



**FARMACEUTICKÁ FAKULTA
V HRADCI KRÁLOVÉ**
Univerzita Karlova

Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

Oxadiazoly jako potenciální léčiva II.

Diplomová práce

Lucie Kolčárková

Hradec Králové, 2018

Vedoucí práce: PharmDr. Marta Kučerová, Ph.D.

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

V Hradci Králové, 12. 5. 2018

Lucie Kolčárková

Diplomová práce vznikla za podpory grantu SVV 260 401.

Ráda bych zde poděkovala PharmDr. Martě Kučerové, Ph.D. za její podporu, trpělivost, cenné rady a inspiraci nejen při vypracování této diplomové práce.

*Dále děkuji doc. RNDr. V. Opletalové Ph.D. za odbornou pomoc, doc. PharmDr. J. Kunešovi za změření a interpretaci NMR spekter, RNDr. K. Konečné, Ph.D. a paní I. Dufkové za testování antifungální a antibakteriální aktivity; Mgr. O. Jand'ourkovi za testování antituberkulotické aktivity proti *Mycobacterium smegmatis* a *M. aurum*.*

ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové,

Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

Kandidát: Kolčárková Lucie

Školitel: PharmDr. Marta Kučerová, Ph.D.

Název diplomové práce: Oxadiazoly jako potencionální léčiva II.

Ve své práci jsem se zaměřila na hledání nových potenciálních léčiv s antibakteriální a antifungální aktivitou a to z důvodu zvyšující se rezistence mikroorganismů na stávající léčiva. Jako strukturní základ byl vybrán 3-pyrazin-2-yl-1,2,4-oxadiazol.

V teoretické části jsem se věnovala zejména různým způsobům přípravy 1,2,4-oxadiazolů. Způsoby přípravy jsou rozděleny podle použitých výchozích látek.

V experimentální části byly vyzkoušeny různé způsoby přípravy s cílem syntetizovat hledané látky a následně zdokonalit podmínky reakcí, aby bylo dosaženo čistých produktů s vysokým reakčním výtěžkem.

Ani jedna z připravených sloučenin dosud popsána nebyla. Sloučeniny byly charakterizovány IČ a NMR spektry a také teplotou tání. Čistota látek byla ověřena za pomoci tenkovrstvé chromatografie a elementární analýzy.

Z připravených látek bylo odevzdáno šest produktů na biologické testování antibakteriální a antifungální aktivity *in vitro*. Byla nalezena střední antifungální aktivita u jedné sloučeniny a u jiné látky střední aktivita vůči *Mycobacterium smegmatis* a *M. aurum*.

ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmaceutical Analysis

Candidate: Kolčárková Lucie

Supervisor: PharmDr. Marta Kučerová, Ph.D.

Title of diploma thesis: Oxadiazoles as Potential Drugs II.

My work was focused on finding new potential drugs with antibacterial and antifungal activity, from the reason of increasing microbial resistance against current drugs. 3-Pyrazin-2-yl-1,2,4-oxadiazole was chosen as the structural scaffold for the research.

In the theoretical part of this diploma thesis I have reviewed various procedures of the preparation of 1,2,4-oxadiazoles. The methods of preparation have been assorted according to the starting material used.

In the experimental part of this study several different ways of preparation to synthesize these compounds were explored and then improvement of reaction conditions in order to gain the pure product in good yields were tested.

None of compounds has been reported so far. They have been characterized by IR and NMR spectra and by melting points as well. Their purity was checked by TLC and elemental analysis.

Six of the synthesized compounds have been tested *in vitro* for their antibacterial and antifungal activity. One of the compounds has shown medium antifungal activity and another one has shown medium activity against *Mycobacterium smegmatis* and *M. aurum*.

OBSAH

1. Úvod a cíl práce.....	8
2. Teoretická část.....	10
2.1 Způsoby přípravy 1,2,4-oxadiazolů dle reaktantů	10
2.1.1 Příprava oxadiazolů z organických kyselin	11
2.1.2 Příprava oxadiazolů z chloridů	13
2.1.3 Příprava oxadiazolů z esterů	17
2.1.4 Příprava oxadiazolů z aldehydů	19
2.1.5 Příprava oxadiazolů z anhydridů.....	22
2.1.6 Příprava oxadiazolů z nitrilů	23
2.1.7 Příprava oxadiazolů z imidů	24
2.1.8 Příprava oxadiazolů z oximů.....	24
2.1.9 Příprava oxadiazolů z jiných heterocyklů	26
3. Experimentální část	28
3.1 Chemická část	28
3.1.1 Příprava alkylovaných pyrazin-2-karbonitrilů	29
3.1.2 Příprava 1,2,4-oxadiazolů z benzaldehydů	30
3.1.3 Příprava 1,2,4-oxadiazolů z organických kyselin	37
3.1.4 Příprava 1,2,4-oxadiazolů z acylchloridů	39
3.2 Biologická část.....	46
3.2.1 Hodnocení antifungální aktivity.....	46
3.2.2 Hodnocení antibakteriální aktivity	47
3.2.3 Hodnocení antituberkulotické aktivity	48
4. Diskuze.....	51
5. Závěr.....	54
6. Literatura	55

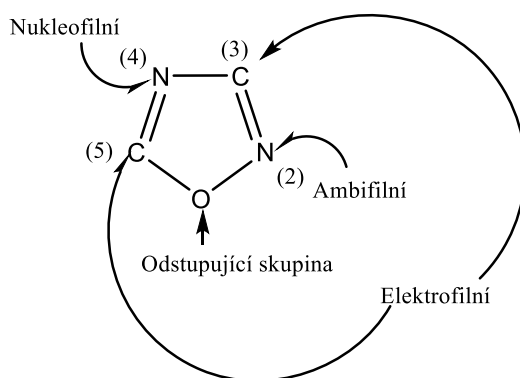
Seznam použitých zkratek:

AgOTf	triflát stříbrný
Amf.B	amfotericin B
CAN	dusičnan ceričito-amonný
CDI	1,1'-karbonyldiimidazol
CPX	ciprofloxacín
DCC	dicyklohexylkarbodiimid
DIC	diisopropylkarbodiimid
DMA	dimethylacetamid
DMF	dimethylformamid
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropylethylamin
DMSO	dimethylsulfoxid
HATU	2-(3H-[1,2,3]triazolo[4,5-b]pyridin-3-yl)-1,1,3,3-tetramethyl- isouronium hexafluorofosfát
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
GEN	gentamicin
IČ	Infračervené
INH	izoniazid
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MS	hmotnostní spektrometrie
NMR	nukleární magnetická rezonance
PTSA	<i>p</i> -toluensulfonová kyselina
RIF	rifampicin
T3P	anhydrid propylfosfonové kyseliny
TBS	<i>tert</i> -butyl(dimethyl)silan
TBAH	hydroxid tetrabutylamonný
TEA	triethylamin
THF	tetrahydrofuran
TLC	chromatografie na tenké vrstvě
Yb(OTf) ₃	triflát ytterbitý

1. Úvod a cíl práce

Substituované 1,2,4-oxadiazoly jsou důležité heterocykly, které se vyskytují v přírodních produktech a jsou široce využívány jako bioaktivní molekuly, farmakofory a pro výrobu speciálních materiálů [1]. Deriváty těchto sloučenin disponují širokým rozsahem biologických aktivit, jako například protinádorovými, antivirovými, insekticidními, antibakteriálními a protizánětlivými účinky [2–5]. Tyto účinky ve své diplomové práci popsala v roce 2016 *Dzámová* [6]. Já bych ráda svou práci na tu její navázala a na rozdíl od ní se budu věnovat způsobům přípravy těchto molekul.

1,2,4-Oxadiazoly patří do skupiny pětičlenných heterocyklických systémů s tendencí se přeskupovat do jiných, stabilnějších heterocyklů [7–10]. Jejich reaktivita je důsledkem labilní O-N vazby, elektrofilního charakteru uhlíku v poloze 3 a 5, což může být zvýšeno přítomností elektron-odtahujících substituentů, nukleofilního či slabě bazického charakteru dusíku v poloze 4 a ambifilního charakteru dusíku v poloze 2. Také k tomu přispívá přítomnost kyslíku v kruhu, který se může chovat jako dobrá odstupující skupina a přítomností postranního řetězce, který se může zúčastnit intramolekulárního přeskupování. Jedná se tedy o reaktivní sloučeniny, které díky tomuto přeskupování mohou vytvářet další heterocykly, obzvláště v případě, že mají tří-atomový postranní řetězec, díky kterému může dojít například k *Boulton-Katritzkému* přesmyku [11].



Chemické vlastnosti 1,2,4-oxadiazolů

To vše dělá z 1,2,4-oxadiazolů multifunkční heterocykly, jejichž reaktivita silně závisí na typu substituentů, výchozích látkách a reakčních podmínkách. Proto jejich příprava není snadná a je tedy nutné velice obezřetně volit způsob přípravy a podmínky reakce. Cílem mé práce je tyto způsoby shrnout a porovnat jejich podmínky, aby bylo možné následně vybrat ty optimální. Reakce jsem pro přehlednost rozdělila dle výchozích látek na devět základních skupin. Vzhledem k vysokému počtu reakcí jsem některé

metody popsala do detailu, jiné jsem však pouze zmínila jako další možnosti příprav. Vybírala jsem mimo jiné i reakce, které jsou bez rozpouštědla a to z následujících důvodů. Jednak jsou tyto reakce šetrnější k životnímu prostředí a usnadňují následné zpracování výsledného produktu. Také se při nich dosahuje lepších výsledků, zjednodušují experimentální provedení a nakonec, je to i předmětem mé praktické části.

Z těchto reakcí jsem si některé vybrala pro svou experimentální práci. Vyzkoušela jsem několik typů reakcí, zvolila ty nejvhodnější a zdokonalila jsem jejich podmínky. Mým cílem bylo syntetizovat sérii 3,5-disubstituovaných-1,2,4-oxadiazolů s využitím cyklizace *N'*-hydroxypyrazin-2-karboximidamidu a následně tyto molekuly nechat podrobit *in vitro* testování na antifungální a antibakteriální aktivitu vůči vybraným houbám a bakteriím.

Svou práci jsem se tedy pokusila navázat na výzkum, který probíhá na Katedře farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy Farmaceutické fakulty v Hradci Králové a zabývá se sloučeninami s pyrazinovým jádrem [12, 13, 14].

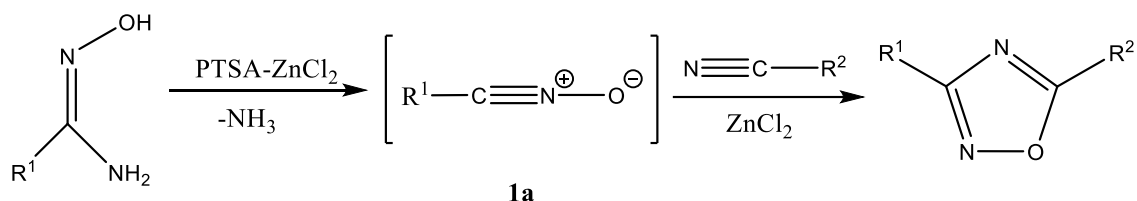
2. Teoretická část

2.1 Způsoby přípravy 1,2,4-oxadiazolů dle reaktantů

Příprava 1,2,4-oxadiazolů poutá mnoho pozornosti, a tak bylo vyvinuto mnoho syntetických metod [15–16]. Většina z nich využívá amidoximy jako výchozí látky.

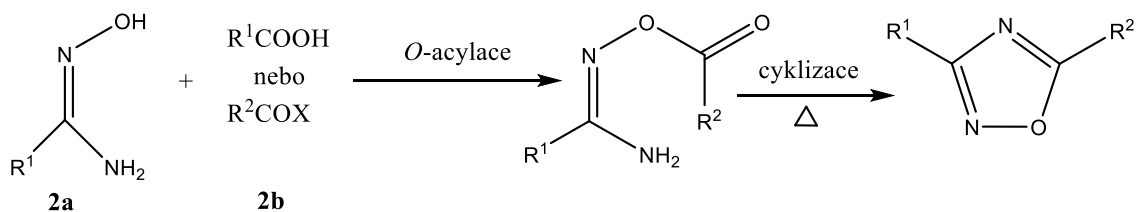
Tyto metody by se daly rozdělit do čtyř skupin:

(A) 1,3-Dipolární cykloadice nitril-oxidů (**1a**).



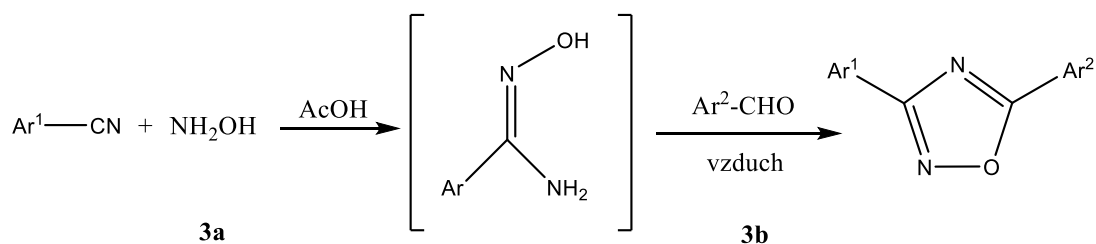
Dipolární cykloadice

(B) *O*-acylace amidoximů (**2a**) využívající karboxylové kyseliny nebo aktivované deriváty karboxylových kyselin (např. estery, anhydridy či chloridy) (**2b**), následována intramolekulární cyklodehydratací. Využívá se zde karboxylových kyselin jako *O*-acetylujícího reagentu s amidoximem a je zapotřebí silného dehydrantu nebo zvýšení teploty.



O-acylace amidoximů

(C) Nitrily reagují s hydroxylaminy (**3a**) za vzniku amidoximů, ty pak reagují s aldehydy (**3b**) a vznikají 4,5-dihydro-1,2,4-oxadiazoly, následuje oxidační dehydrogenace s využitím vzduchu jako oxidantu, mikrovlnného reaktoru a kyselých podmínek. Tato metoda využívá jednodušší substráty ve srovnání s ostatními metodami.



Reakce aldehydů s amidoximy

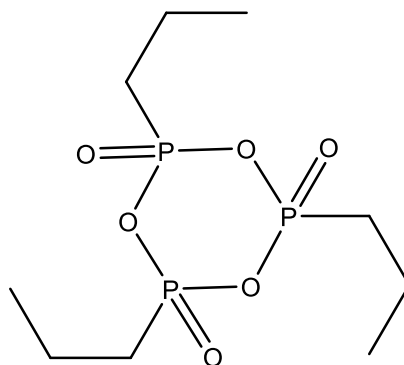
Všechny tyto metody jsou účinné, avšak jejich problémem je, že vyžadují pouze vybrané mnohdy nedostupné substráty nebo náročné podmínky. Proto je nutné hledat další reakce, které by přípravu usnadnily. Tyto i předchozí reakce budou popsány v následujících kapitolách.

2.1.1 Příprava oxadiazolů z organických kyselin

Mnohdy využívaným způsobem přípravy je cyklizace *O*-acylamidoximů v reakci s karboxylovými kyselinami [17]. Jejich nevýhodou je, že potřebují couplingové činidlo jako je dicyklohexylkarbodiimid (DCC); 1,1'-karbonyldiimidazol (CDI) apod.

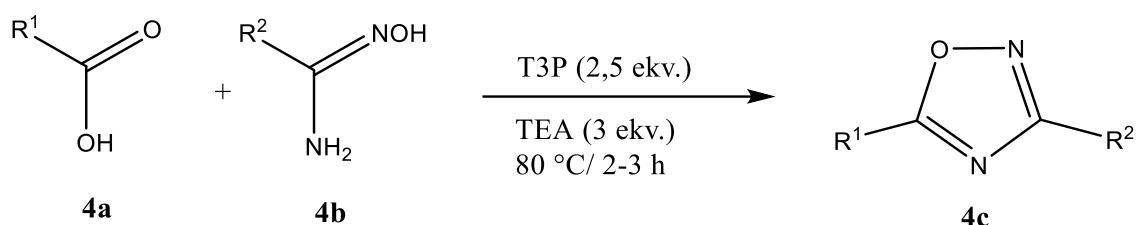
Ve své praktické části jsem vyzkoušela právě přípravu z organických kyselin dle *Deegana et al.* [18]. Tato metoda je dále popsána v kapitole 3.1.3.

Jednou ze zajímavějších metod je příprava podle *Augustine et al* [19]. Využívá anhydridu propylfosfonové kyseliny (**T3P**), který se běžně používá při čištění vody a to díky své nízké toxicitě a nízkému alergickému potenciálu. T3P se využívá také jako mírné couplingové činidlo při peptidových syntézách. Je také dobře známý v konverzích amidů na nitrily, esterových syntézách, syntézách alkenů z alkoholů apod.



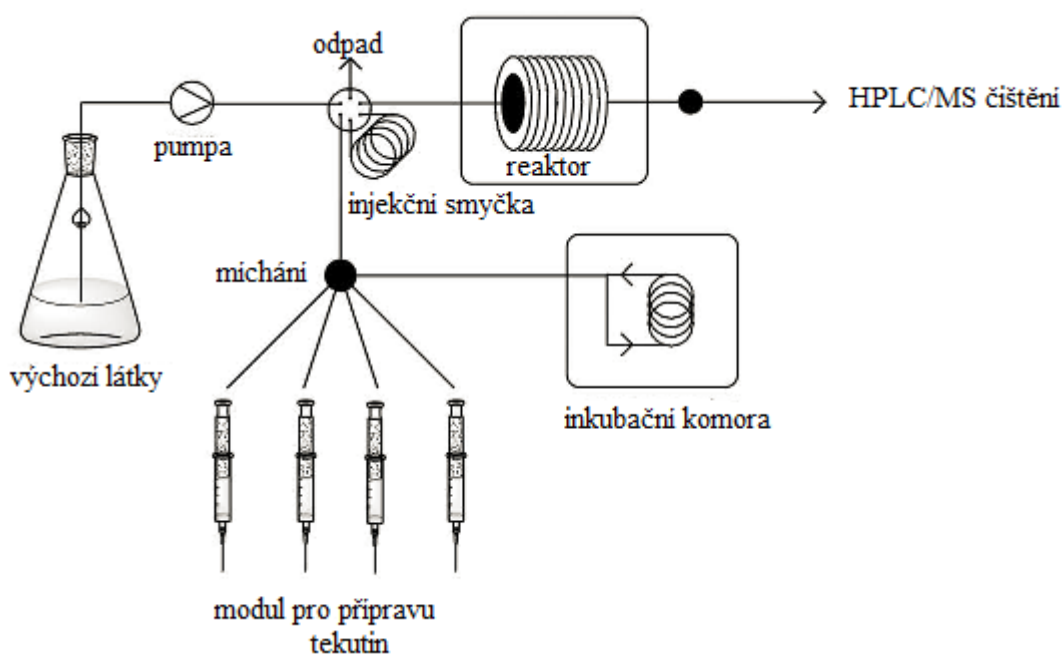
T3P

Díky vysokým výtěžkům byl T3P vyzkoušen i v přípravě oxadiazolů (**4c**). Směs karboxylové kyseliny (**4a**) a amidoximu (**4b**) v ethyl-acetátu byla přidána k triethylaminu (TEA). Ke směsi byl po kapkách přidán T3P. Směs byla zahřívána na 80 °C pod dusíkovou atmosférou po dobu 2–3 hodin. Výtěžky reakce byly 88–95%



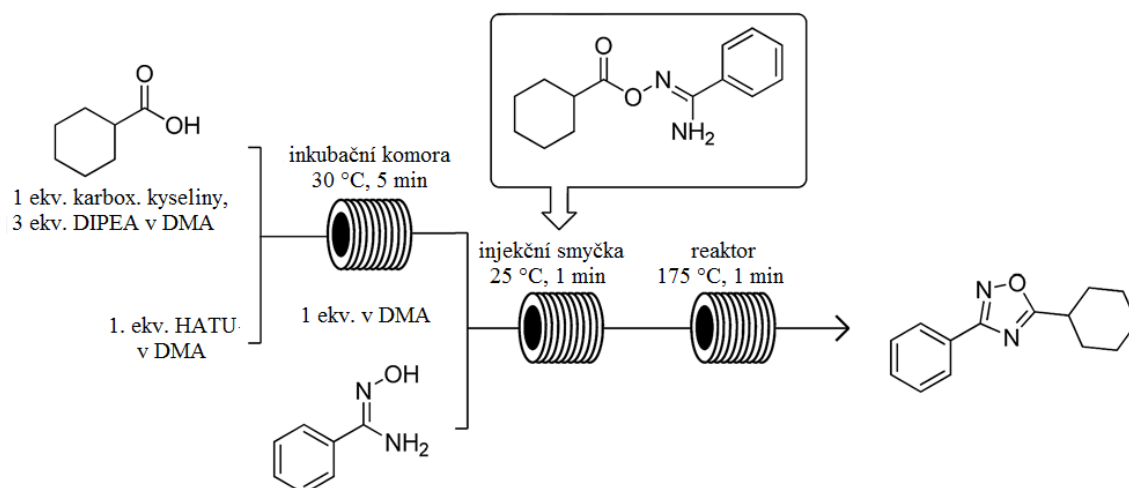
Příprava oxadiazolů s využitím T3P

Méně známou a složitější metodou je metoda dle *Bogdan a Wang*, využívající kontinuální průtokový reaktor [20]. Tato metoda je velice účinná, neboť produkuje čtyři různé sloučeniny za hodinu a dosahuje vysokých výtěžků. Níže je popsáno schéma průtokového reaktoru.



