

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra anorganické a organické chemie

Jitka Musilová

**Syntéza hydroxyderivátů 3-fenyl-2*H*-1,3-benzoxazin-
2,4(3*H*)-dionu**

Diplomová práce

Vedoucí práce: Doc. PharmDr. Miloš Macháček, CSc.

Ráda bych poděkovala PharmDr. Lence Kubicové, CSc., za uvedení do problematiky a Doc. PharmDr. Miloši Macháčkovi, CSc., za pomoc při vypracování diplomové práce.

Děkuji paní Kateřině Kolovratníkové za stanovení teplot tání, paní Ivě Vencovské za měření infračervených spekter, Doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc., za měření NMR spekter a Ing. Pavlu Skálovi za jejich interpretaci.

Antimykobakteriální aktivitu testovala MUDr. Jarmila Kaustová ve Zdravotním ústavu v Ostravě, a antifungální aktivitu paní Ida Dufková a Mgr. Marcela Vejsová z Katedry biologických a lékařských věd, jimž také děkuji.

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

V Hradci Králové 1. května 2008

.....

ABSTRAKT

Syntéza hydroxyderivátů 3-fenyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionu

Jitka Musilová

Tato diplomová práce se zabývá přípravou 16 cyklických analogů hydroxysalicylanilidů, t.j. 3-fenyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionů monosubstituovaných na heterocyklickém jádře hydroxylovou skupinou.

Čtyři série výchozích hydroxysalicylanilidů byly syntetizovány reakcí odpovídajících hydroxysalicylových kyselin s anilinem (nesubstituovaným nebo substituovaným v poloze 4 chlorem, methylovou nebo methoxylovou skupinou) za přítomnosti chloridu fosforitého v mikrovlnném reaktoru. Žádané 1,3-benzoxazinové deriváty z nich byly připraveny působením ethyl-chlorformiátu ve výtěžku 77 - 94 %. Všechny připravené látky byly charakterizovány infračervenými a NMR spektry a elementární analýzou.

Při hodnocení antifungální aktivity *in vitro* vůči *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *Trichosporon asahii*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Aspergillus fumigates* a *Absidia corymbifera* nebyla žádná z látek účinnější než ketokonazol. Výchozí hydroxysalicylanilidy byly vesměs aktivnější než jejich cyklické analogy.

ABSTRACT

Synthesis of hydroxy derivatives of 3-phenyl-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-dione

Jitka Musilová

The thesis is concerned with the preparation of 16 cyclic analogues of hydroxysalicylanilides, i.e. 3-phenyl-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-diones monosubstituted with a hydroxyl group on the heterocyclic ring.

The starting hydroxysalicylanilides belonging to four series were synthesized by the microwave-assisted reaction of the respective hydroxysalicylic acid with aniline (unsubstituted or *para*-substituted by chlorine, methyl or methoxy groups) in the presence of phosphorus trichloride. Their treatment with ethyl-chloroformate afforded the expected 1,3-benzoxazine derivatives in 77 - 94 % yields. All compounds prepared were characterized by infrared and NMR spectroscopy and by elemental analysis.

All the compounds were examined for antifungal activity in vitro against *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *Trichosporon asahii*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Aspergillus fumigates*, and *Absidia corymbifera*, but none of these compounds was more active than ketoconazole. In general, parent hydroxysalicylanilides were more active than their cyclic counterparts.

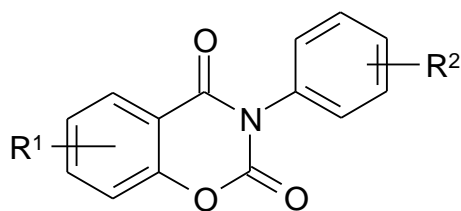
OBSAH

1. ÚVOD	7
2. CÍL PRÁCE	9
3. TEORETICKÁ ČÁST	10
3.1 VYUŽITÍ MIKROVLNNÉHO ZÁŘENÍ V CHEMII	10
3.2 TUBERKULÓZA	12
3.2.1 ZÁKLADNÍ INFORMACE	12
3.2.2 ANTITUBERKULOTIKA A LÉČBA TUBERKULÓZY	15
3.2.3 MULTIREZISTENTNÍ TUBERKULÓZA	19
4. METODICKÁ ČÁST	20
4.1 SYNTÉZA 2-HYDROXYBENZANILIDŮ	20
4.2 SYNTÉZA 3-FENYL-2 <i>H</i> -1,3-BENZOXAZIN-2,4(3 <i>H</i>)-DIONŮ	21
5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	23
5.1 PŘÍPRAVA DIHYDROXYBENZANILIDŮ	23
5.2 PŘÍPRAVA HYDROXYDERIVÁTŮ 3-FENYL-2 <i>H</i> -1,3-BENZOXAZIN-2,4(3 <i>H</i>)-DIONŮ	31
5.3 METODY POUŽITÉ V EXPERIMENTÁLNÍ ČÁSTI	40
6. VÝSLEDKY A DISKUZE	41
7. ZÁVĚR	43
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	44
9. PŘÍLOHY	49

1. ÚVOD

Na Katedře anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy probíhá řadu let intenzivní výzkum různých skupin strukturně podobných látek odvozených od salicylanilidu a syntetizovaných zejména jako potenciální antituberkulotika a antimykotika. Během této doby bylo publikováno několik přehledných referátů zabývajících se biologickou aktivitou salicylanilidů^{1,2}, thiosalicylanilidů³ a dalších skupin podobných látek.^{4,5} Tyto látky mají v závislosti na substituci široké spektrum biologických aktivit (antibakteriální, včetně antimykobakteriální, antifungální, anthelmintické, herbicidní a další).

Jednu ze studovaných skupin látek představují 3-fenyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-diony³, cyklické analogy salicylanilidů.



V roce 1993 byla popsána antimykobakteriální aktivita 12 1,3-benzoxazinových derivátů ($R^1 = \text{H}, 6\text{-Br}$), u nichž větší substituční obměny byly provedeny v *para*-poloze fenylu v poloze 3. Látky byly *in vitro* účinné proti *M. tuberculosis* a také *M. kansasii*, jedné z tzv. atypických mykobaktérií.⁶ Později byly publikovány také výsledky hodnocení antifungální aktivity těchto látek; ukázalo se však, že látky nejsou příliš aktivní, snad s výjimkou dermatofytu *Trichophyton dermatophytes* (nejúčinnější byl dihalogenderivát $R^1 = 6\text{-Br}, R^2 = 4\text{-Cl}$).⁷

V následujícím období byly syntetizovány pod vedením prof. Waissera desítky látek se strukturou modifikovanou jednak substitucí 1,3-benzoxazindionového skeletu, jednak záměnou kyslíku za jiné heteroatomy, dusík a síru, a/nebo zaváděním dalších heteroatomů a dále záměnou jedné nebo obou oxoskupin thioxoskupinou. Data získaná mikrobiologickým hodnocením připravených látek (MIC – minimální inhibiční koncentrace) byla vyhodnocována pomocí metod kvantitativní analýzy vztahů mezi strukturou a aktivitou (QSAR). Příkladem je studie⁸, v níž byly analyzovány vztahy mezi

antimykobakteriální aktivitou (vůči *M. tuberculosis*, *M. kansasii* a *M. avium*) a chemickou strukturou více než 150 připravených derivátů substituovaných v poloze 6 nebo 7 1,3-benzoxazinového jádra a na fenylu. Z výsledků vyplývá, že studované aktivity látek rostou s rostoucí hydrofobicitou a elektronakceptorními vlastnostmi substituentů na fenylovém jádře, vliv substituentů na 1,3-benzoxazinovém kruhu je složitější. V další studii⁹ se Freeovou-Wilsonovou metodou QSAR analyzovala antimykobakteriální aktivita 1,3-benzoxazinových derivátů halogenovaných na benzoxazinovém jádře a substituovaných v *para*-poloze fenylu alkylem.

Tématem této diplomové práce je příprava hydroxyderivátů *N*-fenyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionu; takto substituované látky zůstávaly dosud nepovšimnuty a nebyla jim věnována systematická pozornost.

Práce je součástí výzkumu řešeného v rámci výzkumného záměru MSM 0021620822.

2. CÍL PRÁCE

Tato diplomová práce se zabývá syntézou dihydroxybenzanilidů a jejich cyklických analogů, hydroxyderivátů 3-fenyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionu, jako látek s předpokládanou biologickou aktivitou.

Cílem práce bylo:

1. připravit série dihydroxybenzanilidů odvozených od salicylanilidu lišící se polohou druhé hydroxyskupiny v acylové části molekuly;
2. vypracovat metodiku syntézy těchto dihydroxybenzanilidů a optimalizovat podmínky jejího provedení v mikrovlnném reaktoru;
3. připravit série 3-fenyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionů odvozených od výše uvedených dihydroxybenzanilidů;
4. optimalizovat metodiku syntézy těchto 3-fenyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionů;
5. připravené série látek předat k testování jejich antimykobakteriální a antifungální aktivity *in vitro* a vyhodnotit závislost účinků na struktuře.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 VYUŽITÍ MIKROVLNNÉHO ZÁŘENÍ V CHEMII¹⁰

Mikrovlny jsou vysokofrekvenční elektromagnetické záření s frekvencí v intervalu 30–0,3 GHz, těmto hodnotám odpovídá vlnová délka 0,01–1 m.

Byly objeveny v Anglii na počátku 40. let 20. století na univerzitě v Birminghamu, kde byl vynalezen zdroj mikrovlnného záření zvaný magnetron. K prvnímu praktickému využití mikrovln došlo již za II. světové války - jako součást britského radarového systému v letecké bitvě o Anglii.

Většinou materiálů mikrovlny pronikají jako sluneční světlo sklem, některými materiály jsou silně pohlcovány a mikrovlnná energie se v nich přeměňuje na teplo, u jiných materiálů dochází především k odrazu mikrovln. Schopnost silně pohlcovat mikrovlnné záření mají polární látky. Polární molekuly jsou běžně neuspořádané, v elektrickém poli se orientují záporně nabitou částí ke kladnému pólu a kladně nabitou k zápornému. V mikrovlnném poli se polarita mění $2,45 \cdot 10^9$ -krát za sekundu, polární molekuly se snaží tyto rychlé změny sledovat, tj. pokaždé změnit orientaci. Tak dochází k jejich vibraci až rotaci ve směru pole. Při vysoké rychlosti oscilace pole nestačí molekuly tyto změny zcela sledovat a výsledkem pohybu a vzájemného „tření“ molekul je přeměna mikrovlnné energie na teplo. Při ohřevu nehomogenních materiálů se silně zahřívá pouze polární část. S významným rozdílem od klasického ohřevu se setkáme i u mikrovlnného ohřevu homogenních materiálů, při kterém je nejvyšší teplota uvnitř materiálu a klesá směrem k povrchu. Teplotní profil je tedy opačný než u klasického ohřevu.

V laboratořích jsou mikrovlny používány k vysokoteplotním rozkladům vzorků pro analýzu těžkých kovů atomovou absorpční spektroskopií. Výhodné jsou také extrakce prováděné v mikrovlnném prostředí, např. při přípravě vzorků k chromatografické nebo spektrální analýze, protože přinášejí značnou úsporu času ve srovnání s běžnou Soxhletovou extrakcí. V chemických laboratořích se využívají i další efekty mikrovlnného záření, ke kterým při klasickém ohřevu nedochází. Při rychlém ohřátí kapalin v mikrovlnném poli (bez účinného míchání) je konvekce k povrchu kapaliny, kde dochází k odpařování, nedostatečná a nadbytek energie se projeví jako přehřátí, kapaliny proto vřou za atmosférického tlaku při vyšší teplotě než je teplota varu. Tento tzv. "superheating effect" bývá u polárních rozpouštědel 10 – 30 °C nad teplotu varu a chemici ho využívají k urychlení reakcí.

V letech 1980–90 byl zjištěn významný vliv mikrovlnného pole na rychlost a selektivitu reakcí organických sloučenin. První práce, které popisují cílené využití mikrovlnného záření v organické syntéze publikované v roce 1986, uváděly urychlení reakcí o 2–3 řády. Ukázalo se, že k výraznému urychlení reakcí dochází, je-li záření absorbováno reaktantem nebo katalyzátorem. Dalšími podstatnými vlastnostmi, které ovlivňují interakci látky s mikrovlnným zářením, jsou tepelná kapacita, tepelná vodivost, skupenství látky (ovlivňující možnost rotace molekul) a u kapalných látek jejich výparné teplo. Množství reakcí, u kterých bylo zjištěno významné zkrácení reakčních dob v mikrovlnném prostředí od 80. let minulého století značně vzrostlo, příkladem mohou být esterifikační reakce, Dielsovy-Alderovy cykloadice, alkylace, acylace a aldolizační reakce. Uplatnění nachází mikrovlnná chemie i v praxi, např. při výrobě léčiv.

Nejnovějším poznatkem v mikrovlnné chemii je metoda mikrovlnného ohřevu za současného chlazení. Metoda umožňuje provádět reakce při nízkých teplotách, i pod 0 °C, kdy klasické reakce již neprobíhají. Současné chlazení umožňuje použití vysokých mikrovlnných výkonů, což se projeví vyšší reakční rychlostí, vyšší selektivitou i vyššími výtěžky. Reakce lze provádět za mírných reakčních podmínek, kdy nežádoucí vedlejší či následné reakce jsou potlačeny, což je výhodné např. u tepelně labilních produktů.¹⁰



Obrázek 1

Mikrovlnný reaktor Milestone – MicroSYNTH (MLS ETHOS 1600 URM) používaný na Katedře anorganické a organické chemie. Jedná se o mikrovlnnou pec navrženou speciálně pro provádění organických reakcí.¹¹

3.2 TUBERKULÓZA

3.2.1 ZÁKLADNÍ INFORMACE

Tuberkulóza (TBC) je celkové infekční onemocnění, řazené mezi specifické zánětlivé procesy. TBC je vyvolávána obligátně patogenními mykobakteriemi: *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis* a *M. africanum*, z nichž se u nás uplatňuje hlavně *M. tuberculosis*. Další mykobakterie (*M. kansasii* a *M. avium*, tzv. netuberkulózní) jsou potencionálně patogenní a vyvolávají klinicky obdobná onemocnění nazývaná mykobakteriízy. Tyto bakterie měly ještě v polovině 19. století na svědomí asi ¼ celkového počtu úmrtí a byla hlavní příčinou úmrtí mladých lidí a dětí.

Přibližně od 80. let minulého století lze po předchozím nižším výskytu pozorovat opět vzestup výskytu TBC a to i ve vyspělých zemích. Souvisí to hlavně s rostoucím počtem HIV pozitivních osob, používání imunosupresiv, vznikem rezistentních kmenů. Podle předpokladů Světové zdravotnické organizace vzroste mezi rokem 2002 a 2020 počet infikovaných osob na 100 milionů, 150 milionů lidí onemocní TBC a pro 36 milionů lidí bude mít nemoc fatální následky.

