

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Chemie  
Studijní obor: Chemie životního prostředí



Bc. Petra Kohoutová, DiS.

QSPR A ELEKTROCHEMICKÁ OXIDACE DERIVÁTŮ  
*N*-BENZYLSALICYLTHIOAMIDŮ

QSPR and Electrochemical Oxidation  
of *N*-benzylsalicylthioamides

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Karel Nesměrák, Ph.D.

Praha 2013

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857.

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

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

V Praze dne 22. května 2013

## Abstrakt

Cílem této diplomové práce bylo studium vlivu substituentů na voltametrické chování nově syntetizovaných *N*-benzylsalicylthioamidů a příprava a identifikace produktů jejich elektrochemické oxidace. Voltametrické charakteristiky byly studovány metodou DC voltametrie s rotující diskovou elektrodou v nevodném prostředí. QSER analýzou byl kvantifikován vliv substituentů na anodický půlvlnový potenciál a získány statisticky platné korelační rovnice. Byl prostudován i vliv reakčního prostředí na průběh elektrochemické oxidace. Produkty elektrochemické oxidace dvou vybraných *N*-benzylsalicylthioamidů byly připraveny metodou preparativní elektrolýzy. V obou případech byl identifikován jediný produkt obdobného složení. Bylo navrženo obecné schéma elektrooxidace studovaných *N*-benzylsalicylthioamidů: elektrochemická oxidace je zahájena odebráním elektronů z atomu síry, po němž následuje přesun náboje na atom dusíku; po následném odštěpení sirovodíku se mezi dvěma molekulami příslušného *N*-benzylsalicylthioamidu uzavře nový kruh.

**Klíčová slova:** *N*-benzylsalicylthioamidy, elektrochemická oxidace, DC voltametrie, QSER, preparativní elektrolýza

## Abstract

The study of the substituent effect on the voltammetric behaviour of newly synthesized *N*-benzylsalicylthioamides and the preparation and identification of products of their electrooxidation were the aims of this thesis. The voltametric characteristics were measured by DC voltammetry on a rotating disc electrode in a non-aqueous media. Using QSER, the effect of substituents on the anodic half-wave potential was quantified, and statistically valid correlation equations were obtained. The influence of reaction media on the compounds electrooxidation was also studied. Using preparative electrolysis, the electrooxidation products of two selected *N*-benzylsalicylthioamides were obtained. The one (structurally similar) product was identified in both cases. The following general scheme of electrochemical oxidation of *N*-benzylsalicylthioamides studied was proposed: the electrooxidation starts on sulphur atom by elimination of electrons, followed by translocation of charge on nitrogen atom, then hydrogen sulphite is eliminated, and a new ring is closed between two molecules of appropriate *N*-benzylsalicylthioamide.

**Key words:** *N*-benzylsalicylthioamides, electrochemical oxidation, DC voltammetry, QSER, preparative electrolysis

## Poděkování

Děkuji RNDr. Karlu Nesměrákovi, Ph.D. za cenné rady, podněty a připomínky při zpracování diplomové práce.

## Obsah

1	ÚVOD .....	8
1.1	Cíl diplomové práce .....	8
1.2	Thioamidy .....	9
1.2.1	Chemické a fyzikální vlastnosti thioamidů .....	9
1.2.2	Deriváty thioamidu jako potenciální antituberkulotika .....	11
1.2.3	Příprava a biologické vlastnosti studovaných látek .....	13
1.2.4	Další možnosti farmaceutického využití thioamidů .....	15
1.2.5	Elektrochemické studie thioamidů .....	16
1.3	Vliv substituentů na fyzikálně-chemické chování látek .....	17
1.4	Využití elektrochemické oxidace při studiu metabolických přeměn farmaceuticky aktivních látek .....	19
2	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	21
2.1	Studované látky .....	21
2.2	Použité chemikálie .....	22
2.3	Použité metody .....	22
2.3.1	DC voltametrie s rotující diskovou elektrodou .....	22
2.3.2	Molekulová absorpční spektrometrie v UV oblasti .....	22
2.3.3	Preparativní elektrolýza .....	23
2.3.4	Kapalinová chromatografie s hmotnostním detektorem .....	23
2.4	QSAR, regresní a statistické výpočty .....	24
3	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	25
3.1	Vliv substituentů na voltametrické chování látek .....	25
3.1.1	Stanovení voltametrických charakteristik .....	25
3.1.2	QSER s energiemi HOMO orbitalů .....	29
3.1.3	QSER se substituentovými konstantami .....	31
3.1.4	Diskuse .....	33
3.2	Vliv prostředí na voltametrické chování látek .....	34
3.2.1	Studium vlivu prostředí .....	34
3.2.2	Diskuse .....	37
3.3	Příprava a identifikace elektrooxidačních produktů .....	38
3.3.1	Příprava elektrooxidačních produktů .....	38
3.3.2	Identifikace produktů elektrooxidace .....	40
3.3.3	Diskuse .....	42
4	Závěr .....	44
	Literatura .....	46

## Seznam použitých zkratek a symbolů

$a$	směrnice kalibrační přímky
$A$	plocha elektrody [ $\text{cm}^2$ ] <i>nebo</i> absorbance
$b$	úsek kalibrační přímky
$c$	molární koncentrace [ $\text{mol dm}^{-3}$ ]
DBU	1,8-diazabicyklo[5.4.0]-undec-7-en
DC	direct-current voltametrie
$E$	elektrodový potenciál [V]
$E_{1/2}$	půlvlnový potenciál [V]
$(E_{1/2})_H$	půlvlnový potenciál nesubstituovaného derivátu [V]
$(E_{1/2})_X$	půlvlnový potenciál substituovaného derivátu [V]
$E_{1/2}^{\text{exp}}$	experimentální hodnota půlvlnového potenciálu [V]
$E_{1/2}^{\text{pred}}$	vypočítaná hodnota půlvlnového potenciálu [V]
$F$	“field” substituentová konstanta dle Norringtona <i>nebo</i> hodnota F-testu
$F_{R1}$	Norringtonova substituentová konstanta substituentu na salicylovém kruhu
$F_{R2}$	Norringtonova substituentová konstanta substituentu na benzylovém kruhu
$F_{m, n, \alpha}$	tabelovaná kritická hodnota F-testu pro $n$ měření a $m$ stupňů volnosti na hladině významnosti $\alpha$
HOMO	nejvyšší obsazený molekulový orbital
$I$	proud [A]
$I_{\text{lim}}$	limitní konvektivně-difúzní proud [ $\mu\text{A}$ ]
$K_H$	rovnovážná nebo rychlostní konstanta nesubstituovaného derivátu
$K_X$	rovnovážná nebo rychlostní konstanta substituovaného derivátu
$l$	délka absorbujícího prostředí [cm]
LUMO	nejnižší neobsazený molekulový orbital
$m$	hmotnost [g]
$M$	molární hmotnost [ $\text{g mol}^{-1}$ ]
MIC	minimální inhibiční koncentrace [ $\mu\text{mol l}^{-1}$ ]
MS	hmotnostní spektroskopie
$m/z$	hmotnost/náboj
$n$	počet měření
QSAR	Quantitative structure-activity relationships
QSER	Quantitative structure-electrochemistry relationships
QSPR	Quantitative structure-property relationships
$r$	korelační koeficient

---

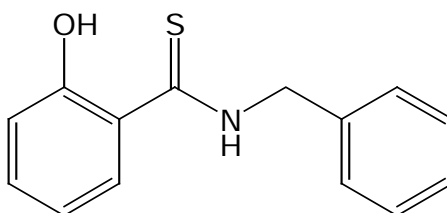
$R$	„resonance“ substituentová konstanta dle Norringtona
$R_{R1}$	Norringtonova substituentová konstanta substituentu na salicylovém kruhu
$R_{R2}$	Norringtonova substituentová konstanta substituentu na benzylovém kruhu
$s_y$	směrodatná odchylka lineární regrese
$t$	čas [s] <i>nebo</i> teplota [°C]
UV	ultrafialová oblast spektra
$\nu$	rychlost polarizace elektrody [ $V s^{-1}$ ] <i>nebo</i> vlnčet [ $cm s^{-1}$ ]
$V$	objem [ml]
$\alpha$	hladina významnosti
$\epsilon_{HOMO}$	energie nejvyššího obsazeného molekulového orbitalu [eV]
$\lambda$	vlnová délka [nm]
$\sigma$	Hammetova substituentová konstanta
$\sigma_{R1}$	Hammetova substituentová konstanta substituentu na salicylovém kruhu
$\sigma_{R2}$	Hammetova substituentová konstanta substituentu na benzylovém kruhu
$\rho$	Hammetova reakční $\rho$ konstanta
$\omega$	úhlová rychlost rotace elektrody [ $s^{-1}$ ]

# 1 ÚVOD

## 1.1 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem této předkládané diplomové práce je studium elektrochemické oxidace nově syntetizovaných derivátů *N*-benzylsalicylthioamidu (obr. 1.1). Struktury všech studovaných látek jsou uvedeny v tabulce 2.1 (na str. 21) společně s číslováním, jež je použito v celé práci.

První část práce se zabývá studiem vlivu substituentů na voltametrické chování studovaných látek a jeho popisem příslušnými QSER rovnicemi. Druhá část práce je zaměřena na přípravu a identifikaci produktů elektrochemické oxidace vybraných derivátů.



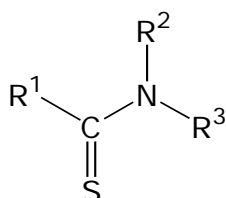
Obr 1.1 Chemická struktura *N*-benzylsalicylthioamidu.



## 1.2 THIOAMIDY

### 1.2.1 Chemické a fyzikální vlastnosti thioamidů

Thioamidy patří mezi reaktivní sloučeniny<sup>1</sup> odvozené od amidů, funkčních derivátů karboxylových kyselin. V přírodě se nejčastěji objevují jako sekundární metabolity anaerobních mikroorganismů, z nichž jsou některé patogenní pro člověka a živočichy. Mnohé z nich vykazují významnou biologickou aktivitu, často jsou toxické.



Obr 1.2 Chemická struktura thioamidové skupiny.

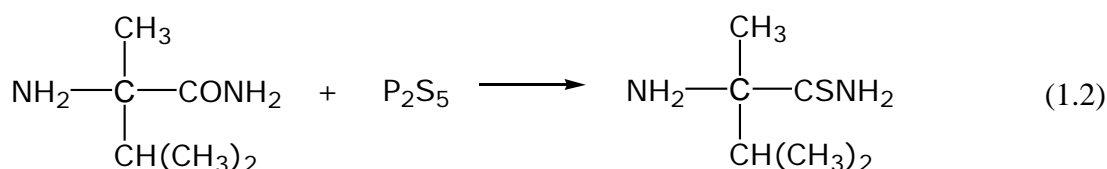
Základní struktura thioamidů je tvořena náhradou jednoho atomu kyslíku za jeden atom síry v amidové skupině (obr. 1.2), což vede ke změně vazebných délek mezi jednotlivými atomy<sup>2</sup>. Kenneth a kol.<sup>3</sup> uvádí ve své studii porovnání vazebných délek a vazebných energií ve struktuře amidů a thioamidů. Vazba C–N má u amidů délku 0,135 nm, u thioamidů se zkracuje na 0,132 nm. Oproti tomu vazba C=O má délku 0,119 nm, zatímco vazba C=S v thioamidech má délku 0,164 nm. Průměrná vazebná energie ve vazbě C=O je pro amidy vyšší (753,6 kJ/mol) než pro thioamidy ve vazbě C=S (586,2 kJ/mol).

Thioamidy mají obecně vysoké body varu, jejichž příčinou jsou vodíkové můstky. Narozdíl od amidů jsou silnějšími kyselinami, a proto snadněji odštěpují vodíkový proton<sup>4</sup>. Malý rozdíl v elektronegativitě jednotlivých atomů ( $X_C = 2,55$ ,  $X_S = 2,58$ ) a větší atomový poloměr síry způsobuje lepší přenos náboje mezi jednotlivými heteroatomy dusíku a síry podle schématu

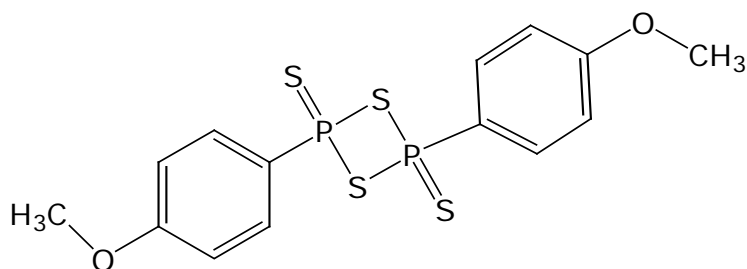
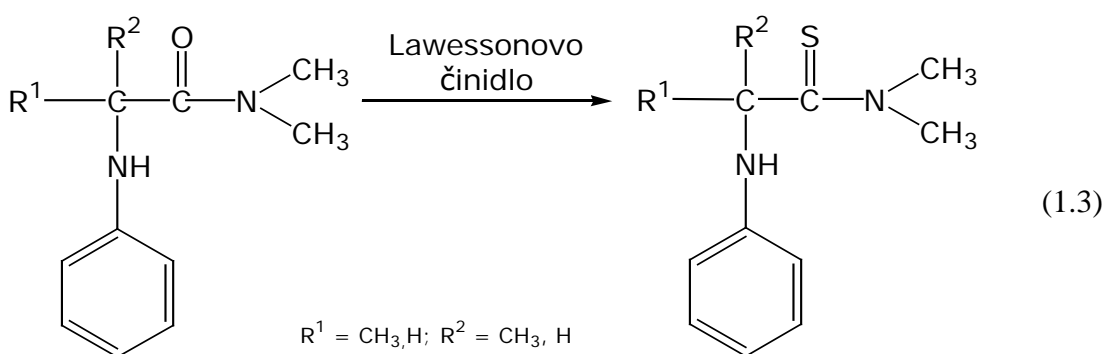


Nejen pro tyto uvedené vlastnosti jsou thioamidy předmětem zájmu mnoha studií ve společném porovnání s amidy<sup>5,6</sup>.

Nejběžnější příprava thioamidů je z příslušného amidu, a to působením vhodného thionačního činidla. Příkladem může být reakce sulfidu fosforečného s 2-amino-2,3-dimethylbutanamidem<sup>7,8</sup> podle rovnice

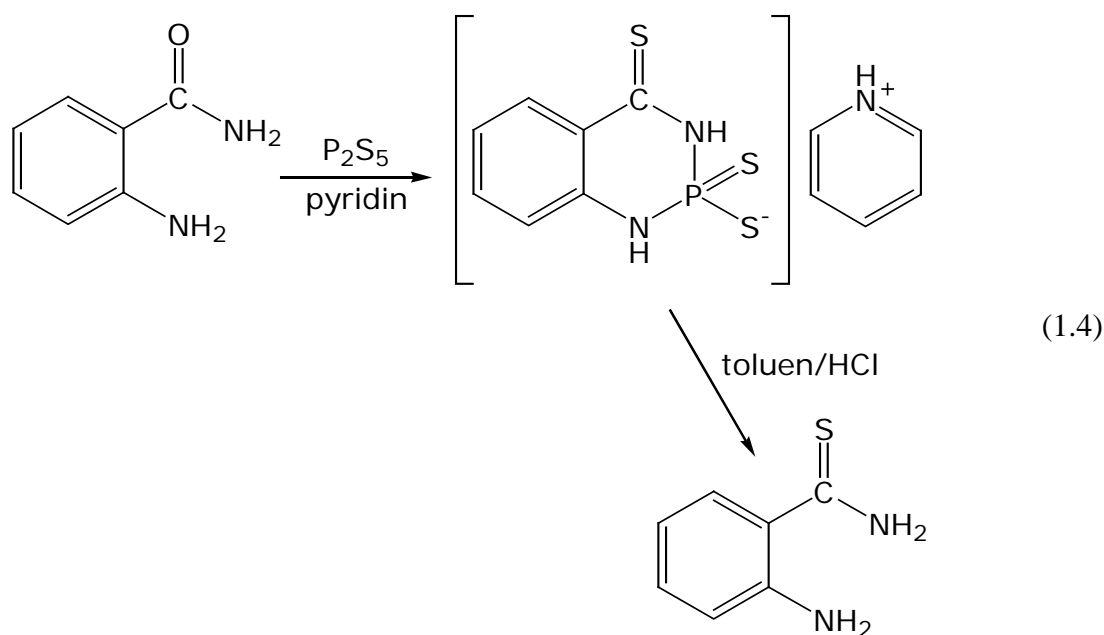


Thioamidy lze připravit z amidů rovněž pomocí tzv. Lawessonova činidla (běžně dostupné komerční činidlo, obr. 1.3)<sup>9-11</sup>. Hlavní nevýhodou tohoto činidla je fakt, že se s ním thionace provádějí při vysokých teplotách, což vede ke vzniku různých vedlejších produktů, které se velmi často špatně separují od požadovaného produktu



Obr 1.3 Chemická struktura Lawessonova činidla

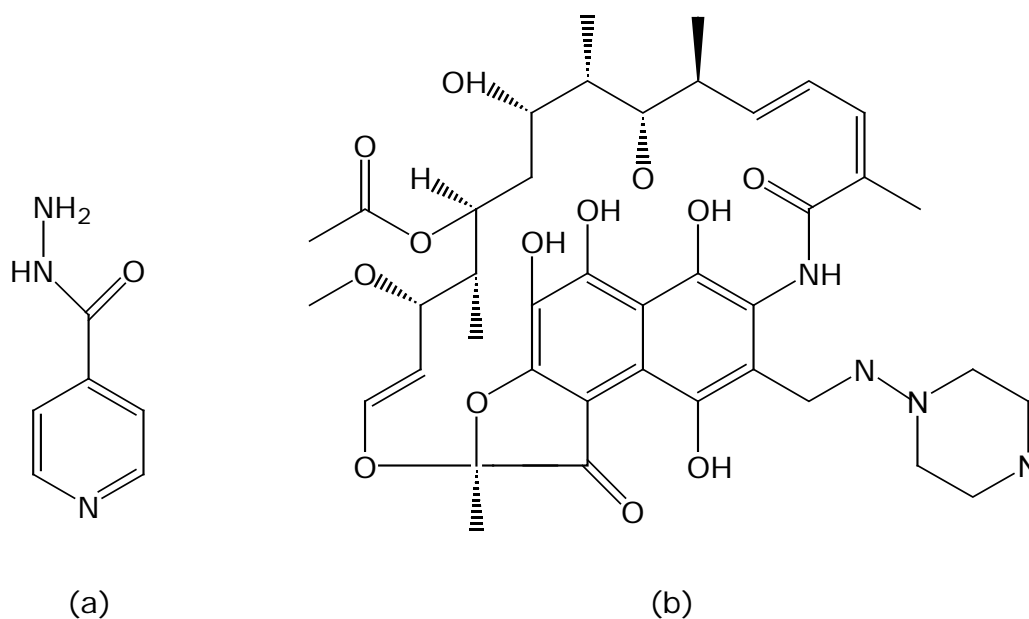
Další možnost přípravy thioamidů je z aromatických amidů<sup>12</sup>. Jako thionační činidlo se používá sulfid fosforečný v kombinaci s pyridinem jako rozpouštědlem. Meziproduktem je cyklická pyridiniová sůl, která se následně rozloží kyselou hydrolyzou. Výtěžky reakce se pohybují okolo 50–70 %. Reakce probíhá podle rovnice



Většina publikovaných prací o thioamidech se zabývá jejich syntézou, chemickými reakcemi a studiem fyzikálně-chemických vlastností<sup>13–16</sup>.