Popis průtokového reaktoru

Zásobní roztok jednoho ekvivalentu karboxylové kyseliny, tří ekvivalentů *N,N*-diisopropylethylaminu (DIPEA) v dimethylacetamidu (DMA) a zásobní roztok jednoho ekvivalentu 1-[bis(dimethylamino)methylen]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]pyridinium 3-oxid-hexafluorofosfátu (HATU) v DMF byl odsán ze svých původních zkumavek, smíchán přes mísící trubici a vložen do inkubační komory při teplotě 30 °C na 5 minut. Reakční segment byl smíchán se zásobním roztokem hydroxyamidu a vložen na minutu do injekční smyčky. Poté byl vstříknut do průtokového reaktoru, který byl nastaven na 175 °C s průtokovou rychlostí 163 ml/min pod tlakem 1000 psi s regulátorem zpětného tlaku. Reakce pak byla vložena přímo do injekční smyčky a přečištěna pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) nebo hmotnostní spektrometrie (MS) s cílem dosáhnout finálních sloučenin. Výtěžek byl 57 %.



Reakce v průtokovém reaktoru

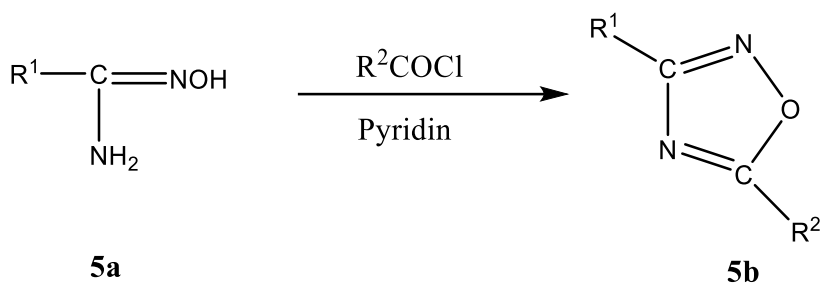
Další speciální metodou pro přípravu oxadiazolů z kyselin je příprava dle *Ducheta et al.* [21]. Využívá iontovou kapalnou fázi, což skýtá pár výhod, čištění je možné po každém kroku a reakce mohou být provedeny v homogenním roztoku. Jedná se o pětikrokovou syntézu z arylnitrilu a kyseliny. Příprava je sice časově náročná, dosahuje se však při ní vysokých výtěžků okolo 90 %.

Přípravu z chirálních aminokyselin ve své práci popsal *Katritzky et al.* [22]. Jako rozpouštědlo byl použit ethanol a výtěžek reakcí byl 70–94 %.

2.1.2 Příprava oxadiazolů z chloridů

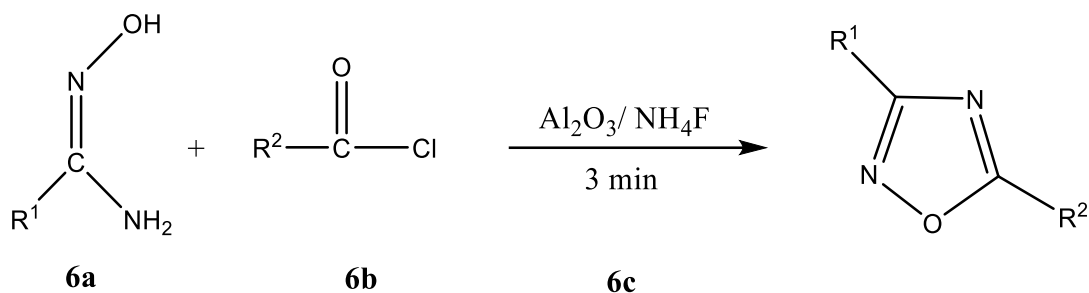
Častou metodou pro přípravu oxadiazolů se stala cyklizace *O*-acylamidoximů s využitím chloridů karboxylových kyselin [15]. Tato metoda má své nedostatky. Chloridy bývají velmi toxické a reaktivní látky, jejich uchování a zacházení s nimi není jednoduchou záležitostí. Dalším nedostatkem je jejich nízká dostupnost.

Jednu z metod přípravy popsali *Chiou a Shine*, zahrnuje přidání acylchloridu k roztoku ekvimolárního množství amidoximu (**5a**) v pyridinu za laboratorní teploty [23]. Dojde k exotermické reakci. Teplo, které při reakci vzniká, přivede reakční směs k varu, což přispívá k formování 1,2,4-oxadiazolu (**5b**). Je vhodné nechat reakční směs ještě 15–30 minut vařit. Výtěžky bývají různé v závislosti na výchozích látkách, většinou se však pohybují okolo 80 %.



Reakce acylchloridu s amidoximem

Další metoda dle *Kaboudina a Saadatiho* využívá oxid hlinitý a fluorid amonný [24]. Jedná se o jednoduchou a selektivní metodu bez rozpouštědla při mírných podmínkách. Nejdříve je připravena směs oxidu hlinitého a fluoridu amonného (**6c**) za pomoci třenky a těrky. Fluorid amonný v reakci vystupuje jako silná báze, což přispívá k tvorbě heterocyklu. Poté se do směsi přidá amidoxim (**6a**) a acylchlorid (**6b**). Tato směs je zahřívána v mikrovlnné troubě kuchyňského typu po dobu 3 minut a výkonu 600 W. Výtěžky reakcí bývají 71–90 %.

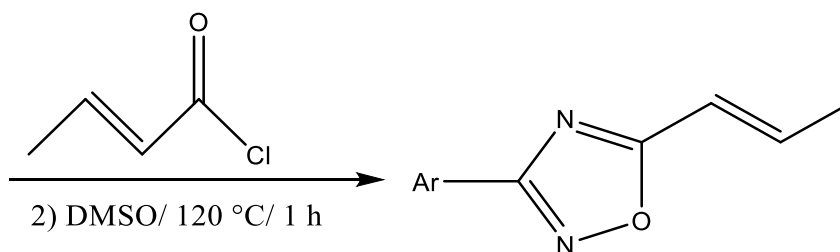
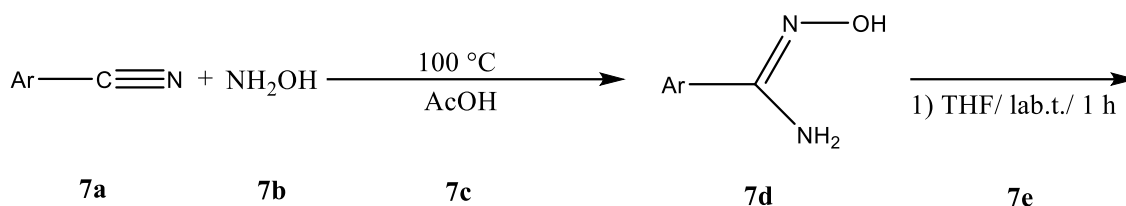


Příprava oxadiazolů s využitím fluoridu amonného

Účinnou metodou bez rozpouštědla je příprava dle *Kaboudina a Navaee* ze stejného pracoviště [25]. K amidoximu bylo přidáno pětinasobné množství upráškováného oxidu hořečnatého. Do směsi bylo přidáno dva a půl násobku množství acylchloridu. Takto vzniklá směs byla míchána po dobu 5 minut a následně vložena na 1 minutu do mikrovlnného reaktoru kuchyňského typu o výkonu 630 W. Reakční směs byla poté mísená za pomoci třenky a těrky, dokud nevznikla směs homogenního charakteru. Výtěžek reakce se pohyboval mezi 67–91 %. Schéma reakce je obdobné jako u předchozí metody.

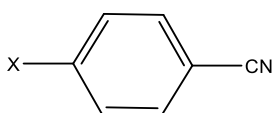
Jednoduchou metodou je příprava 1,2,4-oxadiazolů z nitrilu, hydroxylaminu a krotonoylchloridu dle *Zakeriho et al.* [26]. Směs 4-methoxybenzonitrilu (**7a**) 1,5 ekvivalentu hydroxylaminu (**7b**) a katalytické množství kyseliny octové (**7c**) byla míchána při teplotě 100 °C po dobu 2 h. Došlo ke kondenzaci za vzniku aromatického amidoximu (**7d**). Následně byla směs ochlazena na laboratorní teplotu a bylo přidáno

ekvimolární množství krotonoylchloridu (**7f**) za přítomnosti pár kapek tetrahydrofuranu (**7e**). Došlo k esterifikaci. Směs byla míchána za laboratorní teploty 1 h. Poté byla reakční směs zahřána a byl k ní přidán dimethylsulfoxid (DMSO), přičemž došlo k cyklizaci a zároveň dehydrataci. Pak byla směs míchána při 120 °C další hodinu a poté ponechána přes noc. Výsledný krystalický produkt byl třikrát promyt ethanolem a sušen při 40–50 °C. Produkt byl natolik čistý, že nebylo nutné jej překrystalizovat. Výtěžky reakcí se pohybovaly okolo 70 %.

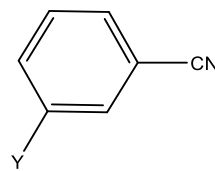


7f

Ar:



X = H, Me, OMe, Cl, Br, NO₂



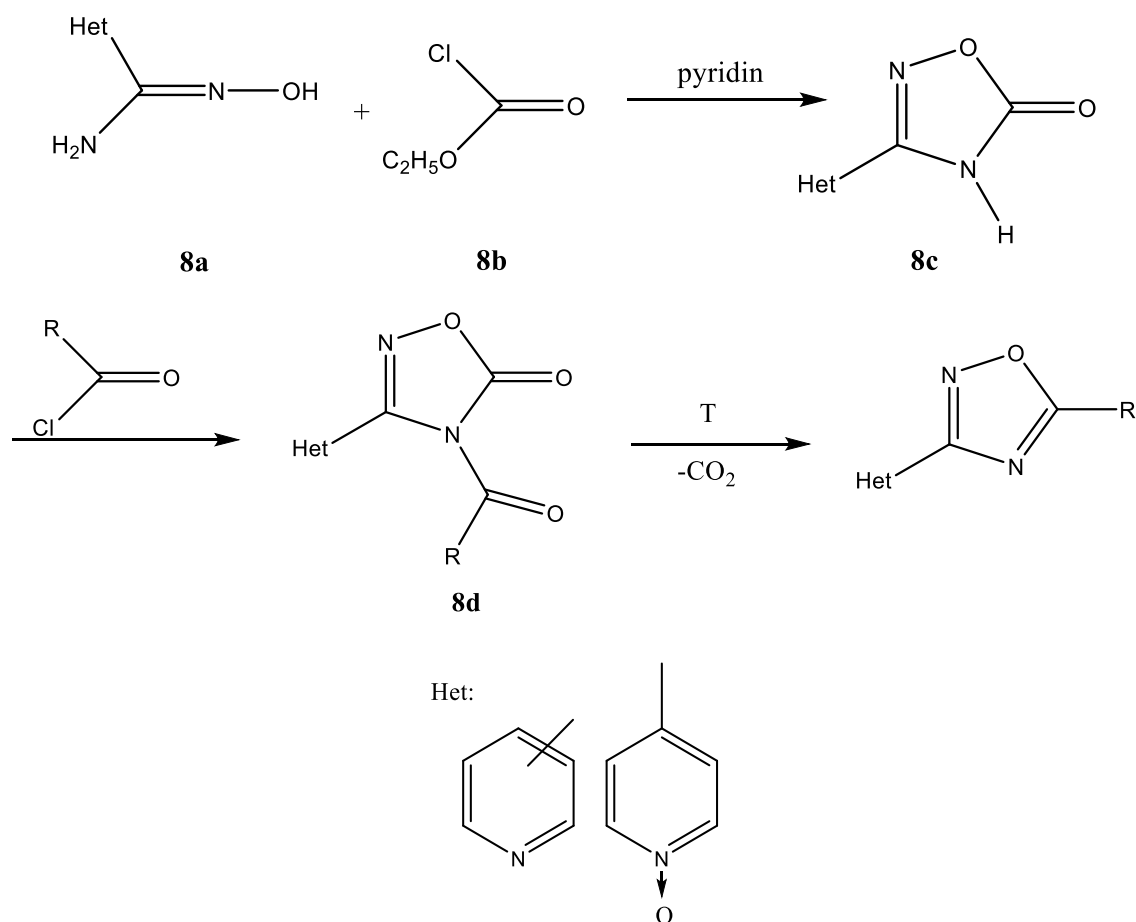
Y = Cl, NO₂

Kondenzační reakce amidoximu s krotonoylchloridem

Přípravit oxadiazoly z chloridů lze i metodou podle *Pancechowské-Ksepko et al* [27]. Jedná se o metodu, které jsem se věnovala ve své experimentální části **3.1.4**. Amidoxim byl rozpuštěn pod argonovou atmosférou v 10 ml bezvodého pyridinu nebo dioxanu. Pak byl přidán chlorid a směs byla zahřívána pod zpětným chladičem 3 hodiny. Po ochlazení bylo odpařeno rozpouštědlo, ke zbytku byla přidána voda (20 ml) a pevný podíl byl překrystalizován za varu z bezvodého ethanolu.

Přípravu bez rozpouštědla s využitím fluoridu draselného jako katalyzátoru představil *Rostamizadeh et al.* [28]. Příprava je dvoukroková, probíhá v mikrovlnném reaktoru při mírných podmínkách a využívá nitril jako výchozí látku. Reakce probíhá ve vodném prostředí. Výtěžek reakce byl 90–95 %

Gobis et al. popsal přípravu oxadiazolů s oxoskupinou v poloze 5 s využitím bezvodého pyridinu dvěma metodami [29]. První metoda využívá amidoximu a trojnásobného množství karbamoylchloridu. Druhá metoda je časově náročnější a jako výchozí látka se místo karbamoylchloridu používají 2 moly ethyl-chlor-formiátu (**8b**) na 1 mol amidoximu (**8a**). Směs se zahřívá pod zpětným chladičem 6 hodin. Poté se pyridin nechá odpařit a zbytek směsi se ochladí. Precipitát se přefiltruje a promyje studenou vodou, následně se nechá rekrystalizovat. Vzniká keton (**8c**). K němu se přidá karbamoylchlorid a pyridin, směs se nechá zahřívát pod zpětným chladičem 3 hodiny. Pyridin se nechá odpařit a zbytek se ochladí. Precipitát se přefiltruje, promyje studenou vodou a rekrystalizuje. Získáme tak novou molekulu, kde se zbytek karboxylové kyseliny naváže na dusík (**8d**). Sloučenina se zahřeje v silikonové lázni na teplotu 214 °C. Poté se produkt dekarboxylace odstraní ze substrátu. Výtěžek reakce byl 52–55 %

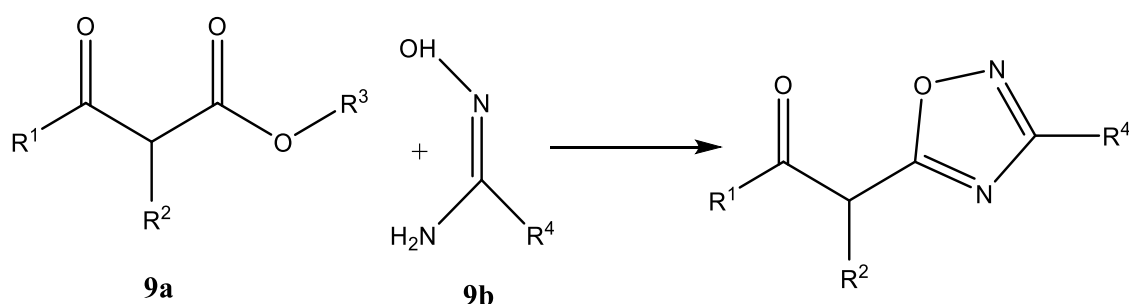


Příprava oxadiazolů dle Gobise

Mezi další metody příprav z chloridů patří metoda dle *Sangepu*. [30], dle *Tamura* [31] a dle *Piccionella* [32].

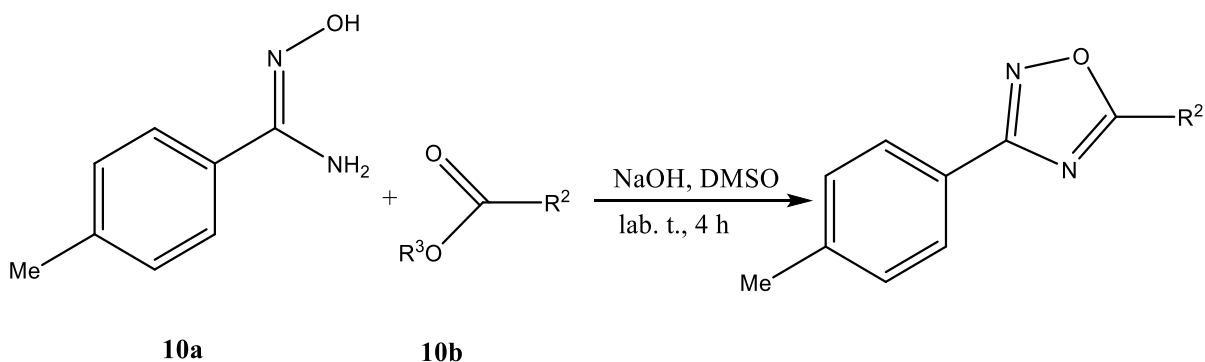
2.1.3 Příprava oxadiazolů z esterů

Příprava dle *Du, et al.* využívá beta-keto esterů jako výchozích látek. β -keto estery jsou důležité stavební molekuly v organických syntézách [1]. Postup je jednoduchý. Amidoxim (**9b**) se smíchá se dvěma ekvivalenty β -keto esteru (**9a**). Směs je zahřívána na 120–140 °C po dobu 2–4 hodin. Po reakci se produkt připraví na flash chromatografické dělení. Pokud jsou výchozí látky v tuhé fázi, je nutné je nejdříve roztavit tak, aby vznikla homogenní reakční směs. Jedná se o reakci bez rozpouštědla, která funguje dobře s širokým rozsahem substrátů. Reakcí se dosahuje dobrých výtěžků 80–90 %. Při reakci se odštěpí molekula vody a alkoholu a pravděpodobně dochází ke vzniku acyl-ketenového meziproductu. Odstranění těchto nežádoucích produktů je snadnější díky nepřítomnosti rozpouštědla.



Příprava 1,2,4-oxadiazolů s využitím β -keto esterů

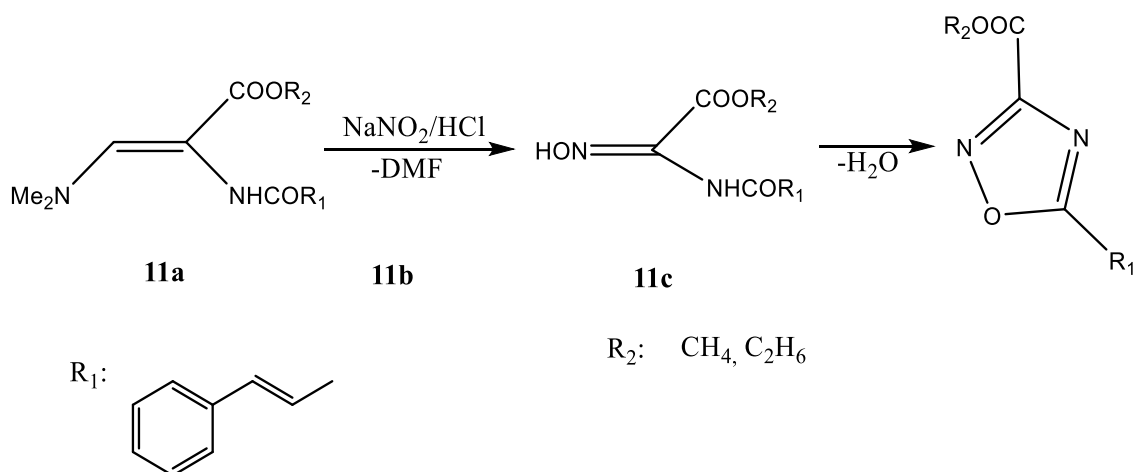
Další typ přípravy předvedl *Baykov et al.* s využitím esterů a bazického prostředí [33]. Nejvhodnější estery pro tento typ reakce byly ty, které nesly elektron-akceptorové substituenty, protože dobře reagovaly s amidoximem. Ke směsi amidoximu (**10a**) a esteru (**10b**) v DMSO se rychle přidá hydroxid sodný. Reakční směs je míchána za laboratorní teploty požadovaný čas (ve většině případů 4 hodiny). Výtěžky reakcí bývají okolo 80 %.



Příprava oxadiazolů z esterů v bazickém prostředí

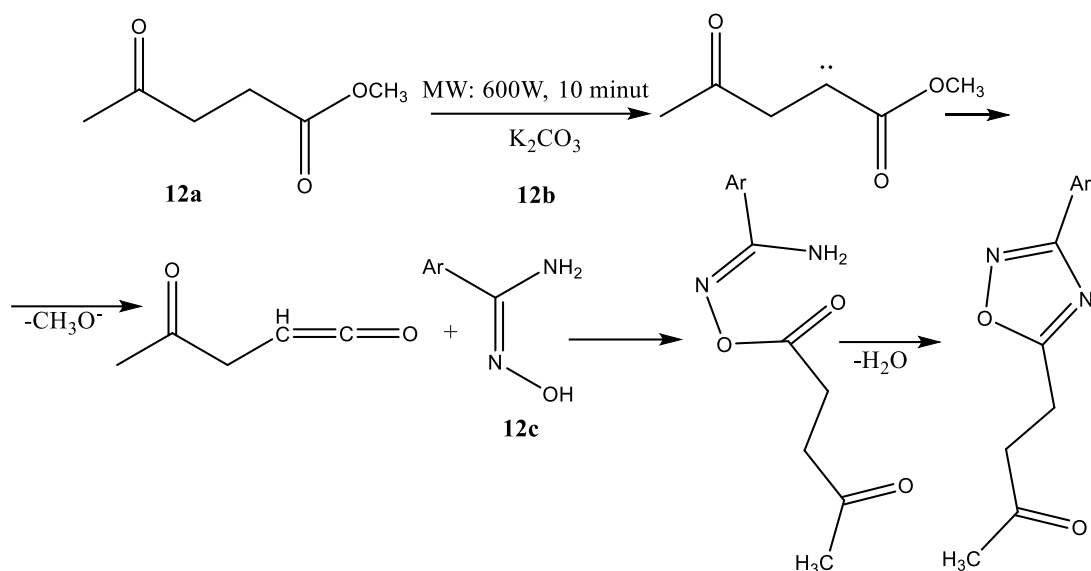
Metoda dle *Lianga* a *Qiana* probíhala na pevné fázi [34]. Reakce mezi benzamidoximem a ethyl-esterem kyseliny piperidin-4-karboxylové běžela tři dny za laboratorní teploty. Jako báze byl pro reakci použit ethoxid sodný a jako rozpouštědlo dichlormethan v ethanolu. Výtěžek reakcí byl velice dobrý, 83-90 %.

