kalistan, R.: *Quantitative structure-chromatographic retention relationships*. Wiley, New York 1987.
24. Unger, S.H.; Cook, J.R.; Hollenberg, J.S.: Simple procedure for determining octanol-aqueous partition, distribution, and ionization coefficients by reversed-phase high-pressure liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 67:10, 1364–1367 (1978).

25. Dryhurst, G.; Kadish, K.M.; Shceller, F.; Renneberg, R.: *Biological Elektrochemistry*. Vol.1. Academic Press, New York 1982.
26. Zaks, A.; Klibanov, A.M.: The effect of water on enzyme action in organic media. *Journal of Biological Chemistry* 263:17, 8017–8021 (1998).
27. Reddy, S.J.; Sridevi, C.: Electrochemistry of drugs containing nitro group. *Asian Journal of Chemistry Reviews* 1:1, 33–52 (1990).
28. Biedermann, G.: The hydrolysis of metal ions. XIV. The hydrolysis of indium(III) ion. *Arkiv för Kemi* 9, 277–293 (1956).
29. Němec, I.; Kies, H.L.; Němcová, I.: Kinetic data on the oxidation of the cobalt(II)-bipyridyl complex by copper(II) and iron(III) perchlorates in anhydrous acetonitrile. *Analytica Chimica Acta* 49:3, 541–555 (1970)
30. Ludvík, J.; Volke, J.: Praktické aspekty coulometrie při konstantním potenciálu v aprotickém prostředí. *Chemické listy* 76:2, 113–146 (1982).
31. Hansch, C.; Leo, A.; Hoekman, D.: *Exploring QSAR. Vol.2 – Hydrophobic, Electronic and Steric Constants*. American Chemical Society, Washington 1995.
32. Thompson, H. W.; Steel, G.: Correlation of vibrational band intensities with reactivity: the CN group. *Transactions of the Faraday Society* 52:7, 1451–1457 (1956).
33. Hansch, C.; Leo, A.; Unger, S.H.; Kim, K.H.; Nikaitani, D.;Lien, E.J.: Aromatic substituent constants for structure-activity correlations. *Journal of Medicinal Chemistry* 16:11, 1207-1216 (1973).
34. Doerffel, K.; Eckschlager, K.: *Optimální postup chemické analýzy*. STNL, Praha 1985.
35. Miller, J.C.; Miller, J.N.: *Statistics for Analytical Chemistry*. 2nd edition. Ellis Horwood, New York 1992.
36. Jozwiak K.; Szumilo H.; Senczyna B.; Niewiadomy A.: RPHPLC as a tool for determining the congenericity of a set of 2,4-dihydroxythiobenzanilide derivatives. *Chromatographia* 52:3–4, 159–161 (2000).
37. Faith, L.; Helia, O. et al.: *Liečivé látky a ich metabolity v analýze*. Osveta, Martin 1987.

PODĚKOVÁNÍ

Na závěr své diplomové práce bych chtěla poděkovat RNDr. Karlu Nesměrákovi, Ph.D. za odborné vedení práce, jeho cenné rady, zájem, pochopení a optimismus, se kterým tuto práci vedl.

Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Janě Suchánkové, Ph.D. za umožnění chromatografického měření, RNDr. Martinu Štíchovi z Katedry organické chemie PřF UK za změřeni a pomoc s interpretací hmotnostních spekter a Doc. RNDr. Věře Klimešové, CSc. z Katedry anorganické a organické chemie FaF UK v Hradci Králové za poskytnutí studovaných derivátů 4-(benzylsulfanyl)pyridinu.