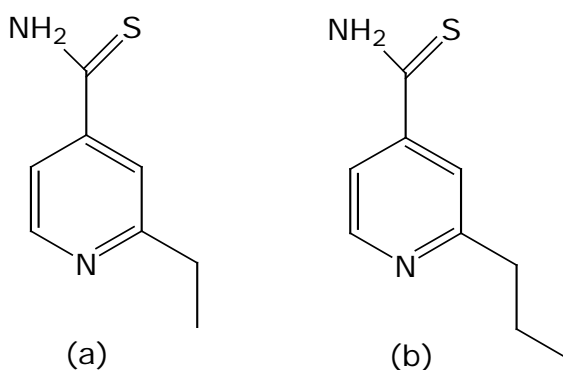
### 1.2.2 Deriváty thioamidu jako potenciální antituberkulotika

Tuberkulóza je infekční onemocnění vyvolané kmeny *Mycobacterium tuberculosis*<sup>17</sup>, které se šíří kapénkovou nákazou. Celosvětový trend zvyšujícího se výskytu tohoto onemocnění je spojen s onemocněním AIDS<sup>18</sup>, drogovou závislostí a imigrací infekčně nakažených osob<sup>19,20</sup>. V poslední době se dramaticky rozšířila epidemiologicky závažná multilékově rezistentní tuberkulóza (MDR-TB = multidrug-resistant tuberculosis)<sup>21,22</sup>, odolná vůči dvěma nejúčinnějším, avšak historicky nejstarším antituberkulotikům první linie: isoniazidu a rifampicinu (obr. 1.4), a navíc se řada dříve neinfekčních kmenů druhu *Mycobacterium* stává infekčními.



Obr 1.4 Chemická struktura (a) isoniazidu, (b) rifampicinu.

Od roku 2006 je nově užíván termín extenzivně rezistentní tuberkulóza (XDR-TB = extremely drug-resistant tuberculosis)<sup>23</sup> označující odolnost navíc vůči jakémukoli fluorochinolonu a nejméně jednomu z injekčních léčiv (amikacin, kapreomycin, kanamycin) či perorálních léčiv (ethionamid, prothionamid, obr. 1.5)<sup>24</sup> druhé volby.



Obr 1.5 Chemická struktura (a) ethionamidu, (b) prothionamidu.

Obecný mechanismus vzniku rezistence spočívá převážně v modifikaci cílových míst, jejich nadprodukci, změněné farmakokinetice či metabolismu léčiv. Léčba MDR-TB je stálou výzvou a zahrnuje tři hlavní oblasti výzkumu: nové látky přinášející zkrácení doby léčby tuberkulózy (ze současných 6–9 měsíců na dva či

méně), vývoj molekul s novým mechanismem účinku bez zkřížené rezistence s užívanými léky a vývoj nových léčiv zlepšujících léčbu latentní infekce<sup>25</sup>.

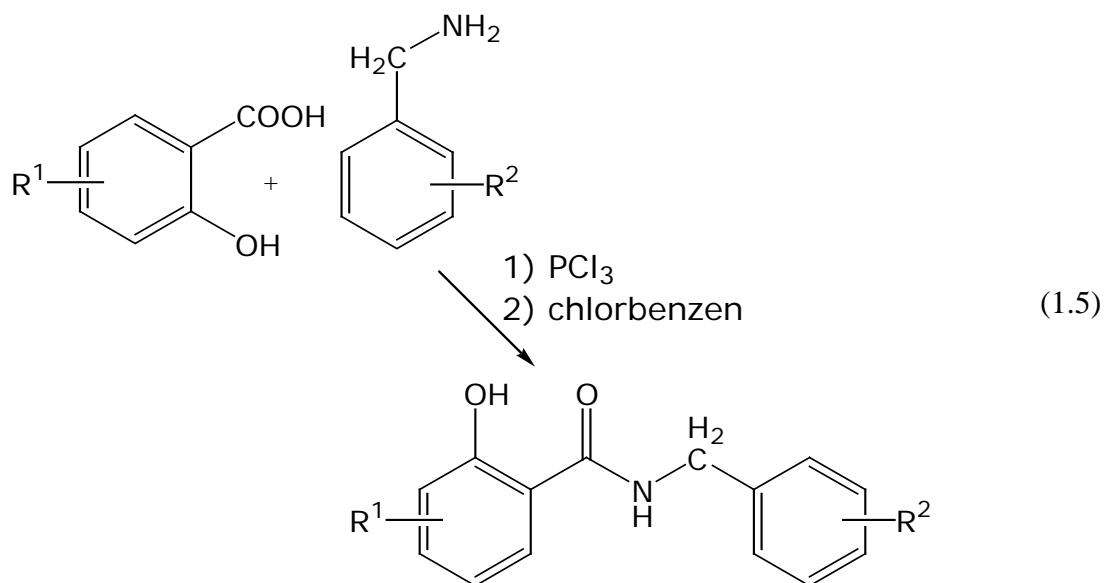
Při hledání nových antituberkulotik se vychází ze základního faktu, že typickým farmakoforem perorálních antituberkulotik druhé linie je thioamidová skupina. Deriváty thioamidu se v tomto ohledu jeví jako velmi slibné látky. Tuto teorii potvrzuje například nově připravená skupina isonikotinoylhydrazinokarbothioamidů kombinující thioamidovou skupinu s isoniazidem. Nejnižší hodnotu minimální inhibiční koncentrace vůči isoniazidu (senzitivním i rezistentním kmenům) prokázala molekula 2-(pyridin-4-yl-karbonyl)-*N*-[2-(trifluoromethyl)fenyl]hydrazinkarbothioamidu, která je zároveň velmi málo toxická. Dobrá účinnost této molekuly byla potvrzena i *in vivo* u myši (dávka 25 mg kg<sup>-1</sup> den<sup>-1</sup>)<sup>26</sup>.

Krinková a kol.<sup>27</sup> uvádí, že 5-butyl-6-(fenylsulfanyl)pyrazin-2-karbothiamid prokazuje nejvyšší aktivitu proti *M. tuberculosis*, která dosahuje 91% inhibice mykobakteriálního růstu. Taktéž vykazuje nejvyšší lipofilitu ( $\log P = 4,95$ ). U skupiny derivátů s karbothioamidovou skupinou je aktivita silně závislá na druhu příslušné atypické mykobakterie.

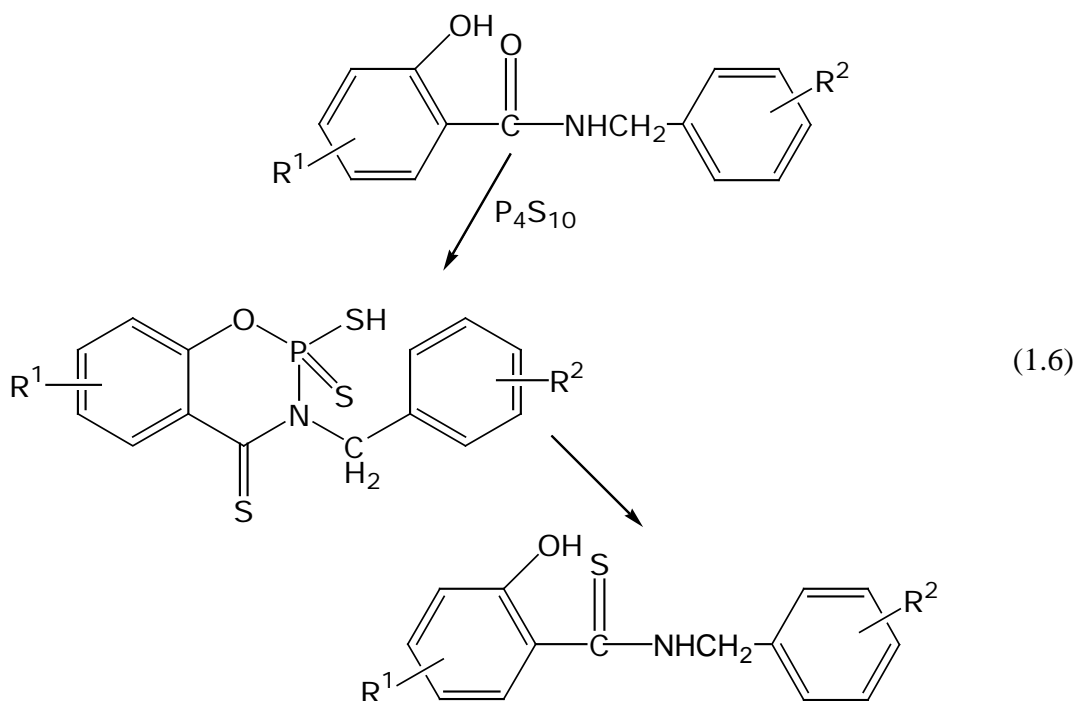
Waiser a kol.<sup>28</sup> studovali možnost vzájemného vztahu mezi antimykotickou a antimykobakteriální aktivitou. Zjistili, že skupina *N*-benzylsalicylthioamidů a *N*-benzylsalicylamidů patří mezi účinné sloučeniny aktivně působící proti *M. tuberculosis*, *M. avium* a *M. kansasii*. Jejich hypotéza ohledně biologické aktivity byla založena na základě vlastností thiosalicylanilidů. Potvrzujícím příkladem může být nově syntetizovaný 5-bromo-*N*-(4-brombenzyl)-salicylthioamid<sup>29</sup>, jenž se jeví jako velmi perspektivní antimykotikum.

### 1.2.3 Příprava a biologické vlastnosti studovaných látek

Ústřední sloučeninou syntézy *N*-benzylsalicylthioamidů je skupina *N*-benzylsalicylamidů připravených reakcí substituované salicylové kyseliny s benzylaminem v prostředí chlorbenzenu za pomoci chloridu fosforitého<sup>30</sup> podle rovnice



Při syntéze *N*-benzylsalicylthioamidů nejprve dochází k thionaci počátečních *N*-benzylsalicylamidů, které společně s  $P_4S_{10}$  produkují heterocyklické sloučeniny, jejichž hydrolyzou vznikají příslušné *N*-benzylsalicylthioamidy:



Antimykobakteriální aktivita studovaných látek byla testována *in vitro* proti *M. tuberculosis* CNCTC My 331/88, *M. kansasii*<sup>31</sup> CNCTC My 235/80 a 6509/96 (kmen izolovaný z pacienta) a *M. avium*<sup>32</sup> CNCTC My 330/88. Pomocí mikrometody byla určena minimální inhibiční koncentrace<sup>33</sup>.

Doležal a kol.<sup>34</sup> ve své práci uvádí souhrnný přehled minimálních inhibičních koncentrací studovaných derivátů *N*-benzylsalicylthioamidu v porovnání s hodnotami standardního isoniazidu. Inkubační doba ke zjištění jednotlivých hodnot byla 14 a 21 dnů při teplotě 37 °C. Ve všech případech došlo k nárůstu inhibiční aktivity proti *M. kansasii* CNCTC My 235/80 a *M. avium* CNCTC My 330/88 v porovnání s isoniazidem. Naopak proti jiným kmenům (*M. tuberculosis* CNCTC My 331/88 a *M. kansasii* CNCTC 6509/96) je aktivita většiny sloučenin horší než u isoniazidu. Obecně lze říci, že největší inhibiční aktivitu proti jednotlivým bakteriím z rodu *Mycobacterium* v porovnání s ostatními deriváty vykazuje *N*-(4-methylbenzyl)-2-hydroxy-4-methylthiobenzamid.

#### 1.2.4 Další možnosti farmaceutického využití thioamidů

V klinické praxi jsou thioamidy hojně využívány v léčbě hypertyreózy, syndromu vyvolaného zvýšenou sekrecí hormonů štítné žlázy se současnou zvýšenou reakcí periferních tkání<sup>35</sup>. Thioamidy (methimazol, propylthiouracil) patří i mezi antithyreoidální látky, které snižují aktivitu štítné žlázy a mají poměrně krátký biologický poločas. Mají několik mechanismů účinku, přičemž jejich hlavním účinkem je zábrana tvorby hormonů inhibicí reakcí katalyzovaných peroxidázou štítné žlázy, které vedou k navázání jodu do organických sloučenin a navíc blokují sprzęžení jodthyrosinů. Nežádoucí účinky při léčbě se projeví poměrně brzy. Problémem při léčbě thioamidy jsou převážně svědivé vyrážky, horečky, vaskulitida a nejkomplicovanější, poměrně vzácná, agranulocytóza<sup>36</sup>.

Dále jsou thioamidy předmětem studia pro svoji antibiotickou aktivitu. Literatura uvádí zejména closthioamid<sup>37,38</sup>, jenž má vlastnosti antibiotika a navíc vykazuje antifungální i antitumorovou aktivitu<sup>39</sup>. Closthioamid byl izolován z *Clostridium cellulolyticum*<sup>40-42</sup> a je aktivní proti multirezistentním stafylokokům. Studie ukazují účinnost také proti methicilin-rezistentní bakterii *Staphylococcus aureus* i vankomycin-rezistentním enterokokům, jež jsou problémem dnešní medicíny<sup>43</sup>.

V současné době probíhá výzkum různých derivátů thioamidu společně s amidoximem a deriváty amidrazonu, které by se v budoucnu mohly uplatnit proti viru lidské imunodeficiency při léčbě AIDS<sup>44</sup>.

### 1.2.5 Elektrochemické studie thioamidů

Z hlediska elektrochemických reakcí byla v literatuře popsána spíše redukce thioamidů, elektrochemické oxidaci nebyla prozatím věnována přílišná pozornost.

Bānicā a kol.<sup>45</sup> studovali elektrochemické vlastnosti thiocinamamidu ve vodném prostředí s 5% obsahem ethanolu pomocí DC a AC polarografie a cyklické voltametrie. Naměřená data ukazují, že při redukci dochází k štěpení vazby C=S za vzniku příslušného sulfidového iontu. Tvary a výšky změřených polarizačních vln jsou velmi závislé na hodnotě pH. Výsledky jsou taktéž porovnány s naměřenými hodnotami thiobenzamidu.

V práci Diona a kol.<sup>46</sup> byla studována elektrochemická redukce thioisonikotinamidu ve vodném prostředí. Pomocí polarografie a cyklické voltametrie na rtuťové elektrodě bylo zjištěno, že thioisonikotinamid je redukován reverzibilním procesem ve dvou stupních a celkově dochází k výměně čtyř elektronů. Po eliminaci sirovodíku nebo amoniaku jsou výslednými produkty buď iminy nebo thioly. Ukázalo se, že v rozmezí pH od 4 do 8 prakticky nedochází ke změnám hodnot naměřených půlvlnových potenciálů.

Tapsoba a kol.<sup>47</sup> studovali redukci *N*-thioamidoimidátu na rtuťové elektrodě v aprotickém prostředí  $1 \times 10^{-3}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  tetrabutylamonium tetrafluoroborátu v acetonitrilu. Redukce probíhá v jednom ireverzibilním kroku, při kterém dochází k štěpení dvojné vazby C=S a výměně jednoho elektronu. *N*-thioamidoimidát se redukuje na dimer.

Podrobně bylo popsáno i stanovení derivátů thioamidu v biologických tekutinách (moč, plazma) pomocí stripping voltametrie na rtuťové kapkové elektrodě<sup>48</sup>.

Zmínku o elektrochemické oxidaci uvádí Iwamoto a kol.<sup>49</sup>, kteří studovali elektrochemickou oxidaci pěti thioamidů (thioacetamid, thiomochovina, thionikotinamid, ethionamid, thiosemicarbazid) na rotující diskové stříbrné elektrodě. Bylo zjištěno, že oxidace probíhá ve dvou nevratných krocích, při nichž dochází k výměně dvou elektronů. Následkem elektrooxidace je sulfid stříbrný, který vzniká díky meziprojektu, thioamidovému komplexu s obsahem stříbra.

