

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

Katedra anorganické a organické chemie



**Syntéza substituovaných arylguanidinů**  
**jako potenciálních léčiv IX.**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Karel Palát, CSc.

Hradec Králové 2014

Ondřej Vidrna

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

V Hradci Králové dne 15.5.2014

Děkuji PharmDr. Karlu Palátovi, CSc. za jeho odborné rady a celkově všestrannou pomoc při vypracování diplomové práce.

Dále bych rád poděkoval PharmDr. Marcelu Špulákovi, Ph.D. za pomoc při měření hmotnostních spekter, doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. za změřeni NMR spekter a Ivě Vencovské za změřeni IČ spekter.

Za provedení biologických testů děkuji Mgr. Marcele Vejsové, Ph.D., PharmDr. Petru Jílkovi, CSc. a Idě Dufkové.

# Obsah

Abstrakt .....	6
Abstract .....	7
1. Úvod a cíl diplomové práce .....	8
2. Metodická část .....	16
2.1. Chemická část .....	16
2.1.1. Příprava sulfidů .....	16
2.1.2. Redukce nitrosloučenin .....	17
2.1.3. Příprava 2-(alkylsulfanyl)-5-methylanilin-chloridů .....	18
2.1.4. Příprava arylguanidinů .....	18
2.1.5. Oxidace sulfidů .....	19
2.1.6. Celkové schéma syntézy .....	20
2.2. Mikrobiologická část .....	21
3. Experimentální část .....	22
3.1. Chemická část .....	22
3.1.1. Příprava aktivní mědi .....	23
3.1.2. Příprava oktyl-(4-methyl-2-nitrophenyl)sulfidu .....	24
3.1.3. Příprava 5-methyl-2-(oktylsulfanyl)anilinu .....	29
3.1.4. Příprava 5-methyl-2-(oktylsulfanyl)anilinium chloridu .....	31
3.1.5. Příprava 1-[5-methyl-2-(oktylsulfanyl)fenyl]guanidinium nitrátu .....	32
3.1.6. Příprava dodecyl-(4-methyl-2-nitrofenyl)sulfidu .....	37
3.1.7. Příprava 5-methyl-2-(dodecylsulfanyl)anilinu .....	42
3.1.8. Příprava 5-methyl-2-(dodecylsulfanyl)anilinium chloridu .....	47
3.1.9. Příprava 1-[5-methyl-2-(dodecylsulfanyl)fenyl]guanidinium nitrátu .....	49
3.1.10. Příprava 1-[5-methyl-2-(dodecylsulfanyl)fenyl]-3,3-dimethylguanidinu .....	54
3.1.11. Příprava 1-(5-methyl-2-dodecylsulfanyl)fenylguanidinium nitrátu .....	59

3.1.12.	Příprava 1-(5-methyl-2-dodecylsulfonyl)fenylguanidinium nitrátu .....	61
3.	Mikrobiologická část .....	62
4.	Diskuze .....	66
5.	Závěr.....	69
6.	Seznam použité literatury .....	70

## Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra anorganické a organické chemie

Kandidát: Ondřej Vidrna

Školitel: PharmDr. Karel Palát, CSc

Název diplomové práce: **Syntéza substituovaných arylguanidinů jako potenciálních léčiv IX.**

Stále častější výskyt onemocnění způsobených fugálními a mykotickými patogeny, z nichž mnohé získávají rezistenci na dostupné antifungální látky, vyvolává potřebu hledání nových molekul inhibujících jejich růst. Celosvětově probíhá výzkum v oblasti látek odvozených od guanidinu, které byly shledány potenciálně aktivními proti mnoha kmenům plísní i bakterií. Výzkumem těchto látek se již řadu let zabývá také Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Snahou je získat co nejaktivnější sloučeniny ze skupiny substituovaných arylguanidinů a najít závislosti struktura-účinek u těchto látek.

V rámci této diplomové práce bylo nasyntetizováno sedm doposud nepopsaných molekul: 1-(4-methyl-2-oktylsulfanyl)fenylguanidin, 1-(4-methyl-2-dodecylsulfanyl)fenylguanidin, 1-(4-methyl-2-oktylsulfanyl)fenyl-3,3-dimethylguanidin, oktyl-(4-methyl-2-nitrofenyl)sulfid, 5-methyl-2-(oktylsulfanyl)anilin, dodecyl-(4-methyl-2-nitrofenyl)sulfid, 5-methyl-2-(dodecylsulfanyl)anilin. Tři z nich byly dále testovány na plísňových a bakteriálních kmenech.