Kmetič a *Stanovník* definovali přípravu oxadiazolů z esteru přes amid jako meziprodukt [35]. Ve vodě se nechá ochladit ethyl-ester kyseliny 2-cinnamoylamino-3-dimethylaminopropenové (**11a**) a dusitan sodný (**11b**). Ke směsi se přidá ochlazená kyselina chlorovodíková. Směs se nechá míchat po dobu 24 hodin. Dochází ke vzniku meziproduktu a to hydroxymidového amidu kyseliny *N*-cinnamoyloxalové (**11c**). Ten se rozpustí v ethanolu a k němu se přidá kyselina chlorovodíková. Reakce probíhá jeden den při laboratorní teplotě. Výtěžek reakce bývá 83 %.



Příprava oxadiazolů přes amid jako meziprodukt

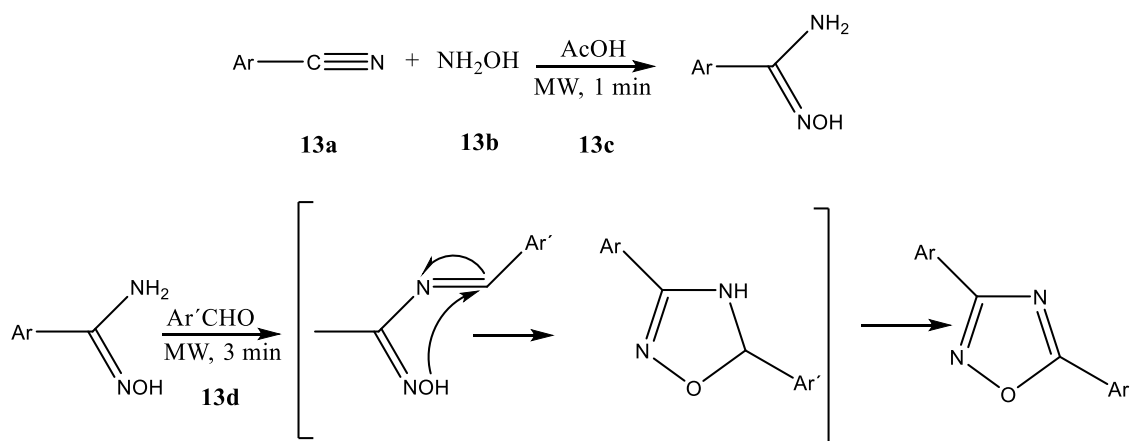
De Freitas et al. popsali dvě metody přípravy oxadiazolů z methylesteru levulové kyseliny: metodu konvenční a metodu, která využívá mikrovlnný reaktor. [36]. Já bych zde popsala druhou zmiňovanou metodu, která probíhala bez rozpouštědla. Směs methylesteru kyseliny levulové (**12a**), příslušného arylamidoximu (**12c**) a uhličitanu draselného (**12b**) byla umístěna do zkumavky, vložena do mikrovlnného reaktoru kuchyňského typu při výkonu 600 W na 10 minut a poté ochlazená. Výtěžky reakcí byly velmi dobré, pohybovaly se okolo 90 %



Příprava oxadiazolů z esteru kyseliny levulové

2.1.4 Příprava oxadiazolů z aldehydů

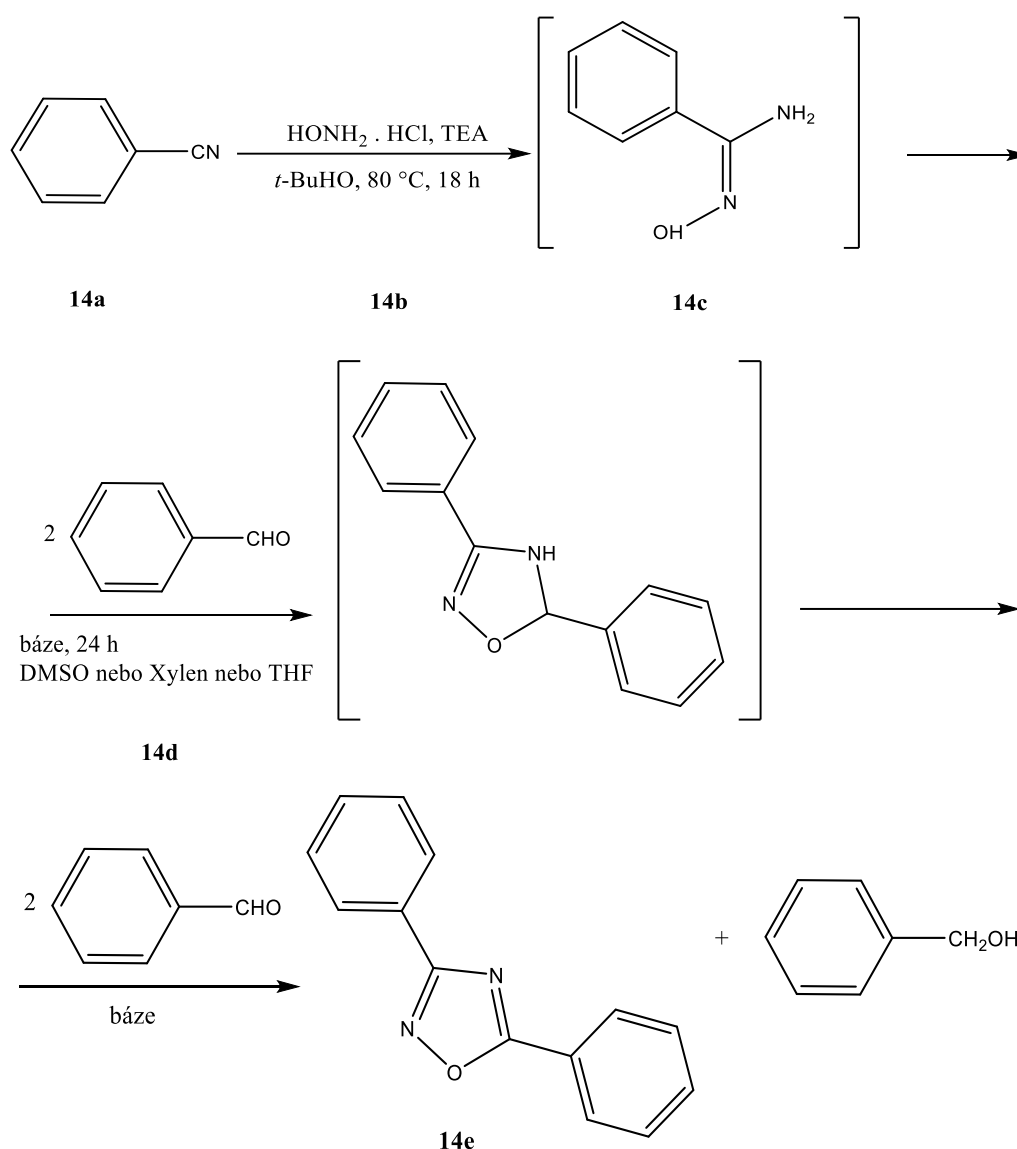
Velmi často používanou a zmiňovanou přípravou je metoda s využitím mikrovlnného reaktoru dle *Adiba* [17]. Tento postup jsem využila pro svou praktickou část 3.1.2.1, 3.1.2.2 a 3.1.2.3. K benzonitrilu (**13a**) bylo přidáno ekvimolární množství hydrochloridu hydroxylaminu (**13b**) v kyselině octové (**13c**). Reakce probíhala v CEM mikrovlnném reaktoru, při teplotě 100 °C a výkonu 600 W po dobu 1 minuty. Poté probíhala při teplotě 100 °C a výkonu 600 W po dobu 3 minut. Poté bylo do reakce přidáno ekvimolární množství benzaldehydu (**13d**). Reakce probíhala v CEM mikrovlnném reaktoru při teplotě 150 °C a výkonu 600 W po dobu 3 minut. Výtěžek reakce byl vynikající, 90–100 %



Kondenzace amidoximů s aldehydy

Při použití aldehydů jako výchozích látek, je nutné využít oxidantů jako je KMnO_4 , MnO_2 nebo NaOCl [15] aldehydy jsou totiž slabé oxidanty. Avšak za určitých

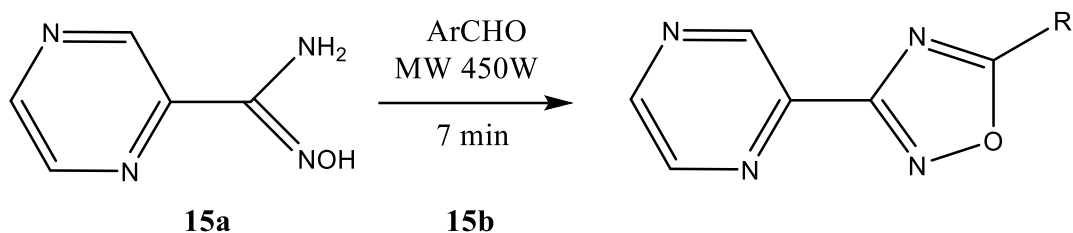
podmínek lze aldehydy použít jako substráty a oxidanty v jednom. Syntéza je v tomto případě tříkroková. Nejdříve probíhá nukleofilní adice hydroxylamin hydrochloridu (**14b**) na nitril (**14a**) v prostředí *t*-butanolu a triethylaminu při teplotě 80 °C za dobu 18 h a bez přístupu vzduchu. Vzniká tak benzamidoxim. V druhém kroku dojde ke kaskádové cyklizační reakci. K meziprojektu (**14c**) se přidá aldehyd a uhličitán cesný v DMSO (**14d**) pro nastavení bazického prostředí. Tato směs se míchá při teplotě 100 °C po dobu 24 h. Cílový produkt (**14e**) je získán v posledním kroku oxidativní dehydrogenací v bazickém prostředí. Výtěžek reakce bývá v tomto případě poměrně vysoký a to 75 %.



Nukleofilní adice hydroxylaminu na nitril a následná cyklizace

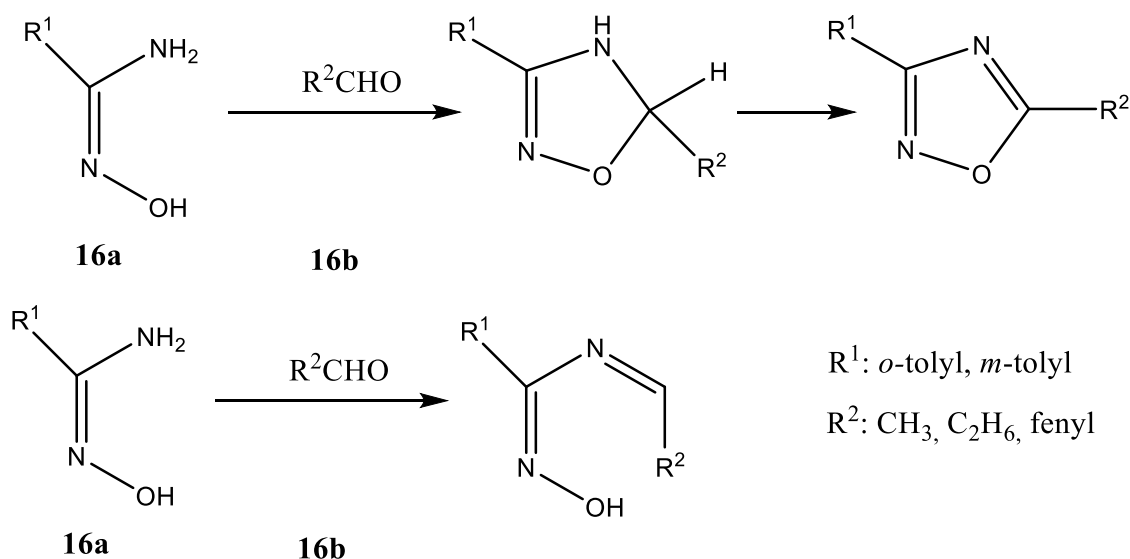
Přípravou, kterou jsem použila v praktické části 3.1.2.4 a 3.1.2.5 je příprava dle *Sondhiho et al.*[37]. *N'*-hydroxypyrazin-2-karboximidamid (**15a**) byl smíchán

s benzaldehydem (**15b**). Reakce probíhala v CEM mikrovlnném reaktoru při teplotě 150 °C, výkonu 450 W pod dobu 7 minut. Výtěžek reakce byl velmi dobrý, 70–80 %



Kondenzační reakce N'-hydroxypyrazin-2-karboximidamidu s benzaldehydem

Další možnou metodou je metoda dle *Srivastavy et al.* [38]. Bohužel je časově náročná. Amidoxim (**16a**) byl rozpuštěn v ledové kyselině octové a smíchán s čerstvě predestilovaným benzaldehydem (**16b**). Směs byla míchána při laboratorní teplotě 4 dny. Roztok byl poté probublán vzduchem, aby se přebytečný benzaldehyd přeměnil na kyselinu benzoovou. Kyseliny byly poté zneutralizovány nasyceným vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného a extrahovány chloroformem. Zbytek roztoku byl přes noc míchán s hydrogenuhličitanem sodným s cílem odstranit kyselinu benzoovou. Nevýhodou této metody je časová náročnost a nízká výtěžnost, okolo 25 %.



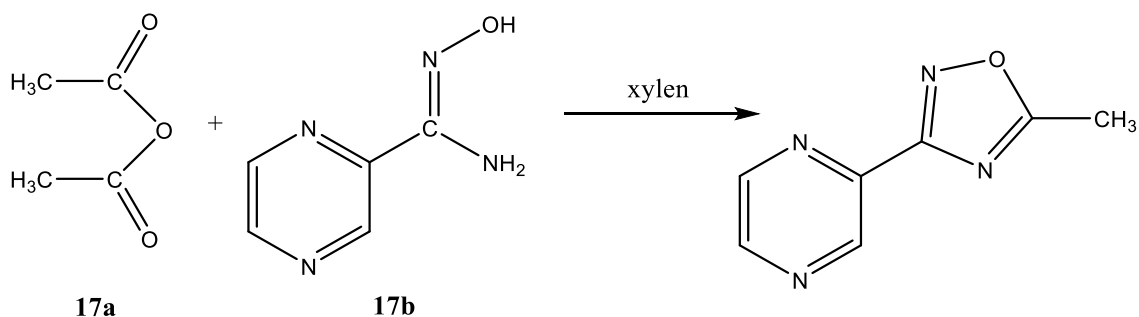
Kondenzační reakce dle Srivastavy

Young a Beidler. popsali reakci 2,5-dimethoxybenzaldehydu s nitroethanem a octanem amonným v kyselině octové [10].

Mezi další metody příprav z aldehydů patří metoda dle *Ubaradka* [39].

2.1.5 Příprava oxadiazolů z anhydridů

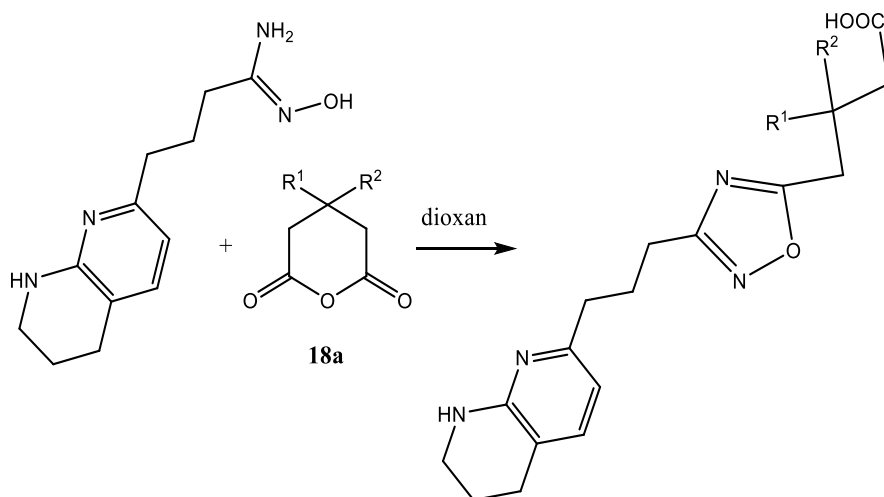
Přípravu oxadiazolů z anhydridů uvedl *Fanshawe et al.*[40]. Pyrazinkarboxamid (**17b**) byl smíchán s anhydridem kyseliny octové (**17a**) v 50 ml xylenu. Tato směs byla zahřívána pod zpětným chladičem po dobu 3 hodin. Rozpouštědlo (xylen) bylo odpařeno při sníženém tlaku a surový produkt byl dvakrát rekrystalizován z isopropylalkoholu. Po rekrystalizaci vypadly bílé krystalky.



Příprava oxadiazolů z esteru kyseliny levulové

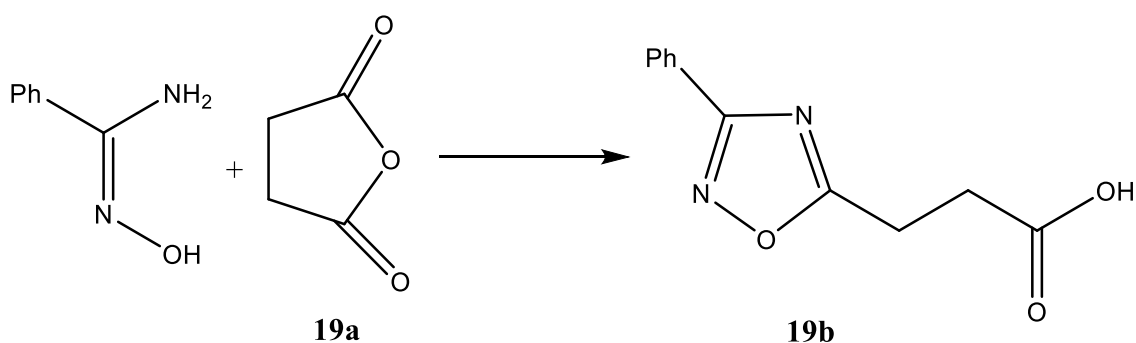
Časově méně náročnou přípravu z anhydridu popsal *Clarke* [41]. *p*-Brombenzamidoxim byl zahříván 3–4 minuty s anhydridem kyseliny octové. Reakce probíhala v ethanolu.

Metoda podle *Boyse et al.* využívá anhydridy kyseliny glutarové substituované v poloze 3 (**18a**) [42]. Reakce probíhala za tepla v dioxanu. Výtěžky reakce byly různé, 29–96 %.



Příprava oxadiazolů z anhydridu kyseliny glutarové

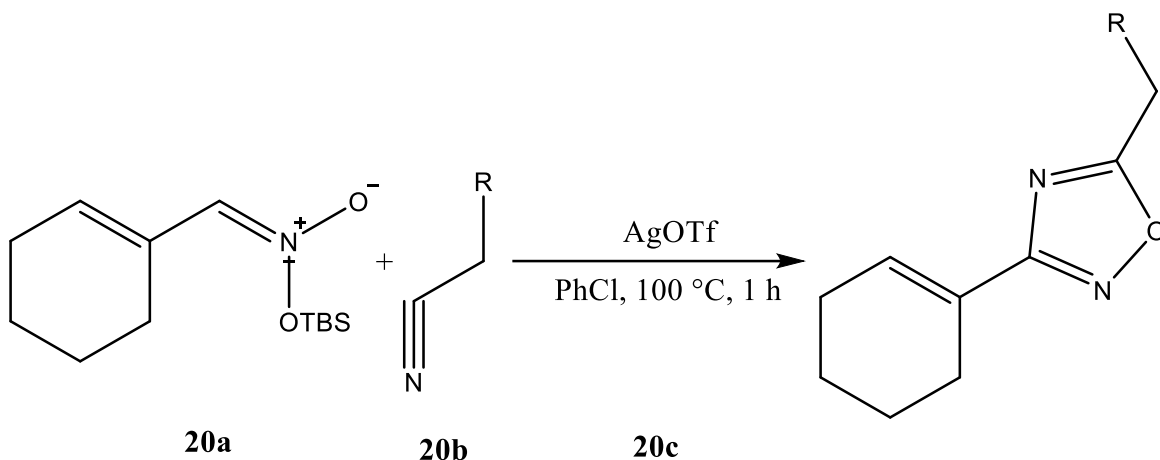
Leite et al. definovala přípravu oxadiazolů z anhydridů kyseliny jantarové (**19a**) [43]. Dojde ke vzniku 1,2,4-oxadiazol-5-ylpropanových kyselin (**19b**), které slouží jako vynikající substráty pro další reakce.