Davidson a Smyth<sup>50</sup> studovali elektrochemickou oxidaci i redukci některých primárních, sekundárních a terciárních thioamidů pomocí DC polarografie, cyklické a stripping voltametrie na kapající rtuťové elektrodě. Uvádí, že katalytická redukce nastává ve všech případech. Při anodické oxidaci u primárních a sekundárních



thioamidů dochází k tvorbě sulfidu rtuťnatého dvouelektronovým pochodem. Terciární thioamidy nepodléhají anodické elektrolýze.

Cinghiřá a kol.<sup>51</sup> ve své práci studovali elektrochemickou oxidaci thioacetamidu pomocí voltametrie na diamantové elektrodě dopované borem ve vodném prostředí. Při anodické oxidaci dochází k štěpení vazby C–N a C=S.

Berube a kol.<sup>52</sup> studovali elektrochemické chování  $\alpha$ -kyano- $\alpha$ -karboethoxy-thioacetanilidů v prostředí  $1 \times 10^{-1}$  mol dm<sup>-3</sup> triethylamonium fosfátu v acetonitrilu. Pomocí tenzometrie, voltametrie na rotační platinové elektrodě, coulometrie a preparativní elektrolýzy bylo zjištěno, že počet vyměňovaných elektronů odpovídá poměru základního analytu a stanovované látky. Jednoelektronová výměna probíhá při jednoekvivalentním poměru, se stoupajícím počtem ekvivalentů základního analytu dochází k výměně dvou elektronů.

### 1.3 Vliv substituentů na fyzikálně-chemické chování látek

Chemické a fyzikální vlastnosti sloučeniny jsou jednoznačně dány strukturou molekuly<sup>53</sup>. V mnoha případech lze změnou druhu a polohy substituentu na základním skeletu tyto vlastnosti ovlivňovat. Tohoto faktu se využívá při studiu vztahů mezi strukturou a vlastnostmi sloučenin. Tímto studiem se zabývá vědní obor zvaný korelační analýza vztahů mezi strukturou a aktivitou (QSAR, angl. Quantitative Structure-Activity Relationships). Pod pojmem aktivita si lze představit jak aktivitu chemickou (rychlost reakce, elektrochemické a chromatografické parametry apod.) tak aktivitu biologickou (toxická, antibiotická účinnost atd.)<sup>54</sup>. Pro studium vztahů mezi strukturou látek a jejich chemickým chováním se spíše používá termín QSPR (angl. Quantitative Structure-Property Relationships). Jejím hlavním cílem je pomocí zpracování kvantitativních experimentálních a teoretických dat matematickou modelací stanovit obecnější vztahy mezi strukturou a vlastnostmi látek<sup>55–57</sup>.

Základ těmto metodám dal roku 1935 L. P. Hammett, který jako první formuloval rovnici popisující vztah mezi strukturou a vlastnostmi látky<sup>58</sup>

$$\log K_X = \log K_H + \rho\sigma \quad (1.7)$$

kde  $K_X$  je rychlostní konstanta substituovaného derivátu,  $K_H$  je rychlostní konstanta nesubstituovaného derivátu,  $\rho$  je empirická konstanta charakterizující reakci, je nezávislá na substituentu, a  $\sigma$  je empirická Hammettova substituentová konstanta popisující elektronový efekt substituentu (kladné hodnoty  $\sigma$  přísluší elektrofilním substituentům, záporné hodnoty  $\sigma$  substituentům nukleofilním).

Pomocí substituentovaných konstant lze také popsat fyzikálně-chemické vlastnosti derivátu. Konstanty jsou vztažené pouze na matečné části molekuly a mají kvantitativní charakter, proto lze vlastnosti molekul charakterizovat číslem. Byla navržena celá řada nových modifikací jak základní rovnice (1.7), tak substituentovaných konstant<sup>59, 60</sup>.

V elektrochemii je situace obdobná. Zákonitostí vlivu struktury na elektrochemické chování látek si všiml již J. Heyrovský. Pomocí polarografie resp. voltametrie bylo studováno chování řady substitučních derivátů mnoha látek. Bylo odvozeno, že změny chování polarizačních křivek souvisejí s různými posuny elektronů v molekule vlivem rozdílného chemického charakteru substituentů. Ukázalo se, že mezi Hammettovými konstantami a půlvlnovými potenciály existuje obvykle přímý lineární vztah<sup>61</sup>. Hammettova rovnice (1.7) pak přejde do tvaru tzv. Hammettovy rovnice pro půlvlnové potenciály

$$(E_{1/2})_X = (E_{1/2})_H + \rho\sigma \quad (1.8)$$

kde  $(E_{1/2})_X$  je půlvlnový potenciál substituovaného derivátu,  $(E_{1/2})_H$  půlvlnový potenciál nesubstituovaného derivátu,  $\rho$  označuje Hammettovu reakční konstantu a  $\sigma$  Hammettovu substituentovou konstantu. Zuman<sup>62</sup> se ve své monografii převážně zabýval problematikou elektrochemické redukce substituentů v organické polarografii.

Při elektrochemické oxidaci, resp. redukci, dochází ke ztrátě, resp. dopování, jednoho nebo více elektronů do vazebných molekulových orbitalů. Energetické parametry molekuly mohou být dobře charakterizovány energiemi nejvyššího obsazeného (HOMO), resp. nejnižšího neobsazeného (LUMO), molekulového orbitalu. V literatuře lze nalézt mnoho případů těsné korelace mezi energiemi molekulových orbitalů a půlvlnovým potenciálem<sup>63</sup>.

V současnosti se pro hodnocení vlivu substituentů na elektrochemické chování látek užívá název QSER (angl. Quantitative Structure-Electrochemistry

Relationships)<sup>64–67</sup>. Snaha definovat vztahy mezi elektrochemickými vlastnostmi a biologickou aktivitou chemických látek, resp. najít určité korelace mezi nimi, má obrovský význam zejména při vývoji léčiv.

#### 1.4 VYUŽITÍ ELEKTROCHEMICKÉ OXIDACE PŘI STUDIU METABOLICKÝCH PŘEMĚN FARMACEUTICKY AKTIVNÍCH LÁTEK

Technický pokrok a vývoj analytických metod podstatně rozšířily možnosti farmakologie. Nové analytické metody se užívají při kvantitativním i kvalitativním stanovování léčiv v biologickém materiálu. Výběr analytické metody je ovlivněn fyzikálně-chemickými vlastnostmi léčiva, jeho koncentrací v biologických tekutinách, metabolismem i znalostí farmakokinetiky. Součástí studia pohybu podané látky v organismu je i sledování pochodů, které mění strukturu léčiva, které je ovšem *in vivo* značně obtížné a složité. Proto se v prvním přiblížení využívá jednodušších modelů *in vitro*, mezi něž patří i elektrochemický model první fáze biotransformace. Počet používaných léčiv je velký, ale přesto se jejich biotransformační přeměna v organismu děje na základě relativně malého počtu reakcí. Znalost těchto metabolických cest je při preklinickém vývoji významná pro výběr vhodného zvířecího druhu, který nejlépe odpovídá situaci u člověka<sup>68–70</sup>.

Elektrochemie patří do širokého spektra analytických metod hojně používaných při studiích farmaceuticky aktivních látek. Využívá se nejen při analýzách léčiv, či jejich metabolitů, ale zároveň se uplatňuje jako modelová technika při simulaci biologických redoxních reakcí situovaných převážně do lipidových buněčných membrán<sup>71</sup>. Tento přístup je založen na podobnosti oxidačně-redukčních reakcí na elektrodě s oxidačně-redukčními enzymatickými reakcemi v živém organismu. Z důvodu nepolárního charakteru prostředí biologických membrán se tyto modelové reakce provádějí v nevodném prostředí (acetonitril, dimetylformamid)<sup>72, 73</sup>. Výhodou nevodného prostředí bývá i větší stálost reakčních produktů, což umožňuje jejich bližší studium.

V práci Lohmanna a Karsta<sup>74</sup> jsou mimo jiné popsány i elektrochemické modely použité jako simulační modely k studiu látkové přeměny. Popisují především studie prováděné na elektrolytických průtokových celách v úplné či částečné kombinaci s hmotnostní spektroskopií a kapalinovou chromatografií. Podstatnou výhodou

elektrochemického modelování metabolitů, oproti jiným metodám, je extrémně jednoduché začlenění oxidační reakce do instrumentálního systému, což je požadavkem pro identifikaci generovaných metabolitů. I přes to, že není stále možné kompletně napodobit spektrum metabolických reakcí, probíhajících například na cytochromech P450, jsou elektrochemické modely považovány za vhodný nástroj k přímé identifikaci reaktivních metabolitů.

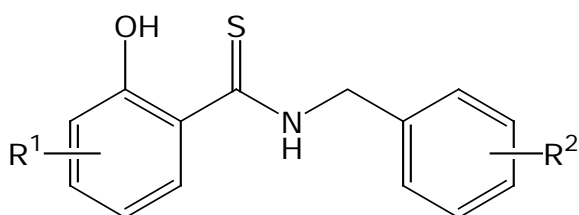
Elektrochemie poskytuje celou řadu informací o charakteru oxidačního, resp. redukčního, děje (reverzibilita, počet vyměňovaných elektronů apod.), který je podobný enzymatickým redoxním přeměnám v biologických membránách. Výsledky elektrochemického studia oxidačních reakcí v nevodném prostředí tak mohou poskytovat řadu užitečných informací o pravděpodobném biologickém průběhu biologické oxidace<sup>75</sup>. Této skutečnosti je využito v elektrofarmakologii, v oboru využívající analogie některých elektrochemických a farmakologických děj

## 2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 2.1 STUDOVANÉ LÁTKY

Studované *N*-benzylsalicylthioamidy byly syntetizovány na Katedře anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové. Totožnost a čistota byly stanoveny elementární analýzou, měřením bodu tání a nukleární magnetickou rezonancí. Přehled studovaných látek je podán v tab. 2.1.

Tab. 2.1 Struktury a molární hmotnosti studovaných *N*-benzylsalicylthioamidů



derivát	R <sup>1</sup>		R <sup>2</sup>		M g mol <sup>-1</sup>	derivát	R <sup>1</sup>		R <sup>2</sup>		M g mol <sup>-1</sup>
	poloha	substituent	poloha	substituent			poloha	substituent	poloha	substituent	
<b>1</b>		-H		-H	243,33	<b>14</b>	4	-OCH <sub>3</sub>	3	-Cl	307,80
<b>2</b>		-H	3	-CH <sub>3</sub>	257,35	<b>15</b>	4	-CH <sub>3</sub>	3	-NO <sub>2</sub>	302,35
<b>3</b>		-H	3	-Cl	277,77	<b>16</b>	4	-Cl	4	-Br	356,67
<b>4</b>		-H	4	-CH <sub>3</sub>	257,36	<b>17</b>	5	-Br	4	-Br	401,12
<b>5</b>		-H	4	-Cl	277,77	<b>18</b>	3	-CH <sub>3</sub>	4	-Cl	291,80
<b>6</b>		-H	4	-F	261,31	<b>19</b>	5	-Cl	4	-F	295,76
<b>7</b>		-H	4	-OCH <sub>3</sub>	273,36	<b>20</b>	4	-CH <sub>3</sub>	4	-CH <sub>3</sub>	271,38
<b>8</b>		-H	4	- <i>tert</i> -butyl	299,43	<b>21</b>	5	-NO <sub>2</sub>	4	-CH <sub>3</sub>	302,35
<b>9</b>		-H	3,4	-Cl <sub>2</sub>	312,22	<b>22</b>	5	-Cl	3,4	-Cl <sub>2</sub>	346,66
<b>10</b>	4	-OCH <sub>3</sub>		-H	273,35	<b>23</b>	5	-Br	3,4	-Cl <sub>2</sub>	391,11
<b>11</b>	5	-Cl		-H	277,77	<b>24</b>	4	-CH <sub>3</sub>	4	- <i>tert</i> -butyl	313,46
<b>12</b>	4	-CH <sub>3</sub>		-H	257,35	<b>25</b>	5	-OCH <sub>3</sub>		-H	273,35
<b>13</b>	5	-Br	3	-Br	401,12						

## 2.2 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE

Jako prostředí pro elektrochemické a spektrofotometrické studium byl použit acetonitril Chromasolv (Sigma-Aldrich) s obsahem vody nižším než 0,02 obj. %. Jako základní elektrolyt byl použit chloristan sodný pro HPLC (Fluka).

Ostatní použité chemikálie byly analytické čistoty: aceton (Lach-Ner), dusičnan stříbrný (Fluka), chloroform čistoty pro HPLC 99,9% Chromasolv (Sigma-Aldrich) s obsahem vody nižším než 0,02 obj. %.

## 2.3 POUŽITÉ METODY

### 2.3.1 DC voltametrie s rotující diskovou elektrodou

Měření bylo realizováno na přístroji Palm Sense Instruments BV (Electrochemical Biosensor Interface, NL) se sběrem dat softwarem Palm Sense PC v. 2.0 a probíhalo v třídílné polarografické nádobce. Použité zapojení bylo tříelektrodové. Pracovní elektrodou byla platinová rotující elektroda o ploše  $14 \text{ mm}^2$ , rychlost rotace elektrody byla  $1226 \text{ ot min}^{-1}$  a rychlost polarizace  $10 \text{ mV s}^{-1}$ . Elektroda byla ponořena do měřicího prostoru s roztokem základního elektrolytu  $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$  chloristanu sodného v acetonitrilu. Referentní elektrodu tvořil stříbrný plíšek o ploše  $1,8 \text{ cm}^2$  ponořený do roztoku  $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$  dusičnanu stříbrného v  $1 \text{ mol dm}^{-3}$  roztoku chloristanu sodného v acetonitrilu. Od měřicího prostoru byla referentní elektroda oddělena meziprostorem s náplní  $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$  roztoku chloristanu sodného v acetonitrilu. Pomocnou pracovní elektrodou byl platinový plíšek o ploše  $0,68 \text{ cm}^2$ . Měření probíhalo za laboratorní teploty  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Ze získaných polarogramů byly graficky vyhodnoceny hodnoty půlvlnových potenciálů  $E_{1/2}$  a limitních konvektivně-difuzních proudů  $I_{\text{lim}}$ .

### 2.3.2 Molekulová absorpční spektrometrie v UV oblasti

Spektrofotometrická měření byla realizována na spektrofotometru HP 8453 (Hewlett Packard) s diodovým polem. Měrná tloušťka křemenné kyvety byla  $1 \text{ cm}$  a měření probíhalo ve vlnovém rozsahu  $200\text{--}400 \text{ nm}$ .

### 2.3.3 Preparativní elektrolýza

Produkty elektrochemické oxidace vybraných derivátů byly získány pomocí preparativní elektrolýzy. Elektrolýza probíhala ve skleněné nádobce H-typu s tříelektrodovým zapojením. Pracovní i pomocnou elektrodu tvořila Fischerova velkoplošná platinová elektroda. Obě elektrody byly ponořeny do základního elektrolytu  $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$  chloristanu sodného v acetonitrilu. Pracovní i pomocná elektroda byly od sebe odděleny meziprostorem s náplní  $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$  roztoku chloristanu sodného v acetonitrilu. Objem základního elektrolytu v prostoru elektrolýzy byl 40 ml. Referentní elektroda byla realizována stříbrným drátkem ponořeným do  $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$  roztoku dusičnanu stříbrného a  $1 \text{ mol dm}^{-3}$  roztoku chloristanu sodného v acetonitrilu a od pracovního prostoru byla oddělena meziprostorem s  $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$  roztokem chloristanu sodného v acetonitrilu. Zdrojem napětí byl Potenciostat/Galvanostat Model 273 (EG&G Princeton Applied Research). Elektrolýza probíhala za intenzivního míchání při laboratorní teplotě. Před elektrolýzou látky byl vždy po dobu 20 minut elektrolyzován samotný základní elektrolyt pro odstranění případných nečistot.

Před zahájením i v průběhu elektrolýzy bylo měřeno UV spektrum elektrolyzátu. Ke spektrofotometrickému měření (viz kap. 2.3.2) bylo vždy odebráno  $50 \mu\text{l}$  elektrolyzátu a zředěno čistým acetonitrilem.

Po ukončení elektrolýzy byl elektrolyzát odpařen do sucha na vakuové rotační odparce s vodní lázní o teplotě  $75 \text{ }^\circ\text{C}$  a extrahován chloroformem. Oddělený extrakt byl odebrán, znovu odpařen a podroben identifikaci metodou hmotnostní spektrometrie.

### 2.3.4 Kapalinová chromatografie s hmotnostním detektorem

Produkty elektrochemické oxidace studovaných látek byly analyzovány metodou HPLC-MS. Separace byla prováděna na kapalinovém chromatografu Agilent 1100 na koloně Watrex RP-C18, délky 250 mm, průměru 4 mm a velikosti zrn  $5 \mu\text{m}$ . Eluce probíhala isokraticky s mobilní fází acetonitril:voda v poměru 95:5 při průtokové rychlosti  $0,6 \text{ ml min}^{-1}$ . Detekce probíhala při 254 nm a zároveň byla

měřena hmotnostní spektra na hmotnostním detektoru Bruker Esquire 3000 s ionizací elektrosprejem.