## Abstract

Charles university in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Anorganic and Organic Chemistry

Candidate: Ondřej Vidrna

Supervisor: PharmDr. Karel Palát, CSc

Title of diploma thesis: **Synthesis of substituted arylguanidines as potential drugs IX.**

The increasing incidence of diseases caused by fungal and mycotic pathogens, many of which acquire resistance to available antifungal substances, causes the need for a search for new molecules inhibiting their growth. The worldwide research is focused on substances derived from guanidine which were found to be potentially active against many strains of fungi and bacteria. Faculty of Pharmacy in Hradec Králové has been researching these substances for many years. The aim is to get the most active compounds from the group of substituted arylguanidines and find a structure-activity relationships effect of these substances.

In this study the seven previously undescribed molecules were synthesized: 1-(4-methyl-2-octylsulfanyl)phenylguanidinium nitrate, 1-(4-methyl-2-dodecylsulfanyl)phenylguanidinium nitrate, 1-(4-methyl-2-dodecylsulfanyl)phenyl-3,3-dimethylguanidine, octyl-(4-methyl-2-nitrophenyl)sulfide, 5-methyl-2-(octylsulfanyl)aniline, dodecyl-(4-methyl-2-nitrophenyl)sulfide and 5-methyl-2-(dodecylsulfanyl)aniline. Three of them were further tested on fungal and bacterial strains .

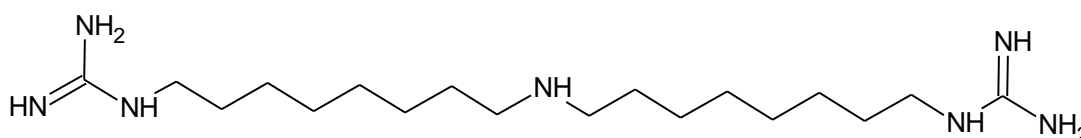
## 1. Úvod a cíl diplomové práce

V posledních letech se neustále zvyšuje výskyt systémových mykóz a nových oportunistických onemocnění, které jsou vyvolány plísněmi rezistentními na dostupná antifungální léčiva<sup>1</sup>. Tato onemocnění tak získávají stále větší klinický význam a jsou jimi ohroženi především imunodeficientní pacienti trpící např. HIV infekcí, rakovinou nebo ve stavu po orgánových transplantacích.

Antifungální léčiva používaná v současné terapii jsou látky z mnoha strukturálně odlišných skupin<sup>2</sup>. Mezi nejpoužívanější patří azoly (např. flukonazol a itraconazol), polyeny (např. amfotericin B), morfolinové deriváty, pyridininové deriváty a allylaminy. Azoly jsou fungistatické, perorálně i lokálně používané látky, účinné vůči většině kvasinek a vláknitých hub. Flukonazol vykazuje dobrou antimykotickou aktivitu s relativně nízkou toxicitou, a proto se stal léčivem první volby při léčbě systémových mykóz. Jeho nevýhodou je neustále se rozšiřující rezistence, čímž se stává neefektivním proti invazivním aspergilózám. Další azol, itraconazol, je zase limitován nízkou biologickou dostupností. Klesající účinnost používaných léčiv související s rezistencí je důvodem, proč je hledání nových antifungálních látek pro budoucí boj s infekcemi způsobenými fungálními patogeny nezbytné.

Deriváty guanidinů vykazují široké spektrum biologické aktivity a byla prokázána jejich, mimo jiné, antifungální a antimykobakteriální aktivita<sup>3</sup>, na kterou se zaměříme v této diplomové práci.

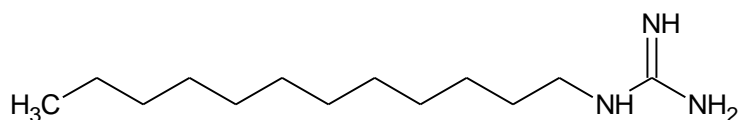
Guanidinová skupina může být součástí cyklu nebo se jedná o lineární alkylsubstituované a arylsubstituované deriváty. Mezi starší popsané látky s požadovanou aktivitou patří například molekula *guazatinu*<sup>4</sup> (I) (bis(8-guanidino-oktyl)amin) či *dodinu*<sup>5</sup> (II, str. 9) (1-dodecylguanidinium acetát), jež prokazují vysokou efektivitu při omezování růstů plísní.