Příprava oxadiazolů z anhydridu kyseliny jantarové

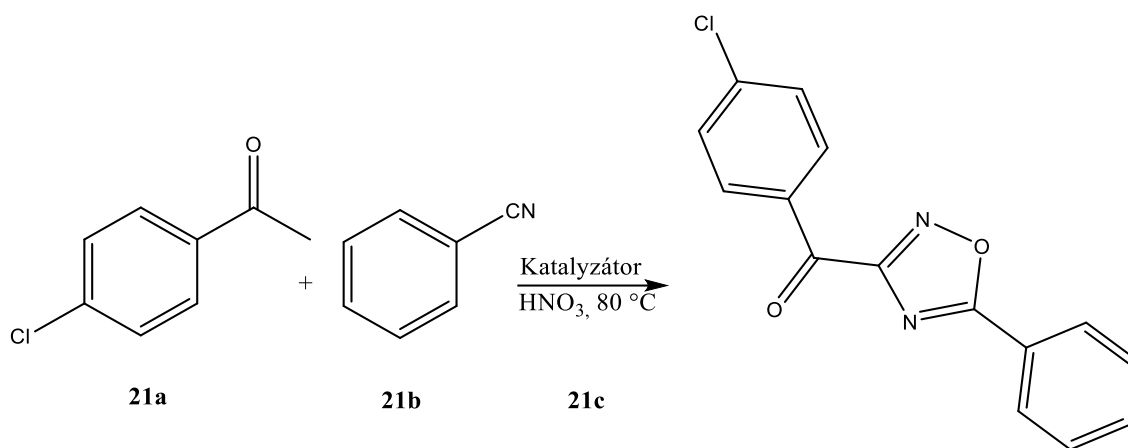
2.1.6 Příprava oxadiazolů z nitrilů

Nikodemiak a Koert popsali kovem katalyzovanou cykloadici silyl-nitronátu a nitrilu [44]. Silyl-nitronáty jsou univerzální reagenty v organických syntézách s využitím např. u nitro-aldolových reakcí. Katalyzátor vhodný pro reakci je triflát stříbrný (AgOTf) a ytterbitý [Yb(OTf)₃]. Ke třem ekvivalentům nitrilu (**20b**) a AgOTf v chlorbenzenu (**20c**) byl přidán silyl-nitronát (**20a**). Směs byla míchána hodinu při 100 °C. Po ochlazení na pokojovou teplotu bylo rozpouštědlo odsáno za sníženého tlaku. Výtěžky reakcí byly značně vysoké, pohybovaly se okolo 95 %.



Cykloadice silyl-nitronátu a nitrilu

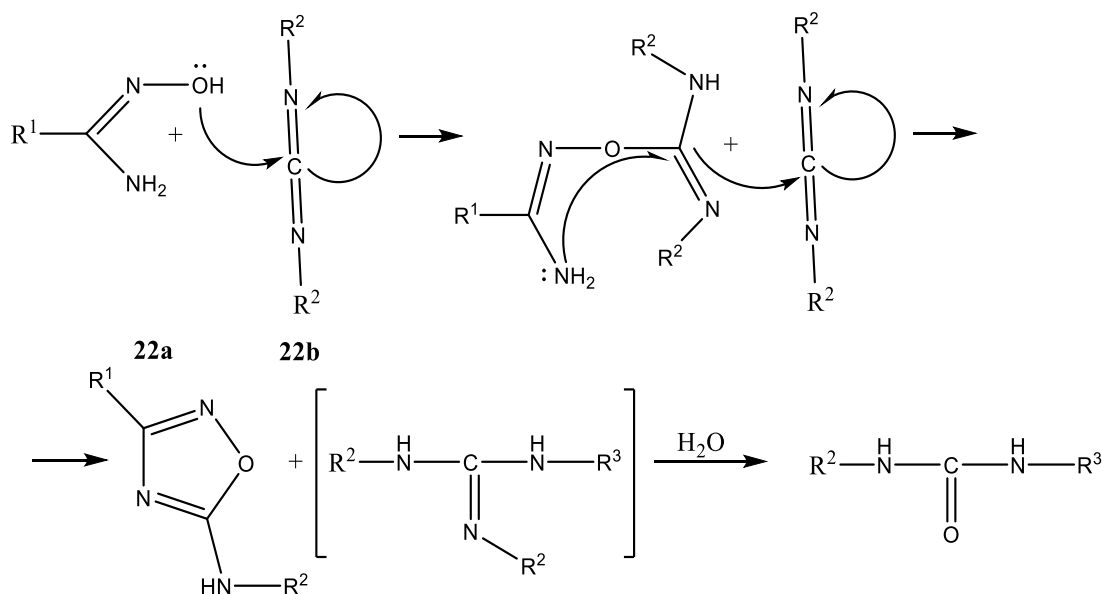
Vale et al. popsal přípravu oxadiazolů s využitím oxidů lanthanoidů jako katalyzátorů [45]. Kyselina dusičná byla míchána s oxidy různých lanthanoidů (**21c**) při teplotě 50 °C. Pak byl přidán keton (**21a**) a po deseti minutách příslušný nitril (**21b**). Tato směs byla míchána při 80 °C 1,5–4 hodiny dle konkrétního lanthanoidu. Reakční směs byla ukončena roztokem hydrogenuhličitanem sodného a produkt byl opakovaně extrahován z ethyl-acetátu. Výtěžky reakcí byly 45–87 %.



Příprava oxadiazolů s využitím oxidů lanthanoidů

2.1.7 Příprava oxadiazolů z imidů

Metoda dle *Ispikoudiho et al.* představuje přípravu oxadiazolů s využitím diisopropylkarbodiimidu (DIC) nebo DCC [46]. Amidoxim (**22a**) byl rozpuštěn v toluenu a poté bylo najednou přidáno 2,1 ekvivalentu DIC nebo DCC (**22b**). Směs byla zahřívána pod zpětným chladičem po dobu 6–10 hodin, a pak ochlazena na laboratorní teplotu. Výtěžky reakcí byly dobré, pohybovaly se nad 65 %.

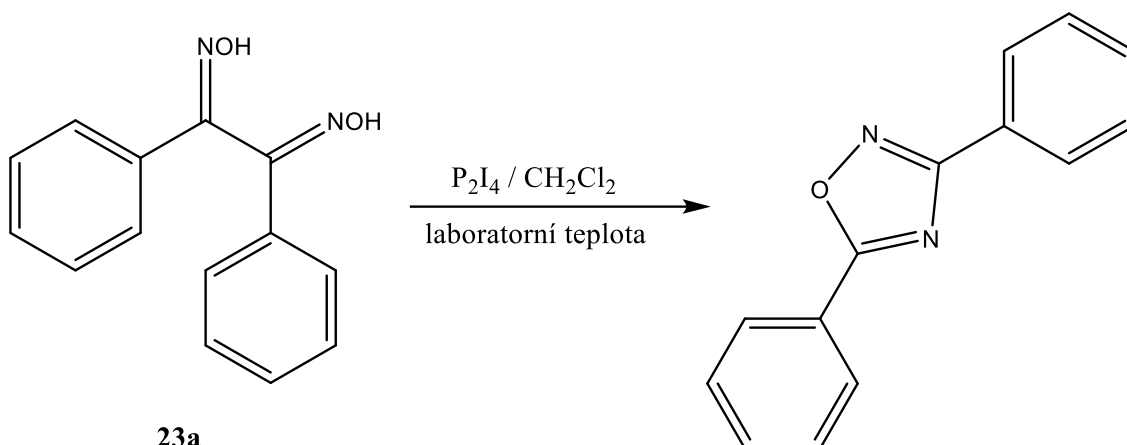


Příprava oxadiazolů s využitím DIC nebo DCC

2.1.8 Příprava oxadiazolů z oximů

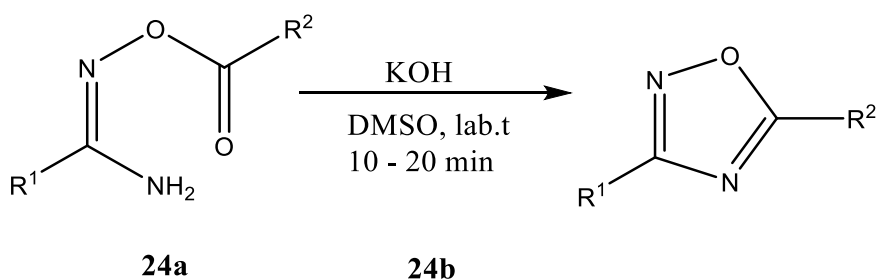
Jednou z méně známých příprav oxadiazolů je metoda dle *Telvekara a Takale* z oximů a tetrajodidu difosforečného, který se používá jako katalyzátor při syntéze nitrilů z kyselin [47]. Tetrajodid difosforečný byl míchán v bezvodém dichlormethanu 5 minut, aby byl získán čistý roztok. Poté byl přidán dioxim (**23a**) ve dvojnásobném množství.

Směs byla nadále míchána při laboratorní teplotě 2 hodiny. Výtěžky se pohybovaly od 50 do 89 % dle použitého rozpouštědla.



Příprava oxadiazolů z oximů

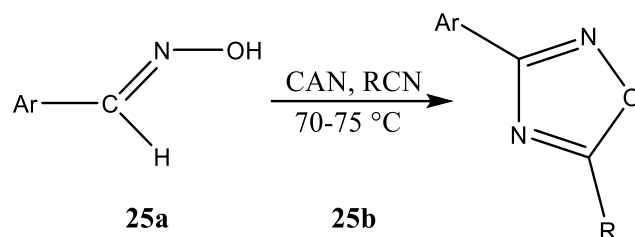
Používanou metodou je metoda dle *Baykova et al.* [48]. Jedná se o cyklodehydrataci *O*-acylamidoximů (**24a**). V organických syntézách je kombinace KOH/DMSO (**24b**) často používána díky své dostupnosti, a proto byla použita i pro tuto reakci. Byly však vyzkoušeny i jiné báze, například hydroxid sodný či lithný s podobnými výsledky. Nižší výtěžky poskytovaly uhličitan cesný a draselný. Hydroxidy alkalických kovů jsou nejvýhodnějšími reagenty pro cyklodehydrataci při mírných podmínkách. Většina substituentů byla stabilní v tomto vysoce zásaditém prostředí, avšak občas docházelo k postranním reakcím. Navzdory tomu výtěžnost reakce byla velmi dobrá, průměrně 90 %.



Cyklodehydratace O-acylamidoximů

Metoda dle *Giurga a Mlochovskiho* popisuje oxidaci aldoximů s využitím alifatických nitrilů jako rozpouštědel [49]. Roztok dusičnanu ceřičito-amonného (CAN) v acetonitrilu (**25b**) byl po kapkách přidáván do roztoku či suspenze příslušného oximu (**25a**) v acetonitrilu při teplotě 70–75 °C po dobu 30 minut. Reakce pak běžela dalších

10 minut. Při přidávání roztoku dusičnanu vznikala bílá sraženina, která však po reakci zmizela. Výťažky této metody byly různé, pohybovaly se od 24 % do 73 %.



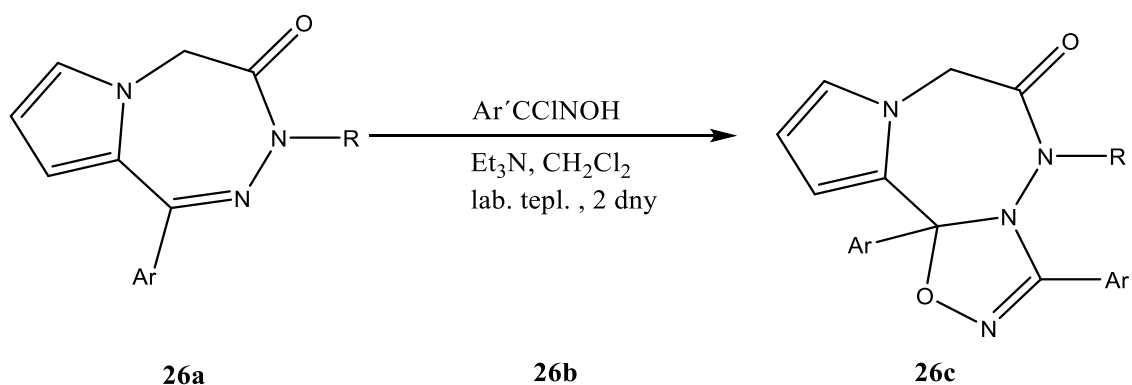
Příprava oxadiazolů s využitím alifatických nitrilů

Příprava dle *Otaky et al.* využívá jako katalyzátor hydroxid tetrabutylamonnný (TBAH) [50]. K *O*-acylamidoximu v tetrahydrofuranu (THF) byl přidán vodný roztok TBAH a směs byla následně míchána po dobu 10 minut. Schéma reakce je obdobné jako u předchozí metody.

Mezi další metody příprav z oximů patří metoda dle *Kayukové* [51], dle *Anbazhagana* [52].

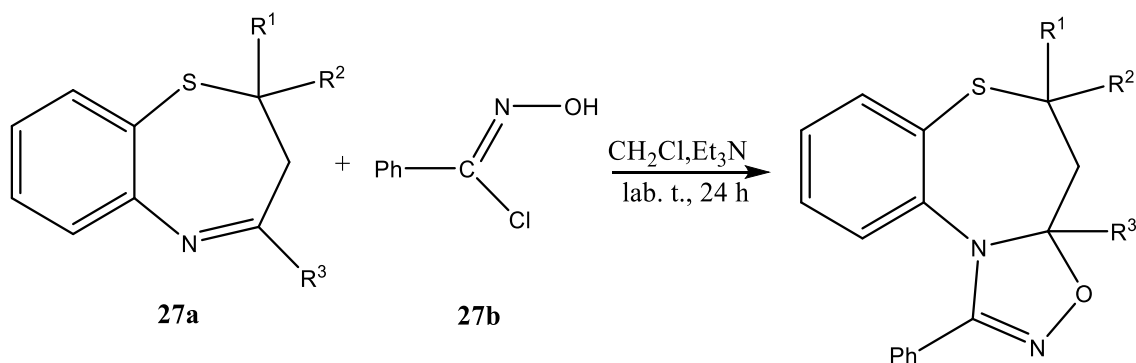
2.1.9 Příprava oxadiazolů z jiných heterocyklů

Mezi složitější metody patří příprava oxadiazolů z jiných heterocyklů. Cykloadici pyrrolotriazepinonových derivátů za vzniku dihydro-1,2,4-oxadiazolů (**26c**) ve své práci uvedl *Földesi et al.* [53]. Tento způsob je časově náročnější, avšak probíhá za laboratorní teploty a není jej tedy nutné zahřívat. K roztoku pyrrolotriazepinonového derivátu (**26a**) v dichlormethanu bylo přidáno dvojnásobné množství triethylaminu. Do této reakční směsi byl po kapkách přidán *N*-hydroxyarylkarboximidoylchlorid (**26b**) v dichlormethanu. Směs byla míchána při laboratorní teplotě (asi 24–48 hodin), dokud výchozí látky nebyly spotřebovány, což bylo monitorováno na TLC. Výťažky této metody nebyly bohužel vysoké, pohybovaly se okolo 15 %.



Příprava oxadiazolů z heterocyklů cykloadicí

Podobný průběh má příprava dle *De Sarra et al.* [54]. Benzohydroximinoylchlorid (**27b**) byl za stálého míchání přidán do roztoku příslušného 1,5-benzothiazepinového derivátu (**27a**) v dichlormethanu. Do roztoku byl po kapkách přidán triethylamin. Reakce stejně jako u předchozí metody probíhala za laboratorní teploty zhruba 24 hodin. Po reakci bylo rozpouštědlo odpařeno za sníženého tlaku. Ke zbytku byl přidán diethylether a zfiltrován hydrochlorid triethylaminu. Všechny sloučeniny byly překrystalizovány z ethanolu. Výtěžky byly různé, pohybovaly se mezi 37 a 80 %.



Příprava oxadiazolů z 1,5 benzothiazepinu

Další metody mají velmi podobný průběh [55-56].

Hemming et al. popsal přípravu z 1-azetinu využívající tetrafluoroboritan stříbrný jako fluorodesulfurizační činidlo [57]. Výtěžky se pohybovaly okolo 80 %.

Pro přípravu oxadiazolů lze použít ještě mnoho dalších metod [58–68]. Další z nich je mimo jiné také příprava dle *Younga* a *DeVita* z jodidů s využitím palladia jako katalyzátoru [69], popřípadě metoda dle *Andersena et al.*, která využívá palladiem katalyzované karbonylační párování arylbromidů s amidoximy či hydrazidy za přítomnosti oxidu uhelnatého [70]. Další možnosti příprav shruje ve své práci *Kayukova* [71].

3. Experimentální část

3.1 Chemická část

Při přípravě byly použity komerčně dostupné chemikálie:

- Pyrazin-2-karbonitril (Aldrich)
- 4-Methoxybenzoylchlorid (Aldrich)
- 2-Chlorbenzoylchlorid (Aldrich)
- 3-Chlorbenzoylchlorid (Aldrich)
- 4-Tolyl-chlorid (Aldrich)
- 4-Chlorbenzoylchlorid (Aldrich)
- Benzaldehyd (Aldrich)
- Hydroxylamin-hydrochlorid (Aldrich)
- 4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd (Aldrich)
- 2-Fluorobenzaldehyd (Aldrich)
- Dusičnan stříbrný (Penta)
- Kyselina máselná (Chemapol)
- Kyselina propionová (Merck)
- 1,1'-Karbonyldiimidazol (Merck)
- 3-Nitrobenzoová kyselina (Merck)
- 2-Nitrobenzaldehyd (Loba-chemie)
- Bezvodý pyridin 99,8 % (Aldrich)
- 2-Methoxybenzaldehyd (Fluka)

Další látky byly v laboratoři k dispozici jako meziprodukty připravené dříve.

Chromatografie na tenké vrstvě (TLC) byla prováděna na TLC hliníkových fóliích Silikagel 60 F254 (Merck Germany). Jako mobilní fáze byla používána směs hexan + ethyl-acetát 60:40 (v/v).

Pro mikrovlnné syntézy byl použit reaktor CEM Discover s fokusovaným polem s připojeným autosamplerem Explorer 24 (CEM Corporation, Matthews, NC, UA) využívající CEMs Synergy™ software pro nastavení a sledování podmínek reakcí.

Většina produktů byla čištěna na flash chromatografu CombiFlash® Rf (Teledyne Isco Inc., Lincoln, NE, USA) gradientovou elucí za použití hexanu (LachNer, Neratovice,

Česká republika) a ethyl-acetátu (Penta, Praha, Česká republika) jako mobilní fáze. Jako stacionární fáze byl použit silikagel (0.040–0.063 nm, Merck, Darmstadt, Německo)

Vzorky látek pro analýzu byly sušeny 24 hodin v exsikátoru nad oxidem fosforečným za tlaku 1,33 kPa.

Teploty tání byly stanoveny na digitálním bodotávku Stuart SPM 20 a nebyly korigovány.

Hodnoty logP a Clog byly vypočteny pomocí programu ChemDraw 16.0.

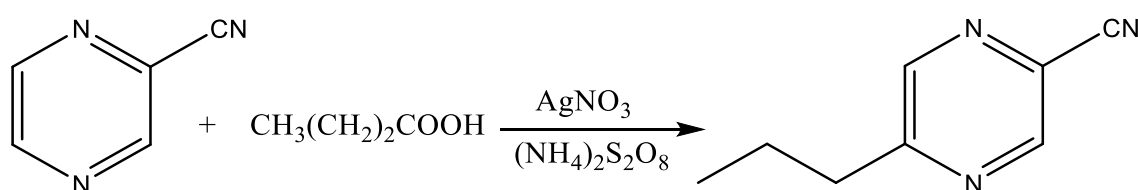
Elementární analýzy byly provedeny na analyzátoru Vario Micro Cube Elemental Analyzer (Elementar Analysensysteme GmbH, Hanau, Německo).

IČ spektra byla měřena na spektrofotometru NICOLET 6700 metodou ATR-Ge. Vlnočty jsou uváděny v cm^{-1} .

$^1\text{H-NMR}$ a $^{13}\text{C-NMR}$ spektra byla měřena na VNMR S500 spektrometru pracující na frekvenci 500 MHz pro $^1\text{H-NMR}$ a 125 MHz pro $^{13}\text{C-NMR}$). Chemické posuny jsou uváděny v δ hodnotách v ppm a jsou nepřímě vztaženy k tetramethylsilanu (TMS) prostřednictvím signálu rozpouštědla (2,49 ppm pro ^1H a 39,7 ppm pro ^{13}C v DMSO) a interakční konstanty J jsou uváděny v Hz.

3.1.1 Příprava alkylovaných pyrazin-2-karbonitrilů

Obecný postup:



Pyrazin-2-karbonitril (10,5 g, 0,1 mol) byl rozpuštěn v 300 ml vody zahřáté na 80 °C. K tomuto roztoku se přidal dusičnan stříbrný (1,7 g, 0,01 mol) a kyselina máselná (10,2 g, 0,1 mol). Potom se za míchání přikapal (asi během půl hodiny) roztok peroxidisíranu amonného v 70 ml vody. Teplota se během přidávání udržovala v rozmezí 75–80 °C. Při této teplotě se směs míchala celkem 1 hodinu. Zchladlá reakční směs se zalkalizovala 10 % roztokem hydroxidu sodného na pH 9–10 a kontinuálně se extrahovala etherem. Etherový výtřepek se vysušil bezvodým síranem sodným a směs se dvakrát přečistila na flash chromatografii. Výsledný produkt byl ověřen pomocí tenkovrstvé chromatografie, a poté využit pro práci dalších studentů.