## 2.4 QSAR, REGRESNÍ A STATISTICKÉ VÝPOČTY

Substituentové Hammettovy  $\sigma$  konstanty byly převzaty z tabulek Hansche, Lea a Hoekmana<sup>76</sup>, Swain-Luptonovy konstanty byly převzaty podle úpravy provedené Norringtonem<sup>77</sup>. U látek s více substituenty v molekule byly substituentové konstanty získány součtem substituentovaných konstant jednotlivých substituentů<sup>78</sup>. Regresní výpočty byly provedeny v programu Microsoft Excel 2003 (Microsoft Corporation, USA) pomocí statistické funkce Data Analysis – Regression.

Hodnoty energií HOMO orbitalů byly vypočítány programem Gaussian<sup>®</sup> 03W, ver. 6.0 (cit.<sup>79</sup>) inkorporovaného do programu Chem3D Ultra, ver. 8.0 (CambridgeSoft). Minimalizace energie sloučenin byla provedena podle metody Hartree-Fock v plynné fázi.

Naměřená data byla zpracována běžnými statistickými postupy<sup>80, 81</sup>. Prezentované výsledky sériových měření jsou mediány nejméně tří měření. Lineární závislosti dvou proměnných byly zpracovány metodou lineární regrese s vyhodnocením příslušných odchylek a korelačních koeficientů. Výpočty byly realizovány pomocí softwarových programů Microcal OriginPro 7.5 (OriginLab Corporation, USA) a Microsoft Excel 2000 (Microsoft Corporation, USA).



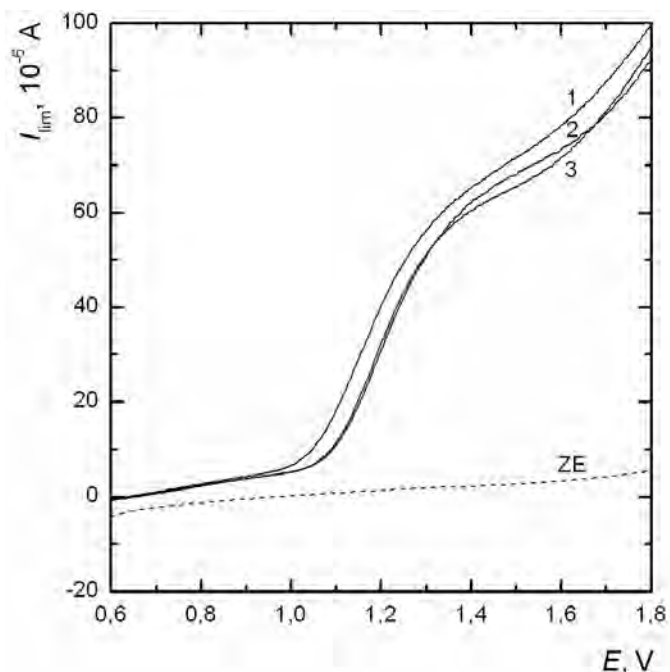
### 3 VÝSLEDKY A DISKUSE

#### 3.1 VLIV SUBSTITUENTŮ NA VOLTAMETRICKÉ CHOVÁNÍ LÁTEK

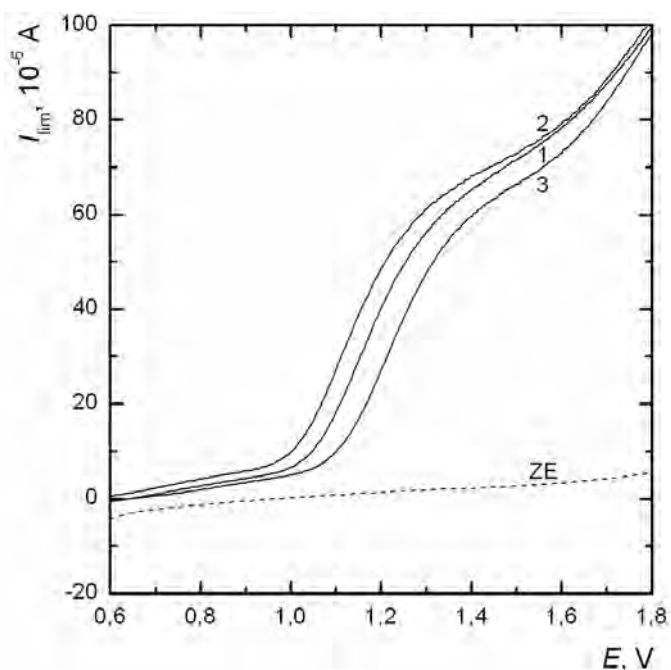
##### 3.1.1 Stanovení voltametrických charakteristik

Vliv substituentů na voltametrické chování studovaných *N*-benzylsalicylthioamidů byl studován metodou DC voltametrie s rotující diskovou elektrodou. Téměř všechny studované deriváty poskytovaly v prostředí 0,1 mol dm<sup>-3</sup> roztoku chloristanu sodného v acetonitrilu jednu zřetelnou oxidační vlnu, jejíž půlvolnový potenciál závisel na počtu a druhu substituentů (obr. 3.1–obr. 3.3). Výjimkou byl však derivát **25**, jenž ve stejném prostředí poskytoval dvě oxidační vlny. V porovnání s literaturou<sup>82, 83</sup> je pravděpodobnou příčinou tohoto chování výskyt methoxyskupiny v poloze 5 a tedy odlišný mechanismus, což vedlo k vyřazení tohoto derivátu ze skupiny látek pro korelační analýzu (kap. 3.1.2 a 3.1.3).

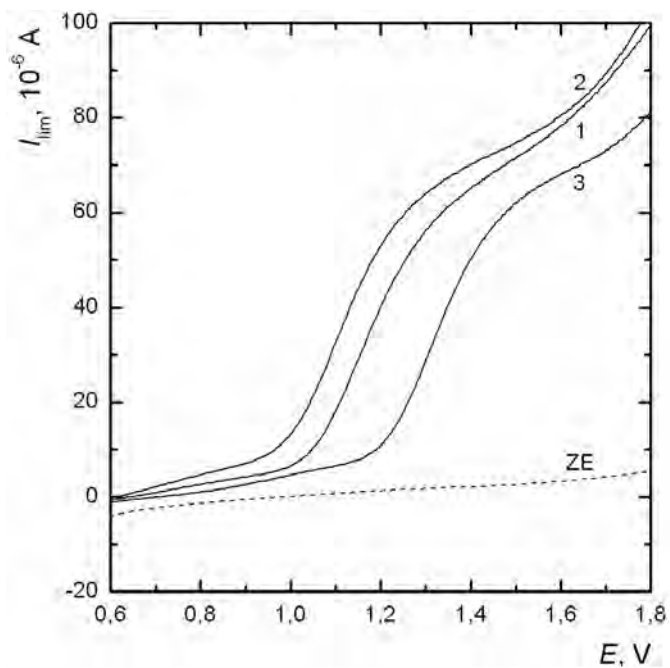
Kalibrační závislosti byly lineární v rozsahu 0,5–5,0×10<sup>-4</sup> mol dm<sup>-3</sup>. Hodnoty půlvolnových potenciálů studovaných derivátů závisely na struktuře derivátu, nezávisely však na koncentraci látky. Směrnice a úseky kalibračních přímk jednotlivých derivátů zachycuje tab. 3.1. Naměřené hodnoty půlvolnových potenciálů, příslušné Hammetovy a Swain-Luptonovy konstanty a energie HOMO orbitalů zachycuje tab. 3.2.



Obr. 3.1 DC voltamogramy (1) *N*-benzyl-2-hydroxythiobenzamidu (derivát **1**), (2) *N*-(3-chlorbenzyl)-2-hydroxythiobenzamidu (derivát **3**) a (3) *N*-(3,4-dichlorbenzyl)-2-hydroxythiobenzamidu (derivát **9**) v  $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$  chloristanu sodném v acetonitrilu. ( $c = 2 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $A = 14 \text{ mm}^2$ ,  $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$ ,  $\omega = 1226 \text{ ot min}^{-1}$ , měřeno proti  $\text{Ag}/0,01 \text{ mol dm}^{-3} \text{ AgNO}_3/0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaClO}_4$ ).

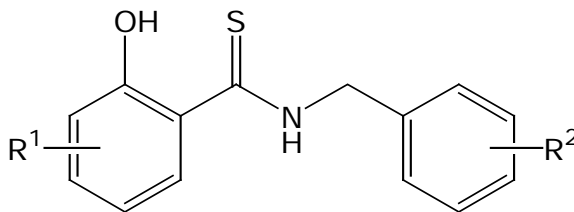


Obr. 3.2 DC voltamogramy (1) *N*-benzyl-2-hydroxythiobenzamidu (derivát **1**), (2) *N*-benzyl-2-hydroxy-4-methoxythiobenzamidu (derivát **10**) a (3) *N*-benzyl-5-chlor-2-hydroxythiobenzamidu (derivát **11**) v  $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$  chloristanu sodném v acetonitrilu. ( $c = 2 \times 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $A = 14 \text{ mm}^2$ ,  $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$ ,  $\omega = 1226 \text{ ot min}^{-1}$ , měřeno proti  $\text{Ag}/0,01 \text{ mol dm}^{-3} \text{ AgNO}_3/0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaClO}_4$ ).



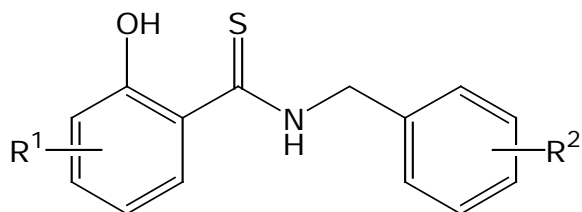
Obr. 3.3 DC voltamogramy (1) *N*-benzyl-2-hydroxythiobenzamidu (derivát **1**), (2) 2-hydroxy-4-methyl-*N*-(4-methylbenzyl)thiobenzamidu (derivát **20**) a (3) *N*-(4-fluorbenzyl)-5-chlor-2-hydroxythiobenzamidu (derivát **19**) v 0,1 mol dm<sup>-3</sup> chloristanu sodném v acetonitrilu. ( $c = 2 \times 10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup>,  $A = 14$  mm<sup>2</sup>,  $\nu = 10$  mV s<sup>-1</sup>,  $\omega = 1226$  ot min<sup>-1</sup>, měřeno proti Ag/0,01 mol dm<sup>-3</sup> AgNO<sub>3</sub>/0,1 mol dm<sup>-3</sup> NaClO<sub>4</sub>).

Tab. 3.1 Struktury, směrnice, úseky kalibračních přímek a hodnoty korelačních koeficientů studovaných derivátů *N*-benzylsalicylthioamidu pro DC voltametrii v 0,1 mol dm<sup>-3</sup> chloristanu sodném v acetonitrilu ( $c = 2 \times 10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup>,  $A = 14$  mm<sup>2</sup>,  $\nu = 10$  mV s<sup>-1</sup>,  $\omega = 1226$  ot min<sup>-1</sup>, měřeno proti Ag/0,01 mol dm<sup>-3</sup> AgNO<sub>3</sub>/0,1 mol dm<sup>-3</sup> NaClO<sub>4</sub>)



derivát	R <sup>1</sup>		R <sup>2</sup>		$a \times 10^{-4}$ [ $\mu\text{A mol}^{-1}$ l]	$b$ [ $\mu\text{A}$ ]	$r$
	poloha	substituent	poloha	substituent			
1		-H		-H	26,2	-5,3	0,9991
2		-H	3	-CH <sub>3</sub>	26,3	-6,2	0,9997
3		-H	3	-Cl	23,4	-5,0	0,9820
4		-H	4	-CH <sub>3</sub>	25,8	-4,7	0,9989
5		-H	4	-Cl	22,2	-6,2	0,9971
6		-H	4	-F	28,2	-4,0	0,9992
7		-H	4	-OCH <sub>3</sub>	16,8	-0,8	0,9982
8		-H	4	- <i>tert</i> -butyl	24,9	-3,3	0,9978
9		-H	3,4	-Cl <sub>2</sub>	24,3	-3,6	0,9992
10	4	-OCH <sub>3</sub>		-H	24,1	-3,4	0,9985
11	5	-Cl		-H	22,2	-5,0	0,9993
12	4	-CH <sub>3</sub>		-H	19,8	-1,7	0,9852
13	5	-Br	3	-Br	18,1	-3,1	0,9931
14	4	-OCH <sub>3</sub>	3	-Cl	25,9	-5,0	0,9968
15	4	-CH <sub>3</sub>	3	-NO <sub>2</sub>	17,9	-3,5	0,9995
16	4	-Cl	4	-Br	26,6	-11,7	0,9998
17	5	-Br	4	-Br	18,9	-3,4	0,9968
18	3	-CH <sub>3</sub>	4	-Cl	21,3	-2,5	0,9997
19	5	-Cl	4	-F	18,5	-1,6	0,9938
20	4	-CH <sub>3</sub>	4	-CH <sub>3</sub>	23,7	-4,6	0,9961
21	5	-NO <sub>2</sub>	4	-CH <sub>3</sub>	22,3	-3,8	0,9978
22	5	-Cl	3,4	-Cl <sub>2</sub>	17,3	-3,1	0,9986
23	5	-Br	3,4	-Cl <sub>2</sub>	17,5	0,4	0,9986
24	4	-CH <sub>3</sub>	4	- <i>tert</i> -butyl	29,1	-11,5	0,9993

Tab. 3.2 Struktury, Hammetovy a Swain-Luptonovy substituentové konstanty, půlvalnové potenciály studovaných derivátů *N*-benzylsalicylthioamidu v 0,1 mol dm<sup>-3</sup> chloristanu sodném v acetonitrilu ( $c = 2 \times 10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup>,  $A = 14$  mm<sup>2</sup>,  $v = 10$  mV s<sup>-1</sup>,  $\omega = 1226$  ot min<sup>-1</sup>, měřeno proti Ag/0,01 mol dm<sup>-3</sup> AgNO<sub>3</sub>/0,1 mol dm<sup>-3</sup> NaClO<sub>4</sub>) a vypočítané hodnoty energií HOMO orbitalů



derivát	R <sup>1</sup>					R <sup>2</sup>					$E_{1/2}$ [V]	$\epsilon_{\text{HOMO}}$ [eV]
	poloha	substituent	$\sigma_{R1}$	$F_{R1}$	$R_{R1}$	poloha	substituent	$\sigma_{R2}$	$F_{R2}$	$R_{R2}$		
1		-H	0,00	0,00	0,00		-H	0,00	0,00	0,00	1,167	-9,433062
2		-H	0,00	0,00	0,00	3	-CH <sub>3</sub>	-0,07	-0,05	-0,05	1,165	— <sup>a</sup>
3		-H	0,00	0,00	0,00	3	-Cl	0,37	0,68	-0,06	1,190	-9,424002
4		-H	0,00	0,00	0,00	4	-CH <sub>3</sub>	-0,17	-0,05	-0,14	1,169	-9,432930
5		-H	0,00	0,00	0,00	4	-Cl	0,23	0,69	-0,16	1,154	-9,415245
6		-H	0,00	0,00	0,00	4	-F	0,06	0,71	-0,34	1,187	-9,419869
7		-H	0,00	0,00	0,00	4	-OCH <sub>3</sub>	-0,27	0,41	-0,50	1,117	-9,426035
8		-H	0,00	0,00	0,00	4	- <i>tert</i> -butyl	-0,20	-0,10	-0,14	1,175	-9,432130
9		-H	0,00	0,00	0,00	3,4	-Cl <sub>2</sub>	0,60	1,37	-0,22	1,203	-9,405926
10	4	-OCH <sub>3</sub>	-0,27	0,41	-0,50		-H	0,00	0,00	0,00	1,132	-9,437573
11	5	-Cl	0,37	0,68	-0,06		-H	0,00	0,00	0,00	1,216	— <sup>a</sup>
12	4	-CH <sub>3</sub>	-0,17	-0,05	-0,14		-H	0,00	0,00	0,00	1,137	-9,443127
13	5	-Br	0,39	0,71	-0,06	3	-Br	0,39	0,71	-0,06	1,220	-9,393343
14	4	-OCH <sub>3</sub>	-0,27	0,41	-0,50	3	-Cl	0,37	0,68	-0,06	1,125	-9,427399
15	4	-CH <sub>3</sub>	-0,17	-0,05	-0,14	3	-NO <sub>2</sub>	0,71	1,09	0,05	1,190	— <sup>a</sup>
16	4	-Cl	0,23	0,69	-0,16	4	-Br	0,23	0,73	-0,18	1,205	-9,39023
17	5	-Br	0,39	0,71	-0,06	4	-Br	0,23	0,73	-0,18	1,192	— <sup>a</sup>
18	3	-CH <sub>3</sub>	-0,07	-0,05	-0,05	4	-Cl	0,23	0,73	-0,18	1,230	-9,403533
19	5	-Cl	0,37	0,68	-0,06	4	-F	0,06	0,71	-0,34	1,235	-9,388709
20	4	-CH <sub>3</sub>	-0,17	-0,05	-0,14	4	-CH <sub>3</sub>	-0,17	-0,05	-0,14	1,125	-9,442793
21	5	-NO <sub>2</sub>	0,71	1,09	0,05	4	-CH <sub>3</sub>	-0,17	-0,05	-0,14	1,231	— <sup>a</sup>
22	5	-Cl	0,37	0,68	-0,14	3,4	-Cl <sub>2</sub>	0,60	1,37	-0,22	1,244	-9,376606
23	5	-Br	0,39	0,71	-0,15	3,4	-Cl <sub>2</sub>	0,60	1,37	-0,22	1,218	— <sup>a</sup>
24	4	-CH <sub>3</sub>	-0,17	-0,05	-0,14	4	- <i>tert</i> -butyl	-0,20	-0,10	-0,14	1,155	— <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Hodnoty energie HOMO orbitalu nebylo možné spočítat.