Guazatin

I





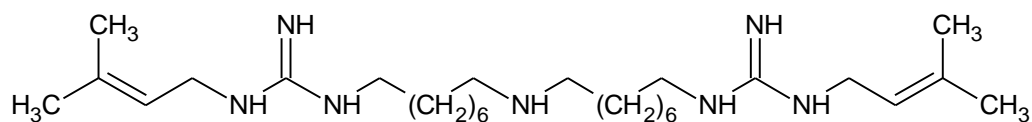
Dodin

II

Součástí diplomové práce bylo provedení rešerše v databázi Chemical Abstracts, jejímž úkolem bylo zjistit výzkum v oblasti derivátů guanidinu na poli antifungálních látek v letech 2009-2014. Klíčovým termínem při vyhledávání byl „antifungal guanidine“. Celkový počet nalezených výsledků, vztahujících se přímo k danému slovnímu spojení, byl tři. Dalším klíčovým slovním spojením při vyhledávání bylo „antimycobacterial guanidine“, kterému odpovídaly čtyři reference.

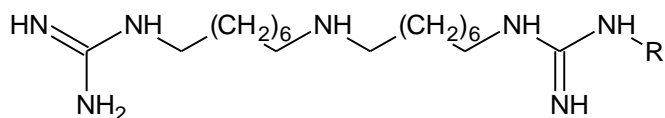
Mezi nověji nasyntetizované látky s antifungální aktivitou patří lineární (III, IV, str. 10) a makrocyclické (V, str. 10) deriváty guanidinů<sup>6</sup>. Struktura těchto látek vychází z výše zmíněné molekuly guazatinu. Byla testována jejich aktivita proti kandidózám v porovnání s flukonazolem a také účinnost proti *Aspergillus spp.* v porovnání s amfotericinem B a itrakonazolem. Z laboratorních výsledků vyplývá, že tyto sloučeniny mají vysoký potenciál jako antimykotika a v prvních fázích biologického testování vykazují nízkou toxicitu. Mají dobrý inhibiční profil proti fungálním patogenům, v mnoha případech lepší než flukonazol. Budoucnost těchto látek se předpokládá v topické léčbě kandidóz, nedostatek studií a klinických testů prozatím neumožňuje použití v běžné praxi.

Dále byla ze zkoumaných derivátů vybrána nejaktivnější molekula (V, str. 10, R=but-2-enyl), jejíž aktivita byla testována proti pěti kmenům *Aspergillus spp.* Ve všech případech byla prokázána dobrá účinnost, a to dokonce v nižších koncentracích v porovnání s amfotericinem B a itrakonazolem. Nejvyšší aktivitu látka vykazovala u kmenů *A. niger* a *A. versicolor*. Minimální inhibiční koncentrace (dále MIC) se pohybovala mezi 4 – 18  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ . Také proběhlo in vitro testování na toxicitu na lidských lymfocytech v koncentracích 0-50  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ . Při koncentracích do 30  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  nedošlo k žádnému poškození buněk, zatímco při vyšších koncentracích se objevila interakce s buněčnými membránami a viabilita lymfocytů byla snížena až o 57%.