Sumární vzorec: C₈H₉N₃

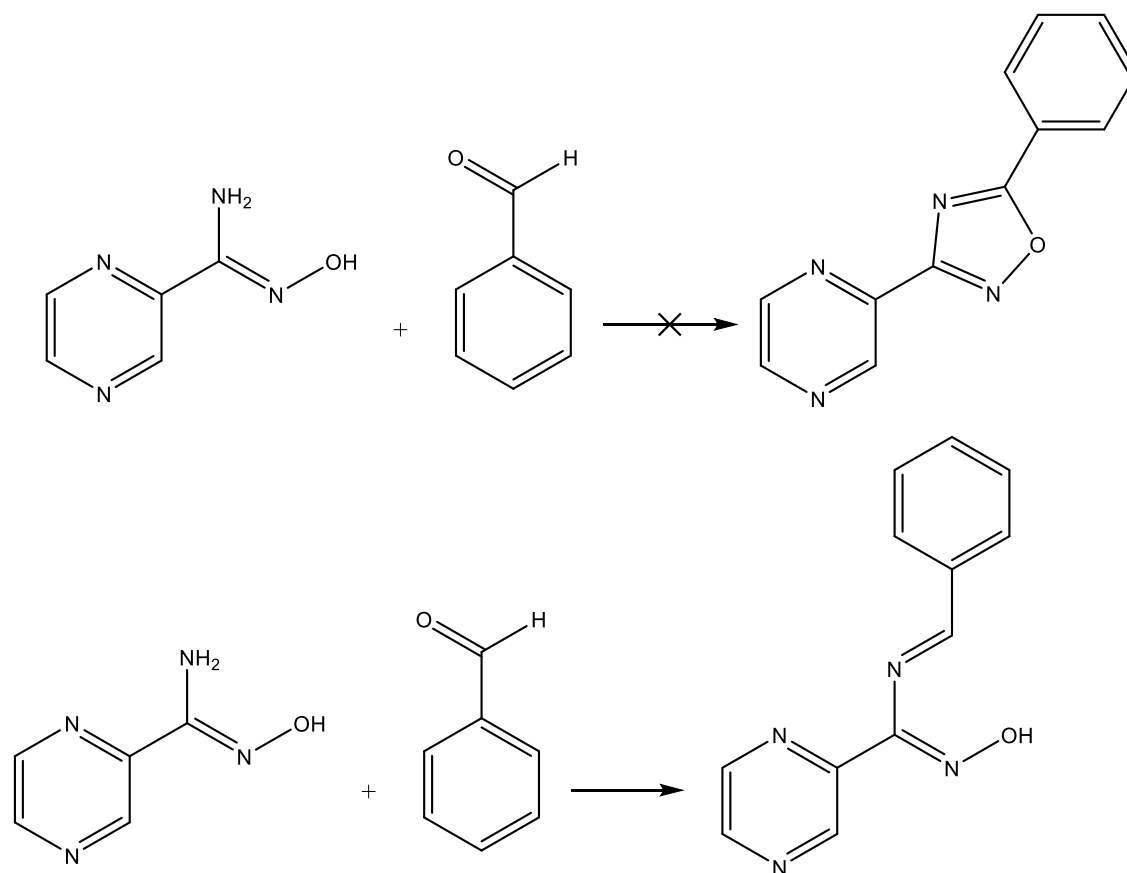
Molekulová hmotnost: 147,18

Vzhled: nažloutlá kapalná látka

Výtěžek reakce: 4,6 g (31 %)

3.1.2 Příprava 1,2,4-oxadiazolů z benzaldehydů

3.1.2.1 Syntéza 5-fenyl-3-(pyrazin-2-yl)-1,2,4-oxadiazolu



1. Mikrovlnná syntéza

K *N'*-hydroxypyrazin-2-karboximidamidu (0,56 g; 4 mmol) byl přidán benzaldehyd (0,42 g, 4 mmol). Reakce probíhala v CEM mikrovlnném reaktoru při teplotě 150 °C a výkonu 300 W po dobu 6 minut. Surový produkt byl překrystalizován za varu z bezvodého ethanolu. Elementární analýza čistotu produktu nepotvrdila, proto byla směs po reakci připravena pro dělení na flash chromatografu. Dvě majoritní frakce byly a dvakrát překrystalizovány za varu z bezvodého ethanolu. Jedna obsahovala výchozí látku a druhá frakce Schiffovu bazi.

Sumární vzorec: C₁₂H₈N₄O (oxadiazol) C₁₂H₁₀N₄O (Schiffova báze)

Molekulová hmotnost: 224, 22 (oxadiazol); 226,24 (Schiffova báze)

LogP: 2,13 (oxadiazol);1,99 (Schiffova báze)

ClogP: 1,52 (oxadiazol); 076 (Schiffova baze)

Vzhled: žlutá krystalická látka

Výtěžek reakce: 0,18 g (20 %)

Teplota tání: 139,5–141,5 °C (předpokládaný oxadiazol 143–145 °C ref. [72])

Elementární analýza po krystalizaci (vypočtena pro Schiffovu bazi):

	% C	% H	% N
Vypočteno	63,71	4,46	24,76
Nalezeno	63,76	4,40	24,67

2. Syntéza za laboratorní teploty

N'-hydroxypyrazin-2-karboximidamid (0,46 g; 3,3 mmol) byl rozpuštěn v 8 ml ledové kyselině octové a smíchán s benzaldehydem (3ml). Směs byla míchána při laboratorní teplotě 4 dny. Kyseliny byly poté zneutralizovány nasyceným vodným roztokem hydrogenuhličitanu sodného a extrahovány ethyl-acetátem. Zbytek roztoku byl přes noc míchán s hydrogenuhličitanem sodným s cílem odstranit kyselinu benzoovou. Následně byla provedena filtrace a chromatografie využívající jako mobilní fázi hexan a ethyl-acetát. Produkt byl překrystalizován za varu z bezvodého ethanolu.

Vzhled: vínovo-hnědé krystaly

Výtěžek reakce: 0,31 g (41 %)

Teplota: 140,0–142,5 °C

Elementární analýza:

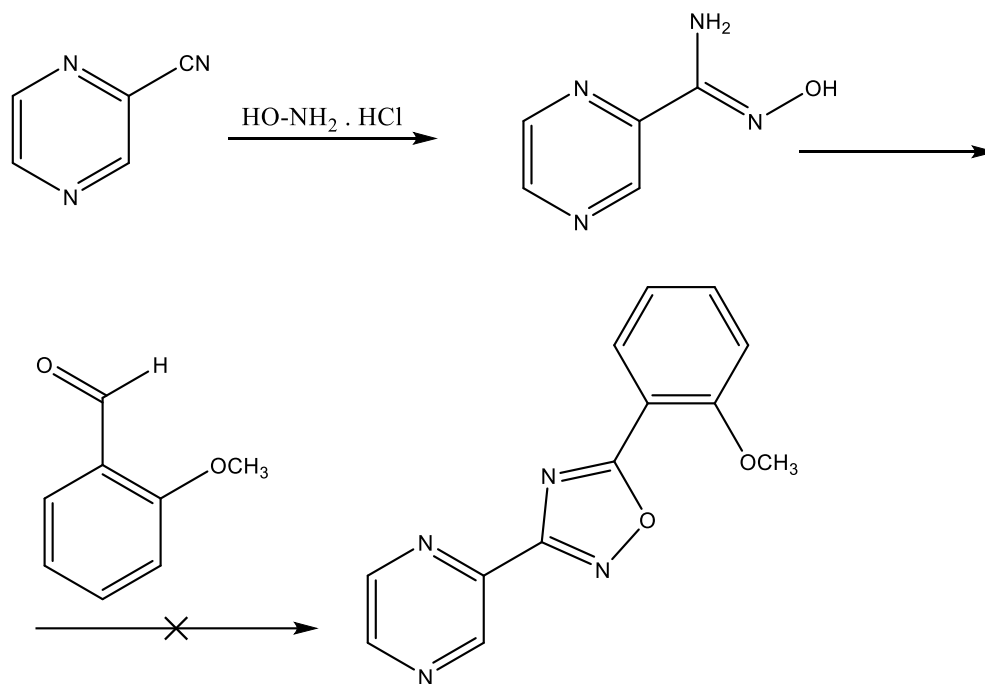
	% C	% H	% N
Vypočteno	63,71	4,46	24,76
Nalezeno	63,76	4,52	24,77

IČ spektrum 3213 (OH), 2881 (CH aliph.), 1596, 1502 (C=N), 1172, 1130 (C=N pyrazine), 1057, 1024 (C=C pyrazine), 950 (N-O)

¹H NMR (DMSO) δ 9,09 (1H; δ; *J* = 1,0 Hz; H3'); 8,77-8,75 (2H; m; H5'; H6'); 8,37 (1H; bs; OH); 7,54-7,50 (2H; m; H2''; H6''); 7,46-7,39 (3H; m; H3''; H4''; H5''); 6,61 (1H; δ; *J* = 2.0 Hz; CH)

¹³C NMR (DMSO) δ 154,5; 146,1, 144,4; 143,2; 141,0; 139,8; 129,5; 128,7; 127,0; 93,8

3.1.2.2 Dvoustupňová syntéza 5-(2-methoxyfenyl)-3-(pyrazin-2-yl)-1,2,4-oxadiazolu



K pyrazin-2-karbonitrilu (0,5 g; 4,75 mmol) byl přidán hydrochlorid hydroxylaminu (0,33 g; 4,75 mmol) v kyselině octové. Reakce probíhala v CEM mikrovlnném reaktoru, při teplotě 100 °C a výkonu 300 W po dobu 5 minut. Poté pokračovala při teplotě 100 °C a výkonu 300 W po dobu 10 minut. Podle monitorování reakce pomocí TLC s dříve připraveným meziproduktem (ref. [13]) došlo ke vzniku *N'*-hydroxypyrazin-2-karboximidamidu. Po reakci směs zhnědla a ztuhla. Poté byl do reakce přidán 2-methoxybenzaldehyd (0,65 g; 4,77 mmol). Reakce běžela v CEM mikrovlnném reaktoru při teplotě 150 °C a výkonu 300 W po dobu 3 minut. Poté se vzhled směsi nezměnil. Po neúspěšném pokusu o krystalizaci z různých rozpouštědel (z acetonu, ethyl-acetátu a ethanolu) byla směs připravena na chromatografické dělení. Majoritní frakce o hmotnosti (0,23 g) byla překrystalizována za varu z bezvodého ethanolu. Bylo získáno 56 mg hnědých krystalů o teplotě tání 140 °C (za rozkladu). NMR nepotvrdilo přítomnost produktu

Sumární vzorec: C₁₃H₁₀N₄O₂ (oxadiazol), C₁₃H₁₂N₄O₂ (Schiffova base)

Molekulová hmotnost: 254,25

LogP: 2 (oxadiazol); 1,86 (Schiffova base)

ClogP: 1 (oxadiazol); 0,68 (Schiffova base)

Vzhled: oranžovohnědá krystalická látka

Výtěžek reakce: surový: 1,46 g (120 %)

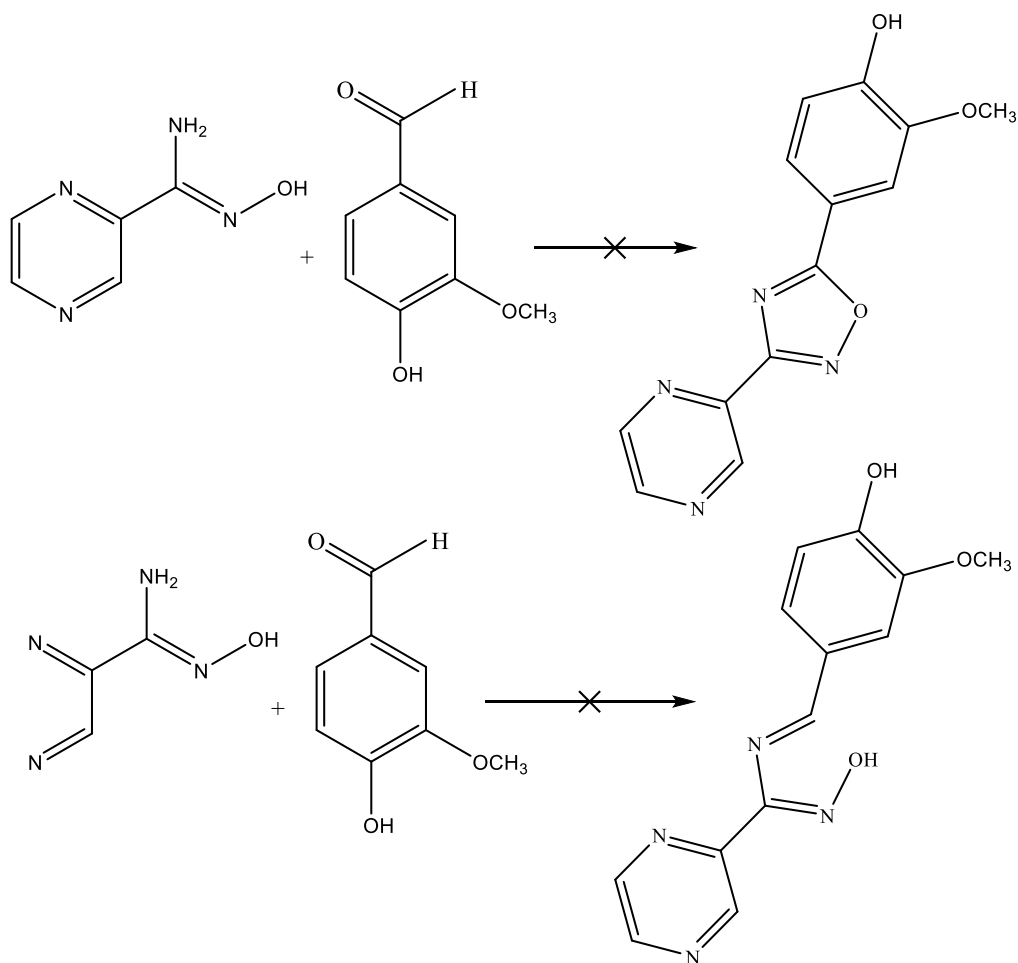
přečištěný 0,02 g (2 %)

Teplota tání: 135,6–136,2 °C

Elementární analýza před krystalizací

	% C	% H	% N
Vypočteno (oxadiazol)	61,41	3,96	22,04
Vypočteno (Schiffova baze)	60,93	4,72	21,86
Nalezeno	57,94	3,86	28,59

3.1.2.3 Syntéza 5-(4-hydroxy-3-methoxyfenyl)-(3-(pyrazin-2-yl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl)fenolu



K *N'*-hydroxypyrazin-2-karboximidamidu (0,5 g; 3,62 mmol) byl přidán 4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyd (0,66 g, 4,34 mmol). Reakce probíhala v CEM mikrovlnném reaktoru při teplotě 160 °C, výkonu 300 W po dobu 30 minut. Reakce byla sledována pomocí TLC a vzhledem k tomu, že neproběhla, byly přidány 3 ml methanolu jako rozpouštědlo. Dále reakce pokračovala při 150 °C celkem po dobu 30 minut z důvodu problémů s reaktorem. Po reakci zůstal hnědý roztok, z něhož stáním vypadly hnědé krystalky v množství 1,52 g, které byly nejlépe rozpustné v ethanolu (hůře v acetonu a ethyl-acetátu). Látka byla následně překrystalizována za varu z bezvodého

ethanolu. A byly získány hnědočervené jemné krystalky o teplotě tání 143,6–145,1 °C. Elementární analýza (její výsledky nejsou prezentovány) nepotvrdila požadovaný oxadiazol ani Schiffovu bázi. Látka byla znovu rozpuštěna a připravena pro dělení flash chromatografií. Dvě majoritní frakce byly znovu překrystalizovány z bezvodého ethanolu. Dle NMR měření se však jednalo o komplikovanou směs látek, produkt získán nebyl.

Sumární vzorec: C₁₃H₁₀N₄O₃ (oxadiazol), C₁₃H₁₂N₄O₃ (Schiffova báze)

Molekulová hmotnost: 270,25

LogP: 1,61 (oxadiazol); 1,47 (Schiffova báze)

ClogP: 0,92 (oxadiazol); -0,06 (Schiffova báze)

Výtěžek reakce: surový: 1,52 g (155 %)

po krystalizaci 0,42 (66 %)

po flash chromatografii: 1.frakce 0,17 g

2.frakce 0,13 g

Teplota tání: 1.frakce: 153,1–155,2 °C světle žlutý prášek

2. frakce: 182,7–185,5 °C okrový prášek

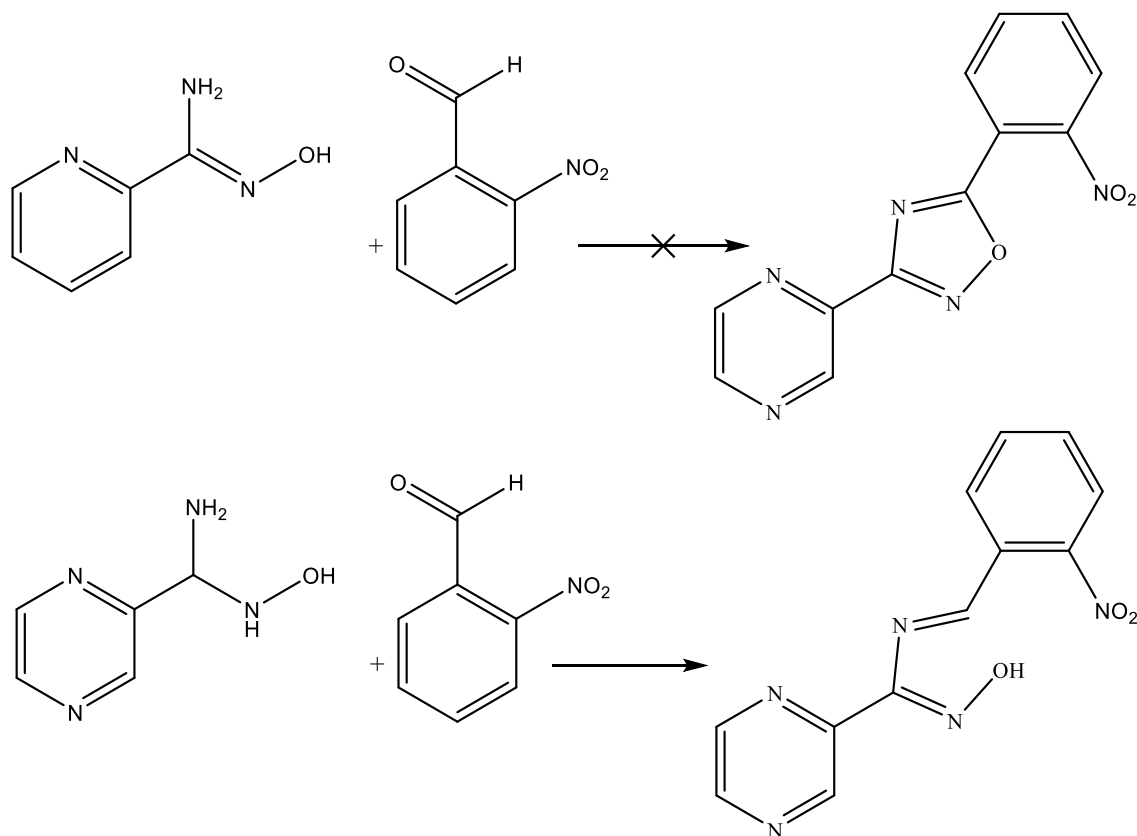
Elementární analýza před krystalizací (vypočtena pro oxadiazol):

	% C	% H	% N
Vypočteno	57,78	3,73	20,73
Nalezeno	52,16	4,35	27,82

Elementární analýza před krystalizací (vypočtena pro Schiffovu bázi):

	% C	% H	% N
Vypočteno	57,35	4,44	20,58
Nalezeno	56,56	4,26	21,04

3.1.2.4 Syntéza 5-(2-nitrofenyl)-3-(pyrazin-2-yl)-1,2,4-oxadiazolu



K *N'*-hydroxypyrazin-2-karboximidamidu (0,5 g; 3,62 mmol) byl přidán 2-nitrobenzaldehyd (0,66 g, 4,36 mmol). Jako rozpouštědlo byl použit methanol (1 ml). Reakce probíhala v CEM mikrovlnném reaktoru při teplotě 150 °C, výkonu 300 W po dobu 30 minut. Po reakci vypadly žlutobílé krystalky, které byly rozpustně v ethyl-acetátu. Po odsání byla směs připravena pro dělení flash chromatografií. Látka byla překrystalizována z bezvodého ethanolu. Elementární analýza odpovídala spíše Schiffově bazi než oxadiazolu, ale podle NMR spektra se jednalo o složitou směs látek.

Sumární vzorec: C₁₂H₇N₅O₃ (oxadiazol), C₁₂H₉N₅O₃ (Schiffova baze)

Molekulová hmotnost: 269,22

Log P: 0,46 (Schiffova baze)

ClogP: 1,27 (oxadiazol); 0,50 (Schiffova baze)

Vzhled: žlutohnědá pevná látka

Výtěžek reakce: surový: 1,14 g (96 %)

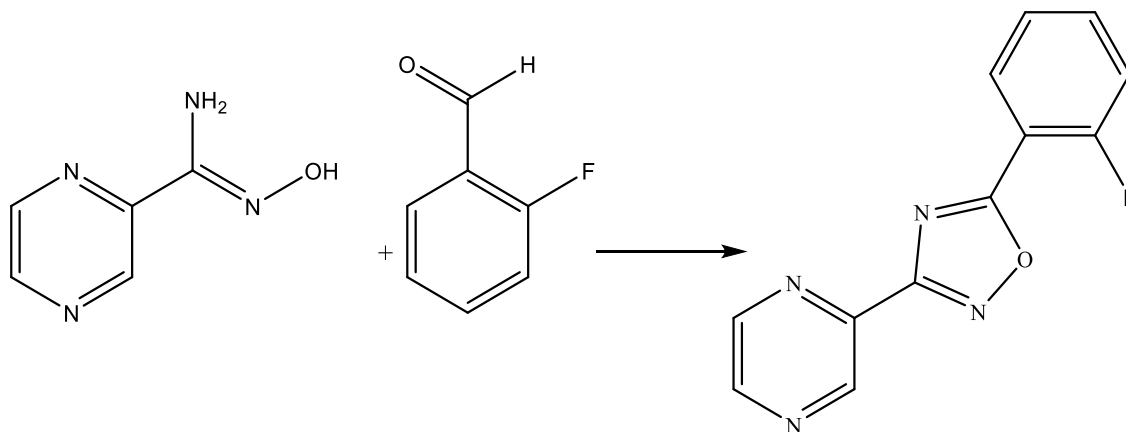
 přečištěný: 0,18 g (15 %)

Teplota tání: 102,8–103,4 °C

Elementární analýza před krystalizací:

	% C	% H	% N
Vypočteno (oxadiazol)	53,54	2,62	26,01
Vypočteno (Schiffova base)	53,14	3,34	25,82
Nalezeno	53,05	3,72	24,84

3.1.2.5 Syntéza 5-(2-fluorfenyl)-3-(pyrazin-2-yl)-1,2,4-oxadiazolu



K *N'*-hydroxypyrazin-2-karboximidamidu (0,5 g; 3,62 mmol) byl přidán 2-fluorbenzaldehyd (0,54 g, 4,34 mmol). Jako rozpouštědlo byl použit methanol (3 ml). Reakce probíhala v CEM mikrovlnném reaktoru při teplotě 150 °C, výkonu 300 W po dobu 30 minut. Směs byla připravena pro dělení flash chromatografií. Majoritní frakce byla překrystalizována za varu z bezvodého ethanolu. NMR analýza ukázala, že se jedná o komplikovanou směs látek.