V současné době je bakteriemi TBC infikována celá 1/3 lidstva a TBC je nejčastější příčinou smrti z infekčních onemocnění vůbec. Každoročně je ve světě hlášeno asi 8 miliónů nových onemocnění touto chorobou, z nichž je asi 3,6 miliónů postiženo vysoce infekční plicní formou tuberkulózy prokazatelnou již mikroskopií sputa. Největší počet nových nálezů připadá na Asii. Na tuberkulózu dnes ročně umírá asi 3 miliony nemocných, převážně v rozvojových oblastech.¹²

Ze zemí střední a východní Evropy patří Česká republika mezi země s nejnižším ročním výskytem tuberkulózy (zhruba 20 případů onemocnění na 100.000 obyvatel) ve srovnání s průměrným ročním výskytem v Západní Evropě (25 případů na 100.000 obyvatel). V České republice je tato situace stabilizovaná, došlo však ke stagnaci původního plynulého poklesu výskytu TBC, který byl zaznamenáván až do roku 1988.¹³ Podle dat z Registru TBC se v roce 2006 vyskytlo v ČR 973 případů onemocnění tuberkulózu, 607 u mužů a 366 u žen, což představovalo 9,5 případů na 100 tis. obyvatel. Nejčastější formou onemocnění byla TBC dýchacího ústrojí. Z hlediska věku postižených je nejvyšší nemocnost TBC u mužů i žen v kategorii osob nad 75 let. Léčba antituberkulotiky nejčastěji trvala 27–39 dnů a nejběžněji podávanými antituberkulotiky byly rifampicin a isoniazid. Do Registru TBC bylo v roce 2006 hlášeno 52 úmrtí (56 v roce 2005), příčinou byla vždy TBC dýchacího ústrojí.¹⁴

Doposud nejúčinnějším způsobem ochrany proti tuberkulóze je očkování vakcínou BCG (BCG = avirulentní Bacil Calmette Guerin). Očkovací látka je tvořena lyofilizátem bakteriálních zárodků *M. bovis*, které se získávají pomnožením vhodného atenuovaného vakcinačního kmene na umělém kultivačním médiu. První lidské očkování s tímto atenuovaným kmenem, bylo provedeno v roce 1921 v Paříži. Od roku 1928 se provádí plošné očkování proti TBC. V prevenci tuberkulózy sehrála BCG imunizace jednu z nejvýznamnějších rolí. Používá se v pravidelném očkování v 64 zemí a doporučuje se v dalších 118 zemích.

Primární imunizace je prováděna jednou vakcinační dávkou nejdříve 4. den po narození až do 6 týdnů. Revakcinace se povinně provádí v 11. roce u těch dětí s negativním výsledkem tuberkulinového testu. Tuberkulinové zkoušky se rovněž provádějí u těch osob (zejména mladších 30 let), u nichž existuje reálné riziko expozice tuberkulózy, např. v rodinném prostředí. Podle situace se tato zkouška může opakovat každoročně.

Princip tohoto očkování spočívá podobně jako u ostatních živých vakcín v simulaci infekčního onemocnění s dávkou nižší než je infekční a za použití takového kmene, který nevykazuje patogenitu. BCG indukovaná imunita se vyvíjí zhruba 6 týdnů po imunizaci. Toto očkování snižuje riziko bezprostředního onemocnění, ale nesnižuje riziko nákazy. Po imunizaci probíhá případné onemocnění v lehčí a mírnější formě, která při správné léčbě neohrožuje pacienta na životě. Proti tuberkulóze se v ČR očkuje už více než padesát let. V současnosti je používána bezpečná vakcína dánského původu s minimálními postvakcinačními účinky. Obecně se uznává, že očkování chrání před onemocněním 80 % dětí a u dospělých zabraňuje vzniku nejtěžších forem tuberkulózy (tuberkulózní záněty mozku a mozkových blan, miliární TBC, tj. TBC s rozsevem do celého organismu, kavernózní TBC).¹⁵

Základním diagnostickým vyšetřením u TBC je rentgenologické vyšetření, dále počítačová tomografie nebo i magnetická rezonance, které informuje o rozsahu a lokalizaci lézí. Tuberkulóza na sebe upozorní přítomností infiltrátů ve středních a horních plicních polích a zvětšením lymfatických uzlin. K odlišení TB od jiných onemocnění, zejména od velmi častých nádorových změn plicní tkáně, slouží bronchoskopie. Další diagnostickou možností je provedení kožního tuberkulinového testu. Jeho spolehlivost je však do značné míry omezena očkováním. Rozhodujícím kritériem je ale bakteriologický průkaz původce onemocnění, tj. *M. tuberculosis* (mikroskopie a kultivace z biologických vzorků materiálu, obvykle vykašlovaných hlenů pacienta a průkaz přítomnosti

mykobakterií v plicích.). Část TBC onemocnění (přibližně 30 %) zůstává ovšem bakteriologicky neověřená, tj. v laboratořích je nález mikroskopie i kultivace mykobakterií negativní. U nich je pak diagnóza stanovena na základě příznaků onemocnění, rentgenologického nálezu, nebo také na základě dobré odezvy po zahájení léčby antituberkulotiky. K diagnostice TBC jsou v posledním desetiletí kromě klasických metod využívány i nové metody urychlené detekce mykobakterií a metody průkazu nukleových kyselin těchto mikroorganismů.

Zdrojem onemocnění TBC je především člověk. Nejrozšířenější způsobem přenosu TBC je inhalační cesta (kapénková infekce).

Onemocnění tuberkulózou může nejdřív probíhat bezpříznakově, může být považováno za běžnou virózu. Symptomy mohou vypuknout až po určité době nebo i letech od získání infekce.

Stádia TBC lze rozdělit na primární a postprimární. Bakterie po vdechnutí pronikají do plicních sklípků a vyvolávají zde místní zánět. Rychle se pomnoží a šíří do spádových lymfatických uzlin. Způsobují zvětšení uzlin. Primární TBC je charakterizována vznikem primárního komplexu (specifické zánětlivé ložisko v místě průniku bacila do organismu) a regionálním zánětem mízních uzlin (lymfadenitida). Většinou se primární komplexy vyskytují v plicích a to vzhledem k nejčastějšímu způsobu šíření infekce. Rozsev bacilů do různých orgánů s sebou zpravidla nepřináší žádné obtíže. U jinak zdravého jedince imunitní systém reaguje na přítomnost patogenních agens prostřednictvím buněčné imunity. Makrofágy pohlcují bacily, ohraničují zánět. Zbytková ložiska se následně opouzdří a kalcifikují. Mykobakterie v ložiscích jsou ale stále životaschopné. Následuje různě dlouhé období latence, ale i po mnoha letech od nákazy může dojít k reaktivaci a vzniku infekce.

S bakterií tuberkulózy se během života setkají skoro všichni lidé, u naprosté většiny nákaza proběhne skrytě. Na pozdější reaktivaci a rozvoji tuberkulózy se podílí oslabení imunitního systému při závažných chorobách (např. současná infekce virem HIV, diabetes mellitus, užívání imunosupresiv atd.), vliv nedostatečných sociálních a ekonomických podmínek (typicky u bezdomovců) nebo styk s nakaženými osobami (typicky zdravotníci). Většina osob, které prodělaly primoinfekci, jsou nositeli latentní infekce, jež může vést ke znovuvzplanutí TBC infekce, tzv. postprimární typ TBC.

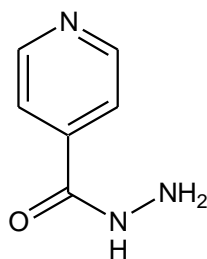
Aktivace do postprimární TBC postihuje 10 - 15 % infikovaných osob. V postižené tkáni se pak objevují granulomy či tuberkuly. Takto ohraničená ložiska se postupně rozpadají a uvolňují bakterie. Rozvíjí se zánět plic a nitrohruďních uzlin.

Neléčená TBC vede k destrukci plicní tkáně. Příznaky aktivní TBC nejsou většinou příliš specifické (únava, bolest na hrudi, noční pocení, subfebrilie, úbytek na váze). Plicní formy, které jsou nejčastější a také nejvíc nebezpečné pro okolí (pacient bacily vykašlává) se projevují vleklým kašlem přetrvávající déle než 3 týdny, často spojený s vykašláváním hlenového nebo hlenohnisavého sputa s příměsí krve (hemoptýza). Jinou situací je šíření bakterií krví mimo plíce, bakterie se usazují a množí v mozkových obalech, v ledvinách nebo kostech. Tak vznikají nejnebezpečnější formy tuberkulózy - záněty mozkových blan s postižením více orgánů současně (generalizovaná forma). V těchto případech je úspěch léčby nejistý a nemocný je ohrožen smrtí nebo těžkými, zpravidla neurologickými následky.

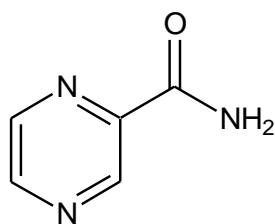
Léčba tuberkulózy trvá několik měsíců a vyžaduje hospitalizaci. V poslední době se objevují tuberkulózní bacily, které nereagují na antibiotickou léčbu, což je skutečnost, která celou situaci kolem léčby tuberkulózy značně komplikuje^{14,15}.

3.2.2. ANTITUBERKULOTIKA A LÉČBA TUBERKULÓZY

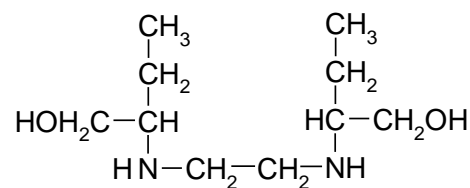
Základem léčby tuberkulózy je antimikrobní terapie, která je prováděná antituberkulotiky (AT). Antituberkulotika se obvykle dělí do dvou linií. Do první, základní linie, patří AT, která se používají přednostně – isoniazid (**I**), pyrazinamid (**II**), ethambutol (**III**), rifampicin (**IV**), streptomycin (**V**). V případě rezistence na AT první linie, při výskytu nežádoucích nebo toxických účinků se používají léčiva druhé linie - náhradní AT - capreomycin, cykloserin, kanamycin, ethionamid, kyselina *para*-aminosalicylová (**VI**), moderní fluorochinolony – perfloxacin, ofloxacin, ciprofloxacin, levofloxacin, sparfloxacin, a také případně makrolidy jako azithromycin, clarithromycin, roxithromycin, skupina aminoglykosidů - např. amikacin a kanamycin, rifamyciny – rifabutin, rifapentin.



I



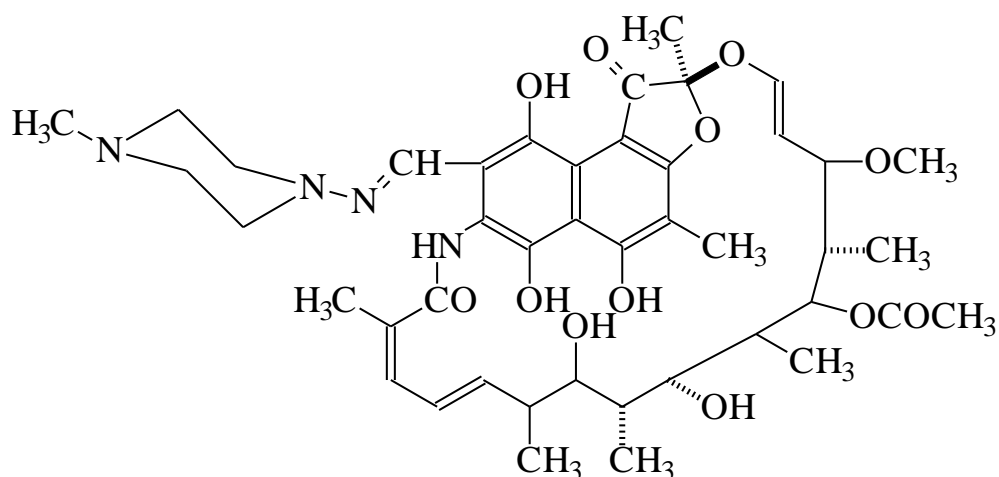
II



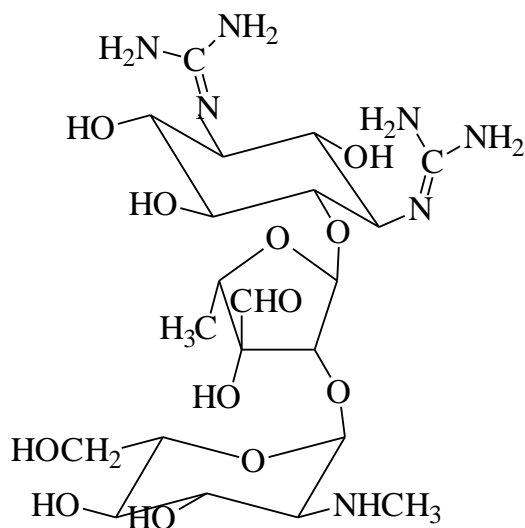
III

Hlavní zásadou léčby TBC je, aby byla kombinovaná, dlouhodobá a nepřerušovaná. Právě kombinací AT je možno vyléčit převážnou většinu tuberkulózních chorob. Důvodem kombinované léčby tuberkulózy je zábrana riziku vzniku lékové rezistence, snížení dávky jednotlivých léčiv a tím i riziko výskytu nežádoucích či toxických účinků. V každé mikrobiální populaci totiž existují vedle mykobakterií citlivých na aplikované AT i ojedinělé mutanty, které jsou primárně na toto antituberkulotikum rezistentní. Dalším důvodem vyžadujícím kombinovanou léčbu antituberkulotiky je heterogenita mykobakteriální populace, podmiňující účinnost jednotlivých léků.

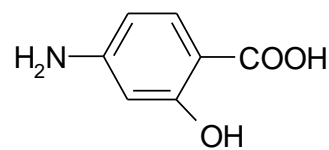
Antituberkulotika zasahují do metabolických pochodů mykobakterií, ale jen pokud jsou mykobakterie biologicky aktivní. Mykobakterie však přetrvávají v tuberkulózních lézích, aniž by se dále množila a tudíž v tomto stavu jsou nevnímavá na AT. Biologicky inaktivní bakterie mohou po rozpadu makrofágů a úpravě pH zvýšit svoji metabolickou aktivitu a dát tak vznik další atace onemocnění - z tohoto důvodu je nutno dávat AT dlouhodobě - za dostatečně dlouhou dobu léčby je považována délka léčby 6 – 12 měsíců. Každý léčebný režim má fázi iniciální (hospitalizace) a fázi pokračovací (převážně ambulantní). V iniciální fázi je nemocný léčen čtyřlékovou nebo alespoň třílékovou kombinací, léky jsou aplikovány nepřerušovaně, denně, kontinuálně po dobu dvou měsíců. V pokračovací fázi mohou být AT aplikována denně, nebo intermitentně, ve 2 nebo 3 dávkách v týdnu.^{16,17}



IV



V



VI

Mechanismy účinku známe pouze u některých antituberkulotik. Isoniazid (I) lze považovat za nejdůležitější antituberkulózní látku. Mechanismus působení isoniazidu vede k oxidaci na kyselinu isonikotinovou kyselinu za účasti enzymů katalázy a peroxidázy a poté se kyselina začleňuje do NAD, blokuje NAD a vznikají oxo-, peroxoradikály. Výsledným efektem je inhibice mykolových kyselin, které zastávají roli specifických stavebních kamenů buněčných stěn a membrán mykobakterií. Spektrum účinku isoniazidu (I) obsahuje kmeny *M. tuberculosis* a *M. bovis*. V rámci snahy o preventivní opatření pro vznik rezistencí se využívá kombinací isoniazidu s dalšími léky první řady ethambutolem (II), rifampicinem (IV), streptomycinem či thiacetazonem¹⁴.