### 3.1.2 QSER s energiemi HOMO orbitalů

V kapitole 1.3 bylo uvedeno, že hodnota energie nejvýše obsazeného molekulového orbitalu dobře charakterizuje energetické parametry molekuly v případě oxidačních dějů. Proto byla nejprve vyšetřována korelace mezi hodnotami půlvalnových potenciálů a energiemi HOMO orbitalů.

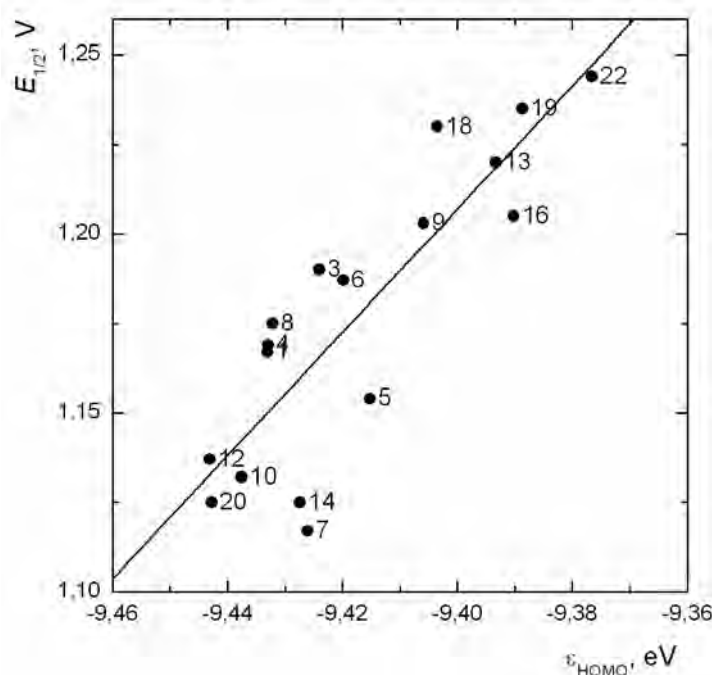
Pro studované deriváty *N*-benzylsalicylthioamidu byla vypočítána energie HOMO orbitalu (výpočet bylo možné provést pouze pro sedmnáct derivátů, tab. 3.2, příčiny neúspěchu kalkulace u zbývajících derivátů nebyly v době sepsování této diplomové práce vysvětleny) a následně získána uspokojivá korelace mezi půlvlnovým potenciálem a hodnotou energie HOMO orbitalu

$$E_{1/2} \text{ (V)} = -1,723 (\pm 0,271) \varepsilon_{\text{HOMO}} \text{ (eV)} + 17,402 (\pm 2,552) \quad (3.1)$$

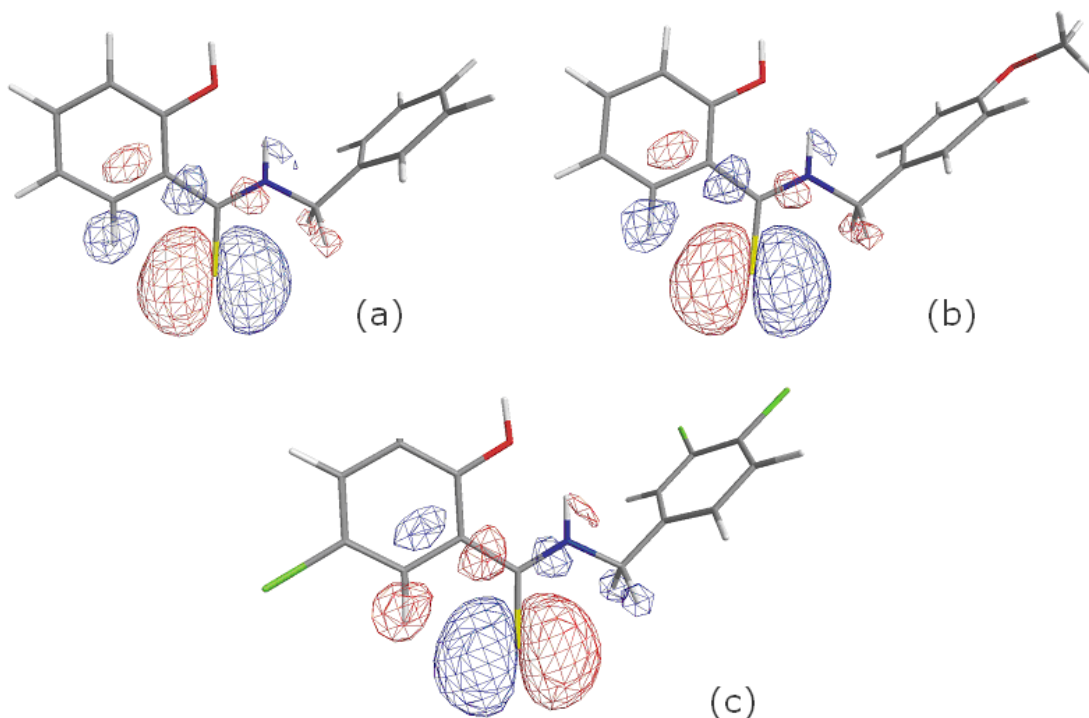
$$n = 17, r = 0,8540, s_y = 0,022$$

$$F = 40,42 > F_{2, 17, 0,05} = 3,59$$

Graficky je tato korelace znázorněna na obr. 3.4. Z platnosti této korelace lze, v souladu s teorií hraničních molekulových orbitalů, předpokládat, že při elektrochemické oxidaci *N*-benzylsalicylthioamidů je elektron odnímám z atomu s nejvyšší hustotou HOMO orbitalu. Kvantově-chemický výpočet ukazuje, že tímto atomem je pro všechny studované deriváty atom síry (obr. 3.5).



Obr. 3.4 Korelace mezi naměřenými hodnotami půlvlnových potenciálů studovaných derivátů *N*-benzylsalicylthioamidu a vypočítanými hodnotami energie HOMO orbitalu,  $r = 0,8540$  (čísla u jednotlivých bodů odpovídají číslování derivátů).



Obr. 3.5 Rozložení HOMO orbitalů vypočítaných programem Gaussian<sup>®</sup> 03W, ver. 6.0, pro (a) *N*-benzyl-2-hydroxythiobenzamid (derivát **1**), (b) *N*-(4-methoxybenzyl)-2-hydroxythiobenzamid (derivát **7**), (c) *N*-(3,4-dichlorobenzyl)-5-chlor-2-hydroxythiobenzamid (derivát **22**).

### 3.1.3 QSER se substituentovými konstantami

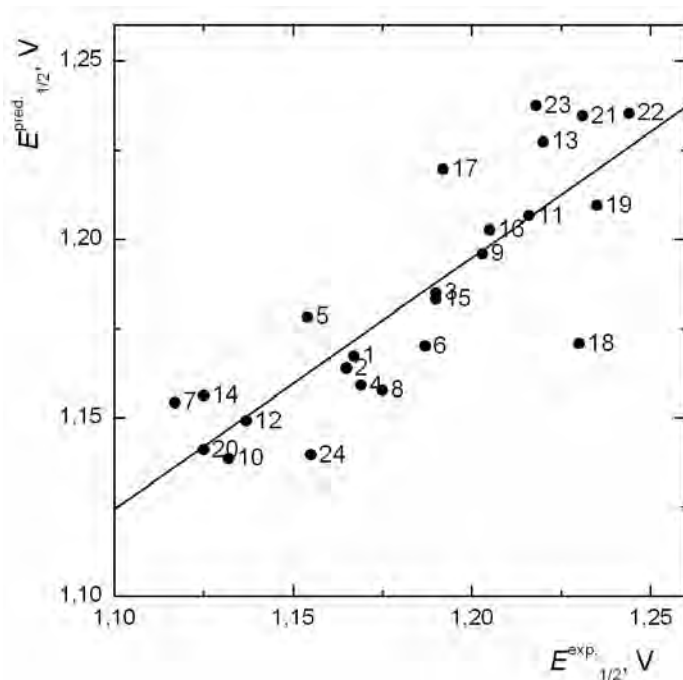
Vliv substituentů na voltametrické chování studovaných derivátů *N*-benzylsalicylthioamidu pro půlvlnový potenciál byl dále kvantifikován pomocí Hammettových  $\sigma$  konstant. Byla provedena korelační analýza vztahu mezi naměřenými hodnotami půlvlnových potenciálů a příslušných substituentových Hammettových  $\sigma$  konstant, a nalezena následující korelační rovnice:

$$E_{1/2} \text{ (V)} = 0,106 (\pm 0,018)\sigma_{R1} + 0,048 (\pm 0,016)\sigma_{R2} + 1,167 (\pm 0,005) \quad (3.2)$$

$$n = 24; r = 0,8402; s_y = 0,022$$

$$F = 25,20 > F_{2;24;0,05} = 3,40$$

Vzájemnou korelaci mezi změřenými a vypočítanými hodnotami půlvlnových potenciálů podle rovnice (3.2) zachycuje obr. 3.6.



Obr. 3.6 Korelace mezi naměřenými hodnotami půlvolných potenciálů studovaných derivátů *N*-benzylsalicylthioamidu a hodnotami půlvolných potenciálů vypočítaných podle rovnice (3.2),  $r = 0,8402$  (čísla u jednotlivých bodů odpovídají očíslovaným derivátům).

Nevýhodou Hammettových konstant může být skutečnost, že jsou mírou celkového elektronového efektu substituentů a nerozlišují mezi induktivním a mezomerním efektem. Tento nedostatek se pokusili odstranit Swain a Lupton, a dospěli k závěru, že každý elektronový parametr lze vyjádřit  $F$  a  $R$  konstantami, jež popisují zvlášť vliv induktivního (field) a mezomerního (resonance) efektu<sup>84</sup>. K otestování korelační rovnice (3.2) byla provedena korelační analýza s použitím Swain-Luptonových  $F$  a  $R$  konstant, a získána následující rovnice:

$$E_{1/2}(\text{V}) = 0,057 (\pm 0,013)F_{R1} + 0,153 (\pm 0,035)R_{R1} + 0,032 (\pm 0,010)F_{R2} + \quad (3.3)$$

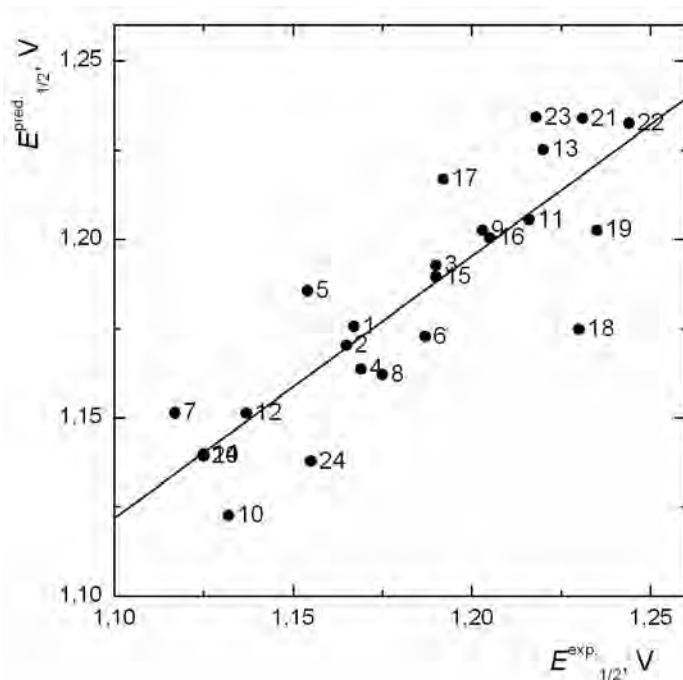
$$+ 0,074 (\pm 0,040)R_{R2} + 1,176 (\pm 0,009)$$

$$n = 24; r = 0,8578; s_y = 0,025$$

$$F = 13,22 > F_{4;24;0,05} = 2,78$$

Vzájemnou korelaci mezi změřenými a vypočítanými hodnotami půlvolných potenciálů podle rovnice (3.3) zachycuje obr. 3.7.





Obr. 3.7 Korelace mezi naměřenými hodnotami půlvlnových potenciálů studovaných derivátů *N*-benzylsalicylthioamidu a hodnotami půlvlnových potenciálů vypočítaných podle rovnice (3.3),  $r = 0,8578$  (čísla u jednotlivých bodů odpovídají očíslovaným derivátům).

#### 3.1.4 Diskuse

Graficky znázorněná korelace na obrázku 3.5 dle regresní rovnice (3.1) ukazuje uspokojivý vzájemný vztah mezi půlvlnovým potenciálem a hodnotou energie HOMO orbitalu. Z hodnoty korelačního koeficientu lze soudit, že je rovnice dobře použitelná pro většinu studovaných derivátů a je statisticky platná.

Z podobných hodnot korelačních koeficientů ze vztahu naměřených hodnot půlvlnových potenciálů s Hammetovými konstantami (rovnice 3.2) nebo Swain-Luptonovými konstantami (rovnice 3.3) je patrné, že oba typy substituentových konstant mají stejný vliv. Jejich záměna by nevedla ke změně platnosti QSPR rovnic.

Stejným způsobem vzájemného porovnání byla provedena i analýza vztahu mezi naměřenými hodnotami půlvlnových potenciálů a jednotlivých Hammetových konstant  $\sigma_{R1}$ ,  $\sigma_{R2}$  a vzájemně oddělených Swain-Luptonových konstant  $F$  a  $R$ . Nalezené korelační rovnice byly nevyhovující, jelikož se všechny korelační koeficienty snížily téměř o polovinu.

Porovnání hodnot koeficientů i grafické znázornění korelačních rovnic ukazuje, že všechny korelační rovnice (3.1–3.3) jsou statisticky platné a všechny užití přístupy dobře popisují vztah mezi strukturou molekuly a jejím půlvlnovým potenciálem.

## **3.2 Vliv prostředí na voltametrické chování látek**

### **3.2.1 Studium vlivu prostředí**

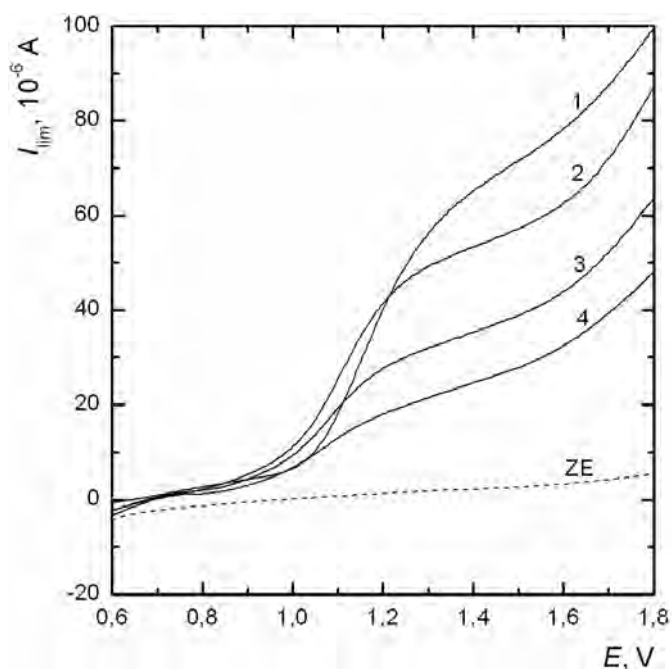
Byl studován vliv prostředí na voltametrické chování vybraných zástupců derivátů *N*-benzylsalicylthioamidu. Ke studiu byly vybrány čtyři deriváty **1**, **9**, **11** a **20**, tedy derivát nesubstituovaný, derivát substituovaný jen na benzylovém kruhu, derivát substituovaný jen na salicylovém kruhu a derivát substituovaný na obou kruzích. Pro sledování vlivu prostředí na chování látek byla použita kyselina chloristá, báze 1,8-diazabicyklo[5.4.0]-undec-7-en a voda. Byly naměřeny změny půlvlnových potenciálů a limitních proudů vybraných derivátů v závislosti na koncentraci látky ovlivňující prostředí (tab. 3.2).

Graficky je vliv prostředí na voltametrické chování demonstrován na obr. 3.8–3.10.