Lineární derivát guanidinu

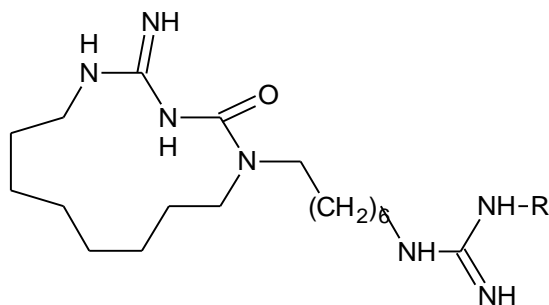
III



Lineární derivát guanidinu

R = methylocyclopropyl, fenyl

IV

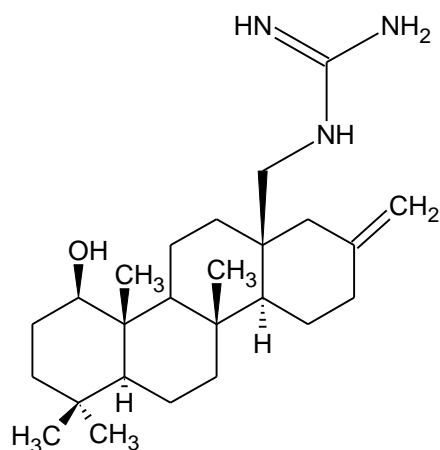


Makrocyclický derivát guanidinu

R = benzyl, propargyl, but-2-enyl, isobutenyl, fenyl

V

Strukturálně odlišnou molekulou, která byla objevena v posledních letech je *scytoscalarol*<sup>7,8</sup> (VI, str. 11). Jedná se o přírodní antimikrobiální sesterterpen nesoucí skupinu guanidinu, který byl izolován z kultivovaných sinic *Scytonema sp.* U *scytoscalarolu* byla prokázána antimikrobiální účinnost proti *Bacillus anthracis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* a *Mycobacterium tuberculosis* s hodnotou MIC v rozmezí 2-110  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ . Bylo prokázáno, že mechanismus účinku spočívá ve vazbě molekuly *scytoscalarolu* na arabinosyltransferasu<sup>9</sup> *Mycobacterium tuberculosis*, čímž způsobuje její inhibici. Podobně zřejmě účinkuje etambutol, jenž patří mezi antituberkulotika používaná v dnešní klinické praxi.

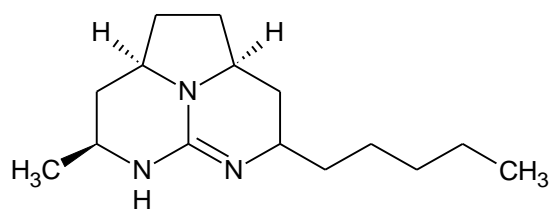


scytoscalarol

VI

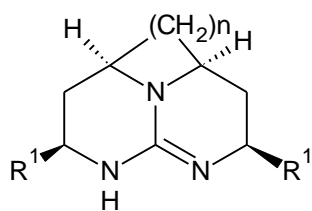
Další látky byly připraveny odvozením od molekuly batzelladinu K<sup>10</sup> (VII, str. 12). Ta byla izolována z jamajské houby *Monanchora unguifera*. Jedná se o tricyklické analogy guanidinu, u kterých byla prokázána mimo jiné antifungální a antibakteriální aktivita<sup>11</sup>. Celkem byly nasyntetizovány čtyři série bicyklických guanidinových analogů založených na struktuře *batzelladinu K*. Pro tyto analogy byla stanovována jejich aktivita proti malárii, leishmanióze, bakteriím, houbám a HIV. Antifungální účinky byly zkoumány na kmenech *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *Cryptococcus neoformans* a *Aspergillus fumigatus*.

Nejúčinnějšími se ukázaly analogy zobrazené na obr. VIII (str. 12). Analog batzelladinu K (VIII a, str. 12), substituovaný nonylem, dosahoval nejvyšší účinnosti při MIC 5,99, 2,99, 2,99 a 11,99  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  proti *Candida albicans*, *C. glabrata*, *Cryptococcus neoformans* a *Aspergillus fumigatus*. Analog batzelladinu K (VIII b, str. 12) prokázal nejvyšší aktivitu proti *C. krusei*, a to při MIC 2,90  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ . U dalšího analogu batzelladinu K (VIII c, str. 12) byla pozorována nejvyšší aktivita proti *Cryptococcus neoformans*, MIC byla 1,51  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ . Derivát batzelladinu K (IX, str. 12), substituovaný methylem a pentylem, byl aktivní proti všem výše zmíněným patogenům, kromě HIV. Samotný batzelladin K v experimentech prokázal aktivitu pouze proti kmenu *Cryptococcus neoformans*, proti ostatním byl neaktivní.