Podobný účinek jako INH související s metabolismem nikotinamidu projevuje pyrazinamid (II), který působí jen na *M. tuberculosis*, zatímco jiní původci jsou většinou rezistentní. Mechanismus účinku pyrazinamidu není přesně znám, ve formě pyrazinkarbonové kyseliny se kumuluje v bakteriích, kde se štěpí působením amidázy a ve formě karbonové kyseliny již nemůže z bakterie uniknout. Naopak mechanismus účinku rifampicinu (IV) je dobře znám - spočívá v inhibici na DNA-dependentní RNA-polymerázy v bakteriích potlačuje syntézu bakteriální RNA a tím působí baktericidně na množící se mikroby. Kromě dalších typů bakterií působí na *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. leprae* a na atypické mykobaktérie jako jsou *M. kansasii*, *M. avium*, *M. intracellulare* a *M. marinum*.

Další antituberkulotikum ethambutol (**III**) působí bakteriostaticky proti množícím se bakteriím. Proniká do mykobaktérií a pravděpodobně zasahuje do syntézy buněčné stěny tím, že potlačuje multiplikaci interferencí se syntézou RNA. Je specificky účinný proti rostoucím mikroorganismům rodu *Mycobacterium* jako *M. tuberculosis*, *M. bovis* a *M. leprae*.⁵ Je rovněž účinný proti některým podmíněně patogenním mykobaktériím včetně *M. kansasii*. Účinek proti jiným mikroorganismům nebyl prokázán. Ethambutol je vhodný pouze ke kombinované terapii, zejména u pacientům s prokázanou nebo předpokládanou rezistencí na izoniazid. Zkřížená rezistence nebyla prokázána. Primární rezistence na ethambutol je v rozvinutých zemích řídká, ale pokud se ethambutol používá samotný, snadno vznikají resistantní kmeny *M. tuberculosis*.

Aminoglykosidové antibiotikum streptomycin působí baktericidně. Podává se parenterální formou (**V**), podléhá extracelulární distribuci a je užitečný v boji proti extracelulárním formám *M. tuberculosis* a *M. bovis* a proti podmíněně patogenním mykobaktériím. Používá se k terapii zvláštních forem tuberkulózy - tuberkulózní meningitida u dětí. Zpomaluje proteosyntézu a způsobuje zabudování chybných aminokyselin do polypeptidických řetězců, tyto chybně sestavené bílkoviny ztrácí své biologické funkce a vedou k částečnému nebo úplnému zastavení všech procesů v buňce. *In vitro* se prokázalo, že streptomycin způsobuje v překladačnické RNA chyby ve čtení. Uvažuje se, že streptomycin způsobuje deformaci ribosomů, a tím dochází právě k chybám čtení. Mutací se mohou bakteriální kmeny citlivé na streptomycin stát rezistentními.

Para-aminosalicylová kyselina (**VI**) způsobuje inhibici syntézy listové kyseliny díky kompetici s PABA (*p*-aminobenzoovou kyselinou). Četné bakterie potřebují kyselinu *p*-aminobenzoovou jako růstový faktor, který zabudovávají do molekuly kyseliny dihydroxylové. Sulfonamidy na základě své chemické podobnosti s kyselinou *p*-aminobenzoovou namísto ní obsazují její cílová místa, takže brzdí syntézu kyseliny dihydroxylové, nutné pro množení bakterií. Vznikne nedostatek kyseliny tetrahydroxylové, následně se snižuje syntéza purinů a tymidinu nutných pro syntézu nukleových kyselin DNA a RNA. To vyvolává bakteriostatický efekt, který postihuje široké spektrum patogenních mikroorganismů. Para-aminobenzoová kyselina působí ze všech kmenů mykobaktérií výhradně jen na *M. tuberculosis*.

3.2.2. MULTIREZISTENTNÍ TUBERKULÓZA

Multirezistentní tuberkulóza (MDR TBC – multidrug-resistant TBC) je definována jako onemocnění vyvolané kmenem *Mycobacterium tuberculosis* rezistentním minimálně na kombinaci antituberkulotik isoniazid a rifampicin. V současnosti se stala problémem, protože kauzální terapie základními antituberkulotiky (AT), tj. isoniazidem, rifampiciem, streptomycinem, pyrazinamidem a ethambutolem u onemocnění tohoto typu selhává. MDR TBC představuje pro nemocného krajně nepříznivou prognózu. Z tohoto hlediska je nutné věnovat maximální možnou pozornost vyhledávání dalších antibakteriálních léků a ověřování účinnosti léčby těmito preparáty.

V České republice je situace ve výskytu MDR TBC prozatím uspokojivá. Podle výsledků globálního projektu Světové zdravotnické organizace „*Surveillance lékové rezistence M. tuberculosis*“ i výsledků Výročních zpráv o mykobakteriologické diagnostice v ČR, kterou vydává každoročně SZU tvoří MDR TRC v posledních 6 letech zhruba 2.2 – 3.2 % ze všech případů bacilární tuberkulózy v ČR.

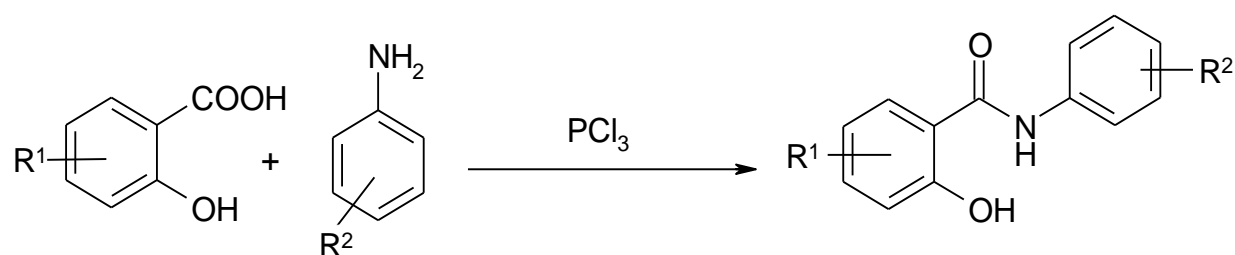
Hledání a používání dalších antibakteriálních léků (second-line drugs) v terapii tuberkulózy je velkou nadějí pro nemocné multirezistentní tuberkulózou. Představuje pro ně šanci na vyléčení a pro celou společnost pak šanci na to, že dojde k eliminaci zdrojů tohoto nebezpečného onemocnění a že přenos infekčního agens mezi zdrojem infekce a vnímavým jedincem bude definitivně přerušeno.

I když multirezistentní tuberkulóza v České republice v programu kontroly tuberkulózy nepředstavuje nejožehavější problém, není možné ji podceňovat a je nutné jí stále věnovat přiměřenou pozornost. Ta by měla spočívat ve vyhledávání účinných farmakoterapeutických preparátů, v umožnění jejich registrace v ČR a v precizním provádění testů citlivosti před zahájením terapie.¹⁸

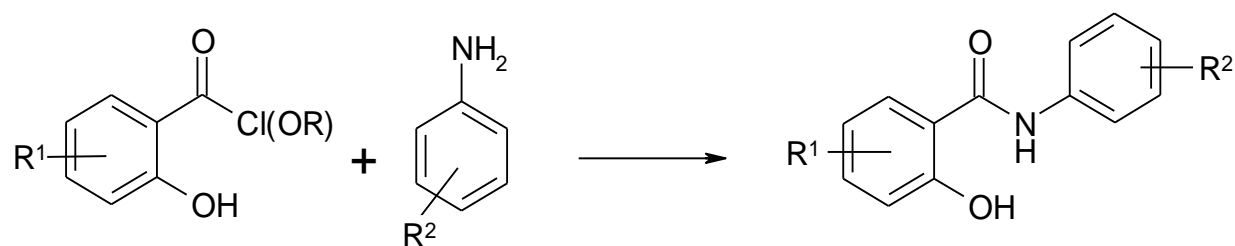
4. METODICKÁ ČÁST

4.1 SYNTÉZA 2-HYDROXYBENZANILIDŮ

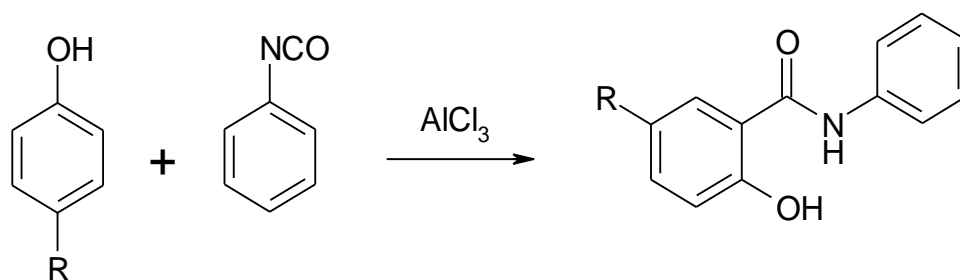
Při syntéze 2-hydroxybenzanilidů můžeme vycházet z příslušné substituované kyseliny salicylové a anilinu. Reakce probíhá za přítomnosti chloridu fosforitého a jako rozpouštědlo lze použít (toluen, xylen, chlorbenzen, pyridin).^{19,20,21,22,23}



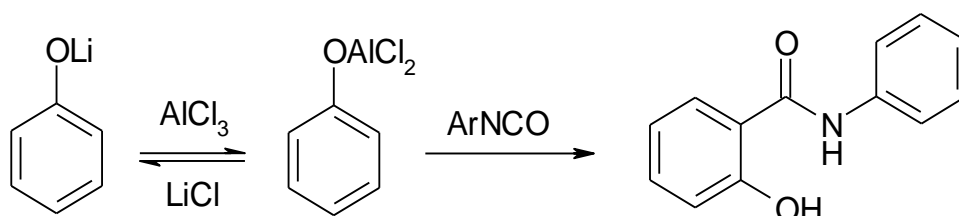
2-Hydroxybenzanilidy je možno připravit také z funkčních derivátů kyseliny salicylové (chloridu²⁴ nebo esteru^{25,26,27})



Další cestou syntézy derivátů 2-hydroxybenzanilidu je *ortho*-aminokarbonylace fenolů fenyloksyanátem na principu Friedelovy-Craftsovy reakce.²⁸ Tato metoda však má velká omezení, která jsou závislá na poloze substituentů na fenolu, aby bylo dosaženo žádaného 2-hydroxybenzanilidu.

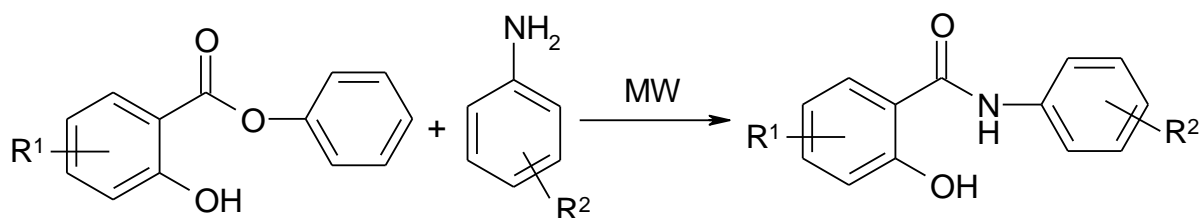


Zajímavou variantu syntézy benzanilidů z fenolů popsal Balduzzi *et al.*²⁹ Nejprve reaguje fenol za laboratorní teploty s roztokem butyllithia v hexanu a chloridem hlinitým v xylenu. Po přidání roztoku fenylisokyanátu v xylenu se reakční směs udržuje za varu pod zpětným chladičem po dobu 20 hodin. Reakce je ukončena přidáním 10% kyseliny chlorovodíkové. Použití fenolátu sodného nebo draselného místo lithného vede ke směsi izomerů.



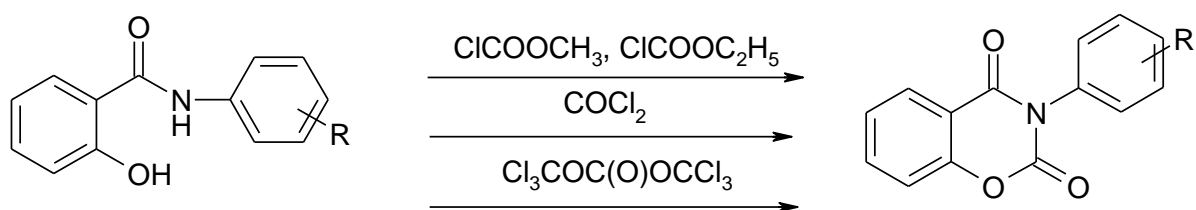
Další možností přípravy 2-hydroxybenzanilidů je použití fenylesteru příslušné salicylové kyseliny^{30,31,32}, a anilinu. Syntézy výchozích fenylesterů jsou velmi dobře popsány³³.

V posledních letech se objevuje trend převedení syntéz do mikrovlnného reaktoru. Příklad úspěšné syntézy 2-hydroxybenzanilidů v mikrovlnném reaktoru popsala skupina autorů ze Slovenska²⁵, a to bez použití rozpouštědel („solvent-free“ metoda).

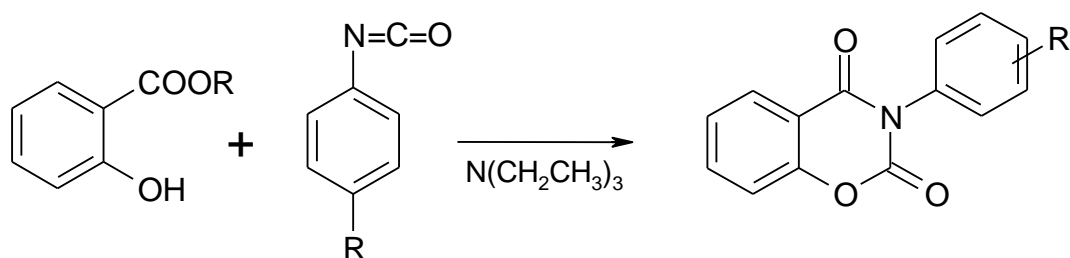


4.2 SYNTÉZA 3-FENYL-2H-1,3-BENZOXAZIN-2,4(3H)-DIONŮ

2-Hydroxybenzanilidy mohou být výchozími látkami při syntéze 3-fenyl-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dionů. Reakce může probíhat za přítomnosti pyridinu, toluenu nebo tetrahydrofuranu. Jako cyklizační činidla lze použít methyl- i ethylester kyseliny chlormravenčí, fosgen, trifosgen. Ve směsi je nutná přítomnost pomocné báze (pyridin, triethylamin)^{34,35}, která váže odštěpující se vodík z hydroxylové skupiny.