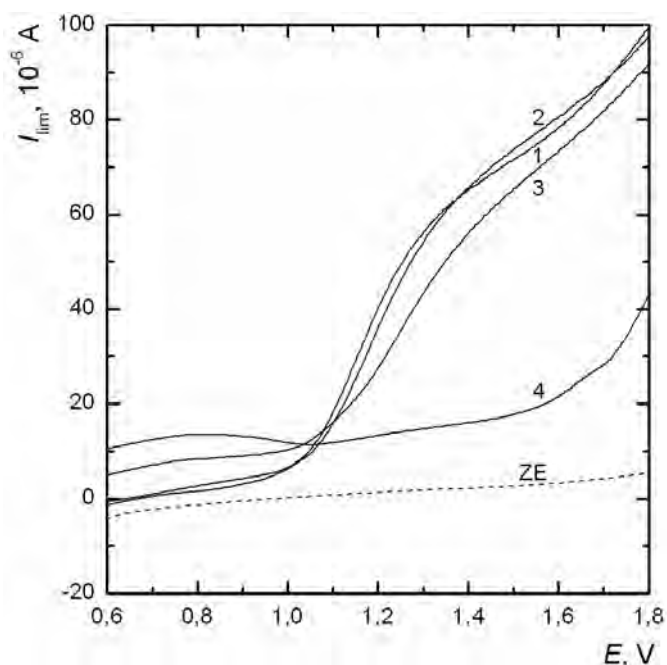
Tab. 3.2 Půlvolnové potenciály a limitní proudy studovaných derivátů *N*-benzylsalicylthioamidu v 0,1 mol dm<sup>-3</sup> chloristanu sodném v acetonitrilu ( $c = 2 \times 10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup>,  $A = 14$  mm<sup>2</sup>,  $v = 10$  mV s<sup>-1</sup>,  $\omega = 1226$  ot min<sup>-1</sup>, měřeno proti Ag/0,01 mol dm<sup>-3</sup> AgNO<sub>3</sub>/0,1 mol dm<sup>-3</sup> NaClO<sub>4</sub>) v závislosti na přidávku HClO<sub>4</sub>, DBU a H<sub>2</sub>O do základního elektrolytu

derivát	HClO <sub>4</sub>			DBU			H <sub>2</sub> O		
	$c$ [mol l <sup>-1</sup> ]	$E_{1/2}$ [V]	$I_{lim}$ [μÁ]	$c \times 10^4$ [mol l <sup>-1</sup> ]	$E_{1/2}$ [V]	$I_{lim}$ [μÁ]	$c$ [mol l <sup>-1</sup> ]	$E_{1/2}$ [V]	$I_{lim}$ [μÁ]
<b>1</b>	0,00	1,147	34,21	0,00	1,234	55,51	0,00	1,245	68,16
	0,10	1,143	33,42	0,50	1,227	40,05	0,10	1,262	63,96
	0,25	1,125	24,58	1,00	1,233	36,21	0,50	1,240	53,58
	0,50	1,123	17,04	1,50	— <sup>a</sup>	— <sup>a</sup>	0,75	1,270	54,13
	0,75	1,120	10,23	2,00	— <sup>a</sup>	— <sup>a</sup>	1,00	— <sup>a</sup>	— <sup>a</sup>
	1,00	1,098	8,26	2,50	— <sup>a</sup>	— <sup>a</sup>	2,50	— <sup>a</sup>	— <sup>a</sup>
	1,50	1,099	5,89	3,00	— <sup>a</sup>	— <sup>a</sup>	5,00	— <sup>a</sup>	— <sup>a</sup>
<b>9</b>	0,00	1,188	27,85	0,00	1,293	48,66	0,00	1,345	52,59
	0,10	1,171	22,02	0,50	1,285	43,59	0,10	1,310	42,27
	0,25	1,132	18,35	1,00	1,310	35,36	0,50	1,270	42,34
	0,50	1,100	13,20	1,50	1,316	29,10	0,75	1,261	39,91
	0,75	1,082	8,65	2,00	1,320	29,89	1,00	— <sup>a</sup>	— <sup>a</sup>
	1,00	— <sup>a</sup>	— <sup>a</sup>	2,50	1,377	17,30	2,50	— <sup>a</sup>	— <sup>a</sup>
	1,50	— <sup>a</sup>	— <sup>a</sup>	3,00	— <sup>a</sup>	— <sup>a</sup>	5,00	— <sup>a</sup>	— <sup>a</sup>
<b>11</b>	0,00	1,193	35,98	0,00	1,260	59,64	0,00	1,190	49,02
	0,10	1,183	34,40	0,50	1,286	51,12	0,10	1,176	42,90
	0,25	1,170	22,61	1,00	1,525	41,29	0,50	1,163	15,86
	0,50	1,163	15,34	1,50	— <sup>a</sup>	— <sup>a</sup>	0,75	1,170	19,93
	0,75	1,143	13,76	2,00	— <sup>a</sup>	— <sup>a</sup>	1,00	1,194	28,90
	1,00	1,146	9,73	2,50	— <sup>a</sup>	— <sup>a</sup>	2,50	1,217	31,45
	1,50	1,150	6,55	3,00	— <sup>a</sup>	— <sup>a</sup>	5,00	— <sup>a</sup>	— <sup>a</sup>
<b>22</b>	0,00	1,217	31,76	0,00	1,305	44,04	0,00	1,343	39,72
	0,10	1,207	29,88	0,50	1,309	37,16	0,10	1,321	35,39
	0,25	1,173	25,69	1,00	1,301	28,90	0,50	1,273	34,87
	0,50	1,161	13,76	1,50	1,291	34,08	0,75	1,273	31,00
	0,75	1,158	12,35	2,00	1,323	29,50	1,00	— <sup>a</sup>	— <sup>a</sup>
	1,00	— <sup>a</sup>	— <sup>a</sup>	2,50	— <sup>a</sup>	— <sup>a</sup>	2,50	— <sup>a</sup>	— <sup>a</sup>
	1,50	— <sup>a</sup>	— <sup>a</sup>	3,00	— <sup>a</sup>	— <sup>a</sup>	5,00	— <sup>a</sup>	— <sup>a</sup>

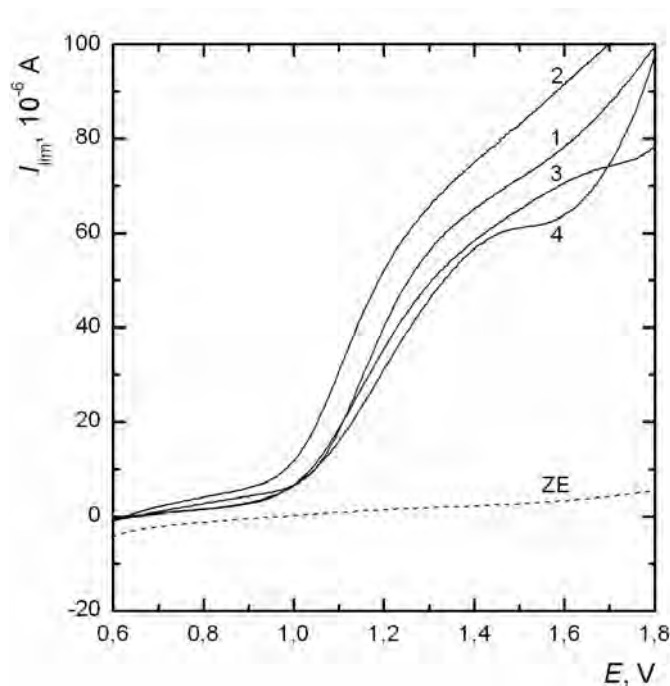
<sup>a</sup> Zánik vlny.



Obr. 3.8 Vliv přítomnosti kyseliny chloristé na DC voltamogram (1) *N*-benzyl-2-hydroxythiobenzamidu (derivát **1**). Koncentrace kyseliny chloristé v základním elektrolytu 0 mol  $dm^{-3}$ , (2) 0,25 mol  $dm^{-3}$ , (3) 0,75 mol  $dm^{-3}$ , (4) 1,50 mol  $dm^{-3}$  v 0,1 mol  $dm^{-3}$  chloristanu sodném v acetonitrilu ( $c = 2 \times 10^{-4}$  mol  $dm^{-3}$ ,  $A = 14$  mm<sup>2</sup>,  $v = 10$  mV s<sup>-1</sup>,  $\omega = 1226$  ot min<sup>-1</sup>, měřeno proti Ag/0,01 mol  $dm^{-3}$  AgNO<sub>3</sub>/0,1 mol  $dm^{-3}$  NaClO<sub>4</sub>).



Obr. 3.9 Vliv přítomnosti báze DBU na DC voltamogram (1) *N*-benzyl-2-hydroxythiobenzamidu (derivát **1**). Koncentrace báze v základním elektrolytu 0 mol  $dm^{-3}$ , (2) 1,0 mol  $dm^{-3}$ , (3) 2,0 mol  $dm^{-3}$ , (4) 3,0 mol  $dm^{-3}$  v 0,1 mol  $dm^{-3}$  chloristanu sodném v acetonitrilu ( $c = 2 \times 10^{-4}$  mol  $dm^{-3}$ ,  $A = 14$  mm<sup>2</sup>,  $v = 10$  mV s<sup>-1</sup>,  $\omega = 1226$  ot min<sup>-1</sup>, měřeno proti Ag/0,01 mol  $dm^{-3}$  AgNO<sub>3</sub>/0,1 mol  $dm^{-3}$  NaClO<sub>4</sub>).



Obr. 3.10 Vliv přítomnosti destilované vody na DC voltamogram (1) *N*-benzyl-2-hydroxythiobenzamidu (derivát **1**). Koncentrace destilované vody v základním elektrolytu 0 mol dm<sup>-3</sup>, (2) 0,50 mol dm<sup>-3</sup>, (3) 0,75 mol dm<sup>-3</sup>, (4) 2,50 mol dm<sup>-3</sup> v 0,1 mol dm<sup>-3</sup> chloristanu sodném v acetonitrilu ( $c = 2 \times 10^{-4}$  mol dm<sup>-3</sup>,  $A = 14$  mm<sup>2</sup>,  $v = 10$  mV s<sup>-1</sup>,  $\omega = 1226$  ot min<sup>-1</sup>, měřeno proti Ag/0,01 mol dm<sup>-3</sup> AgNO<sub>3</sub>/0,1 mol dm<sup>-3</sup> NaClO<sub>4</sub>).

### 3.2.2 Diskuse

U všech studovaných derivátů *N*-benzylsalicylthioamidů byl při použití různého prostředí elektrochemické oxidace zaznamenán stejný trend anodických vln.

Se zvyšující se koncentrací kyseliny chloristé (v rozsahu 1×10<sup>-4</sup> až 1,5 mol dm<sup>-3</sup>) docházelo k postupnému poklesu hodnot půlvolnových potenciálů i hodnot limitních difúzních proudů. V případě derivátu **9** byl posun hodnoty půlvolnového potenciálu vyšší než 100 mV, v ostatních případech poklesla hodnota půlvolnového potenciálu přibližně o 50 mV. Při koncentraci kyseliny chloristé rovné či vyšší než 3×10<sup>-4</sup> mol dm<sup>-3</sup> došlo k zániku vlny.

Se zvyšující se koncentrací 1,8-diazabicyklo[5.4.0]-undec-7-enu (v rozmezí 5×10<sup>-5</sup> až 3×10<sup>-4</sup> mol dm<sup>-3</sup>) docházelo opět k postupnému snižování hodnot půlvolnových potenciálů a limitní difúzní proud klesl z původní hodnoty zhruba na polovinu.

Se zvyšujícím se obsahem vody (v rozsahu 0,1 až 5 mol dm<sup>-3</sup>) docházelo rovněž k snižování hodnot půlvolnových potenciálů i hodnot limitních difúzních proudů.

### 3.3 PŘÍPRAVA A IDENTIFIKACE ELEKTROOXIDAČNÍCH PRODUKTŮ

#### 3.3.1 Příprava elektrooxidačních produktů

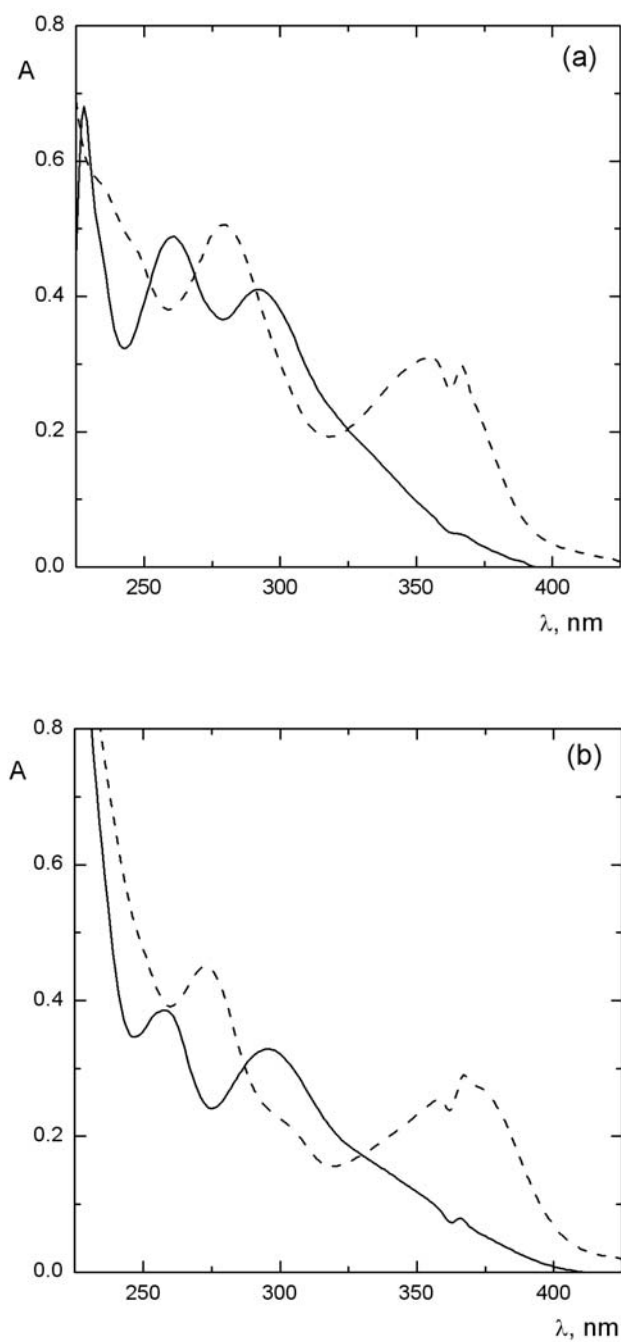
Metodou preparativní elektrolýzy byly připraveny produkty elektrochemické oxidace vybraných dvou *N*-benzylsalicylthioamidů:

- a) *N*-(3-chlorbenzyl)-2-hydroxythiobenzamidu (derivát **3**),
- b) *N*-benzyl-5-chlor-2-hydroxythiobenzamidu (derivát **11**).

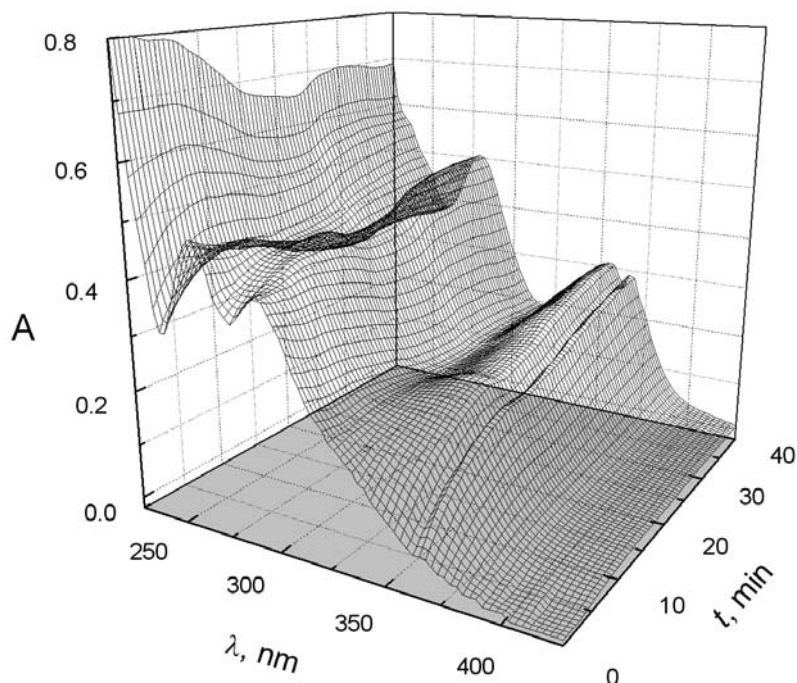
Deriváty k přípravě elektrooxidačních produktů byly zvoleny tak, aby byly substituovány chlorem, jehož izotopické složení umožňuje výhodnější identifikaci struktury produktu elektrooxidace pomocí hmotnostní spektrometrie.

Postupem popsáním v kap. 2.3.3 bylo ve 40 ml 0,1 mol dm<sup>-3</sup> roztoku chloristanu sodného v acetonitrilu elektrolyzováno 10 mg příslušného derivátu při potenciálu odpovídajícímu limitnímu konvektivně-difúznímu proudu DC voltametrie (pro oba deriváty při 1,5 V proti Ag/0,01 mol dm<sup>-3</sup> AgNO<sub>3</sub>/0,1 mol dm<sup>-3</sup> NaClO<sub>4</sub>) po dobu 40 minut. Proud v průběhu elektrolýzy poklesl z 2,5 mA na 0,4 mA.

Průběh elektrolýzy byl sledován měřením UV spekter elektrolyzovaného roztoku. U obou studovaných derivátů byly patrné změny ve spektrech před a po elektrolýze (obr. 3.11), zejména pokles absorpčního maxima při vlnové délce 260 nm a vznik dvou nových absorpčních maxim při vlnových délkách 278 a 360 nm. Na obr. 3.12 je pro ilustraci podán časový průběh UV spekter elektrolyzovaného roztoku při elektrolýze derivátu **3**.



Obr. 3.11 UV spektra elektrolyzovaného roztoku při přípravě produktů elektrooxidace (a) *N*-(3-chlorobenzyl)-2-hydroxythiobenzamidu (derivát **3**), (b) *N*-benzyl-5-chlor-2-hydroxythiobenzamidu (derivát **11**). Plná čára přísluší spektru před elektrolyzou, čárkovaná čára spektru po ukončení elektrolyzy (odebráno 50  $\mu$ l elektrolyzátu a zředěno 1,00 ml acetonitrilu, měřeno v 1cm křemenné kyvetě).