Sumární vzorec: C₁₂H₇FN₄O

Molekulová hmotnost: 242,21

LogP: 2,29

ClogP: 1,67

Vzhled: žlutá krystalická látka

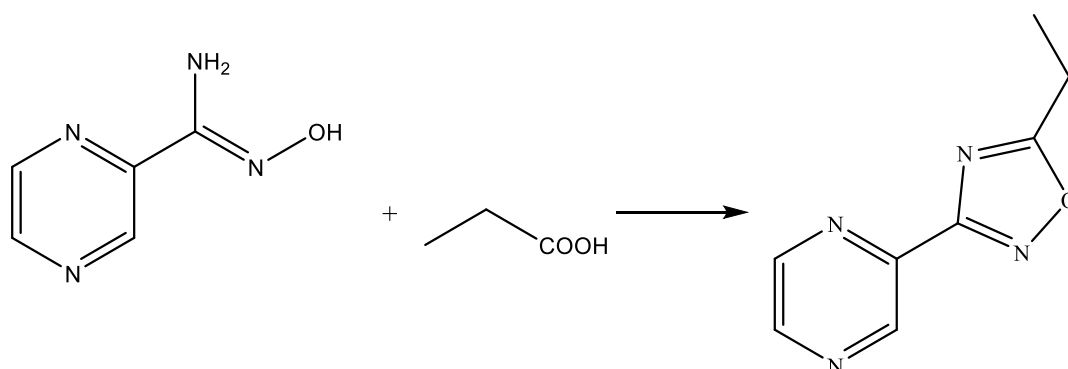
Výtěžek reakce: po chromatografii 0,30 g (128 %)

po krystalizaci: 0,11 g (13 %)

Teplota tání: 121,3–122,4 °C

3.1.3 Příprava 1,2,4-oxadiazolů z organických kyselin

3.1.3.1 Syntéza 5-ethyl-3-(pyrazin-2-yl)-1,2,4-oxadiazolu



K 2,6 ml 0,5 M roztoku propionové kyseliny (1,45 mmol) v DMF bylo přidáno 1,45 ml 1,0 M roztoku CDI (1,45 mmol) v DMF. Směs byla míchána po dobu 30 minut, poté bylo přidáno 2,6 ml 0,55 M roztoku *N'*-hydroxypyrazin-2-karboximid-amidu (0,200 g, 1,45 mmol) v DMF a směs byla míchána při teplotě 25 °C po dobu 4 hodin. Následně bylo přidáno 1,45 ml 1,0 M roztoku CDI (1,45mmol) v DMF a reakce byla zahřívána při teplotě 115 °C po dobu 6 hodin. Po ochlazení na laboratorní teplotu bylo přidáno 18,4 ml ethyl-acetátu a 7,9 ml vody. Po 10 minutách míchání byly kapalně fáze odděleny a organická vrstva byla promyta 8 ml vody, 8 ml 1 M HCl, 8 ml nasyceného roztoku hydrogenuhličitanu sodného a 8 ml solanky. Organická vrstva byla vysušena bezvodým síranem sodným a odpařena. Produktem byla žlutá polotuhá látka. NMR spektrum obsahovalo signály hlavně v oblasti nízkého pole, tzn. jednalo se o směs obsahující především alifatické sloučeniny.

Sumární vzorec: C₈H₈N₄O

Molekulová hmotnost: 176,18

LogP: 1,32

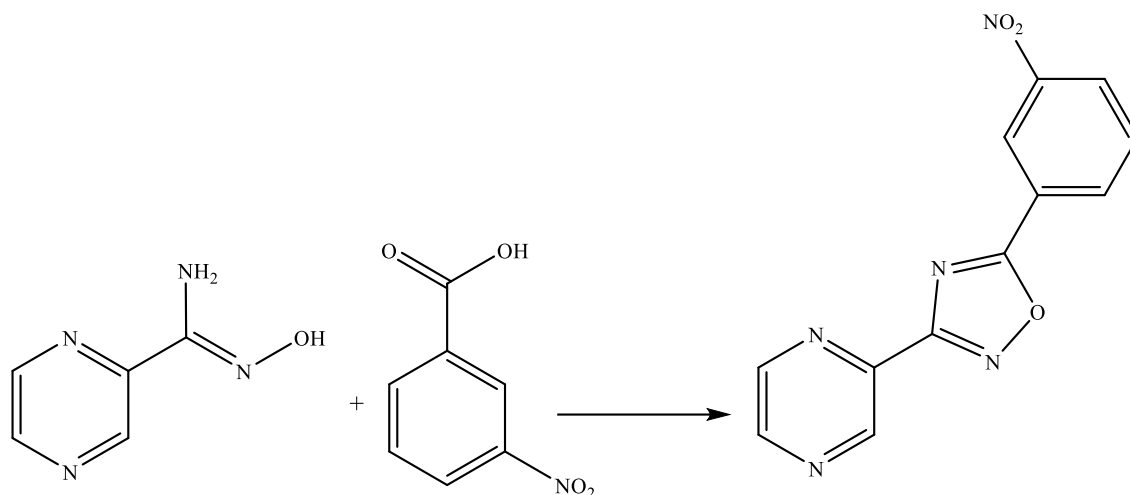
ClogP: 0,22

Vzhled: žlutá polotuhá látka

Výtěžek reakce: surový: 0,29 g (113 %)

Teplota tání: nebyla měřena, jednalo se totiž o polotuhou látku

3.1.3.2 Syntéza 5-(3-nitrofenyl)-3-(pyrazin-2-yl)-1,2,4-oxadiazolu



K 0,24g 0,5 M roztoku 3-nitrobenzoové kyseliny (1,45 mmol) v DMF bylo přidáno 1,45 ml 1,0 M roztoku CDI (1,45 mmol) v DMF. Směs byla míchána po dobu 30 minut, poté bylo přidáno 2,6 ml 0,55 M roztoku *N'*-hydroxypyrazin-2-karboximidamidu (0,200 g, 1,45 mmol) v DMF a směs byla míchána při teplotě 25 °C po dobu 4 hodin. Následně bylo přidáno 1,45 ml 1,0 M roztoku CDI (1,45 mmol) v DMF a reakce byla zahřívána při teplotě 115 °C po dobu 6 hodin. Po zchlazení na laboratorní teplotu bylo přidáno 18,4 ml ethyl-acetátu a 7,9 ml vody. Po 10 minutách míchání byly kapalné fáze odděleny a organická vrstva byla promyta 8 ml vody, 8 ml 1 M HCl, 8 ml nasyceného roztoku hydrogenuhličitanu sodného a 8 ml solanky. Organická vrstva byla vysušena bezvodým síranem sodným a po odpaření byly získány béžové krystaly, které byly dvakrát překrystalizovány za varu z bezvodého ethanolu.

Sumární vzorec: C₁₂H₇N₅O₃

Molekulová hmotnost: 269,22

Clog P: 1,27

Vzhled: béžová pevná látka

Výtěžek reakce: surový: 0,44 g (113 %)

přečištěný: 0,07 g (17 %)

Teplota tání: 180,4–181,0 °C

Elementární analýza:

	% C	% H	% N
Vypočteno	53,54	2,62	26,01
Nalezeno	54,35	2,81	25,43

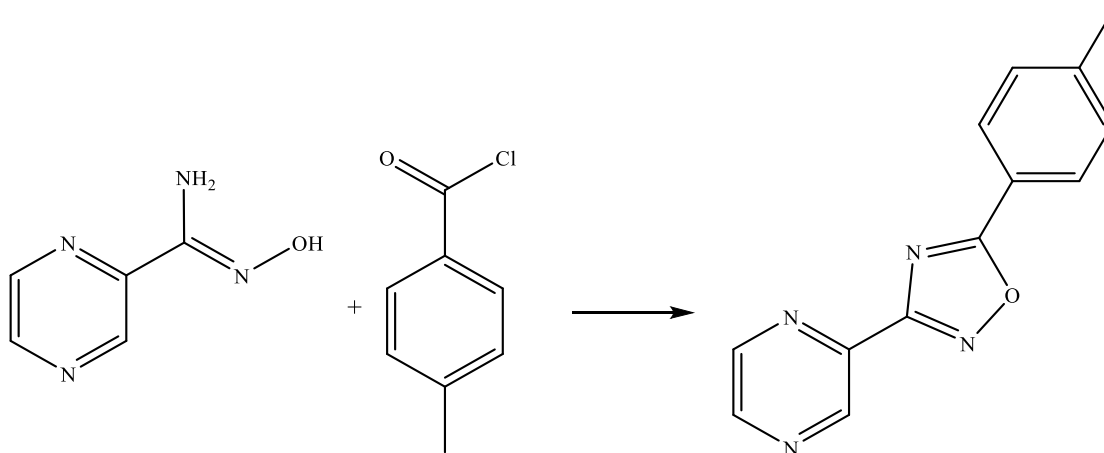
IČ spektrum: 3069 (CH arom.), 1534 (C=N), 1164 (C=N pyrazin), 1152 (C-O), 1020 (C=C pyrazin), 901 (N-O)

¹H NMR (DMSO) δ 9,47 (1H; δ; *J* = 1,5 Hz; H3); 9,14 (1H; t; *J*=2,2 Hz; H2'); 8,82 (1H; δ; *J* = 2,4 Hz; *J* = 1,5 Hz; H5); 8,79 (1H; δ; *J* = 2,4 Hz; H6); 8,61 (1H; δ; *J* = 8,1 Hz; *J* = 1,2 Hz; H4'); 8,51 (1H; δ; *J* = 8,1 Hz; *J* = 2,2 Hz; *J* = 1,2 Hz; H6'); 7,82 (1H; δ; *J* = 8,1 Hz; H5')

¹³C NMR (DMSO) δ 174,8; 167,4; 148,7; 146,8; 144,9; 144,5; 141,9; 133,7; 130,6; 127,5; 125,2; 123,4

3.1.4 Příprava 1,2,4-oxadiazolů z acylchloridů

3.1.4.1 Syntéza 3-(pyrazin-2-yl)-5-(4-tolyl)-1,2,4-oxadiazolu



METODA A:

N'-hydroxypyrazin-2-karboximidamid (0,69 g; 5 mmol) byl rozpuštěn pod argonovou atmosférou v 10 ml bezvodého pyridinu. Pak byl přidán 4-tolylchlorid (0,77 g, 5 mmol) a směs byla zahřívána pod zpětným chladičem 4 hodiny. Po ochlazení bylo odpařeno rozpouštědlo, ke zbytku byla přidána voda (20 ml) a pevný podíl byl překrytalizován za varu z bezvodého ethanolu. Vzhledem k tomu, že pomocí NMR byla zjištěna směs látek, byla reakce provedena za stejných podmínek s 3 ekvivalenty chloridu.

METODA B:

N'-hydroxypyrazin-2-karboximidamid (0,35 g; 2,5 mmol) byl rozpuštěn pod argonovou atmosférou v 10 ml bezvodého pyridinu. Pak byl přidán 4-tolylchlorid (1,14 g, 7,5 mmol) a směs byla zahřívána pod zpětným chladičem 4 hodiny. Po přidání chloridu začal unikat kouř a vypadla bílá sraženina, která se při 113 °C rozpustila. Na závěr vznikla černá lepivá látka. Po ochlazení byla směs připravena pro dělení flash chromatografií a následně byla majoritní frakce překrytalizována za varu z bezvodého ethanolu.

Elementární analýza:

	% C	% H	% N
Vypočteno	65,54	4,23	23,52
Nalezeno	65,68	4,18	23,40

METODA C:

N'-hydroxypyrazin-2-karboximidamid (0,34 g; 2,5 mmol) byl pod argonovou atmosférou rozpuštěn v 5ml xylenu. Pak byl přidán 4-tolylchlorid (1,14 g; 7,5 mmol) a směs byla zahřívána pod zpětným chladičem po dobu 3 hodin. Surový produkt měl po reakci černou barvu. Po ochlazení byla směs připravena pro dělení flash chromatografií. Majoritní podíl byl překrytalizován z cyklohexanu za varu. NMR analýza potvrdila, že se jedná 4-methylbenzoovou kyselinu. Proto jsme se rozhodli vyzkoušet reakci bez přidání rozpouštědel.

METODA D:

K *N'*-hydroxypyrazin-2-karboximidamidu (0,34 g; 2,5 mmol) byl pod argonovou atmosférou přidán 4-tolylchlorid (1,14 g; 7,5 mmol) a směs byla zahřívána pod zpětným chladičem po dobu 3 hodin. Surový produkt měl po reakci černou barvu. Po ochlazení byla směs připravena pro dělení na flash chromatografií. Majoritní podíl byl překrytalizován z bezvodého ethanolu za varu. NMR a elementární analýza potvrdily, že se jedná o čistou hledanou látku. Výtěžek byl vyšší než u postupů s přidáním rozpouštědlem, proto jsme došli k závěru, že reakce vychází nejlépe bez přidání rozpouštědel.

Elementární analýza

	% C	% H	% N
Vypočteno	65,54	4,23	23,52
Nalezeno	65,64	4,45	23,77

Sumární vzorec: C₁₃H₁₀N₄O

Molekulová hmotnost: 238,25

LogP: 2,62

ClogP: 2,02

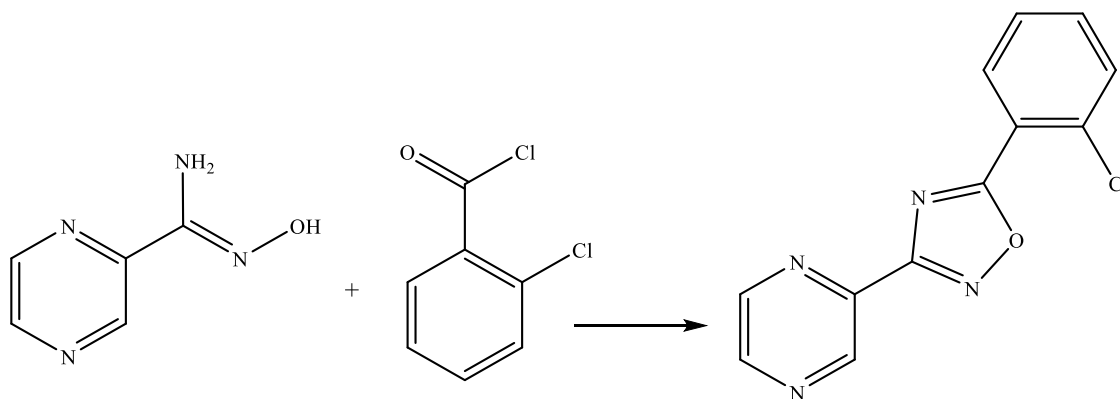
Metoda	Výtěžek	Teplota tání	Vzhled
A	směs	148,3 °C	Bílý prášek
B	0,24 g (20 %)	136,7–137,2 °C	Bílo-žlutý prášek
C	kyselina	150,4 °C	Bílý prášek
D	0,49 g (22 %)	136,7–137,9 °C	Bílo-žlutý prášek

IČ spektrum: (Metoda B): 3069 (CH alif.), 1612 (C=N), 1165 (C=N pyrazin), (C-O), 1048 (C=C pyrazin), 914 (N-O)

¹H NMR (DMSO) δ 9,33 (1H; bs; H3'); 8,91-8,87 (2H; m; H5'; H6'); 8,12-8,07 (2H; m; AA'; BB'; H2''; H6''); 7,50-7,45 (2H; m; AA'; BB'; H3''; H5''); 2,43 (3H; s; CH₃)

¹³C NMR (DMSO) δ 176,6; 167,1; 147,6; 145,7; 144,6; 144,4; 142,1; 130,7; 128,5; 120,8; 21,8

3.1.4.2 Syntéza 5-(2-chlorfenyl)-3-(pyrazin-2-yl)-1,2,4-oxadiazolu



K *N'*-hydroxypyrazin-2-karboximidamidu (0,34 g; 2,5 mmol) byl pod argonovou atmosférou přidán 2-chlorbenzoylchlorid (1,31 g, 7,5 mmol) a směs byla zahřívána pod

zpětným chladičem po dobu 3 hodin. Surový produkt měl po reakci černou barvu. Po ochlazení byla směs připravena pro dělení flash chromatografií. Majoritní podíl byl překrystalizován z bezvodého ethanolu za varu.

Sumární vzorec: C₁₂H₇ClN₄O

Molekulová hmotnost: 258,67

LogP: 2,69

ClogP:1,99

Vzhled: černá tuhá látka

Výtěžek reakce: surový: 0,540 g (84 %)

 přečištěný: 0,24 (37 %)

Teplota tání: 92,6–94,5 °C.

Elementární analýza:

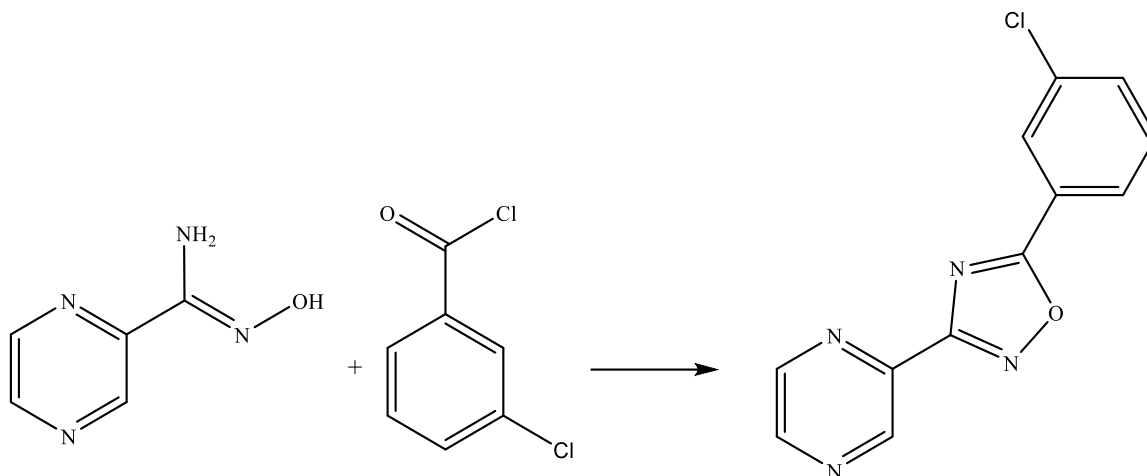
	% C	% H	% N
Vypočteno	55,72	2,73	21,66
Nalezeno	55,92	2,85	21,02

IC spektrum: 1596 (C=N), 1166 (C=N pyrazin), (C-O), 1041 (C=C pyrazin), 909 (N-O)

¹H NMR (500 MHz; DMSO) δ 9,33 (1H; s; H3); 8,92-8,87 (2H; m; H5; H6); 8,22-8,19 (1H; m; H6'); 7,78-7,74 (1H; m; H4'); 7,74-7,71 (1H; m; H3'); 7,65-7,60 (1H; m; H5')

¹³C NMR (125 MHz; DMSO) δ 174,8; 166,6; 147,4; 145,5; 144,1; 141,6; 134,7; 132,7; 132,5; 131,6; 128,2; 122,5

3.1.4.3 Syntéza 5-(3-chlorfenyl)-3-(pyrazin-2-yl)-1,2,4-oxadiazolu



N'-hydroxypyrazin-2-karboximidamid (0,34 g; 2,5 mmol) byl pod argonovou atmosférou rozpuštěn v 5ml bezvodého pyridinu. Pak byl pod argonovou atmosférou

přidán 3-chlorbenzoylchlorid (1,31 g; 7,5 mmol) a směs byla zahřívána pod zpětným chladičem po dobu 3 hodin. Surový produkt měl po reakci černou barvu. Po ochlazení byla směs připravena pro dělení sloupcovou chromatografií. Majoritní podíl byl překrytalizován z bezvodého ethanolu za varu.

Chromatografické podmínky:

stacionární fáze 30 g silikagelu Silpearl

mobilitní fáze: hexan+ethyl-acetát 6:4 (v/v)

velikost frakce: 25 ml

Molekulová hmotnost: 258,67

LogP: 2,69

ClogP: 2,23

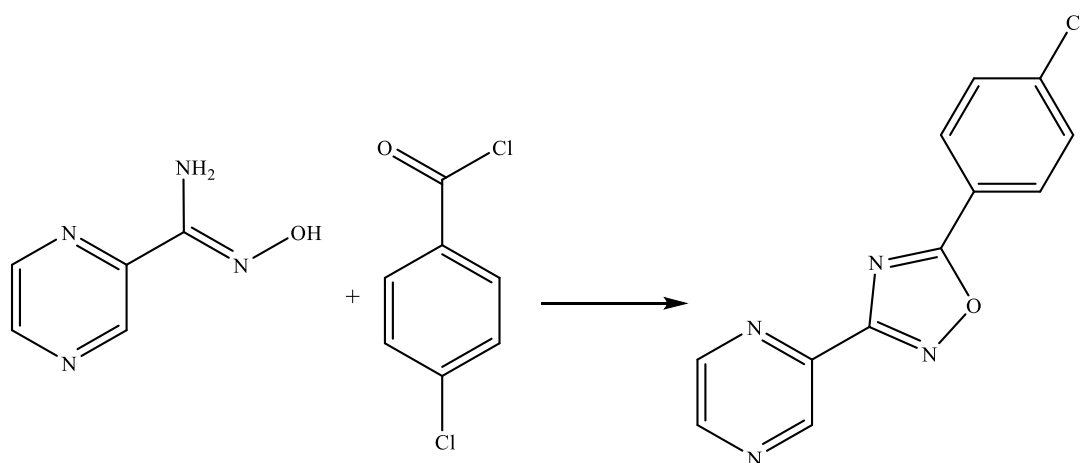
Vzhled: žlutá krystalická látka

Výtěžek reakce: 0,27 g (42 %)

Teplota tání: 111,9–112,7 °C

NMR analýzou bylo zjištěno, že se jedná o směs látek obsahující 3-chlorbenzoovou kyselinu.