*Batzelladin K*

VII



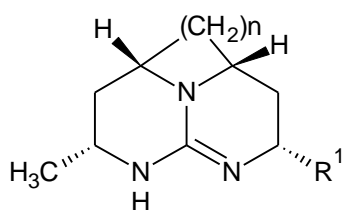
a)  $n=2$ ,  $R^1=C_9H_{19}$

b)  $n=3$ ,  $R^1=C_9H_{19}$

c)  $n=3$ ,  $R^1=CH_2CH_2Ph(m-CH_3)$

Deriváty odvozené od *Batzelladinu K*

VIII



$n=3$ ,  $R^1=C_5H_{11}$

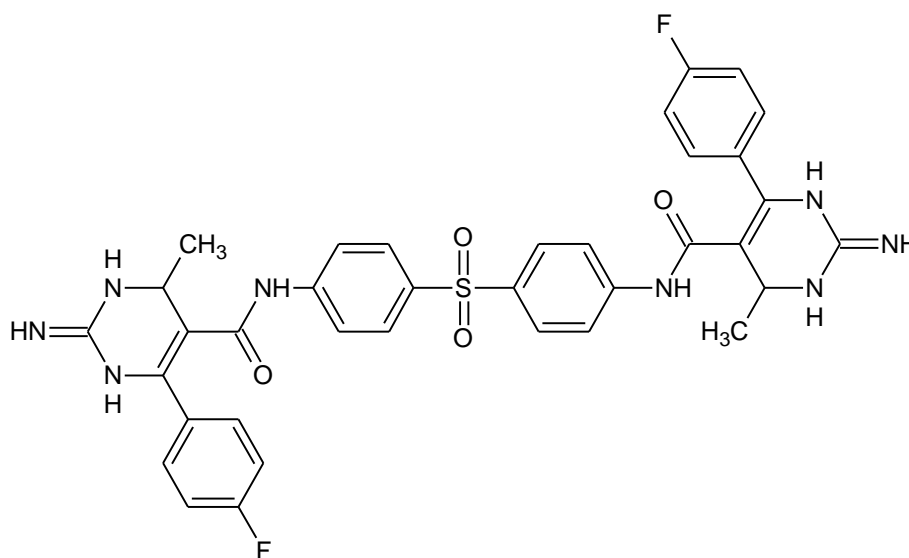
Deriváty odvozené od *Batzelladinu K*

IX

Jiný výzkum byl zaměřen na přípravu řady bis dihydropyrimidinových sloučenin<sup>12</sup>, jež byly nasyntetizovány reakcí dapsonu s acetylacetoacetátem za vzniku N<sup>1</sup>-4-[4-(2-oxopropylkarboxamido)fenylsulfonyl]fenyl-3-oxobutanamidu.

Následovala reakce s guanidinium chloridem a odpovídajícím aldehydem s katalytickým množstvím p-toluensulfonové kyseliny (PTSA) v přítomnosti methanolu. Nově vzniklé molekuly byly testovány na antimykobakteriální aktivitu proti *Mycobacterium tuberculosis* a isoniazid (INH) resistantní *M. tuberculosis*.

Nejslibnější aktivitu vykazoval  $N^{\text{F}}$ -(4-4-[6-(4-fluorofenyl)-2-imino-4-methyl-1,2,3,4-tetrahydro-5-pyrimidinylcarboxamido]fenylsulphonylfenyl)-6-(4-fluorofenyl)-2-imino-4-methyl-1,2,3,4-tetrahydro-5-pyrimidinkarboxamid (X), a to s MIC mezi 0,08 až 0,10  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ .

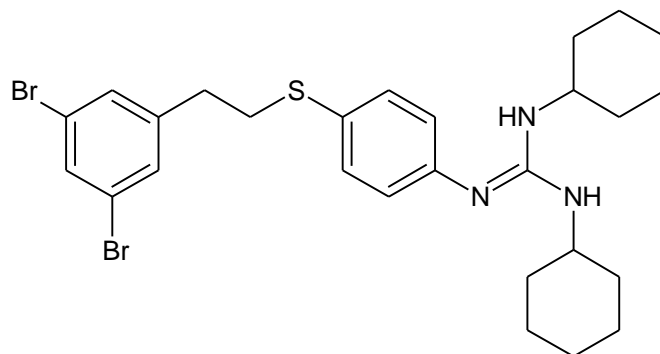


$N^{\text{F}}$ -(4-4-[6-(4-fluorofenyl)-2-imino-4-methyl-1,2,3,4-tetrahydro-5-pyrimidinylcarboxamido]fenylsulphonylfenyl)-6-(4-fluorofenyl)-2-imino-4-methyl-1,2,3,4-tetrahydro-5-pyrimidinkarboxamid