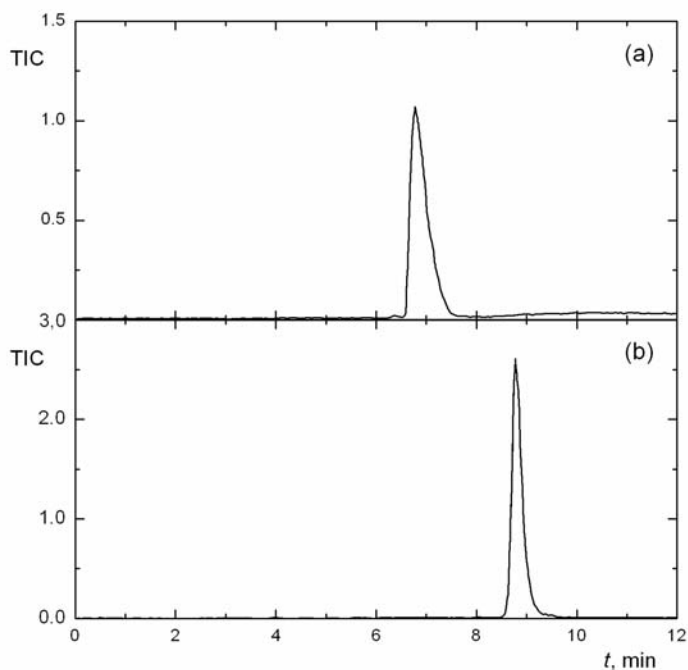
Obr. 3.12 Časový průběh UV spekter elektrolyzovaného roztoku při přípravě produktů elektrooxidace *N*-(3-chlorbenzyl)-2-hydroxythiobenzamidu (derivát **3**). Odebráno (v časech (v časech 0, 2,5, 5, 7,5, 10, 20, 30 a 40 minut od zahájení elektrolýzy) vždy 50  $\mu$ l elektrolyzátu a zředěno 1,00 ml acetonitrilu, měřeno v 1cm křemenné kyvetě.

### 3.3.2 Identifikace produktů elektrooxidace

Produkty elektrooxidace obou studovaných derivátů **3** a **11** byly podrobeny analýze na kapalinovém chromatografu ve spojení s hmotnostním detektorem, za podmínek popsanych v kap. 2.3.4.

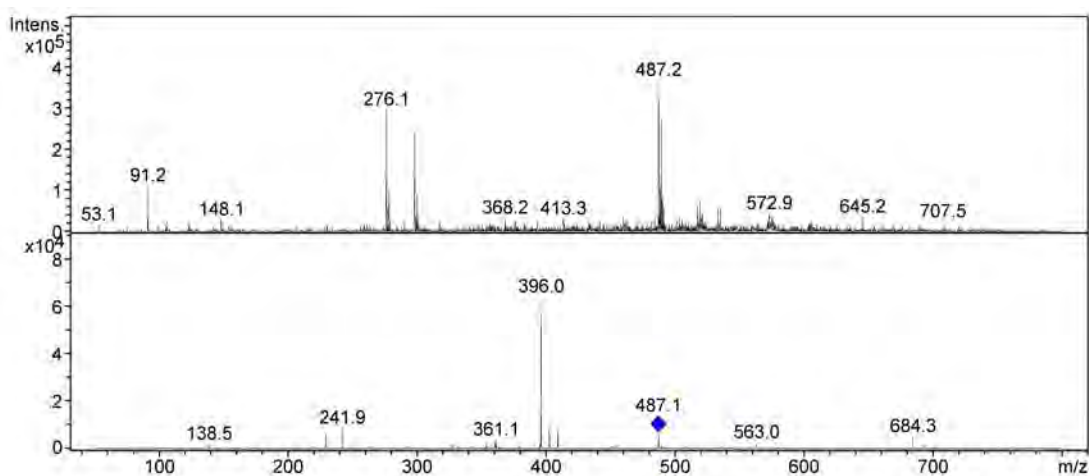
Na obr. 3.13a) je znázorněn HPLC-MS chromatogram výchozího derivátu **3**, který eluoval v retenčním čase 6,77 minut. Chromatogram získaný analýzou produktu elektrochemické oxidace tohoto derivátu je znázorněn na obr. 3.13b); je patrné že vznikl jediný produkt, jehož retenční čas byl 8,11 minut. Podobné chování vykazoval derivát **11**, jehož elektrooxidační produkt eluoval za identických experimentálních podmínek v retenčním čase 9,40 minut.



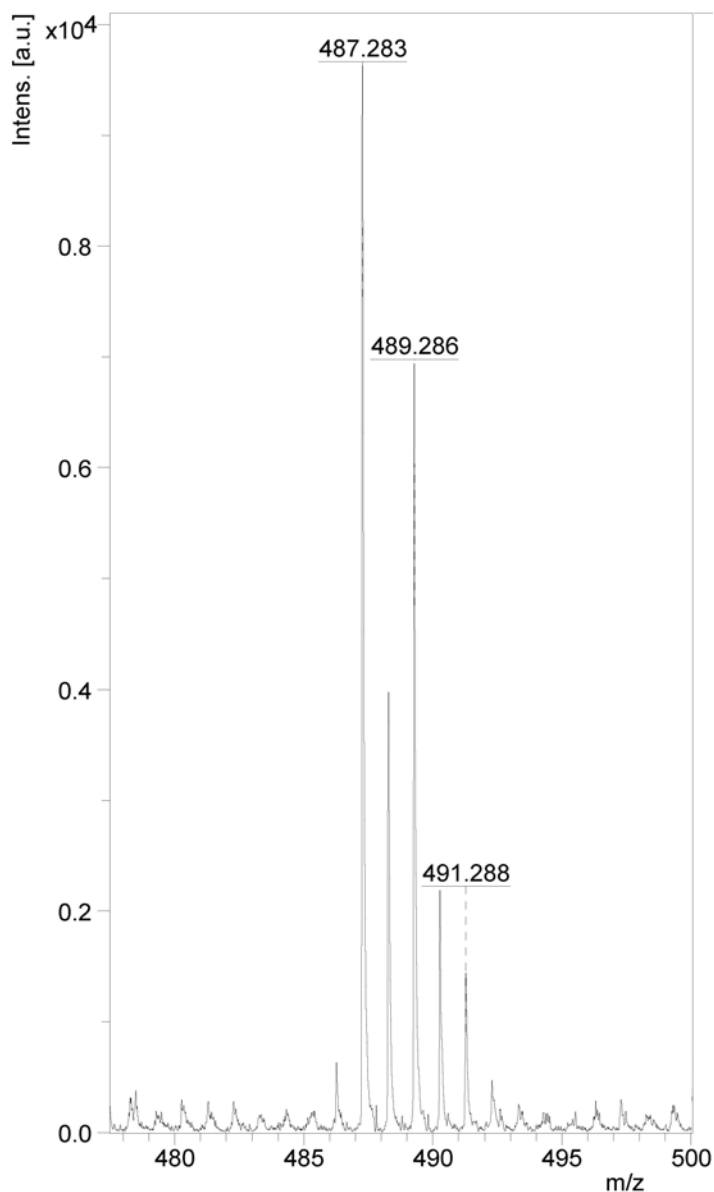


Obr. 3.13 Chromatogramy (a) *N*-(3-chlorbenzyl)-2-hydroxythiobenzamidu (derivát **3**) a (b) produktu jeho elektrochemické oxidace. HPLC-MS na koloně Watrex RP-C18 (250 × 4 mm), mobilní fáze acetonitril:voda v poměru 95:5, průtoková rychlost 0,6 cm<sup>3</sup>min<sup>-1</sup>.

Byla naměřena hmotnostní spektra produktů elektrochemické oxidace obou derivátů. Pro ilustraci je na obr. 3.14 uvedeno hmotnostní spektrum produktu elektrooxidace derivátu **11**. Identifikace tohoto produktu byla podpořena změřením izotopického složení produktu (obr. 3.15), které následně poskytlo sumární vzorec produktu C<sub>28</sub>H<sub>20</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Podobně bylo postupováno v případě druhého studovaného derivátu **3**, u nějž byl identifikován produkt stejného složení.



Obr. 3.14 Hmotnostní spektrum (MS a MS/MS) produktu elektrooxidace *N*-benzyl-5-chlor-2-hydroxythiobenzamidu (derivát **11**) získané ESI ionizací v pozitivním módu.



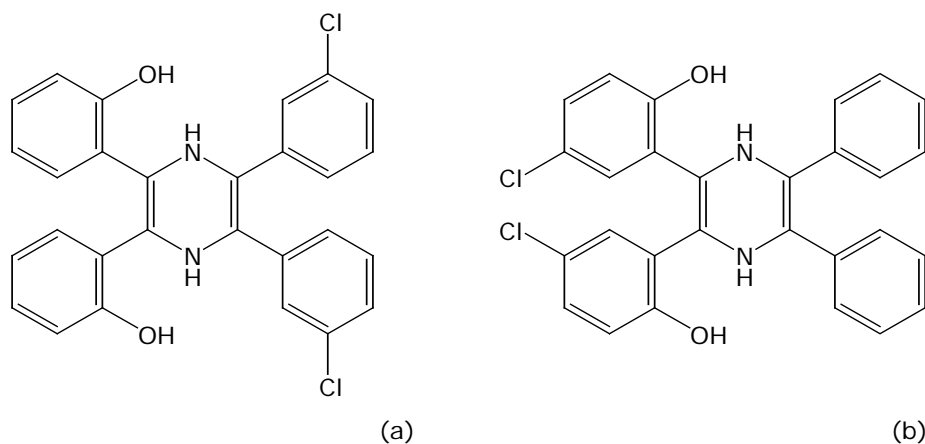
Obr. 3.15 Výřez z MS-TOF spektra produktu elektrooxidace *N*-benzyl-5-chlor-2-hydroxythiobenzamidu (derivát **11**).

### 3.3.3 Diskuse

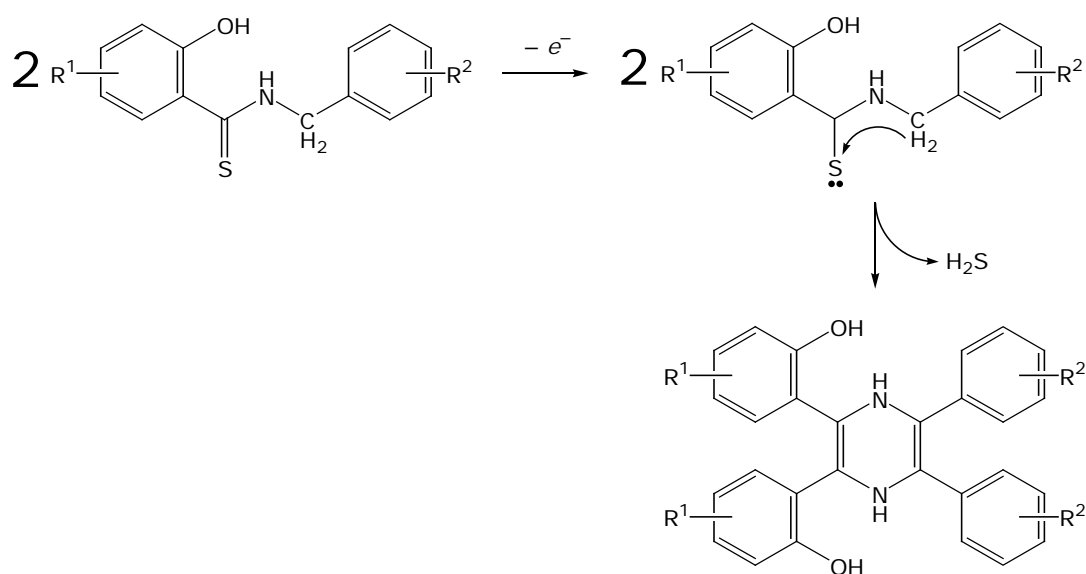
Byly připraveny a následně analyzovány produkty elektrochemické oxidace dvou vybraných *N*-benzylsalicylthioamidů. Ze získaných hmotnostních spekter bylo možné navrhnout struktury identifikovaných produktů elektrochemické oxidace studovaných derivátů (obr. 3.16).

Na základě zjištěných skutečností lze navrhnout následující schéma elektrochemické oxidace *N*-benzylsalicylthioamidů. Elektrochemická oxidace je

zahájena odebráním elektronů z atomu síry s následným přesunem náboje na atom dusíku, následuje odštěpení molekuly sirovodíku a uzavření nového kruhu mezi dvěma molekulami příslušného *N*-benzylsalicylthioamidu (obr. 3.17). Zjištěné skutečnosti jsou v dobré shodě s literárními údaji (výše uvedená rovnice (1.1) a práce<sup>49, 50</sup>), stejně tak se zjištěným rozložením energie HOMO orbitalů (kap. 3.1.2).



Obr. 3.16 Struktury identifikovaných produktů elektrochemické oxidace (a) *N*-(3-chlorbenzyl)-2-hydroxythiobenzamidu (derivát **3**), (b) *N*-benzyl-5-chlor-2-hydroxythiobenzamidu (derivát **11**).



Obr. 3.17 Navržené schéma elektrochemické oxidace *N*-benzyl-2-hydroxythiobenzamidů.

## 4 ZÁVĚR

Předkládaná diplomová práce se zaměřila na QSER studium elektrochemických vlastností nově syntetizovaných derivátů *N*-benzylsalicylthioamidu a na přípravu a pokus o identifikaci produktů jejich elektrochemické oxidace.

V první části byl studován vliv substituentů na anodický půlvlnový potenciál studovaných látek v prostředí acetonitrilu. Bylo zjištěno, že všechny studované deriváty jsou elektrochemicky aktivní. Byly naměřeny půlvlnové potenciály všech studovaných derivátů a pomocí QSPR analýzy byly nalezeny a otestovány korelační rovnice kvantifikující vliv substituentů na hodnotu anodického půlvlnového potenciálu, a to jednak regresní rovnice popisující závislost půlvlnového potenciálu na energii HOMO orbitalu

$$E_{1/2} (\text{V}) = -1,723 (\pm 0,271) \varepsilon_{\text{HOMO}} (\text{eV}) + 17,402 (\pm 2,552) \quad (3.1)$$

Z platnosti této korelace lze, v souladu s teorií hraničních molekulových orbitalů, předpokládat, že při elektrochemické oxidaci *N*-benzylsalicylthioamidů je elektron odnímán z atomu s nejvyšší hustotou HOMO orbitalu. HOMO orbital je podle kvantově-chemických výpočtů lokalizován na atomu síry. Podobně byla vypočítána i regresní rovnice popisující vztah mezi půlvlnovými potenciály studovaných látek a hodnotami klasických Hammettových  $\sigma$  konstant.

$$E_{1/2} (\text{V}) = 0,106 (\pm 0,018) \sigma_{\text{R1}} + 0,048 (\pm 0,016) \sigma_{\text{R2}} + 1,167 (\pm 0,005) \quad (3.2)$$

Podobné hodnoty korelačního koeficientu mezi naměřenými a vypočítanými hodnotami bylo dosaženo užitím Swain-Luptonových konstant v úpravě dle Norringtona. Byla získána korelační rovnice zahrnující  $F$  i  $R$  konstanty pro oba substituenty

$$E_{1/2} (\text{V}) = 0,057 (\pm 0,013)F_{R1} + 0,153 (\pm 0,035)R_{R1} + 0,032 (\pm 0,010)F_{R2} + \quad (3.3) \\ + 0,074 (\pm 0,040)R_{R2} + 1,176 (\pm 0,009)$$

Korelační rovnice (3.2–3.3) se ukázaly jako statisticky platné a z hodnot korelačních koeficientů je patrné, že oba typy substituentových konstant mají stejný vliv na molekulovou strukturu. Jejich záměna by nevedla ke změně platnosti QSPR rovnic.

Byl prostudován vliv reakčního prostředí na průběh elektrochemické oxidace. Bylo zjištěno, že přídavky kyseliny, zásady i vody mají vliv na průběh elektrochemické oxidace. S jejich vzrůstající koncentrací docházelo k postupnému snižování hodnot půlvlnových potenciálů i hodnot limitních konvektivně-difúzních proudů studovaných látek.

V druhé části práce byly připraveny a analyzovány elektrooxidační produkty dvou vybraných derivátů. V obou případech byl identifikován jediný produkt obdobného složení. Identifikace tohoto produktu byla podpořena změřením jeho izotopického složení. Ze získaných produktů elektrolyzy je patrné, že je elektrochemická oxidace zahájena odebráním elektronů z atomu síry s následným přesunem náboje na atom dusíku, následuje odštěpení molekuly sirovodíku a uzavření nového kruhu mezi dvěma molekulami příslušného *N*-benzylsalicylthioamidu. Z hlediska *in vivo* biotransformace by navržené schéma odpovídalo S-oxidaci. Ta byla (včetně odštěpování sirovodíku) detailně popsána i u sloučenin strukturně podobných studovaným *N*-benzylsalicylthioamidům, například u thioacetamidu<sup>85</sup> nebo methimazolu<sup>86</sup>.