Jiným možným postupem při syntéze 3-aryl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionů je použití methyl- nebo ethylesteru kyseliny salicylové a fenyloisokyanátu. Tato reakce probíhá v prostředí triethylaminu.³⁶



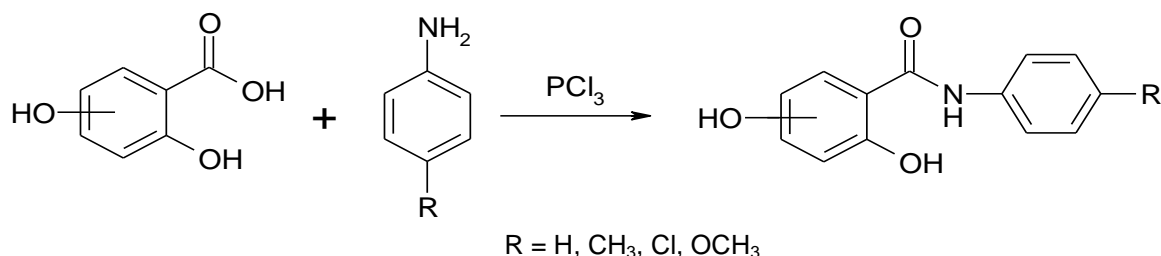
Také je možné vycházet přímo z kyseliny salicylové a fenyloisothiokyanátu. Jedná se o cyklizační a současně desulfurační reakci. Reakce se provádí v prostředí acetonitrilu a baze triethylaminu.³⁷



5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 PŘÍPRAVA DIHYDROXYBENZANILIDŮ

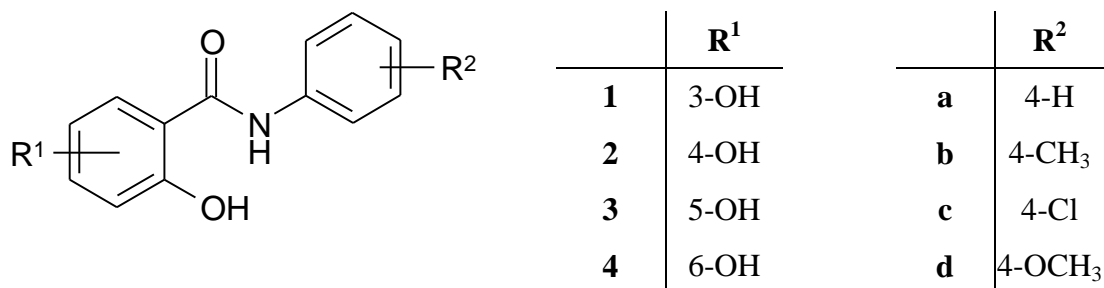
Schéma reakce:



Obecný postup:

Do 150ml destilační baňky opatřené rychloběžným míchadlem bylo předloženo 0,01 mol výchozí dihydroxybenzoové kyseliny a přidáno 60 ml chlorbenzenu jako rozpouštědla. Poté byl přidán přebytek příslušného substituovaného anilinu (0,015 mol) a heterogenní směs byla 10 minut míchána za laboratorní teploty. Ke směsi bylo přidáno 0,5 ml chloridu fosforitého jako chloračního činidla. Směs byla vložena do mikrovlnného reaktoru a zahřívána pod zpětným chladičem 20 minut při výkonu reaktoru 600 W. Poté byl chlorbenzen odpařen za sníženého tlaku a odparek byl čištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu. Jako mobilní fáze bylo použito směsi aceton - hexan (1:5) a výsledný produkt byl následně dočištěn rekrystalizací ze směsi ethanol - voda.

Průběh reakce a čistotu produktu jsem sledovala pomocí tenkovrstvé chromatografie na Silufolu (UV 254/366) a jako mobilní fáze byla použita směs aceton - hexan (2:3). Látky (**1a-4d**) byly sušeny v exsikátoru a charakterizovány teplotou tání, NMR a IČ spektry a elementární analýzou.



5.1.1 *N*-fenyl-2,3-dihydroxybenzamidy

Z kyseliny 2,3-dihydroxybenzoové byly připraveny následující benzanilidy (**1**):

a) *N*-fenyl-2,3-dihydroxybenzamid (**1a**)

Bylo získáno 1,7 g (75% výtěžek) bílé krystalické látky.

Teplota tání: 113 – 114 °C

Sumární vzorec: C₁₃H₁₁NO₃

Molekulová hmotnost: 229,24 g/mol

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 6.78 (t, 1 H, *J* = 7.8 Hz, *H*-5), 6.99 (dd, 1 H, *J* = 1.5 Hz, *J* = 7.8 Hz, *H*-4), 7.12-7.18 (m, 1 H, *H*-4'), 7.34-7.40 (m, 2 H, *H*-3', *H*-5'), 7.45 (dd, 1 H, *J* = 1.5 Hz, *J* = 7.8 Hz, *H*-6), 7.67-7.72 (m, 2 H, *H*-2', *H*-6'), 9.43 (bs, 1 H, *OH*), 10.36 (bs, 1 H, *OH*), 11.69 (bs, 1 H, *NH*).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 117.2, 118.6, 118.7, 119.2, 121.5, 124.6, 128.9, 138.2, 146.4, 148.6, 168.0.

IR(KBr): ν(C=O) = 1642 cm⁻¹

Elementární analýza:

Vypočteno: 68.11 % C; 4.84 % H; 6.11 % N.

Nalezeno: 68.23 % C; 4.96 % H; 6.22 % N.

b) 2,3-dihydroxy-*N*-(4-methylfenyl)benzamid (**1b**)

Bylo získáno 1,9 g (81% výtěžek) bílé krystalické látky.

Teplota tání: 161 – 163 °C

Sumární vzorec: C₁₄H₁₃NO₃

Molekulová hmotnost: 243,26 g/mol

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.26 (s, 3 H, *CH*₃), 6.45 (t, 1 H, *J* = 2.1 Hz, *H*-5), 6.76 (d, 2 H, *J* = 2.1 Hz, *H*-4, *H*-6), 7.08-7.15 (m, 2 H, *H*-3', *H*-5'), 7.59-7.66 (m, 2 H, *H*-2', *H*-6'), 9.56 (bs, 2 H, *OH*), 10.00 (bs, 1 H, *NH*).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 20.7, 117.1, 118.3, 119.1, 119.5, 120.9, 124.7, 128.3, 138.7, 146.6, 148.9, 168.5.

IR(KBr): ν(C=O) = 1653 cm⁻¹

Elementární analýza:

Vypočteno: 69.12 % C; 5.39 % H; 5.76 % N.

Nalezeno: 69.31 % C; 5.52 % H; 5.88 % N.

c) N-(4-chlorfenyl)-2,3-dihydroxybenzamid (1c)

Bylo získáno 1,8 g (69% výtěžek) bílé krystalické látky.

Teplota tání: 137 – 139 °C

Sumární vzorec: C₁₃H₁₀ClNO₃

Molekulová hmotnost: 263,68 g/mol

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 6.78 (t, 1 H, *J* = 7.8 Hz, *H*-5), 6.98 (dd, 1 H, *J* = 1.5 Hz, *J* = 7.8 Hz, *H*-4), 7.39 (d, 1 H, *J* = 1.5 Hz, *H*-6), 7.40-7.46 (m, 2 H, *H*-3', *H*-5'), 7.70-7.77 (m, 2 H, *H*-2', *H*-6'), 9.46 (bs, 1 H, *OH*), 10.43 (bs, 1 H, *OH*), 11.46 (bs, 1 H, *NH*).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 117.5, 118.6, 118.7, 119.2, 122.9, 128.1, 128.8, 137.3, 146.4, 148.3, 167.9.

IR(KBr): ν(C=O) = 1647 cm⁻¹

Elementární analýza:

Vypočteno: 59.22 % C; 3.82 % H; 5.31 % N.

Nalezeno: 59.41 % C; 3.96 % H; 5.36 % N.

d) 2,3-dihydroxy-N-(4-methoxyfenyl)benzamid (1d)

Bylo získáno 2,0 g (77% výtěžek) bílé krystalické látky.

Teplota tání: 129 – 130 °C

Sumární vzorec: C₁₄H₁₃NO₄

Molekulová hmotnost: 259,26 g/mol

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 3.75 (s, 3 H, *OCH*₃), 6.76 (t, 1 H, *J* = 8.1 Hz, *H*-5), 6.91-6.98 (m, 2 H, *H*-3', *H*-5'), 6.98 (d, 1 H, *J* = 1.5 Hz, *H*-4), 7.45 (dd, 1 H, *J* = 1.5 Hz, *J* = 8.1 Hz, *H*-6), 7.54-7.61 (m, 2 H, *H*-2', *H*-6'), 9.35 (bs, 1 H, *OH*), 10.25 (bs, 1 H, *OH*), 11.93 (bs, 1 H, *NH*).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 55.4, 114.0, 116.6, 118.2, 118.5, 119.2, 123.4, 131.0, 146.4, 149.1, 156.3, 168.0.

IR(KBr): ν(C=O) = 1640 cm⁻¹

Elementární analýza:

Vypočteno: 64.86 % C; 5.05 % H; 5.40 % N.

Nalezeno: 64.98 % C; 5.20 % H; 5.44 % N.

5.1.2 N-fenyl-2,4-dihydroxybenzamid

Z kyseliny 2,4-dihydroxybenzoové byly připraveny následující benzanilidy (**2**):

a) N-fenyl-2,4-dihydroxybenzamid (2a)

Bylo získáno 1,5 g (66% výtěžek) bílé krystalické látky.

Teplota tání: 132 – 134 °C (**Literatura**^{29,38} 139 °C; 129 - 132 °C)

Sumární vzorec: C₁₃H₁₁NO₃

Molekulová hmotnost: 229,24 g/mol

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 6.34 (d, 1 H, *J* = 2.4 Hz, *H*-3), 6.39 (dd, 1 H, *J* = 2.4 Hz, *J* = 8.7 Hz, *H*-5), 7.08-7.15 (m, 1 H, *H*-4'), 7.31-7.39 (m, 2 H, *H*-3', *H*-5'), 7.64-7.70 (m, 2 H, *H*-2', *H*-6'), 7.90 (d, 1 H, *J* = 8.7 Hz, *H*-6), 10.15 (bs, 1 H, *OH*), 10.20 (bs, 1 H, *OH*), 12.28 (bs, 1 H, *NH*).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 103.1, 107.7, 108.0, 121.4, 124.2, 128.9, 130.6, 138.4, 161.9, 162.8, 167.5.

IR(KBr): ν(C=O) = 1635 cm⁻¹

Elementární analýza:

Vypočteno: 68.11 % C; 4.84 % H; 6.11 % N.

Nalezeno: 68.26 % C; 5.02 % H; 6.19 % N.

b) 2,4-dihydroxy-N-(4-methylfenyl)benzamid (2b)

Bylo získáno 1,7 g (71% výtěžek) bílé krystalické látky.

Teplota tání: 164 – 166 °C. (**Literatura**³⁸ 178 - 179 °C.)

Sumární vzorec: C₁₄H₁₃NO₃

Molekulová hmotnost: 243,26 g/mol

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.27 (s, 3 H, CH₃), 6.31 (d, 1 H, *J* = 2.1 Hz, *H*-3), 6.36 (dd, 1 H, *J* = 2.1 Hz, *J* = 8.7 Hz, *H*-5), 7.12-7.20 (m, 2 H, *H*-3', *H*-5'), 7.51-7.57 (m, 2 H, *H*-2', *H*-6'), 7.88 (d, 1 H, *J* = 8.7 Hz, *H*-6), 10.01 (bs, 1 H, *OH*), 10.17 (bs, 1 H, *OH*), 12.36 (bs, 1 H, *NH*).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 20.7, 103.1, 107.6, 107.8, 121.5, 129.3, 130.4, 133.3, 135.8, 162.0, 162.7, 167.5.

IR(KBr): ν(C=O) = 1636 cm⁻¹

Elementární analýza:

Vypočteno: 69.12 % C; 5.39 % H; 5.76 % N.

Nalezeno: 69.36 % C; 5.49 % H; 5.82 % N.

c) N-(4-chlorfenyl)-2,4-dihydroxybenzamid (2c)

Bylo získáno 1,4 g (55% výtěžek) bílé krystalické látky.

Teplota tání: 166 – 168 °C

Sumární vzorec: C₁₃H₁₀ClNO₃

Molekulová hmotnost: 263,68 g/mol

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 6.33 (d, 1 H, *J* = 2.1 Hz, *H*-3), 6.38 (dd, 1 H, *J* = 2.1 Hz, *J* = 8.7 Hz, *H*-5), 7.36-7.43 (m, 2 H, *H*-3', *H*-5'), 7.69-7.75 (m, 2 H, *H*-2', *H*-6'), 7.87 (d, 1 H, *J* = 9.0 Hz, *H*-6), 10.23 (bs, 2 H, *OH*), 12.14 (bs, 1 H, *NH*).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 103.0, 107.8, 108.0, 122.8, 127.8, 128.8, 130.7, 137.5, 161.7, 162.8, 167.5.

IR(KBr): ν(C=O) = 1647 cm⁻¹

Elementární analýza:

Vypočteno: 59.22 % C; 3.82 % H; 5.31 % N.

Nalezeno: 59.38 % C; 4.05 % H; 5.39 % N.

d) 2,4-dihydroxy-*N*-(4-methoxyfenyl)benzamid (2d)

Bylo získáno 1,6 g (62% výtěžek) bílé krystalické látky.

Teplota tání: 191 – 193 °C. (Literatura³⁸ 198 °C.)

Sumární vzorec: C₁₄H₁₃NO₄

Molekulová hmotnost: 259,26 g/mol

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 3.74 (s, 3 H, OCH₃), 6.31 (d, 1 H, *J* = 2.4 Hz, *H*-3), 6.37 (dd, 1 H, *J* = 2.4 Hz, *J* = 8.7 Hz, *H*-5), 6.90-6.96 (m, 2 H, *H*-3', *H*-5'), 7.52-7.58 (m, 2 H, *H*-2', *H*-6'), 7.89 (d, 1 H, *J* = 8.7 Hz, *H*-6), 10.04 (bs, 1 H, *OH*), 10.17 (bs, 1 H, *OH*), 12.47 (bs, 1 H, *NH*).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 55.4, 103.1, 107.5, 107.6, 114.0, 123.1, 130.1, 131.02, 156.1, 162.3, 162.7, 167.6.

IR(KBr): ν(C=O) = 1645 cm⁻¹

Elementární analýza:

Vypočteno: 64.86 % C; 5.05 % H; 5.40 % N.

Nalezeno: 65.03 % C; 5.14 % H; 5.43 % N.

5.1.3 *N*-fenyl-2,5-dihydroxybenzamid

Z kyseliny 2,5-dihydroxybenzoové byly připraveny následující benzanilidy (**3**):

a) 2,5-dihydroxy-*N*-fenylbenzamid (3a)

Bylo získáno 1,3 g (58% výtěžek) bílé krystalické látky.

Teplota tání: 176 – 179 °C. (**Literatura**^{39,40} 187-188 °C; 160 - 163 °C.)