3.1.4.4 Syntéza 5-(4-chlorfenyl)-3-(pyrazin-2-yl)-1,2,4-oxadiazolu



N'-hydroxypyrazin-2-karboximidamid (0,34 g; 2,5 mmol) byl rozpuštěn v 5ml xylenu. Pak byl přidán 4-chlorbenzoylchlorid (1,41 g, 7,5 mmol) a směs byla zahřívána pod zpětným chladičem po dobu 3 hodin. Surový produkt měl po reakci černou barvu. Po ochlazení byla směs připravena pro dělení flash chromatografií. Majoritní podíl byl překrytalizován z bezvodého ethanolu za varu.

Sumární vzorec: C₁₂H₇ClN₄O

Molekulová hmotnost: 258,67

LogP: 2,69

ClogP: 2,24

Vzhled: bledě růžová krystalická látka

Výtěžek reakce: přečištěný: 0,10 g (15 %)

Teplota tání: 192,8–194,9 °C (před krystalizací 158,2-158,7 °C)

Elementární analýza:

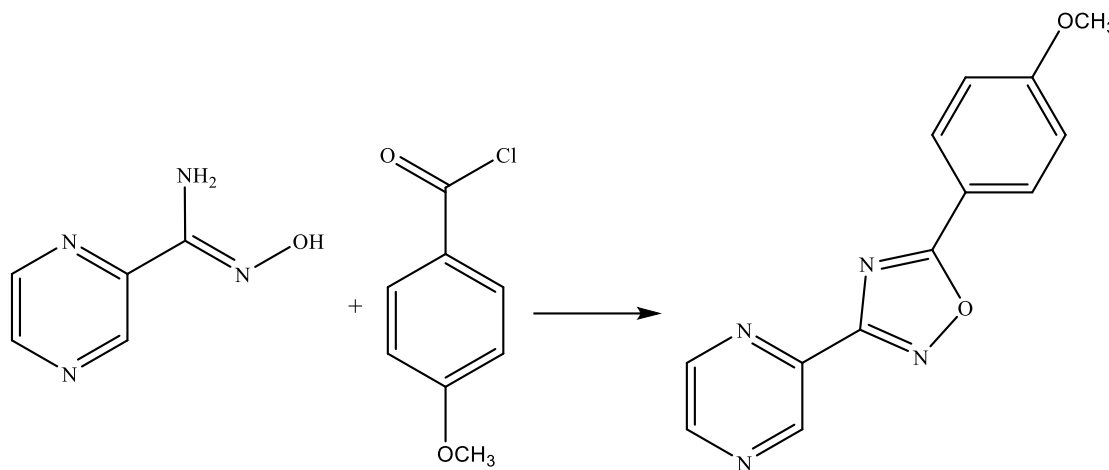
	% C	% H	% N
Vypočteno	56,05	2,73	21,66
Nalezeno	56,28	2,70	21,57

IČ spektrum: 3089 (CH alif.), 1609 (C=N), 1176 (C=N pyrazin), (C-O), 1049 (C=C pyrazin), 909 (N-O)

¹H NMR (DMSO) δ 9,34 (1H; d; J=1,5 Hz; H3); 8,91-8,88 (2H; m; H5; H6); 8,25-8,21 (2H; m; AA'; BB'; H2'; H6'); 7,78-7,74 (2H; m; AA'; BB'; H3'; H5')

¹³C NMR (DMSO) δ 175,4; 167,0; 147,4; 145,5; 144,1; 141,7; 138,7; 130,1; 130,0; 122,2

3.1.4.5 Syntéza 5-(4-methoxyfenyl)-3-(pyrazin-2-yl)-1,2,4-oxadiazolu



K *N'*-hydroxypyrazin-2-karboximidamidu (0,34 g; 2,5 mmol) bylo pod argonovou atmosférou přidáno 5 ml bezvodého pyridinu a následně byl přidán 4-methoxybenzoylchlorid (1,28 g; 7,5 mmol) a směs byla zahřívána pod zpětným chladičem po dobu 3 hodin. Po ochlazení byla směs připravena pro dělení flash chromatografií. Majoritní podíl byl překrystalizován z bezvodého ethanolu za varu.

Sumární vzorec: C₁₃H₁₀N₄O₂

Molekulová hmotnost: 254,25

LogP: 2

ClogP: 1,56

Vzhled: bílá krystalická látka

Výtěžek reakce: přečištěný: 0,40 g (63 %)

Teplota tání: 153,3–155,1 °C

Elementární analýza:

	% C	% H	% N
Vypočteno	61,41	3,96	22,04
Nalezeno	61,30	3,90	21,85

IČ spektrum: 2947, 2846 (CH alif.), 1615 (C=N), 1167 (C=N pyrazin), (C-O), 1049 (C=C pyrazin), 896 (N-O)

¹H NMR (DMSO) δ 9,29 (1H; s; H3); 8,89-8,84 (2H; m; H5; H6); 8,16-8,08 (2H; m; AA'; BB'; H2'; H6'); 7,21-7,14 (2H; m; AA'; BB'; H3'; H5'); 3,87 (3H; s; OCH3)

¹³C NMR (DMSO) δ 176,1; 166,7; 163,5; 147,2; 145,3; 144,0; 141,9; 130,2; 115,5; 115,2; 55,8

3.2 Biologická část

Testované sloučeniny:

- 3.1.2.1 *N*-benzyliden-*N*'-hydroxypyrazin-2-karboximidamid
- 3.1.3.2 5-(3-nitrofenyl)-3-(pyrazin-2-yl)-1,2,4-oxadiazol
- 3.1.4.1 3-(pyrazin-2-yl)-5-(4-tolyl)-1,2,4-oxadiazol
- 3.1.4.2 5-(2-chlorfenyl)-3-(pyrazin-2-yl)-1,2,4-oxadiazol
- 3.1.4.4 5-(4-chlorfenyl)-3-(pyrazin-2-yl)-1,2,4-oxadiazol
- 3.1.4.5 5-(4-methoxyfenyl)-3-(pyrazin-2-yl)-1,2,4-oxadiazol

3.2.1 Hodnocení antifungální aktivity

Stanovení aktivity sloučenin vůči kmenům plísní a hub bylo provedeno na Katedře biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty v Hradci Králové. Jednotlivé kmeny hub jsou popsány níže:

Candida albicans (CA1) ATCC 24433, CCM 8320

Candida krusei (CK) ATCC 6258, CCM 8271

Candida parapsilosis (CP) ATCC 22019, CCM 8260

Candida tropicalis (CT) ATCC 750, CCM 8264

Aspergillus fumigatus (AF) ATCC 204305

Aspergillus flavus (AFla) CCM 8363

Absidia corymbifera (AC) CCM 8077

Trichophyton interdigitale (TI) ATCC 9533, CCM 8377

Testování probíhalo pomocí mikrodiluční bujónové metody v destičkách (200 μ l média + 10 μ l suspenze inokula). Inkubace probíhala staticky, bez přístupu světla, v humidní atmosféře po dobu 24–48 hodin. Hustota výsledné inokulační suspenze měla hodnotu $0,5\text{--}2 \times 10^5$ CFU \times ml⁻¹. Testované sloučeniny byly rozpuštěny v DMSO (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo) a dvojkovým ředěním naředěny v tkáňovém kultivačním médiu RPMI 1640 s glutamanem a 2% glukosou, pH tohoto média bylo upraveno na hodnotu 7,0 pomocí 3-(*N*-morfolinyl)propansulfonové kyseliny. Konečná koncentrace DMSO v testovaném médiu nepřekročila 2,5 % (v/v). Hodnoty jednotlivých minimálních inhibičních koncentrací (MIC v μ mol \times l⁻¹) byly vyhodnoceny po 24 a 48 hodinách statické kultivace při teplotě 35°C. V případě *Trichophyton interdigitale* byly hodnoty MIC odečítány až po 72 a 120 h. K porovnání byl jako standard použit amfotericin B (Amf.B) a flukonazol. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1: Minimální inhibiční koncentrace testovaných látek

KMEN		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC ($\mu\text{mol}\times\text{l}^{-1}$)						
(kód)		3.1.2.1	3.1.3.2	3.1.4.1	3.1.4.2	3.1.4.5	Amf. B	Flukonazol
CA	24h	>500	>125	>500	500	125	0,06	128
	48h	>500	>125	>500	>500	125	0,25	128
CK	24h	>500	>125	>500	>500	125	0,25	128
	48h	>500	>125	>500	>500	125	1	128
CP	24h	>500	>125	>500	>500	125	0,06	16
	48h	>500	>125	>500	>500	>125	0,5	16
CT	24h	>500	>125	>500	>500	125	0,12	128
	48h	>500	>125	>500	>500	>125	0,5	128
AF	24h	>500	>125	>500	>500	>125	0,25	128
	48h	>500	>125	>500	>500	>125	1	128
AFla	24h	>500	>125	>500	500	>125	2	128
	48h	>500	>125	>500	>500	>125	4	128
AC	24h	>500	>125	>500	>500	>125	0,125	128
	48h	>500	>125	>500	>500	>125	1	128
TI	72h	>500	>125	>500	500	>125	0,5	32
	120h	>500	>125	>500	500	>125	1	32

3.2.2 Hodnocení antibakteriální aktivity

Inhibiční účinek připravených sloučenin na bakterie byl zkoušen na Katedře biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty v Hradci Králové. Použité kmeny zahrnovaly kmeny z České sbírky mikroorganismů (Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno): a klinické izoláty (Ústav klinické mikrobiologie, Fakultní nemocnice a Lékařská fakulta, Univerzita Karlova, Hradec Králové): Jednotlivé kmeny bakterií jsou popsány níže:

Staphylococcus aureus spp.aureus (**SA**) ATCC 29213, CCM 4223

Staphylococcus aureus spp.aureus (**MRSA**) ATCC 43300, CCM 4750

Staphylococcus epidermidis (**SE**) klinický izolát

Enterococcus faecalis (**EF**) ATCC 29212, CCM 4224

Escherichia coli (**EC**) ATCC 25922, CCM 3954

Klebsiella pneumoniae (**KP**) klinický izolát

Serratia marcescens (**SEMA**) klinický izolát

Pseudomonas aeruginosa (**PA**) ATCC 27853, CCM 3955

Všechny kmeny byly kultivovány na Müller-Hintonově agaru (MHA, Difco/Becton Dickinson, Detroit, MI, USA) při teplotě 35 °C a uchovávány ve stejném médiu při teplotě 4 °C. Testované bakterie byly suspendovány v 0,85 % roztoku NaCl.

Po úpravě vznikla suspenze hustoty ekvivalentní 0,5 McFarlandovy stupnice ($1,5 \times 10^8$ CFU \times ml $^{-1}$). Testované sloučeniny byly rozpuštěny v DMSO (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo). Testování probíhalo mikrodiluční bujónovou metodou v destičkách (200 μ l média + 10 μ l suspenze inokula). Antibakteriální aktivita sloučenin byla následně stanovena v Müller-Hintonově bujónu (Difco/Becton Dickinson, Detroit, MI) při pH 7,0.

Kontroly obsahovaly pouze médium a DMSO. Konečná koncentrace DMSO v testovacím médiu nepřekročila 2,5 % (v/v) a tím pádem neovlivňovala přirozený růst bakterií. Hodnoty MIC byly odečteny po 24 a 48 hodinách statické kultivace bez přístupu světla a v humidní atmosféře při teplotě 35 °C. Vyhodnocení probíhalo vizuálně. Jako referenční látka byl použit gentamicin (GEN.) a ciprofloxacin (CPX.). Výsledky jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2: Minimální inhibiční koncentrace testovaných látek

KMEN (kód)		TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC/IC ₉₅ (μ mol \times l $^{-1}$)						
		3.1.2.1	3.1.3.2	3.1.4.1	3.1.4.2	3.1.4.5	GEN.	CPX
SA	24h	>500	>125	>500	>500	>125	1	0,5
	48h	>500	>125	>500	>500	>125	1	0,5
MRSA	24h	>500	>125	>500	>500	>125	x	x
	48h	>500	>125	>500	>500	>125	x	x
SE	24h	>500	>125	>500	>500	>125	x	x
	48h	>500	>125	>500	>500	>125	x	x
EF	24h	>500	>125	>500	>500	>125	4	0,25
	48h	>500	>125	>500	>500	>125	8	0,25
EC	24h	>500	>125	>500	>500	>125	1	0,004
	48h	>500	>125	>500	>500	>125	1	0,004
KP	24h	>500	>125	>500	>500	>125	x	x
	48h	>500	>125	>500	>500	>125	x	x
SEMA	24h	>500	>125	>500	>500	>125	x	x
	48h	>500	>125	>500	>500	>125	x	x
PA	72h	>500	>125	>500	>500	>125	0,25	0,125
	120h	>500	>125	>500	>500	>125	0,25	0,125

x...netestováno

3.2.3 Hodnocení antituberkulotické aktivity

Antimykobakteriální test byl proveden s rychle rostoucím *Mycobacterium smegmatis* CCM 4622 (ATCC 607) z České sbírky mikroorganismů (Brno, Česká republika). Pro stanovení aktivity byla použita mikrodiluční bujónová destičková metoda. Jako kultivační médium byl zvolen bujón Middlebrook 7H9 (Sigma-Aldrich, Steinheim,

Německo) obohacený 0,4 % glycerolem (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo) a 10 % růstovým suplementem Middlebrook OADC (Himedia, Mumbai, Indie).

Mykobakteriální kmeny byly kultivovány na agaru Middlebrook 7H9 a suspenze byly připraveny v bujónu Middlebrook 7H9. Konečná hustota byla nastavena na hodnotu 0,5–1,0 McFarlandovy stupnice a naředěna v poměru 1:20 bujónem.

Testované sloučeniny byly rozpuštěny v DMSO (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo) a následně byl přidán Middlebrook bujón pro získání koncentrace 2000 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$. Standardy, které byly použity ke stanovení aktivity, byly isoniazid (INH), rifampicin (RIF) a ciprofloxacin (CPX) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo). Finální koncentrace byly 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625; 7,81 a 3,91 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ a byly dosaženy binárním ředěním a přidáním mykobakteriální suspenze. Finální koncentrace standardu ciprofloxacinu byly 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,0313; 0,0156; 0,0078 a pro rifampicin byly 12,5; 6,25; 3,125; 1,56; 0,78; 0,39; 0,195 a 0,098 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$. Finální koncentrace DMSO nepřekročila 2,5 % (v/v) a neovlivňovala růst *M. smegmatis*. Test zahrnoval také pozitivní (bujón, DMSO, bakterie) a negativní (bujón, DMSO) kontroly.

Destičky byly zakryty polyesterovou adhezivní folií a inkubovány ve tmě při 37°C. Po 48 hodinách byl přidán 0,01 % roztok sodné soli resazurinu. Toto barvivo bylo připraveno rozpuštěním sodné soli resazurinu (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo) v deionizované vodě tak, aby byla dosažena koncentrace roztoku 0,02 %. Potom byl připraven 10 % vodný roztok Tweenu 80 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo). Oba roztoky byly smíchány ve stejném objemovém poměru a zfiltrány přes membránový filtr. Mikrotitrační destičky byly inkubovány další 2,5 hodiny pro určení inhibiční aktivity vůči *M. smegmatis* (MS), pro *M. aurum* (MA) 4 hodiny.

Antimykobakteriální aktivita byla vyjádřena jako minimální inhibiční koncentrace (MIC) a hodnoty byly odečteny na základě barevné změny barviva (modrá barva - aktivní sloučenina; růžová barva - neaktivní sloučenina). Hodnoty MIC standardů byly v rozmezí 7,81–15,625 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ pro isoniazid (INH), 12,5–25 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ pro rifampicin (RIF) a 0,0625–0,125 $\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$ pro ciprofloxacin (CPX). Všechna stanovení byla provedena dvakrát. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3: Minimální inhibiční koncentrace testovaných látek

KMEN	TESTOVANÁ LÁTKA (kód) –MIC ($\mu\text{g}\times\text{ml}^{-1}$)							
	3.1.2.1	3.1.3.2	3.1.4.1	3.1.4.2	3.1.4.5	INH	RFM	CPX
MS	≥ 500	≥ 250	≥ 500	62,5	≥ 250	15,625	25	0,03125-0,125
MA	≥ 500	≥ 250	≥ 500	125	≥ 250	3,91	0.78-1,56	0,00781

4. Diskuze

Moje diplomová práce navázala na diplomové práce *Katirtzi* [13] a *Dzámové* [6] které se zabývaly syntézou 5-methyl-3-pyrazin-2-yl-1,2,4-oxadiazolů. Jejich syntéza probíhala reakcí substituovaných pyrazin-2-karboximidamidů s anhydridy. V rámci své diplomové práce jsem se zaměřila na syntézu 1,2,4-oxadiazolů amidoximovou cestu s jinými kyslíkatými deriváty. Jako výchozí látka byl použit komerčně dostupný pyrazin-2-karbonitril, který jsem dříve připravila jako meziprodukt. Byl připraven podle *Opletalové et al.* radikálovou alkyací pyrazinkarbonitrilu [73]. Výtěžek reakce zhruba odpovídal dříve provedeným syntézám tohoto derivátu. Dále byl použit (Z)-N'-hydroxypyrazin-2-karboximidamid připravený v laboratoři.

Alkylovaný pyrazin-2-karbonitril byl syntetizován jako meziprodukt pro potřeby syntéz jiných studentů v laboratoři. Byl získán radikálovou alkyací ve výtěžku a byl charakterizován pomocí TLC s dříve připravenou látkou [13].

První syntetizovanou sloučeninou měl být 5-fenyl-3-(pyrazin-2-yl)-1,2,4-oxadiazol. Mikrovlnná syntéza za použití aromatických aldehydů je popsána v literatuře buď z aromatických nitrilů dvoustupňovou syntézou přes amidoxim [17] a nebo jednostupňovou syntézou přímo z amidoximů [37]. V případě syntézy v podkapitole **3.1.2.3** jsme dokonce pracovaly s totožnými výchozími látkami. Zkoušely jsme reakce jedno- i dvoustupňové (**3.1.2**), avšak v žádném případě jsme nezískaly požadovaný 1,2,4-oxadiazol. Příčinou mohlo být jiné nastavením mikrovlnného reaktoru. Náš přístroj umožňoval maximální nastavení výkonu na 300 W, ale přesto se jedná o výkonný stroj s fokusovaným polem, což nebyl případ reaktorů použitých v referencích. Jelikož byl výkon poloviční, než uváděly reference, prodloužili jsme reakční čas. Další příčinou mohlo být sterické bránění substituentů v *orto*- polohách substituovaných benzaldehydů, avšak to nepřipadalo v úvahu u benzaldehydu a vanilinu (**3.1.2.3**). Zajímavé je, že při reakci pyrazin-2-karbonitrilu s benzaldehydem v mikrovlnném reaktoru jsme obdržely látku charakteru Schiffovy baze ve výtěžku 20 %. Tuto reakci jsme zopakovaly klasickou syntézou v baňce za laboratorní teploty podle *Srivastavy* [38], který z uvedených látek získal 1,2,4-oxadiazol, avšak v našem případě byla vyizolována opět Schiffova baza v reakčním výtěžku 41 %. V obou případech byl produkt čištěn chromatograficky s následnou rekrystalizací.

Obdobný postup je uveden v práci *Lessela* [58] jenž takto syntetizoval substituované 4,5-dihydro-1,2,4-oxadiazoly. Vznik Schiffovy baze může být vysvětlen

jedním z reakčních mechanismů popsaných v uvedených referencích [38]. Na základě NMR experimentů bylo zjištěno, že se jedná o (Z)-N-((E)-benzyliden)-N'-hydroxypyrazin-2-karboximidamid. V případě reakcí s jinými aldehydy byly stopy Schiffovy baze přítomné v reakčních směsích, ale už se nám nepodařilo připravit a izolovat čistou Schiffovu bazi.

Z důvodu dobré dostupnosti kyselin na katedře jsme se rozhodly využít pro syntézu alifatickou a aromatickou kyselinu aktivovanou CDI (**3.1.3**) postupem popsaným v článku *Deegana* [18]. V případě reakce pyrazin-2-karboximidamidu s propionovou kyselinou byla získána polotuhá látka, v jejímž NMR spektru byly velmi slabé signály pyrazinových vodíků, proto jsme se čištěním směsi dále nezabývaly. Reakcí pyrazin-2-karboximidamidu s 3-nitrobenzoovou kyselinou byl získán produkt ve výtěžku 34 %.

Výše uvedená fakta nás donutila sáhnout po reaktivnějších acylujících činidlech a to po acylchloridech. V případě reakce pyrazin-2-karboximidamidu s tolylchloridem podle *Pancechowské-Ksepko* [27] v bezvodém pyridinu pod argonovou atmosférou byla ovšem získána 4-methylbenzoová kyselina. Při zvýšení množství výchozího chloridu na 3 molární ekvivalenty jsme získaly produkt. Povedlo se to také v případě syntézy pod ochrannou atmosférou bez rozpouštědla s podobným reakčním výtěžkem okolo 20 %. Reakce v xylenu poskytla také jenom kyselinu.