## LITERATURA

- [1] McMurry, J.: *Organická Chemie*. Brno, VUTIUM 2007.
- [2] Pauling, L.: *The Nature of the Chemical Bond*. 3rd ed. New York, Cornell University Press 1960.
- [3] Wiberg, K. B.; Rush, D. J.: Solvent effects on the thioamide rotational barrier: an experimental and theoretical study. *Journal of the American Chemical Society* **123**, 2038–2046 (2001).
- [4] Ho-Jin, L.; Young-Sang, Ch.; Kang-Bong, L.; Jeunghee, P.; Chang-Ju, Y.: Hydrogen bonding abilities of thioamide. *Journal of Physical Chemistry* **106**, 7010–7017 (2002).
- [5] Zieliński, T.; Jurczak, J.: Thioamides versus amides in anion binding. *Tetrahedron* **61**, 4081–4089 (2005).
- [6] Sośnicki, J. G.; Hansen, P. E.: Temperature coefficient of NH chemical shifts of thioamides and amides in relation to structure. *Journal of Molecular Structure* **700**, 91–103 (2004).
- [7] US Pat 4460776. Wepplo, P. J.: *Process for the Preparation of 6-Substituted-2,3-pyridinedicarboxylic Acid Diesters*. 17.7.1984.
- [8] US Pat 4439607. Drabb, T. W.: *Method for the Preparation of Certain Pyridine and Quinoline 2,3-Dicarboxylic Anhydrides*. 27.3.1984.
- [9] Jenny, Ch.; Heimgartner, H.: Synthesis of 4,4-disubstituted 1,3-thiazol-5(4*H*)-thiones. *Helvetica Chimica Acta* **69**, 374–388 (1986).
- [10] Jenny, Ch.; Heimgartner, H.: 2,4-Bis(4-methylphenylthio)-1,3,2λ<sup>5</sup>,4λ<sup>5</sup>-dithiadiphosphetane-2,4-dithione: A new reagent for thiation of *N,N*-disubstituted amides. *Helvetica Chimica Acta* **70**, 1001–1011 (1987).
- [11] Breitenmoser, R. A.; Heimgartner H.: Synthesis and use of 2*H*-azirin-3-amines as dipeptide synthons. *Helvetica Chimica Acta* **85**, 885–912 (2002).
- [12] Hanusek, J.; Hejtmánková, L.; Kubicová, L.; Sedlák, M.: Synthesis of disubstituted 2-benzoyl-aminothiobenzamides and their ring closure to substituted 2-phenylquinazoline-4-thiones. *Molecules* **6**, 323–337 (2001).
- [13] Zubruev, O. I.; Stiasni, N.; Kappe, C. O.: Preparation of thioamide building blocks via microwave-promoted three-component kindler reactions. *Journal of Combinatorial Chemistry* **5**, 145–148 (2003).
- [14] Okamoto, K.; Yamamoto, T.; Kanbara, T.: Efficient synthesis of thiobenzanilides by willgerodt-kindler reaction with base catalysts. *Synlett* **17**, 2687–2690 (2007).

- [15] Heimgartner, H.; Arnhold, F. S.; Fritschi, S. P.; Koch, K. N.; Magirius, J. E. F.; Linden, A.: 1,3-Oxazol-5(4*H*)-ones as intermediates in the formation of macrolides, cyclodepsipeptides and cyclopeptides. *Journal of Heterocyclic Chemistry* **36**, 1539–1547 (1999).
- [16] Sedlák, M.; Drabina P.; Hanusek, J.: Cyclisation reactions giving 5, 5-dimethyl-2-phenyl-imidazolin-4-thiones and 4, 4-dimethyl-2-phenylthiazolin-5-ones. *Heterocyclic Communications* **9**, 129–134 (2011).
- [17] Brennan, P. J.: Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium Tuberculosis*. *Journal of Infection Diseases* **83**, 91–97 (2003).
- [18] Ellner, J. J.; Goldberger, M. J.; Parenti, D. M.: *Mycobacterium avium* infection and AIDS: a therapeutic dilemma in rapid evolution. *Journal of Infection Diseases* **163**, 1326–1335 (1991).
- [19] Böttger, E. C.; Springer, B.: Tuberculosis: drug resistance, fitness, and strategies for global control. *European Journal of Pediatrics* **167**, 141–148 (2008).
- [20] World Health Organization. Data dostupná z: <http://www.who.int/tb/publications/factsheets/en/index.html> [cit. 16.1.2013].
- [21] Snider, D. E.; Castro, K G.: The global threat of drug-resistant tuberculosis. *The New England Journal of Medicine* **338**, 1689–1691 (1998).
- [22] Seddon, J. A.; Hesselring, A. C.; Marais, B. J.; McIlleron, H.; Peloquin, Ch. A.; Donald, P. R.; Schaaf, H. S.: Paediatric use of second-line anti-tuberculosis agents: A review. *Tuberculosis* **92**, 9–17 (2012).
- [23] Gandhi, N. R.: Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a threat to global control of tuberculosis. *Lancet* **375**, 1830–1843 (2010).
- [24] Wang, F.; Langley, R.; Gulten, G.; Dover, L. G.; Besra, G. S.; Jacobs Jr., W. R.; Sacchettini, J. C.: Mechanism of thioamide drug action against tuberculosis and leprosy. *The Journal of Experimental Medicine* **204**, 73–78 (2007).
- [25] Vinšová, J.; Krátký, M.: *Drug-Resistant Tuberculosis: Causes, Diagnosis and Treatments*. New York, Nova Publishers 2009.
- [26] Krátký, M.; Vinšová, J.: Pokroky ve vývoji antituberkulotik působících na multilékově rezistentní kmeny – suplement. *Chemické listy* **104**, 998–1005 (2010).
- [27] Krinková, J.; Doležal, M.; Hartl, J.; Buchta, V.; Pour, M.: Synthesis and biological activity of 5-alkyl-6-(alkylsulfanyl)- or 5-alkyl-6-(arylsulfanyl)pyrazine-2-carboxiamides and corresponding thioamides. *Il Farmaco* **57**, 71–78 (2002).
- [28] Waisser, K.; Petrlíková, E.; Jílek, P.; Dufková, I.: Antibacterial activity of *N*-benzylsalicylthioamides. *Folia Microbiologica* **55**, 418–421 (2010).
- [29] Petrlíková, E.; Waisser, K.; Buchta, V.; Jílek, P.; Vejsová, M.: *N*-benzylsalicylthioamides as novel compounds with promising antimycotic activity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **20**, 4535–4538 (2010).
- [30] Waisser, K.; Peřina, M.; Klimešová, V.; Kaustová, J.: On the relationship between the structure and antimycobacterial activity of substituted *N*-benzylsalicylamides. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **68**, 1275–1294 (2003).

- [31] Ray, S.: QSAR Modeling of Antimycobacterial activities of *N*-benzylsalicylamides and *N*-benzylsalicylthioamides derivatives against *Mycobacterium kansasii* CNCTC My (6509/96) using stepwise and PLS Method. *International Journal of ChemTech Research* **4**, 41–47 (2012).
- [32] Ray, S.: QSAR Modeling of antimycobacterial activities of *N*-benzylsalicylamides and *N*-benzylsalicylthioamides derivatives against *Mycobacterium avium* CNCTC My (330/88) using electropological state atom (e-state) parameters. *International Journal of ChemTech Research* **4**, 99–105 (2012).
- [33] Barry, C. E.; Slayden, R. A.; Sampson, A. E.; Lee, R. E.: Use of genomics and combinatorial chemistry in the development of new antimycobacterial drugs. *Biochemical Pharmacology* **59**, 221–231 (2000).
- [34] Doležal, R.; Waissner, K.; Petrlíková, E.; Kuneš, J.; Kubicová, L.; Macháček, M.; Kaustová, J.; Dahse, H. M.: *N*-Benzylsalicylthioamides: Highly active potential antituberculosis. *Archiv der Pharmazie* **342**, 113–119 (2009).
- [35] Lüllmann, H.; Mohr, K.; Hein, L.: *Barevný atlas farmakologie*. 5. přeprac. vydání. Praha, Grada 2007.
- [36] Katzung, B. G.: *Základní a klinická farmakologie*. Praha, H+H 2006.
- [37] Behnken, S.; Lincke, T.; Kloss, F.; Ishida, K.; Hertweck, Ch.: Antiterminator-mediated unveiling of cryptic polythioamides in an anaerobic bacterium. *Angewandte Chemie International Edition* **51**, 2425–2428 (2012).
- [38] Lincke, T.; Behnken, S.; Ishida, K.; Roth, M.; Hertweck, Ch.: Closthioamide: An unprecedented polythioamide antibiotic from the strictly anaerobic bacterium *Clostridium cellulolyticum*. *Angewandte Chemie International Edition* **49**, 2011–2013 (2010).
- [39] EP Pat 09013674. Behnken, S.; Dahse, H. M.; Hertweck, Ch.; Ishida, K.; Lincke, T.; Roth, M.; Kloss, F.: *Closthioamides*. 30.10.2009.
- [40] Petitdemange, E.; Caillet, F.; Giallo, J.; Gaudin, C.: *Clostridium cellulolyticum* sp. nov., a cellulolytic, mesophilic: species from decayed grass. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **34**, 155–159 (1984).
- [41] Behnken, S.; Hertweck, Ch.: Anaerobic bacteria as producers of antibiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology* **96**, 61–67 (2012).
- [42] Wu, M. Ch.; Law, B.; Wilkinson, B.; Micklefield, J.: Bioengineering natural product biosynthetic pathways for therapeutic applications. *Current Opinion in Biotechnology* **23**, 931–940 (2012).
- [43] Kloss, F.; Lincke, T.; Hertweck, Ch.: Highly efficient total synthesis of the *Clostridium*-derived anti-MRSA antibiotic closthioamide. *European Journal of Organic Chemistry* **2011**, 1429–1431 (2011).
- [44] WO Pat 2012142080. Meanwell, N. A.; Wang, T.; Zhang, Z.; Hamann, L. G.; Kadow, J. F.: *Thioamide, Amidoxime and Amidrazone Derivatives as HIV attachment Inhibitors*. 12.4.2011.
- [45] Bănică, F. G.; Florea, M.; Diacu, E.: Electrochemical investigations of thiocinnamamide. *Electroanalysis* **2**, 43–49 (1990).



- [46] Dion, D.; Laviron, E.: The electrochemical reduction of thioisonicotinamide in aqueous medium. *Electrochimica Acta* **43**, 2061–2069 (1998).
- [47] Tapsoba, I.; Medini, H.; BenKhoud, M. L.; Boujlel, K.: Electrochemical reduction of *N*-thioamidoimidates: Application to the synthesis of thiazolo[5,4-*f*]thiazoles. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **569**, 89–93 (2004).
- [48] Davidson, I. E.; Smyth, W. F.: Direct determination of thioamide drugs in biological fluids by cathodic stripping voltammetry. *Analytical Chemistry* **49**, 1195–1198 (1977).
- [49] Iwamoto, M.; Osteryoung, R. A.: Cathodic stripping voltammetry of thioamides on a rotating silver disk electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry* **169**, 181–194 (1984).
- [50] Davidson, I. E.; Smyth, W. F.: A polarographic and voltammetric study of some primary, secondary and tertiary thioamides of pharmaceutical importance. *Analytica Chimica Acta* **147**, 53–64 (1983).
- [51] Cinghiță, D.; Radovan, C.; Dascălu, D.: Anodic voltammetry of thioacetamide and its amperometric determination in aqueous media. *Sensors* **8**, 4560–4581 (2008).
- [52] Berube, D.; Cauquis, G.; Pierre, G.; Fahmy, H. M.: Anodic behaviour of some *para*-substituted  $\alpha$ -cyano  $\alpha$ -carboethoxy thioacetanilides. *Electrochimica Acta* **27**, 281–286 (1982).
- [53] Exner, O.: *Korelační vztahy v organické analýze*. Praha, SNTL/Alfa 1981.
- [54] Hansch, C.; Leo, A.; Hoekman, D. H.: *Exploring QSAR. Vol. 1. Fundamentals and Applications in Chemistry and Biology*. Washington, American Chemical Society 1995.
- [55] Katritzky, A. R.; Karelson, M.; Lobanov, V. S.: *QSPR as a Means of Predicting and Understanding Chemical and Physical Properties in Terms of Structure*. Tartu, Tartu University Press 2001.
- [56] Katritzky, A. R.; Lobanov, V. S.; Karelson, M.: QSPR: the correlation and quantitative prediction of chemical and physical properties from structure. *Chemical Society Review* **24**, 279–287 (1995).
- [57] Katritzky, A. R.; Lobanov, V. S.; Karelson, M.: Quantum-chemical descriptors in QSAR/QSPR studies. *Chemical Reviews* **96**, 1027–1043 (1996).
- [58] Hammett, L. P.: Some relations between reaction rates and equilibrium constants. *Chemical Reviews* **17**, 125–136 (1935).
- [59] Swain C. G.; Lupton, E. C.: Field and resonance components of substituent effect. *Journal of the American Chemical Society* **90**, 4328–4337 (1968).
- [60] Taft, R. V.: *Steric Effect Organic Chemistry*. New York, Wiley 1956.
- [61] Meot-Ner, M.; Adler, A. D.: Interpretation of linear Hammett constant correlations in substituted *ms*-tetraphenylporphins. *Journal of the American Chemical Society* **94**, 4763–4764 (1972).
- [62] Zuman, P.: *Substituent Effects in Organic Polarography*. Plenum Press, New York 1967.
- [63] Sioda, R. E.; Frankowska, B.: Voltammetric oxidation of naphthalene derivatives. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **612**, 147–150 (2008).

- [64] Nekoei, M.; Mohammadhosseini, M.; Gharahbagh, A. A.: Quantitative structure-electrochemistry relationship (QSER) study for prediction of half-wave reduction potentials of some organic compounds. *Analytical and Bioanalytical Electrochemistry* **1**, 159–168 (2009).
- [65] Nesmerak, K.; Nemeč, I.; Sticha, M.; Waisser, K.; Palat, K.: Quantitative structure-property relationships of new benzoxazines and their electrooxidation as a model of metabolic degradation. *Electrochimica Acta* **50**, 1431–1437 (2005).
- [66] Nesměrák, K.; Doležal, R.; Hudská, V.; Bártil, J.; Štícha, M.; Waisser, K.: Quantitative structure-electrochemistry relationship of 1-phenyl-5-benzyl-sulfanyltetrazoles and their electrooxidation as a metabolic model. *Electroanalysis* **22**, 2117–2122 (2010).
- [67] Nesmerak, K.; Nemeč, I.; Sticha, M.; Nemcova, I.; Horka, V.: Structure-property relationships of thioacridines; their electrochemical oxidation as a model of metabolic degradation. *Analytical Letters* **35**, 1617–1629 (2002).
- [68] Evans, G.: *A Handbook of Bioanalysis and Drug Metabolism*. New York, CRC Press 2004.
- [69] Perlík F.: *Základy farmakologie*. Praha, Galén 2005.
- [70] Lincová, D.; Farghali, H.: *Základní a aplikovaná farmakologie*, 2. vydání. Praha, Galén, Karolinum 2007.
- [71] Dryhurst, G.; Kadish, K. M.; Scheller, F.; Renneberg, R.: *Biological Electrochemistry. Vol. 1*. New York, Academic Press 1982.
- [72] Ball, R. V.; Eckert, G. M.; Gutmann, F.; Wong, D. K.Y.: An electrochemical and spectrophotometric study of some charge-transfer complexes involving drug molecules in acetonitrile. *Electroanalysis* **8**, 66–74 (1996).
- [73] Nesměrák, K.; Nemeč, I.; Štícha, M.; Gabriel, J.; Mirceski, V.: Electrochemical oxidation of probucol in anhydrous acetonitrile. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **64**, 1100–1110 (1999).
- [74] Lohmann, W.; Karst, U.: Biomimetic modeling of oxidative drug metabolism. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **391**, 79–96 (2008).
- [75] Eckert, G. M.; Gutmann, F.; Keyzer, H.: *Electropharmacology*. Boca Raton CRC Press 1990.
- [76] Hansch, C.; Leo, A.; Hoekman, D.: *Exploring QSAR. Vol. 2. Hydrophobic, Electronic, and Steric Constants*. Washington, American Chemical Society 1995.
- [77] Norrington, F. E.; Hyde, R. M.; Williams, S. G.; Wootton, R.: Physicochemical-activity relations in practice. 1. Rational and self-consistent data bank. *Journal of Medicinal Chemistry* **18**, 604–607 (1975).
- [78] Hansch, C.; Leo, A.; Unger, S. H.; Kim, K. H.; Nikaitani, D.; Lien, E. J.: „Aromatic“ substituent constants for structure-activity correlations. *Journal of Medicinal Chemistry* **16**, 1207–1216 (1973).
- [79] *Gaussian 06*, Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, Jr., J. A.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.;

- Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, J. M.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V. G.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas, Ö.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, D. J. Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2003.
- [80] Doerffel, K.; Eckschlager, K.: *Optimální postup chemické analýzy*. Praha, SNTL 1985.
- [81] Miller, J. C.; Miller, J. N.: *Statistics for Analytical Chemistry. 2nd*. New York, Ellis Horwood 1992.
- [82] Said, H.A.; Mhalla, F.M.; Amatore, C.; Verpeaux, J.N.: Mechanistic investigation of the anodic oxidation of *p*-methoxytoluene in dry and wet acetonitrile. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **464**, 85–92 (1999).
- [83] Fabre, B.; Michelet, K.; Simonet, N.; Simonet, J.: Electrochemical oxidation of 1,4-dialkoxybenzenes in organic media. Reversible one-electron process in a methylene chloride/trifluoroacetic acid mixture and electropolymerization reaction in dry acetonitrile. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **425**, 67–75 (1997).
- [84] Kuchař, M.; Rejholec, V.: *Využití kvantitativních vztahů mezi strukturou a biologickou aktivitou*. Praha, Academia 1987.
- [85] Dodge, A.G.; Richman, J.E.; Johnson, G.; Wackett, L.P.: Metabolism of thioamides by *Ralstonia pickettii* TA. *Applied and Environmental Microbiology* **72**, 7468–7476 (2006).
- [86] Poulsen, L.L.; Hyslop, R.M.; Ziegler D.M.: S-oxidation of thioureylenes catalyzed by a microsomal flavoprotein mixed-function oxidase. *Biochemical Pharmacology* **24**, 3431–3440 (1974).