Sumární vzorec: C₁₃H₁₁NO₃

Molekulová hmotnost: 229,24 g/mol

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.02 (d, 1 H, *J* = 8.7 Hz, *H*-3), 7.10-7.17 (m, 1 H, *H*-4'), 7.22 (dd, 1 H, *J* = 2.7 Hz, *J* = 8.7 Hz, *H*-4), 7.34-7.41 (m, 2 H, *H*-3', *H*-5'), 7.67-7.74 (m, 3 H, *H*-6, *H*-2', *H*-6'), 9.78 (bs, 1 H, *OH*), 10.40 (bs, 1 H, *OH*), 11.79 (bs, 1 H, *NH*).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 118.1, 118.3, 121.0, 122.0, 124.5, 127.4, 129.0, 138.3, 142.6, 155.6, 169.7.

IR(KBr): ν(C=O) = 1635 cm⁻¹

Elementární analýza:

Vypočteno: 68.11 % C; 4.84 % H; 6.11 % N.

Nalezeno: 68.23 % C; 4.91 % H; 6.20 % N.

b) 2,5-dihydroxy-*N*-(4-methylfenyl)benzamid (3b)

Bylo získáno 1,7 g (71% výtěžek) bílé krystalické látky.

Teplota tání: 208 – 210 °C.

Sumární vzorec: C₁₄H₁₃NO₃

Molekulová hmotnost: 243,26 g/mol

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.27 (s, 3 H, *CH*₃), 6.80 (d, 1 H, *J* = 8.7 Hz, *H*-3), 6.87 (dd, 1 H, *J* = 3.0 Hz, *J* = 8.7 Hz, *H*-4), 7.12-7.17 (m, 2 H, *H*-3', *H*-5'), 7.36 (d, 1 H, *J* = 3.0 Hz, *H*-6), 7.54-7.59 (m, 2 H, *H*-2', *H*-6'), 9.10 (bs, 1 H, *OH*), 10.32 (bs, 1 H, *OH*), 11.10 (bs, 1 H, *NH*).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 20.7, 114.7, 118.0, 118.1, 120.9, 121.3, 129.4, 133.3, 136.0, 149.9, 150.9, 166.0.

IR(KBr): ν(C=O) = 1636 cm⁻¹

Elementární analýza:

Vypočteno: 69.12 % C; 5.39 % H; 5.76 % N.

Nalezeno: 69.01 % C; 5.66 % H; 5.87 % N.

c) *N*-(4-chlorfenyl)-2,5-dihydroxybenzamid (3c)

Bylo získáno 1,5 g (59% výtěžek) bílé krystalické látky.

Teplota tání: 204 – 207 °C.

Sumární vzorec: C₁₃H₁₀ClNO₃

Molekulová hmotnost: 263,68 g/mol

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 6.82 (d, 1 H, *J* = 8.7 Hz, *H*-3), 6.88 (dd, 1 H, *J* = 2.7 Hz, *J* = 9.0 Hz, *H*-4), 7.33 (d, 1 H, *J* = 2.7 Hz, *H*-6), 7.36-7.44 (m, 2 H, *H*-3', *H*-5'), 7.71-7.78 (m, 2 H, *H*-2', *H*-6'), 9.14 (bs, 1 H, *OH*), 10.48 (bs, 1 H, *OH*), 10.95 (bs, 1 H, *NH*).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 114.8, 118.1, 118.3, 121.4, 122.3, 127.8, 128.9, 137.6, 149.9, 150.6, 166.1.

IR(KBr): ν(C=O) = 1635 cm⁻¹

Elementární analýza:

Vypočteno: 59.22 % C; 3.82 % H; 5.31 % N.

Nalezeno: 59.15 % C; 3.94 % H; 5.38 % N.

d) *N*-(4-methoxyfenyl)-2,5-dihydroxybenzamid (3d)

Bylo získáno 1,6 g (63% výtěžek) bílé krystalické látky.

Teplota tání: 113-114 °C. (**Literatura**³⁹ 114 – 115 °C.)

Sumární vzorec: C₁₄H₁₃NO₄

Molekulová hmotnost: 259,26 g/mol

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 3.75 (s, 3 H, OCH₃), 6.81 (d, 1 H, *J* = 8.7 Hz, *H*-3), 6.89 (dd, 1 H, *J* = 2.7 Hz, *J* = 8.7 Hz, *H*-4), 6.91-6.96 (m, 2 H, *H*-3', *H*-5'), 7.38 (d, 1 H, *J* = 2.7 Hz, *H*-6), 7.56-7.62 (m, 2 H, *H*-2', *H*-6'), 9.09 (bs, 1 H, *OH*), 10.28 (bs, 1 H, *OH*), 11.19 (bs, 1 H, *NH*).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 55.4, 114.1, 114.5, 117.7, 118.0, 121.3, 122.7, 131.5, 149.8, 151.2, 156.1, 166.1.

IR(KBr): ν(C=O) = 1680 cm⁻¹

Elementární analýza:

Vypočteno: 64.86 % C; 5.05 % H; 5.40 % N.

Nalezeno: 64.95 % C; 5.18 % H; 5.38 % N.

5.1.4 *N*-fenyl-2,6-dihydroxybenzamidy

Z kyseliny 2,6-dihydroxybenzoové byly připraveny následující benzanilidy (**4**):

a) 2,6-dihydroxy-*N*-fenylbenzamid (4a)

Bylo získáno 4,3 g (72% výtěžek) bílé krystalické látky.

Teplota tání: 195 – 197 °C. (**Literatura**^{41,42} 196 °C; 196 – 197 °C.)

Sumární vzorec: C₁₃H₁₁NO₃

Molekulová hmotnost: 229,24 g/mol

¹H NMR (300 MHz, DMSO): δ = 6.41 (d, 2 H, *J* = 8.4 Hz, *H*-3, *H*-5), 7.10-7.15 (m, 1 H, *H*-4'), 7.19 (t, 1 H, *J* = 8.4 Hz, *H*-4), 7.32-7.38 (m, 2 H, *H*-3', *H*-5'), 7.61-7.65 (m, 2 H, *H*-2', *H*-6'), 10.73 (bs, 1 H, *NH*), 12.24 (bs, 2 H, *OH*).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO): δ = 104.3, 107.6, 121.2, 124.7, 129.2, 133.8, 13.7, 159.8, 168.3.

IR(KBr): ν(C=O) = 1654 cm⁻¹

Elementární analýza:

Vypočteno: 68.11 % C; 4.84 % H; 6.11 % N.

Nalezeno: 68.22 % C; 4.96 % H; 6.16 % N.

b) 2,6-dihydroxy-*N*-(4-methylfenyl)benzamid (4b)

Bylo získáno 4,8 g (76% výtěžek) bílé krystalické látky.

Teplota tání: 201 – 203 °C. (**Literatura**⁴² 198 – 199 °C.)

Sumární vzorec: C₁₄H₁₃NO₃

Molekulová hmotnost: 243,26 g/mol

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.28 (s, 3 H, *CH*₃), 6.43 (d, 2 H, *J* = 8.4 Hz, *H*-3, *H*-5), 7.16-7.22 (m, 3 H, *H*-4, *H*-3', *H*-5'), 7.50-7.56 (m, 2 H, *H*-2', *H*-6'), 10.69 (bs, 1 H, *NH*), 12.34 (bs, 2 H, *OH*).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 20.7, 104.1, 107.6, 121.2, 129.5, 133.8, 133.9, 135.1, 159.9, 168.3.

IR: ν(C=O) = 1651 cm⁻¹

Elementární analýza:

Vypočteno: 69.12 % C; 5.39 % H; 5.76 % N.

Nalezeno: 68.88 % C; 5.51 % H; 5.81 % N.

c) *N*-(4-chlorofenyl)-2,6-dihydroxybenzamid (4c)

Bylo získáno 4,3 g (63% výtěžek) bílé krystalické látky.

Teplota tání: 225 - 228 °C. (**Literatura**⁴³ 224 °C.)

Sumární vzorec: C₁₃H₁₀ClNO₃

Molekulová hmotnost: 263,68 g/mol

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 6.42 (d, 2 H, J = 8.1 Hz, H -3, H -5), 7.19 (t, 1 H, J = 8.1 Hz, H -4), 7.39-7.45 (m, 2 H, H -3', H -5'), 7.66-7.72 (m, 2 H, H -2', H -6'), 10.74 (bs, 1 H, NH), 11.97 (bs, 2 H, OH).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ = 105.1, 107.5, 122.6, 128.2, 129.0, 133.7, 136.8, 159.5, 168.1.

IR(KBr): $\nu(\text{C}=\text{O}) = 1648 \text{ cm}^{-1}$

Elementární analýza:

Vypočteno: 59.22 % C; 3.82 % H; 5.31 % N.

Nalezeno: 59.40 % C; 3.89 % H; 5.41 % N.

d) *N*-(4-methoxyfenyl)-2,6-dihydroxybenzamid (4d)

Bylo získáno 3,7 g (55% výtěžek) bílé krystalické látky.

Teplota tání: 213 – 215 °C. (Literatura⁴² 213 – 214 °C.)

Sumární vzorec: $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{NO}_4$

Molekulová hmotnost: 259,26 g/mol

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 3.75 (s, 3 H, OCH_3), 6.42 (d, 2 H, J = 8.1 Hz, H -3, H -5), 6.90-6.97 (m, 2 H, H -3', H -5'), 7.20 (t, 1 H, J = 8.1 Hz, H -4), 7.52-7.58 (m, 2 H, H -2', H -6'), 10.63 (bs, 1 H, NH), 12.40 (bs, 2 H, OH).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ = 55.4, 103.8, 107.6, 114.2, 122.9, 130,5, 133.8, 156.4, 160.0, 168.1.

IR: $\nu(\text{C}=\text{O}) = 1652 \text{ cm}^{-1}$

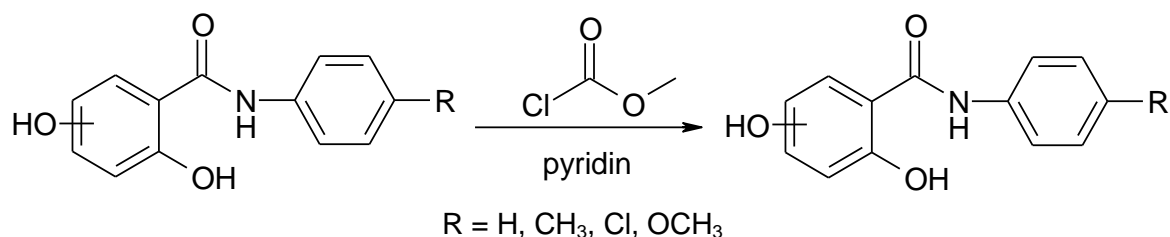
Elementární analýza:

Vypočteno: 64.86 % C; 5.05 % H; 5.40 % N.

Nalezeno: 64.96 % C; 5.26 % H; 24.50 % N.

5.2 PŘÍPRAVA HYDROXYDERIVÁTŮ 3-FENYL-2*H*-1,3-BENZOXAZIN-2,4(3*H*)-DIONU

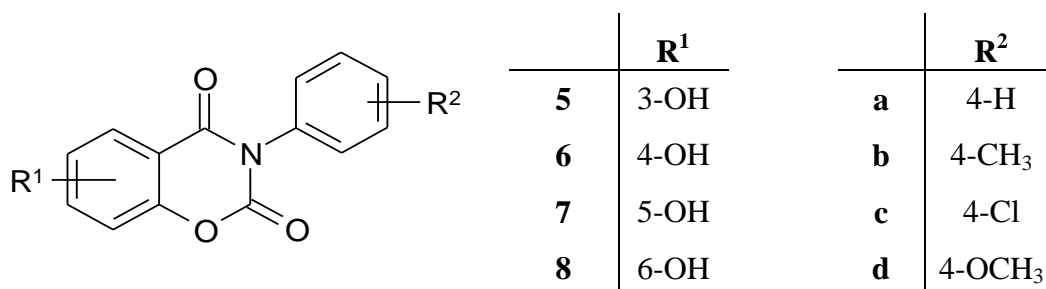
Schéma reakce:



Obecný postup:

Do 150ml destilační baňky bylo předloženo 0,005 mol výchozího dihydroxybenzanilidu a 40 ml pyridinu a směs byla ochlazena ve směsi voda-led-NaCl na -5 - 0 °C. Poté bylo přikapáno 0,5 ml (0,006 mol) methyl-chlorformiátu (teplota směsi nesmí překročit +5 °C) a ponecháno ještě 10 minut míchat při laboratorní teplotě. Reakční směs byla zahřívána pod zpětným chladičem na olejové lázni 2 hodiny a poté míchána 12 hodin za laboratorní teploty. Následně byla reakční směs převedena do kádinky, okyselena 5% HCl na hodnotu pH = 6, což se projevilo vznikem bílého zákalu, a poté ponechána v lednici dokud se nevytvořily krystaly. Vzniklý produkt byl odfiltrován na Büchnerově nálevce a několikrát promyt vodou. Produkt byl rekrystalován z ethanolu.

Látky (**5a-8d**) byly sušeny v exsikátoru, charakterizovány teplotou tání, NMR a IČ spektry a elementární analýzou.



5.2.1 3-fenyl-8-hydroxy-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-diony

Cyklizací odpovídajícího 2,3-dihydroxybenzanilidu (**1**) byly připraveny následující 3-fenyl-8-hydroxy-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-diony (**5**):

a) 3-fenyl-8-hydroxy-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (**5a**)

Bylo získáno 1,1 g (88% výtěžek) bílé krystalické látky.

Teplota tání: 276 - 278,5 °C.

Sumární vzorec: C₁₄H₉NO₄

Molekulová hmotnost: 255,23 g/mol

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.24 (t, 1 H, *J* = 7.8 Hz, *H*-6), 7.31 (dd, 1 H, *J* = 1.8 Hz, *J* = 7.8 Hz, *H*-7), 7.40 (dd, 1 H, *J* = 1.8 Hz, *J* = 7.8 Hz, *H*-5), 7.42-7.54 (m, 5 H, *H*-2', *H*-3', *H*-4', *H*-5', *H*-6'), 10.54 (bs, 1 H, *OH*).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 116.1, 116.9, 122.2, 125.4, 128.8, 129.2, 135.6, 141.7, 145.2, 147.7, 161.1.

IR(KBr): $\nu(\text{C=O}) = 1785 \text{ cm}^{-1}; 1676 \text{ cm}^{-1}$

Elementární analýza:

Vypočteno: 65.88 % C; 3.55 % H; 5.49 % N.

Nalezeno: 65.96 % C; 3.77 % H; 5.58 % N.

b) 8-hydroxy-3-(4-methylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (5b)

Bylo získáno 1,2 g (91% výtěžek) bílé krystalické látky.

Teplota tání: 243 – 245 °C

Sumární vzorec: C₁₅H₁₁NO₄

Molekulová hmotnost: 269,26 g/mol

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 2.37 (s, 3 H, CH₃), 7.23 (t, 1 H, $J = 7.5$ Hz, *H*-6), 7.25-7.34 (m, 5 H, *H*-7, *H*-2', *H*-3', *H*-5', *H*-6'), 7.39 (dd, 1 H, $J = 1.8$ Hz, $J = 7.5$ Hz, *H*-5), 10.49 (bs, 1 H, *OH*).

¹³C-NMR (63 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 20.5, 115.5, 116.5, 121.8, 124.9, 128.0, 129.2, 132.4, 137.9, 141.2, 144.7, 147.3, 160.7.