Podle úspěchů těchto čtyř metod, byly průběžně prováděny reakce s dalšími chloridy a to v bezvodém pyridinu (aplikace metody B) s 3-chlorbenzoylchloridem a 4-methoxybenzoylchloridem, v xylenu [40] s 4-chlorbenzoylchloridem a bez rozpouštědla s 2-chlorbenzoylchloridem. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 4. Podmínky jednotlivých metod jsou popsány v kapitole **3.1.4.1**.

Tabulka 4: Porovnání výsledků

Chlorid	Metoda	Výtěžek
3.1.4.1	A	Směs látek
3.1.4.1	B	20 %
3.1.4.1	C	Kyselina
3.1.4.1	D	22 %
3.1.4.2	D	84 %
3.1.4.3	B	42 %
3.1.4.4	C	15 %
3.1.4.5	B	13 %

Struktury byly potvrzeny IČ, ^1H a ^{13}C NMR spektry a čistota potvrzena elementární analýzou. Všechny získané produkty byly testovány na katedře Biologických a lékařských věd na biologickou aktivitu, konkrétně aktivitu antibakteriální a antimykotickou. Na Katedře farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy bylo provedeno testování inhibice *Mycobacterium smegmatis* a *M. aurum*. Jeden derivát byl středně účinný vůči kmenům plísní a hub. Jednalo se o 5-(4-methoxyfenyl)-3-(pyrazin-2-yl)-1,2,4-oxadiazol a jeden derivát byl středně účinný vůči *Mycobacterium smegmatis* a *M. aurum*. Tímto derivátem byl (2-chlorfenyl)-3-(pyrazin-2-yl)-1,2,4-oxadiazol.

Výsledky biologické aktivity jednoho derivátu nebyly při odevzdání diplomové práce k dispozici. Jednalo se o 5-(4-chlorfenyl)-3-(pyrazin-2-yl)-1,2,4-oxadiazol.

5. Závěr

Ve své diplomové práci jsem připravila šest nových oxadiazolových derivátů, tyto deriváty nebyly dosud nikde v literatuře popsány:

- **3.1.2.1** *N*-benzyliden-*N'*-hydroxypyrazin-2-karboximidamid
- **3.1.3.2** 5-(3-nitrofenyl)-3-(pyrazin-2-yl)-1,2,4-oxadiazol
- **3.1.4.1** 3-(pyrazin-2-yl)-5-(4-tolyl)-1,2,4-oxadiazol
- **3.1.4.2** 5-(2-chlorfenyl)-3-(pyrazin-2-yl)-1,2,4-oxadiazol
- **3.1.4.4** 5-(4-chlorfenyl)-3-(pyrazin-2-yl)-1,2,4-oxadiazol
- **3.1.4.5** 5-(4-methoxyfenyl)-3-(pyrazin-2-yl)-1,2,4-oxadiazol

Vyzkoušela jsem nejrůznější způsoby příprav a různé podmínky reakcí. Některé reakce probíhající se substituovanými fenylykarboimidamidy nejsou aplikovatelné na pyrazinové deriváty. Nejvíce produktů bylo získáno reakcí amidoximů s acylchloridy. Nejvhodnější prostředí pro reakce bylo prostředí argonové atmosféry bez rozpouštědla.

Všechny výsledné látky byly testovány jako potenciální antifungální a antibakteriální sloučeniny. Jedna látka vykazovala antifungální aktivitu a jedna antituberkulotickou aktivitu. Látky budou ještě dále testovány na *M. tuberculosis*, *M. kansasii* a *M. avium*.

Výsledky této práce byly součástí výsledků prezentovaných na konferenci [74] a pracovním setkání skupiny Mutalig COST Action [75].

6. Literatura

1. Du, W. *et al.* A one-pot synthesis of 3-substituted-5-carbonylmethyl-1,2,4-oxadiazoles from β -keto esters and amidoximes under solvent-free conditions. *Tetrahedron Lett.*, **2007**, *48*, 2231–2235.
2. Kumar, D. *et al.* Synthesis and anticancer activities of novel 3,5-disubstituted-1,2,4-oxadiazoles. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2009**, *19*: 2739–2741.
3. Ding, D. *et al.* Exploration of the structure-activity relationship of 1,2,4-oxadiazole antibiotics. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2015**, *25*, 4854–4857.
4. Liu, Q. *et al.* Structure-based bioisosterism design, synthesis, insecticidal activity and structure–activity relationship (SAR) of anthranilic diamide analogues containing 1,2,4-oxadiazole rings. *Pest Manage. Sci.*, **2017**, *73*, 917–924.
5. Janardhanan, J. *et al.* The oxadiazole antibacterials. *Curr. Opin. Microbiol.*, **2016**, *33*, 13–17.
6. Džámová, P.; Oxadiazoly jako potenciální léčiva I. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové, 2016, dostupná online
https://is.cuni.cz/webapps/UKSESSIONFF43DC39AA858F0E4AEA3AE99ECF225A/zp/detail/156309/28207760/?q=%7B%22_searchform_search%22%3A%22dz%5Cu00e1mov%5Cu00e1%22%2C%22_searchform_butsearch%22%3A%22Vyhledat%22%2C%22PNzpzSearchListbasic%22%3A1%7D&back_id=6
7. Pace, A.; Pierro, P. The new era of 1,2,4-oxadiazoles. *Org. Biomol. Chem.*, **2009**, *7*, 4337–4348.
8. Vaidya A. *et al.* Synthesis and Biological Activities of Oxadiazole Derivatives: A Review. *Mini-Rev. Med. Chem.*, **2016**, *16*, 825–845.
9. Hemming, K.; 1,2,4-Oxadiazoles. *Elsevier Ltd.*, **2008**, 243–314.
10. Bora, R. O. *et al.* [1,2,4]-oxadiazoles: Synthesis and Biological Applications. *Mini-Rev. Med. Chem.*, **2014**, *14*, 355–369.

11. Piccionello, A. P. *et al.* Rearrangements of 1,2,4-Oxadiazole: ‘One Ring to Rule Them All’. *Chem. Heterocycl. Compd.*, **2017**, *53*, 936–947.
12. Opletalová, V.; Deriváty acetylpyrazinů jako potenciální léčiva, Habilitační práce, Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, **2006**.
13. Katirtzi, A.; Amidoximes as intermediates for the synthesis of potential drugs. Diplomová práce, Univerzita Kralova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové, 2015, dostupná online
https://is.cuni.cz/webapps/UKSESSIONFBFCABD58F669D5A586A423C1018C814/zzp/detail/140729/18047721/?q=%7B%22_searchform_search%22%3A%22katirtzi%22%2C%22_searchform_butsearch%22%3A%22Vyhledat%22%2C%22PNzpzSearchListbasic%22%3A1%7D&back_id=7
14. Horká, M.; Amidoximy jako syntetické intermediáty a potenciální léčiva I. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové, 2011, dostupná online
https://is.cuni.cz/webapps/zzp/detail/81096/14131260/?q=%7B%22_searchform_search%22%3A%22horka%5Cu00e1%22%2C%22_searchform_butsearch%22%3A%22Vyhledat%22%2C%22_facetform_facets_workType%22%3A%5B%22DP%22%5D%2C%22_facetform_facets_faculty%22%3A%5B%2211160%22%5D%2C%22PNzpzSearchListbasic%22%3A1%7D&lang=cs
15. Wang, W. *et al.* Base-mediated one-pot synthesis of 1,2,4-oxadiazoles from nitriles, aldehydes and hydroxylamine hydrochloride without addition of extra oxidant. *Org. Biomol. Chem.*, **2016**, *14*, 9814–9822.
16. Ningaiah, S. *et al.* Novel pyrazoline amidoxime and their 1,2,4-oxadiazole analogues: Synthesis and pharmacological screening. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2013**, *23*, 4532–4539.
17. Adib, M.; *et al.* Microwave-assisted efficient, one-pot, three-component synthesis of 3,5-disubstituted 1,2,4-oxadiazoles under solvent-free conditions. *Tetrahedron Lett.*, **2006**; *47*: 2965–2967.
18. Deegan, T. L. *et al.*: Parallel synthesis of 1,2,4-oxadiazoles using CDI activation. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1999**, *9*, 209–212.

19. Augustine, J. K.; *et al.* Propylphosphonic anhydride (T3P®): an efficient reagent for the one-pot synthesis of 1,2,4-oxadiazoles, 1,3,4-oxadiazoles, and 1,3,4-thiadiazoles. *Tetrahedron*, **2009**, *65*, 9989–9996.
20. Bogdan, A. R.; Wang, Y. A high-throughput synthesis of 1,2,4-oxadiazole and 1,2,4-triazole libraries in a continuous flow reactor. *RSC Adv.*, **2015**, *5*, 79264–79269.
21. Duchet, L. *et al.* Synthesis of 3,5-disubstituted 1,2,4-oxadiazoles using ionic liquid-phase organic synthesis (IoLiPOS) methodology. *Tetrahedron*, **2010**, *66*, 986–994.
22. Katritzky, A. R.; Shestopalov, A. A. A convenient synthesis of chiral 1,2,4-oxadiazoles from N-protected (α -aminoacyl) benzotriazoles. *ARKIVOC*, **2005**, *7*, 36–55.
23. Chiou, S.; Shine, H. J. A Simplified procedure for preparing 3,5-disubstitued-1,2,4-oxadiazoles by reaction of amidoximes with acyl chlorides in pyridine solution. *J. Heterocycl. Chem.*, **1989**, *26*, 126–128.
24. Kaboudin, B.; Saadati, F. Novel method for the synthesis of 1,2,4-oxadiazoles using alumina supported ammonium fluoride under solvent-free condition. *J. Heterocycl. Chem.*, **2005**, *42*, 699–701.
25. Kaboudin, B.; Navaee, K. One-pot synthesis of 1,2,4-oxadiazoles mediated by microwave irradiation under solvent-free condition. *Heterocycles*, **2003**, *60*, 2287–2292.
26. Zakeri, M.; *et al.* A new one-pot synthesis of 1,2,4-oxadiazoles from aryl nitriles, hydroxylamine and crotonoyl chloride. *J. Chem. Sci.*, **2013**, *125*, 731–735.
27. Pancechowska-Ksepko, D.; *et al.* Badania nad pochodnymi pirazyny. *Acta Pol. Pharm.*, **1986**, *3*, 211–217.
28. Rostamizadeh, S.; *et al.* Clean one-pot synthesis of 1,2,4-oxadiazoles under solvent-free conditions using microwave irradiation and potassium fluoride as catalyst and solid support. *Tetrahedron*, **2010**, *66*, 494–497.
29. Gobis, K. *et al.* Synthesis and antibacterial activity of novel pyridine and pyrazine derivatives obtained from amidoximes. *J. Heterocycl. Chem.*, **2009**, *46*, 1271–1279.
30. Sangepu, B. *et al.* Synthesis of Isoxazole, 1,2,4-oxadiazole and (1H-Pyrazol-4-yl)-methanone oxime derivatives from N-Hydroxy-1H-pyrazole-4-carbonyl chloride and their biological activity. *J. Heterocycl. Chem.*, **2016**, *53*, 754–761.

31. Tamura, M. *et al.* Facile synthesis of 3-carbamoyl-1,2,4-oxadiazoles. *Synthesis-Stuttgart*, **2006**, 3453–3461.
32. Piccionello, A. P. *et al.* Synthesis and preliminary antibacterial evaluation of linezolid-like 1,2,4-oxadiazole derivatives. *Eur. J. Med. Chem.*, **2012**, *50*, 441–448.
33. Baykov, S. *et al.* The first one-pot ambient-temperature synthesis of 1,2,4-oxadiazoles from amidoximes and carboxylic acid esters. *Tetrahedron*, **2017**, *73*, 945–951.
34. Liang, G. B.; Qian, X. Oxadiazole synthesis on solid supports. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1999**, *9*, 2101–2104.
35. Kmetič, M.; Stanovnik, B. Nitrosation of methyl-2-cinnamoylamino-3-dimethylaminopropenoates. Alkyl *N*-cinnamoyloxalic acid hydroxyimidic amides, intermediates in the synthesis of alkyl-styryl-1,2,4-oxadiazole-3 carboxylates. *J. Heterocycl. Chem.*, **1997**, *34*, 1705–1708.
36. De Freitas, J. J. R. *et al.* Microwave-induced one-pot synthesis of 4-[3-(aryl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl]-butan-2-ones under solvent free conditions. *Tetrahedron Lett.*, **2007**, *48*, 6195–6198.
37. Sondhi, S. M.; Kumar, S. Synthesis anti-inflammatory and anticancer activity evaluation of some pyrazole and oxadiazole derivatives. *Med. Chem. Res.*, **2012**, *21*, 3042–3052.
38. Srivastava, R. M. *et al.* Synthesis, spectroscopic studies and the mechanism of formation of 4,5-dihydro-1,2,4-oxadiazoles. *J. Heterocycl. Chem.*, **1987**, *24*, 101–105.
39. Ubaradka, S. R. *et al.* A. Synthesis, characterization and their anticonvulsant, anti-inflammatory studies of some novel chromeno oxadiazoles. *Med. Chem. Res.*, **2013**, *22*, 1497–1503.
40. Fanshawe, W. J.; Safir, S. R. (Wyeth Holdings Corp) Cyclopropyl-1,2,4-oxadiazolyldiazines. US Patent 3935211A, *Chem. Abstr.*, **1976**, *84*, 135719
41. Clarke, K.; The synthesis of 1,2,4-oxadiazoles. *J. Chem. Soc.*, **1954**, 4251–4253.
42. Boys, M. L. *et al.* Convergent, parallel synthesis of a series of beta-substituted 1,2,4-oxadiazole butanoic acids as potent and selective alpha(v)beta3 receptor antagonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2006**, *16*, 839–844.

43. Leite, A. C. L. *et al.* Synthesis, anti-inflammatory and antimicrobial activities of new 1,2,4-oxadiazoles peptidomimetics. *Elsevier Ltd.*, **2000**, *55*: 719–724.
44. Nikodemiak, P.; Koert, U. Metal-Catalyzed Synthesis of Functionalized 1,2,4-Oxadiazoles from Silyl Nitronates and Nitriles. *Adv. Synth. Catal.*, **2017**, *359*, 1708–1716.
45. Vale, J. A. *et al.* Lanthanide nitrates as Lewis acids in the one-pot synthesis of 1,2,4-oxadiazole derivatives. *J. Braz. Chem. Soc.*, **2012**, *23*, 1437–1440.
46. Ispikoudi, M. *et al.* Convenient synthesis and biological profile of 5-amino-substituted 1,2,4-oxadiazole derivatives. *Eur. J. Med. Chem.*, **2010**, *45*, 5635–5645.
47. Telvekar, V. N.; Takale, B. S. Reaction of oximes of-diketones with diphosphorous tetraiodide for preparation of oxadiazoles and nitriles. *Synth. Commun.*, **2013**, *43*, 221–227.
48. Baykov, S. *et al.* A convenient and mild method for 1,2,4-oxadiazole preparation: Cyclodehydration of O-acylamidoximes in the superbase system MOH/DMSO. *Tetrahedron Lett.*, **2016**, *57*, 2898–2900.
49. Giurg, M.; Mlochowski, J. Ceric ammonium nitrate oxidation of aldoximes in aliphatic nitriles as solvents: a new way for synthesis of 1,2,4-oxadiazoles. *Pol. J. Chem.*, **1997**, *71*, 1093–1101.
50. Otaka, H.; *et al.* Construction of 3,5-substituted 1,2,4-oxadiazole rings triggered by tetrabutylammonium hydroxide: A highly efficient and fluoride-free ring closure reaction of O-acylamidoximes. *Tetrahedron Lett.*, **2014**, *55*, 979–981.
51. Kayukova, L. A. *et al.* Cyclization of O-benzoyl- β -piperidinopropionamidoximes to form 5-phenyl-3- β -piperidinopropionamidoximes. *Russ. Chem. Bull.*, **2002**, *51*, 2100–2105.
52. Anbazhagan, M. *et al.* Palladium-catalyzed N-arylation of O-methylamidoximes. *Tetrahedron Lett.*, **2002**, *43*, 4221–4224.
53. Földesi, T. *et al.* Study on the cycloaddition reactions of pyrrolotriazepine derivatives with nitrile oxides. Synthesis of new fused tricyclic ring systems. *Tetrahedron*, **2017**, *73*, 1711–1717.

- 54 De Sarro G. *et al.* 5H-[1,2,4]Oxadiazolo[5,4-d] [1,5]benzothiazepines as anticonvulsant agents in DBA/2 mice, *Eur. J. Med. Chem.*, **1995**, *30*, 925–929.
55. Nabih, K. *et al.* Highly regio- and diastereoselective 1,3-dipolar cycloaddition of nitrile oxides to 2,4-dimethyl-3H-1,5-benzodiazepines: Synthesis of bis[1,2,4-oxadiazolo][1,5] benzodiazepine derivatives. *Synth. Commun.*, **2004**, *34*, 3565–3572.
56. Boudina, A. *et al.* Synthesis of new tetraheterocyclic systems by the mixed condensation reactions on [1,2,4]triazolo[4,3-a][1,5]benzodiazepines. *Synth. Commun.*, **2006**, *36*, 573–579.
57. Hemming, K. *et al.* A clean and efficient synthesis of 5-(2'-fluoro-2',3'-dimethylbutan-3'-yl) substituted 1,2,4-oxadiazoles using silver tetrafluoroborate as a fluorodesulfurization reagent. *J. Fluorine Chem.*, **2000**, *106*, 83–86.
- 58 Lessel, J. Δ^2 -1,2,4-Oxadiazoline durch Kondensation von Amidoximen mit Ketonen und Aldehyden. *Arch. Pharm.*, **1993**; *329*; 383–389.
59. Liu, Q. *et al.* Structure-based bioisosterism design, synthesis, insecticidal activity and structure–activity relationship (SAR) of anthranilic diamide analogues containing 1,2,4-oxadiazole rings. *Pest Manage. Sci.*, **2017**, *73*, 917–924.
60. Lade, J. J. *et al.* Oxidative cyclization of amidoximes and thiohydroxamic acids: A facile and efficient strategy for accessing 3,5-disubstituted 1,2,4-oxadiazoles and 1,4,2-oxathiazoles. *Tetrahedron Lett.*, **2017**, *58*, 2103–2108.
61. Zora, M. *et al.* A novel one-pot synthesis of ferrocenyl-substituted 1,2,4-oxadiazoles. *J. Organomet. Chem.*, **2014**, *759*, 67–73.
62. Jakopin, Ž. *et al.* Synthesis of 3,5-disubstituted 1,2,4-oxadiazoles as peptidomimetic building blocks. *Tetrahedron Lett.*, **2007**, *48*, 1465–1468.
63. Suresh, D. *et al.* Microwave promoted one-pot synthesis of 2-aryl substituted 1,3,4-oxadiazoles and 1,2,4-oxadiazole derivatives using Al^{3+} -K10 clay as a heterogeneous catalyst. *Tetrahedron Lett.*, **2014**, *55*, 3678–82.
64. Watjen, F. *et al.* Novel benzodiazepine receptor partial agonists: oxadiazolyimidazobenzodiazepines. *J. Med. Chem.*, **1989**, *32*, 2282–2291.

65. Shanker, G.; Tschierske, C. Synthesis of non-symmetrically substituted 1,2,4-oxadiazole derived liquid crystals. *Tetrahedron*, **2011**, *67*, 8635–8638.
66. Ovdichuk, O. V. *et al.* Synthesis and conformational study of novel pyrazine-based pseudopeptides bearing amidoxime, amidoxime ester and 1,2,4-oxadiazole units. *Tetrahedron*, **2016**, *72*, 3427–3435.
67. Nakka, M. *et al.* Synthesis of 1,2,4-Triazoles, *N*-Fused 1,2,4-Triazoles and 1,2,4-Oxadiazoles via Molybdenum Hexacarbonyl-Mediated Carbonylation of Aryl Iodides. *Adv. Synth. Catal.*, **2016**, *358*, 520–525.
68. Krolenko, K. Y. *et al.* Synthesis and antimicrobial activity of 5-(1H-1,2,3-triazol-4-yl)-1,2,4-oxadiazole derivatives. *Chem. Heterocycl. Compd.*, **2016**, *52*, 823–830.
69. Young, J. R.; DeVita, R. J. Novel synthesis of Oxadiazoles via palladium catalysis. *Tetrahedron Lett.*, **1998**, *39*, 3931–3934.
70. Andersen, T. L. *et al.* 1,2,4- and 1,3,4-Oxadiazole Synthesis By Palladium-Catalyzed Carbonylative Assembly of Aryl Bromides With Amidoximes or Hydrazides. *Adv. Synth. Catal.*, **2014**, *356*, 3074–3082.
71. Kayukova L.A. Drug synthesis Methods and manufacturing Technology. *Pharm. Chem. J.*, **2005**, *39*, 539–547.
72. Grant D. *et al.* Rapid multistep synthesis of 1,2,4-oxadiazoles in a single continuous microreactor sequence., *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 7219–7223.
73. Opletalová V. *et al.* 5-Alkyl-2-pyrazinecarboxamides, 5-alkyl-2-pyrazinecarboxamides and 5-alkyl-2-acetylpyrazines as synthetic intermediates for antiinflammatory agents. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1996**, *61*, 1093–1101.
74. Kučerová-Chlupáčová, M *et al.* Antimicrobial Potential of 1,2,4-Oxadiazoles and Their Synthesis. 10th Joint Meeting on Medicinal Chemistry, Dubrovnik (Srebreno), Croatia, June 25–28, 2017
75. Kučerová-Chlupáčová, M *et al.* Synthesis of 1,2,4-oxadiazoles and amidoxime related derivatives as potential antimicrobial agents. Second WG Meeting Mutalig Costa Action, Instituto Universitario de Bio-Organica “Antonio Gonzalez” (IUBO-AG). Universidad de La Laguna, Tenerife (Spain), March 15–16, 2018