IR(KBr): $\nu(\text{C=O}) = 1753 \text{ cm}^{-1}; 1701 \text{ cm}^{-1}$

Elementární analýza:

Vypočteno: 66.91 % C; 4.12 % H; 5.20 % N.

Nalezeno: 67.09 % C; 4.22 % H; 5.22 % N.

c) 3-(4-chlorfenyl)-8-hydroxy-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (5c)

Bylo získáno 1,2 g (84% výtěžek) bílé krystalické látky.

Teplota tání: 255 – 257 °C.

Sumární vzorec: C₁₄H₈ClNO₄

Molekulová hmotnost: 289,68 g/mol

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.24 (t, 1 H, $J = 7.8$ Hz, *H*-6), 7.30 (dd, 1 H, $J = 1.8$ Hz, $J = 7.8$ Hz, *H*-7), 7.39 (dd, 1 H, $J = 1.8$ Hz, $J = 7.5$ Hz, *H*-5), 7.44-7.50 (m, 2 H, *H*-3', *H*-5'), 7.54-7.61 (m, 2 H, *H*-2', *H*-6'), 10.55 (bs, 1 H, *OH*).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 116.0, 116.9, 122.3, 125.4, 129.3, 130.8, 133.5, 134.5, 141.6, 145.2, 147.6, 161.1.

IR(KBr): $\nu(\text{C=O}) = 1742 \text{ cm}^{-1}; 1699 \text{ cm}^{-1}$

Elementární analýza:

Vypočteno: 58.05 % C; 2.78 % H; 4.84 % N.

Nalezeno: 57.87 % C; 2.91 % H; 4.84 % N.

d) 8-hydroxy-3-(4-methoxyfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (5d)

Bylo získáno 1,3 g (89% výtěžek) bílé krystalické látky.

Teplota tání: 245 – 247 °C.

Sumární vzorec: C₁₅H₁₁NO₅

Molekulová hmotnost: 285,26 g/mol

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 3.81 (s, 3 H, OCH₃), 7.00-7.07 (m, 2 H, *H*-3', *H*-5'), 7.23 (t, 1 H, *J* = 7.8 Hz, *H*-6), 7.27-7.36 (m, 3 H, *H*-7, *H*-2', *H*-6'), 7.39 (dd, 1 H, *J* = 1.8 Hz, *J* = 7.8 Hz, *H*-5), 10.48 (bs, 1 H, *OH*).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 55.6, 114.4, 116.1, 116.9, 122.1, 125.3, 128.0, 129.9, 141.6, 145.2, 147.9, 159.4, 161.3.

IR(KBr): ν(C=O) = 1766 cm⁻¹; 1704 cm⁻¹

Elementární analýza:

Vypočteno: 63.16 % C; 3.89 % H; 4.91 % N.

Nalezeno: 63.29 % C; 4.11 % H; 4.88 % N.

5.2.2 3-fenyl-7-hydroxy-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-diony

Cyklizací odpovídajícího 2,4-dihydroxybenzanilidu (**2**) byly připraveny následující 3-fenyl-7-hydroxy-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-diony (**6**):

a) 3-fenyl-7-hydroxy-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (6a)

Bylo získáno 1,0 g (81% výtěžek) bílé krystalické látky.

Teplota tání: 283 – 286 °C.

Sumární vzorec: C₁₄H₉NO₄

Molekulová hmotnost: 255,23 g/mol

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 6.74 (d, 1 H, *J* = 2.1 Hz, *H*-8), 6.86 (dd, 1 H, *J* = 2.1 Hz, *J* = 8.7 Hz, *H*-6), 7.38-7.52 (m, 5 H, *H*-2', *H*-3', *H*-4', *H*-5', *H*-6'), 7.82 (d, 1 H, *J* = 8.7 Hz, *H*-5), 11.08 (bs, 1 H, *OH*).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 101.9, 106.3, 114.1, 129.2, 129.5, 130.9, 133.4, 134.4, 148.0, 154.6, 160.3, 164.9.

IR(KBr): ν(C=O) = 1770 cm⁻¹; 1699 cm⁻¹

Elementární analýza:

Vypočteno: 65.88% C; 3.55% H; 5.49% N.

Nalezeno: 65.59% C; 3.62% H; 5.49% N.

b) 7-hydroxy-3-(4-methylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (6b)

Bylo získáno 1,2 g (86% výtěžek) bílé krystalické látky.

Teplota tání: 282 – 285 °C.

Sumární vzorec: C₁₅H₁₁NO₄

Molekulová hmotnost: 269,26 g/mol

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.37 (s, 3 H, CH₃), 6.73 (d, 1 H, *J* = 2.1 Hz, *H*-8), 6.85 (dd, 1 H, *J* = 2.1 Hz, *J* = 8.7 Hz, *H*-6), 7.23-7.31 (m, 4 H, *H*-2', *H*-3', *H*5', *H*-6'), 7.81 (d, 1 H, *J* = 8.7 Hz, *H*-5), 11.07 (bs, 1 H, *OH*).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 21.0, 101.8, 106.4, 114.0, 128.6, 129.5, 129.6, 132.8, 138.2, 148.3, 154.5, 160.4, 164.8.

IR(KBr): ν(C=O) = 1771 cm⁻¹; 1698 cm⁻¹

Elementární analýza:

Vypočteno: 66.91 % C; 4.12 % H; 5.20 % N.

Nalezeno: 66.98 % C; 4.29 % H; 5.23 % N.

c) 3-(4-chlorfenyl)-7-hydroxy-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (6c)

Bylo získáno 1,1 g (77% výtěžek) bílé krystalické látky.

Teplota tání: 250 – 252 °C.

Sumární vzorec: C₁₄H₈ClNO₄

Molekulová hmotnost: 289,68 g/mol

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 6.74 (d, 1 H, *J* = 2.1 Hz, *H*-8), 6.86 (dd, 1 H, *J* = 2.1 Hz, *J* = 8.4 Hz, *H*-6), 7.41-7.47 (m, 2 H, *H*-3', *H*-5'), 7.53-7.59 (m, 2 H, *H*-2', *H*-6'), 7.81 (d, 1 H, *J* = 8.7 Hz, *H*-5), 11.10 (bs, 1 H, *OH*).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 101.9, 106.3, 114.1, 129.2, 129.5, 130.9, 133.4, 134.4, 148.0, 154.6, 160.3, 164.9.

IR(KBr): ν(C=O) = 1766 cm⁻¹; 1703 cm⁻¹

Elementární analýza:

Vypočteno: 58.05 % C; 2.78 % H; 4.84 % N.

Nalezeno: 58.31 % C; 2.86 % H; 4.76 % N.

d) 7-hydroxy-3-(4-methoxyfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (6d)

Bylo získáno 1,2 g (84% výtěžek) bílé krystalické látky.

Teplota tání: 262 – 265 °C.

Sumární vzorec: C₁₅H₁₁NO₅

Molekulová hmotnost: 285,26 g/mol

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 3.80 (s, 3 H, OCH₃), 6.73 (d, 1 H, *J* = 2.1 Hz, *H*-8), 6.85 (dd, 1 H, *J* = 2.1 Hz, *J* = 8.7 Hz, *H*-6), 6.99-7.05 (m, 2 H, *H*-3', *H*-5'), 7.27-7.32 (m, 2 H, *H*-2', *H*-6'), 7.81 (d, 1 H, *J* = 8.7 Hz, *H*-5), 11.05 (bs, 1 H, *OH*).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 56.0, 102.3, 106.9, 114.5, 114.8, 128.5, 130.0, 130.4, 148.8, 155.0, 159.8, 161.0, 165.3.

IR(KBr): ν(C=O) = 1766 cm⁻¹; 1704 cm⁻¹

Elementární analýza:

Vypočteno: 63.16 % C; 3.89 % H; 4.91 % N.

Nalezeno: 63.21 % C; 3.97 % H; 5.06 % N.

5.2.3 3-fenyl-6-hydroxy-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-diony

Cyklizací odpovídajícího 2,5-dihydroxybenzanilidu (**3**) byly připraveny následující 3-fenyl-6-hydroxy-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-diony (**7**):

a) 3-fenyl-6-hydroxy-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (7a)

Bylo získáno 1,1 g (89% výtěžek) bílé krystalické látky.

Teplota tání: 266 – 269 °C.

Sumární vzorec: C₁₄H₉NO₄

Molekulová hmotnost: 255,23 g/mol

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.24 (dd, 1 H, *J* = 2.7 Hz, *J* = 8.7 Hz, *H*-7), 7.28 (d, 1 H, *J* = 2.4 Hz, *H*-5), 7.35 (d, 1 H, *J* = 8.7 Hz, *H*-8), 7.38-7.54 (m, 5 H, *H*-2', *H*-3', *H*-4', *H*-5', *H*-6'), 11.05 (bs, 1 H, *OH*).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 111.3, 115.4, 117.8, 124.2, 128.8, 129.2, 135.6, 145.8, 148.0, 154.7, 160.9.

IR(KBr): ν(C=O) = 1735 cm⁻¹; 1680 cm⁻¹

Elementární analýza:

Vypočteno: 65.88 % C; 3.55 % H; 5.49 % N.

Nalezeno: 65.71 % C; 3.82 % H; 5.53 % N.

b) 6-hydroxy-3-(4-methylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (7b)

Bylo získáno 1,2 g (87% výtěžek) bílé krystalické látky.

Teplota tání: 269 – 272 °C.

Sumární vzorec: C₁₅H₁₁NO₄

Molekulová hmotnost: 269,26 g/mol

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.37 (s, 3 H, CH₃), 7.23 (dd, 1 H, *J* = 3.0 Hz, *J* = 8.7 Hz, *H*-7), 7.26-7.35 (m, 6 H, *H*-5, *H*-8, *H*-2', *H*-3', *H*5', *H*6'), 10.04 (bs, 1 H, *OH*).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 21.0, 111.3, 115.4, 117.8, 124.2, 128.5, 129.7, 132.9, 138.3, 145.8, 148.0, 154.7, 160.9.

IR(KBr): ν(C=O) = 1749 cm⁻¹; 1683 cm⁻¹

Elementární analýza:

Vypočteno: 66.91 % C; 4.12 % H; 5.20 % N.

Nalezeno: 66.59 % C; 4.24 % H; 5.33 % N.

c) 3-(4-chlorfenyl)-6-hydroxy-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (7c)

Bylo získáno 1,2 g (83% výtěžek) bílé krystalické látky.

Teplota tání: 233 – 235 °C.

Sumární vzorec: C₁₄H₈ClNO₄

Molekulová hmotnost: 289,68 g/mol

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.20-7.24 (m, 2 H, *H*-5, *H*-7), 7.34 (d, 1 H, *J* = 8.3 Hz, *H*-8), 7.42-7.47 (m, 2 H, *H*-3', *H*-5'), 7.54-7.59 (m, 2 H, *H*-2', *H*-6'), 10.15 (bs, 1 H, *OH*).

¹³C-NMR (63 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 110.8, 114.8, 117.4, 123.9, 128.8, 130.3, 133.1, 133.9, 145.3, 147.3, 154.2, 160.3.

IR(KBr): ν(C=O) = 1749 cm⁻¹; 1685 cm⁻¹

Elementární analýza:

Vypočteno: 58.05 % C; 2.78 % H; 4.84 % N.

Nalezeno: 57.81 % C; 2.75 % H; 4.84 % N.

d) 6-hydroxy-3-(4-methoxyfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (7d)

Bylo získáno 1,3 g (90% výtěžek) bílé krystalické látky.

Teplota tání: 275 – 278 °C

Sumární vzorec: C₁₅H₁₁NO₅

Molekulová hmotnost: 285,26 g/mol

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 3.81 (s, 3 H, OCH₃), 7.00-7.06 (m, 2 H, *H*-3', *H*-5'), 7.23 (dd, 1 H, *J* = 2.7 Hz, *J* = 8.7 Hz, *H*-7), 7.27 (d, 1 H, *J* = 2.4 Hz, *H*-5), 7.28-7.35 (m, 3 H, *H*-8, *H*-2', *H*-6'), 10.04 (bs, 1 H, *OH*).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 55.6, 111.3, 114.4, 115.4, 117.8, 124.2, 128.0, 129.8, 145.8, 148.2, 154.7, 159.4, 161.0.

IR(KBr): $\nu(\text{C=O}) = 1751 \text{ cm}^{-1}; 1704 \text{ cm}^{-1}$

Elementární analýza:

Vypočteno: 63.16 % C; 3.89 % H; 4.91 % N.

Nalezeno: 62.91 % C; 3.98 % H; 4.84 % N.

5.2.4 3-fenyl-5-hydroxy-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-diony

Cyklizací odpovídajícího 2,6-dihydroxybenzanilidu (**4**) byly připraveny následující 3-fenyl-5-hydroxy-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-diony (**8**):

a) 3-fenyl-5-hydroxy-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dion (**8a**)

Bylo získáno 3,4 g (87% výtěžek) bílé krystalické látky.

Teplota tání: 172 – 173 °C. (**Literatura**⁴⁴ 169-170 °C)

Sumární vzorec: C₁₄H₉NO₄

Molekulová hmotnost: 255,23 g/mol

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 6.88 (d, 1 H, *J* = 8.3 Hz, *H*-6), 6.92 (d, 1 H, *J* = 8.3 Hz, *H*-8), 7.44-7.57 (m, 5 H, *H*-2', *H*-3', *H*-4', *H*-5', *H*-6'), 7.69 (t, 1 H, *J* = 8.3 Hz, *H*-7), 10.78 (bs, 1 H, *OH*).

¹³C-NMR (63 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 100.9, 105.9, 112.0, 128.2, 128.7, 128.8, 133.9, 136.9, 146.7, 152.3, 159.1, 164.3.

IR(KBr): $\nu(\text{C=O}) = 1761 \text{ cm}^{-1}; 1662 \text{ cm}^{-1}$

Elementární analýza:

Vypočteno: 65.88 % C; 3.55 % H; 5.49 % N.

Nalezeno: 65.95 % C; 3.76 % H; 5.63 % N.

b) 5-hydroxy-3-(4-methylfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dion (**8b**)

Bylo získáno 3,9 g (89% výtěžek) bílé krystalické látky.

Teplota tání: 179 – 181 °C. (**Literatura**⁴⁴ 177 - 177,5 °C.)

Sumární vzorec: C₁₅H₁₁NO₄

Molekulová hmotnost: 269,26 g/mol

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.38 (s, 3 H, CH₃), 6.88 (dd, 1 H, *J* = 0.9 Hz, *J* = 8.4 Hz, *H*-6), 6.93 (dd, 1 H, *J* = 0.9 Hz, *J* = 8.1 Hz, *H*-8), 7.29-7.35 (m, 4 H, *H*-2', *H*-3', *H*-5', *H*-6'), 7.69 (t, 1 H, *J* = 8.4 Hz, *H*-7), 10.79 (bs, 1 H, OH).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 21.0, 101.5, 106.4, 112.5, 128.5, 129.8, 31.8, 137.4, 138.7, 147.3, 152.8, 159.7, 165.0.

IR(KBr): ν (C=O) = 1752 cm⁻¹; 1667 cm⁻¹

Elementární analýza:

Vypočteno: 66.91 % C; 4.12 % H; 5.20 % N.

Nalezeno: 66.38 % C; 4.29 % H; 5.26 % N.

c) 3-(4-chlorofenyl)-5-hydroxy-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dion (8c)

Bylo získáno 3,4 g (93% výtěžek) bílé krystalické látky.

Teplota tání: 232 – 234 °C. (Literatura⁴⁴ 226 – 228 °C.)

Sumární vzorec: C₁₄H₈ClNO₄

Molekulová hmotnost: 289,68 g/mol

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 6.84-6.95 (m, 2 H, *H*-6, *H*-8), 7.44-7.52 (m, 2 H, *H*-3', *H*-5'), 7.54-7.62 (m, 2 H, *H*-2', *H*-6'), 7.68 (t, 1 H, *J* = 8.3 Hz, *H*-7), 10.68 (bs, 1 H, OH).

¹³C-NMR (63 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 101.7, 106.7, 112.9, 129.6, 131.0, 133.5, 134.2, 137.7, 147.3, 153.0, 159.9, 164.9.

IR(KBr): ν (C=O) = 1757 cm⁻¹; 1666 cm⁻¹

Elementární analýza:

Vypočteno: 58.05 % C; 2.78 % H; 4.84 % N.

Nalezeno: 57.89 % C; 3.09 % H; 4.86 % N.

d) 5-hydroxy-3-(4-methoxyfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dion (8d)

Bylo získáno 2,8 g (85% výtěžek) bílé krystalické látky.

Teplota tání: 212 – 214 °C.

Sumární vzorec: C₁₅H₁₁NO₅

Molekulová hmotnost: 285,26 g/mol

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 3.81 (s, 3 H, OCH₃), 6.87 (dd, 1 H, *J* = 0.9 Hz, *J* = 8.4 Hz, *H*-6), 6.92 (dd, 1 H, *J* = 0.9 Hz, *J* = 8.1 Hz, *H*-8), 7.02-7.08 (m, 2 H, *H*-3', *H*-5'), 7.33-7.39 (m, 2 H, *H*-2', *H*-6'), 7.69 (t, 1 H, *J* = 8.4 Hz, *H*-7), 10.81 (bs, 1 H, OH).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ (ppm) = 55.6, 101.5, 106.4, 112.4, 114.5, 126.8, 129.8, 137.4, 147.4, 152.8, 159.6, 159.7, 165.2.

IR(KBr): $\nu(\text{C=O}) = 1765 \text{ cm}^{-1}; 1679 \text{ cm}^{-1}$

Elementární analýza:

Vypočteno: 63.16 % C; 3.89 % H; 4.91 % N.

Nalezeno: 63.20 % C; 4.04 % H; 5.07 % N.

5.3 METODY POUŽITÉ V EXPERIMENTÁLNÍ ČÁSTI

Průběh reakcí a čistotu produktů jsem sledovala pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC) na Silufolu UV 254/366. Jako mobilní fázi jsem používala toluen, chloroform, ethyl-acetát nebo směs aceton - hexan v různých poměrech. Produkty jsem čistila sloupcovou chromatografií za použití Silikagelu Merck 60 jako stacionární fáze a směsi aceton - hexan v různých poměrech jako mobilní fáze.

Vzorky k analýze a biologickému hodnocení jsem sušila 8 hodin nad oxidem fosforečným za sníženého tlaku při teplotě 60 °C. Teploty tání jsou stanoveny na automatickém přístroji Büchi Melting Point B-545. Měření ¹H-NMR a ¹³C-NMR spekter bylo prováděno v deuterovaném dimethylsulfoxidu na přístroji Varian Merkurs-Vx BB 300. Chemický posun δ je udáván v jednotkách ppm vzhledem k tetramethylsilanu za použití signálu rozpouštědla jako sekundárního standardu (2,49 pro ¹H a 39,7 pro ¹³C). Infračervená spektra byla měřena v tabletách bromidu draselného na přístroji NICOLET IMPACT 400.

6. VÝSLEDKY A DISKUZE

Byly připraveny čtyři řady dihydroxybenzanilidů (**1-4**) substituovaných v *para*-poloze anilinové části molekuly. Volba substituentů – methyl, chlor, a methoxyskupina - vychází z Toplissova operačního schématu. Přehled připravených dihydroxybenzanilidů je uveden v Příloze (Tab č. 1). Jejich cyklizací byly připraveny čtyři řady odpovídajících 3-fenyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionů, a to s hydroxyskupinou v poloze 8, 7, 6 a 5 (**5-8**). Jejich přehled podává Tab č. 4. Všechny látky byly charakterizovány teplotou tání, IČ a NMR a elementární analýzou.

Při přípravě výchozích dihydroxybenzanilidů (**1-4**) jsem zvolila metodu, která vychází s příslušné dihydroxybenzoové kyseliny a odpovídajícího anilinu. Jako činidlo vytvářející chlorid kyseliny jsem použila chlorid fosforitý a reakce probíhala v chlorbenzenu. Syntézu jsem optimalizovala pro provedení v mikrovlnném reaktoru, při kterém se výrazně zkrátil reakční čas. Oproti zahřívání bez použití reaktoru, které trvá 2 – 3 hodiny,³⁵ se při provedení reakce v mikrovlnném reaktoru zkrátí reakční čas na 20 minut (při výkonu 600 W). Také se osvědčilo před čištěním produktů krystalizací použít sloupcovou chromatografii. Dosažené výtěžky činily 55 – 81 %.

Při syntéze 3-fenyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionů (**5-8**) jsem vycházela z připravených dihydroxybenzanilidů. Použila jsem methyl-chlorformiát jako cyklizační činidlo a pyridin jako rozpouštědlo. Trochu obtížná byla zpočátku izolace produktu z bílé heterogenní směsi, která vznikla po okyselení zředěnou kyselinou chlorovodíkovou. Její ochlazení v mrazicím boxu do vyloučení bílé krystalické látky umožnilo následné odfiltrování produktu. Touto metodou byly připraveny substituované 3-fenyl-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-diony ve výtěžku 77 – 94 %.

Antifungální aktivita připravených látek byla hodnocena mikrodiluční bujonovou metodou *in vitro* vůči *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *Trichosporon asahii* (dříve označován³⁵ jako *T. beigeli*), *Trichophyton mentagrophytes*, *Aspergillus fumigatus* a *Absidia corymbifera* za použití ketokonazolu jako standardu (podrobněji k použité metodě např.³⁵). Minimální inhibiční koncentrace pro dihydroxybenzanilidy (**1-4**) jsou uvedeny v Tab. č. 2 a pro 3-fenyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-diony (**5-8**) v Tab. č. 5 v Příloze.

Jedinou látkou ze skupiny dihydroxybenzanilidů (**1-4**), u níž byla zjištěná alespoň v případě jednoho mikroorganismu aktivita srovnatelná s tímto standardem, byl *N*-(4-

chlorfenyl)-2,6-dihydroxybenzamid (**4c**), a to vůči *T. mentagrophytes* (MIC = 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-1}$). Pokud jde o vliv substituentů v *para*-poloze fenylu na aktivitu, jsou jednoznačně nejúčinnější chlorderiváty (**c**). Nelze však podle nich provést úplné porovnání vlivu polohy hydroxyly na aktivitu, jelikož shodou okolností nebyl testován 2,4-dihydroxyderivát **2c**. Podle tohoto kritéria by byla řada 2,6-dihydroxybenzanilidů **4** účinnější než 2,3-dihydroxybenzanilidy **1**, neboť látka **1c** je aktivnější než **4c** jen vůči dvěma kmenům, *C. tropicalis* a *C. glabrata*. Pokud by se vzala v úvahu všechna data pro obě řady, opravňovalo by to k opačnému závěru, že „v průměru“ jsou aktivnější 2,3-dihydroxybenzanilidy **1**.

Z hodnocení antifungálních dat 3-fenyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionů (**5-8**) vyplývá, že cyklizace biologickou aktivitu zhoršuje. Výjimkou, která stojí za zmínku, je aktivita chlorderivátu **5c** vůči *C. glabrata*, která je srovnatelná (ne-li vyšší) s aktivitou analogického derivátu **1c**. Jako u dihydroxybenzanilidů (**1-4**) platí, že nejúčinnější jsou chlorderiváty (**c**). Posuzujeme-li podle nich vliv polohy hydroxyly na aktivitu, jsou bezpochyby účinnější 2,3-dihydroxy-izomery **5** než 2,6-dihydroxy-izomery **8**. MIC pro *Trichophyton mentagrophytes* (7,8 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-1}$) a *Trichosporon asahii* jsou jediné 2 případy, kdy je látka **8c** aktivnější než její izomer **5c**.

Hodnocení antimykobakteriální aktivity připravených látek *in vitro* na Šulově půdě není dosud ukončeno. Dosud známé minimální inhibiční koncentrace pro dihydroxybenzanilidy (**1-4**) jsou uvedeny v Tab. č. 3 a pro 3-fenyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-diony (**5-8**) v Tab. č. 6 v Příloze.

7. ZÁVĚR

Syntetizovala jsem 16 dihydroxybenzanilidů (z toho šest dosud nepopsaných). Provedením reakce v mikrovlnném reaktoru se dosáhlo podstatného zkrácení reakčního času.

Cyklizací připravených dihydroxybenzanilidů jsem získala 16 hydroxyderivátů 3-fenyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionů (z toho 13 dosud nepopsaných).

Struktura všech produktů byla potvrzena NMR a IČ spektry.

Připravené látky byly podrobeny hodnocení antifungální aktivity; žádná z nich však nebyla účinnější než ketokonazol, použitý jako standard.

Hodnocení antimykobakteriální aktivity dosud není ukončeno.

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Kubicová L., Waisser K.: Biologická aktivita salicylanilidů. Českoslov. Farm. 41, 1992, 208-216.
2. Vinšová J., Imramovský A.: Salicylanilidy – stále aktuální skupina s potenciální antibakteriální aktivitou. Česk. Slov. Farm. 53(6), 2004, 294-299.
3. Waisser K., Kubicová L.: Biologické účinky látek podobných salicylanilidům, 3-aryl-2H,4H-benz[e][1,3]oxazin-2,4-diony a thiosalicylanilidy. Českoslov. Farm. 42, 1993, 218-222.
4. Kubicová L., Waisser K.: Biologické účinky látek podobných salicylanilidům. Benzanilidy. Česk. Slov. Farm. 46, 1997, 99-107.
5. Waisser K., Kubicová L., Dostál H.: Biological effects of substances similar to salicylanilides: Thiobenzanilides. Folia Pharm. Univ. Carol. 23, 1998, 59-66.
6. Waisser K., Kubicová L., Klimešová V., Odlerová. Ž.: New groups of potential antituberculotics: 3-Aryl-2H,4H-benz[e][1,3]oxazin-2,4-diones. Comparison of the Topliss approach with regression analysis. Collect. Czech. Chem. Commun. 1993, 58, 2977-2982.
7. Waisser K., Hladůvková J., Kubicová L., Klimešová V., Buchta V., Odlerová. Ž.: Differences between the structure and activity of potentially antimycobacterial and antifungal compounds. 3-Aryl-2H-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-diones. Comparison of Topliss approach with regression analysis. Sci. Pharm. 1996, 64, 701-707.
8. Waisser K., Bureš O., Holý P., Kuneš J., Oswald R., Jirásková L., Pour M., Klimešová V., Palát, K., Kaustová, J., Danse H.-M., Möllman U.: Antimycobacterial 3-Aryl-2H-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-diones. Pharmazie 58, 2003, 83-93.

9. Waisser K., Matyk J., Divišová H., Husáková P., Kuneš, J., Klimešová V., Palát K., Kaustová J.: The Oriented Development of Antituberculotics (Part II): Halogenated 3-(4-Alkylphenyl)-1,3-benzoxazine-2,4-(3H)-diones. Arch. Pharm.340 (5), 2007, 264-267.
10. Šauliová J.: Užitečné mikrovlny. CHEMagazín 15(1), 2005, 8-10. Dostupný z WWW: http://www.chemagazin.cz/Texty/CHXV_1_cl1.pdf [2008-04-30].
11. CHROMSPEC spol. s r.o.
<<http://www.chromspec.cz/produkty/detail.php?name=microsynth>>. [2008-04-30]
12. Petráš M.: <http://www.vakciny.net/pravidelne_ockovani/TBC.htm> [2008-04-30].
13. Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR - ÚZIS ČR. <<http://www.uzis.cz>> [2008-04-30].
14. Kozáková B.: Současná léčba tuberkulózy. <http://www.zupraha.cz/pracoviste/TBC-mykobakteriozy/soucasna_lecba_tuberkulozy.pdf> [2008-04-30].
15. Státní zdravotní ústav. <<http://www.szu.cz/Menu1/verejnost/tuberkuloza.html>> [2008-04-30].
16. Zdravotnický portál Zdravcentra. < <http://www.zdravcentra.cz/>> [2008-04-30].
17. 1. lékařská fakulta. < <http://www.lf1.cz/upload/tbc.doc>> [2008-04-30].
18. Státní zdravotní ústav. < <http://www.szu.cz/cem/zpravy/zpr0402/tbc.thm>> [2008-04-30].
19. Wanstrat R.: Chem. Ber. 6, 336 (1873); citováno podle Beilstein CrossFire, Beilsteins Informationssysteme GmbH, Frankfurt, Germany.

20. Grimmel H. W., Guenther A., Morgan J. F.: Phosphazo compounds and their use in preparing amides. *J. Amer. Chem. Soc.* 1946, 68(4), 539-542.
21. Lemaire H., Schramm C. H., Cahn A.: Synthesis and germicidal activity of halogenated salicylanilides and related compounds. *J. Pharm. Sci.* 50, 1961, 831-837.
22. Agrawal V. K., Sharma S.: Salicylanilides in the treatment of helminth diseases. *Pharmazie* 39, 1984, 373-378.
23. Kótai A., Szókán G.: New salicylamide derivatives. II. Synthesis of the substituted hydrazides and further derivatives of 4-dimethylaminosalicylic acid. *Acta Pharm. Hungarica* 40, 1970, 108-115.
24. Anschütz R., Mehring H.: Action of phosphorus pentachloride and trichloride on 3:5-dichlorosalicylic acid. *Justus Liebigs Ann. Chem.* 346, 1906, 300-311.
25. Veverková E., Mečiarová M., Toma Š., Balko J.: Synthesis of substituted salicylanilides under microwave irradiation. *Monatsh. Chem.* 134(9), 2003, 1215-19.
26. Petyunin P. A., Berdinskii I. S., Shklyayev V. S.: Reaction of N,N-bis(halomagnesium)arylamines with esters and acyl halides. *Zh. Obshch. Khim.* 24, 1954, 181-182.
27. Ioffe I. S., Zal'manovich M. Z.: N-Substituted amides of salicylic acid and its derivatives. I. Arylamides of 3,5-dichlorosalicylic acid and 5-nitrosalicylic acid. *Zh. Obshch. Khim.* 29, 1959, 2682-2685.
28. Desai R. D.: Some new observations on the Friedel-Crafts reaction. *J. Indian Chem. Soc.* 45(3), 1968, 193-199.
29. Balduzzi G., Bigi F., Casiraghi G., Casnati G., Sartori G.: Unusual Friedel-Crafts reactions. 5. Synthesis of salicylanilides via ortho-aminocarbonylation of phenols with phenyl isocyanate. *Synthesis* 10, 1982, 879-881.

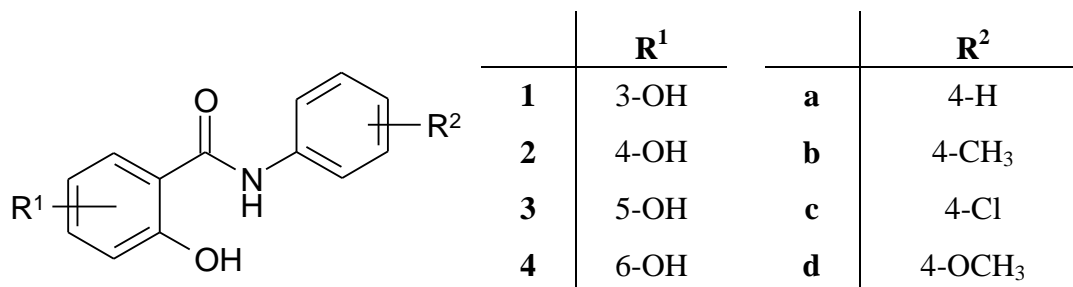
30. Daidone G., Maggio B., Schillaci D.: Salicylanilide and its heterocyclic analogues. A comparative study of their antimycobacterial activity. *Pharmazie*, 45, 1990, 441-442.
31. Salicyl-o-toluidin. *Org. Synth.*, Coll. Vol. 3, 765-767. Wiley, New York 1955.
32. Waisser K., Dražková K., Kuneš J., Klimešová V., Kaustová J.: Antimycobacterial *N*-pyridinylsalicylamides, isosters of salicylamides. *Farmaco* 59, 2004, 615-625.
33. *p*-Chlorfenyl salicylate. *Org. Synth.*, Coll. Vol. 4. 178-179. Wiley, New York 1963.
34. Wagner G., Singer D., Weuffen W.: Untersuchungen über 2-hydroxythiobenzamide und 2-hydroxythiobenzanilide. *Pharmazie* 21, 1966, 161-166.
35. Bureš O.: Vztahy mezi strukturou a antimykobakteriální aktivitou v poloze 4 substituovaných salicylanilidů a jim odpovídajících 3-aryl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionů a jejich sírných derivátů. Disertační práce, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové Univerzita Karlova v Praze, 2002.
36. Butt A., Khan A. M., Perveen R., Kemal R.: Synthesis of heterobicyclic compounds. III. Formation of 2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-dione. *Pakistan J. Sci. Ind. Res.* 14(3), 1972, 192-193.; *Chem. Abstr.* 76: 46151
37. Shibuya I., Goto M., Shimizu M., Yanagisawa M., Gama Y.: Silver(I) ion-mediated desulfurization-cyclization of isothiocyanates with several hydroxy acids and *N*-substituted amino acids. *Heterocycles* 51(11), 1999, 2667-2673.
38. Byatnal V. N., Desai R. D.: The Friedel-Crafts reaction. X. The action of acetic anhydride on the arylamides of β -resorcylic acid. *J. Indian Chem. Soc.* 29, 1952, 555-559.
39. Eastman Kodak Co. (US) Hydroxybenzamides for stabilization of normally oxidizable materials. Bell A., Lappin G. R. (inventors). US 2848335. 1958-08-19.; *Chem. Abstr.* 53:8419.

40. Scott G.; Wroblewski A. D., Aubé J.: Regioselective single and double conjugate additions to substituted cyclohexa-2,5-dienone monoacetals. *Org. Lett.* 7(15), 2005, 3167-70.
41. Farbwerke Hoechst A.-G. (DE). 2,6-Dihydroxybenzoesäure-anilide und ihre Verwendung als Pflanzenschutzmittel. Ruschig H., König J., Haertel K. (inventors). DE, Ger. Offen. 1945255 A. 1971-03-18.; Chem. Abstr. 74: 141320.
42. Desai R. D., Marballi M. S.: Coumarins from arylamides of β -resorcylic acid. *J. Sci. Ind. Res.* 11B, 1952, 292-294.
43. Ruschig H., König J., Düvel D., Loewe H.: 2,6-Dihydroxybenzoesäurederivate als Anthelminthika. *Arzneim. Forsch.* 23(12), 1973, 1745-1758.
44. Nippon Soda Co (JP). 2,3-Dihydro-4H-1,3-benzoxazines. Yasuda Y., Kosaka S., Myazaki Y., Yakushiji M. (inventors). JP 51004183. 1976-01-14.; Chem. Abstr. 85: 21389.

9. PŘÍLOHY

Tabulka č. 1

Přehled připravených dihydroxybenzanilidů



Látka	Sumární vzorec	<i>M_r</i> g/mol	Výtěžek %	T. tání (Lit.) °C	$\nu(\text{C}=\text{O})$ cm ⁻¹
1a	C ₁₃ H ₁₁ NO ₃	229,24	75	113-114	1642
1b	C ₁₄ H ₁₃ NO ₃	243,26	81	161-163	1653
1c	C ₁₃ H ₁₀ ClNO ₃	263,68	69	137-139	1647
1d	C ₁₄ H ₁₃ NO ₄	259,26	77	129-130	1640
2a	C ₁₃ H ₁₁ NO ₃	229,24	66	132-134 (139; 129-132)	1653
2b	C ₁₄ H ₁₃ NO ₃	243,26	71	164-166 (178-9)	1636
2c	C ₁₃ H ₁₀ ClNO ₃	263,68	55	166-168	1647
2d	C ₁₄ H ₁₃ NO ₄	259,26	62	191-193 (198)	1645
3a	C ₁₃ H ₁₁ NO ₃	229,24	58	176-179 (187-8; 160-3)	1635
3b	C ₁₄ H ₁₃ NO ₃	243,26	71	208-210	1636
3c	C ₁₃ H ₁₀ ClNO ₃	263,68	59	204-207	1635
3d	C ₁₄ H ₁₃ NO ₄	259,26	63	114-115 (114-5)	1680
4a	C ₁₃ H ₁₁ NO ₃	229,24	72	195-197 (196; 196-7)	1654
4b	C ₁₄ H ₁₃ NO ₃	243,26	76	201-203 (198-9)	1651
4c	C ₁₃ H ₁₀ ClNO ₃	263,68	63	225-228 (224)	1648
4d	C ₁₄ H ₁₃ NO ₄	259,26	55	213-215 (213-4)	1652

Tabulka č. 2

Antifungální aktivita dihydroxybenzanilidů *in vitro* – MIC ($\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-1}$)

Látka	CA		CT		CK		CG		TA		AF		AC		TM	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	72 h	120 h
1a	15,63	62,5	7,81	15,63	62,5	62,5	7,81	15,63	62,5	125	62,5	250	125	125	31,25	31,25
1b	31,25	62,5	7,8	15,62	31,25	62,5	7,8	15,62	62,5	125	125	125	62,5	62,5	31,25	31,25
1c	7,81	31,25	3,91	7,81	15,63	31,25	3,91	7,81	31,25	62,5	31,25	125	62,5	31,25	7,81	15,63
1d	31,25	62,5	62,5	62,5	31,25	62,5	62,5	62,5	31,25	62,5	62,5	250	15,62	15,62	31,25	31,25
2a	62,5	125	250	250	250	250	250	250	250	250	125	250	250	250	31,25	62,5
2b	125	500	500	>500	500	>500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500
2c	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2d	250	500	>500	>500	>500	>500	500	>500	500	500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
3b	125	250	250	250	500	500	250	500	250	250	250	250	250	250	125	125
3c	31,25	62,5	125	125	125	250	125	250	250	250	125	250	125	250	31,25	62,5
3d	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
4a	250	250	250	250	125	250	125	250	62,5	250	62,5	250	125	250	31,25	31,25
4b	15,63	31,25	62,5	62,5	31,25	31,25	62,5	62,5	31,25	62,5	31,25	62,5	62,5	62,5	7,81	15,63
4c	3,91	7,81	15,63	31,25	7,81	7,81	15,63	31,25	7,81	15,63	15,63	31,25	15,63	31,25	1,95	1,95
4d	125	125	250	500	125	250	250	250	125	250	125	250	125	125	125	125
ketokonazol	0,061	0,122	1,95	3,91	1,95	3,91	0,49	1,95	0,061	0,122	7,81	7,81	15,63	31,25	0,49	1,95

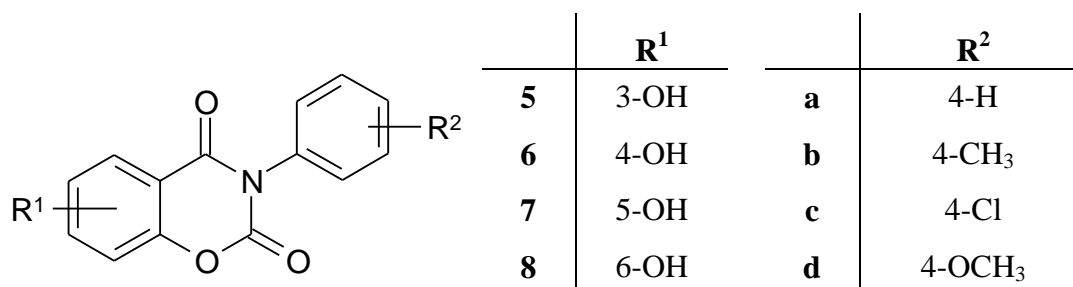
Testované kmeny: CA - *Candida albicans*, CT- *Candida tropicalis*, CK - *Candida krusei*, CG - *Candida glabrata*, TA- *Trichosporon asahii*, TM- *Trichophyton mentagrophytes*, AF - *Aspergillus fumigatus*, AC - *Absidia corymbifera*

Tabulka č. 3Antimykobakteriální aktivita *N*-fenyldihydroxybenzamidů *in vitro* - MIC ($\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-1}$)

Látka	<i>M. tuberculosis</i> My 331/88		<i>M. avium</i> My 330/88		<i>M. kansasii</i> My 235/80			<i>M. kansasii</i> 6509/96		
	14 d	21 d	14 d	21 d	7 d	14 d	21 d	7 d	14 d	21 d
1a	125	250	500	500	250	250	500	250	500	500
1b	250	250	500	500	125	250	500	125	250	500
1c	250	500	500	500	250	500	500	125	250	500
1d	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
4a	32	62,5	62,5	125	32	62,5	62,5	32	62,5	62,5
4b	62,5	62,5	32	62,5	32	62,5	62,5	32	62,5	62,5
4c	32	62,5	32	62,5	16	32	62,5	16	32	62,5
4d	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
INH	0,5	0,5	>250	>250	>250	>250	>250	2	4	4

Tabulka č. 4

Přehled připravených *N*-fenyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionů



Látka	Sumární vzorec	<i>M_r</i> g/mol	Výtěžek %	T. tání (Lit.) °C	$\nu(\text{C}=\text{O})$ cm ⁻¹
5a	C ₁₄ H ₉ NO ₄	255,23	88	276-278	1785, 1676
5b	C ₁₅ H ₁₁ NO ₄	269,26	91	243-245	1753, 1701
5c	C ₁₄ H ₈ ClNO ₄	289,68	94	255-257	1742, 1699
5d	C ₁₅ H ₁₁ NO ₅	285,26	89	245-247	1766, 1704
6a	C ₁₄ H ₉ NO ₄	255,23	81	283-286	1770, 1699
6b	C ₁₅ H ₁₁ NO ₄	269,26	86	282-285	1771, 1698
6c	C ₁₄ H ₈ ClNO ₄	289,68	77	250-252	1766, 1703
6d	C ₁₅ H ₁₁ NO ₅	285,26	84	262-265	1766, 1704
7a	C ₁₄ H ₉ NO ₄	255,23	89	266-269	1735, 1680
7b	C ₁₅ H ₁₁ NO ₄	269,26	87	269-272	1749, 1683
7c	C ₁₄ H ₈ ClNO ₄	289,68	83	233-235	1749, 1685
7d	C ₁₅ H ₁₁ NO ₅	285,26	90	275-278	1751, 1706
8a	C ₁₄ H ₉ NO ₄	255,23	87	172-173 (169-170)	1761, 1662
8b	C ₁₅ H ₁₁ NO ₄	269,26	89	179-181 (177-7,5)	1752, 1667
8c	C ₁₄ H ₈ ClNO ₄	289,68	93	232-234 (226-228)	1757, 1666
8d	C ₁₅ H ₁₁ NO ₅	285,26	85	212-214	1765, 1679

Tabulka č. 5

Antifungální aktivita *N*-fenyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionů *in vitro* – MIC ($\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-1}$)

Látka	CA		CT		CK		CG		TA		AF		AC		TM	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	72 h	120 h
5a	125	250	250	250	250	250	62,5	62,5	250	250	250	500	250	250	125	125
5b	125	125	125	250	125	125	15,62	31,25	62,5	125	125	250	125	125	31,25	31,25
5c	15,62	31,25	31,25	62,5	31,25	31,25	3,9	3,9	31,25	62,5	62,5	125	15,62	31,25	62,5	62,5
5d	125	125	250	250	125	125	31,25	31,25	250	250	250	500	250	250	250	250
6a	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	500	500	>500	>500	>500	>500	>500	>500
6b	500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	250	500
6c	500	500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	500	500	125	250
6d	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
7a	500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	250	250
7b	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	250	250
7c	250	500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	>500	250	>500	>500	>500	125	125
7d	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	>500	>500	>500	>500	250
8a	125	250	250	500	250	250	500	500	125	125	125	250	250	250	31,25	31,25
8b	125	125	125	125	125	125	250	250	62,5	125	62,5	125	125	125	31,25	31,25
8c	125	125	125	125	125	125	125	125	7,81	15,62	125	125	125	125	7,81	7,81
8d	250	250	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
ketokonazol	0,061	0,122	1,95	3,91	1,95	3,91	0,49	1,95	0,061	0,122	7,81	7,81	15,63	31,25	0,49	1,95

Testované kmeny: CA - *Candida albicans*, CT- *Candida tropicalis*, CK - *Candida krusei*, CG - *Candida glabrata*, TA- *Trichosporon asahii*, TM- *Trichophyton mentagrophytes*, AF - *Aspergillus fumigatus*, AC - *Absidia corymbifera*

Tabulka č. 6Antimykobakteriální aktivita *N*-fenyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionů *in vitro* -MIC ($\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-1}$)

Látka	<i>M. tuberculosis</i> My 331/88		<i>M. avium</i> My 330/88		<i>M. kansasii</i> My 235/80			<i>M. kansasii</i> 6509/96		
	14 d	21 d	14 d	21 d	7 d	14 d	21 d	7 d	14 d	21 d
8a	32	62,5	32	62,5	32	62,5	125	32	62,5	125
8b	32	62,5	32	62,5	16	32	62,5	16	32	62,5
8c	16	32	16	32	16	32	62,5	16	32	62,5
INH	0,5	0,5	>250	>250	>250	>250	>250	2	4	4