X

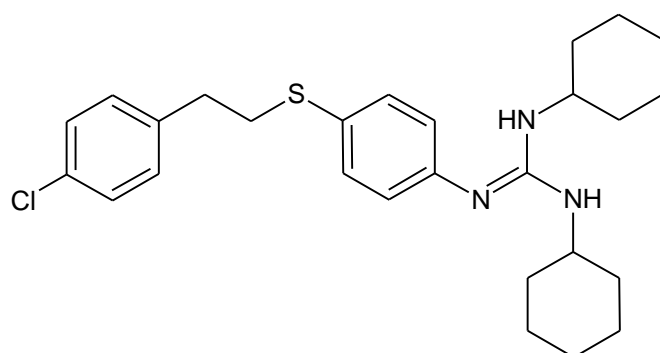
Další ze studií se zabývala syntézou sérií derivátů benzylsulfanyl-fenylaminů<sup>13</sup>. Sloučeniny XI-XIV (str. 15) vykazovaly největší potenciální antifungální aktivitu. Tyto látky byly zkoumány na kmenech *C. albicans* a *C. glabrata*, přičemž u všech čtyř látek dosahovala MIC hodnot menších než 10  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ . Základní skelet bez substituovaného guanidinu vykazoval aktivitu nižší, molekuly s nesubstituovanou aminovou skupinou fungicidní efekt zcela postrádaly. Další testy probíhaly na kombinovaném biofilmu s kmeny *C. albicans* a *Staphylococcus epidermidis*, což jsou běžně se vyskytující patogeny u katetrizovaných pacientů. Deriváty benzylsulfanyl-fenylaminů (XI, str. 14) a (XII, str. 14) vykazovaly kombinaci zároveň dobré fungicidní i antibakteriální aktivity. Testy na toxicitu

a *in vivo* účinnost probíhaly na *C. albicans* infikovaných červech *Caenorhabditis elegant* a bylo při nich zjištěno, že látky (XI) a (XIII) jsou méně toxické pro tento organismus než zbylé dva deriváty. *In vivo* účinnost se potvrdila přežitím většího množství červů představujících minihostitelský model.



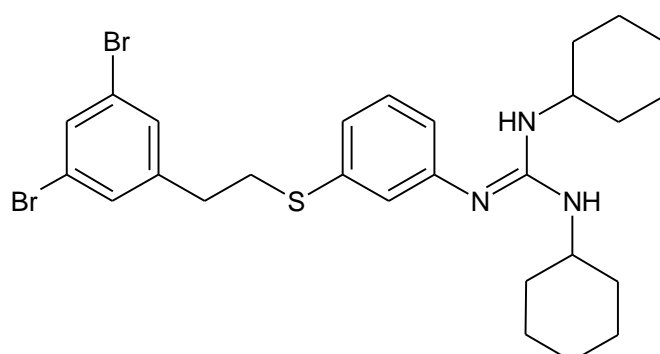
Derivat benzylsulfanyl-fenylaminu

XI



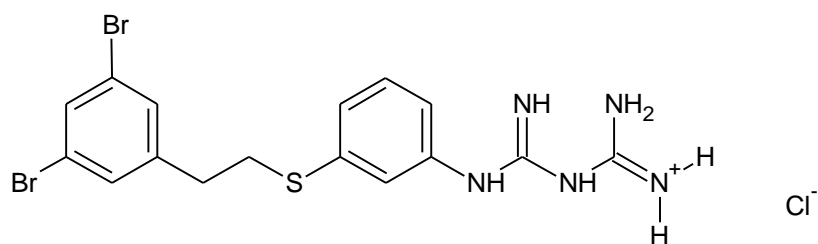
Derivat benzylsulfanyl-fenylaminu

XII



Derivat benzylsulfanyl-fenylaminu

XIII



Derivát benzylsulfanyl-fenylaminu

XIV

Cílem této diplomové práce bylo připravit sérii nových molekul obsahující guanidinovou skupinu a nasyntetizovat látky potenciálně aktivní proti fungálním a mykobakteriálním patogenům. Tuto aktivitu lze předpokládat právě ze strukturální podobnosti s látkami již vyvinutými a popsány, a to nejen na katedře anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, ale i na jiných pracovištích po celém světě.

## 2. Metodická část

### 2.1. Chemická část

Cílem experimentální části diplomové práce bylo připravit dvě látky ze skupiny 1-(5-methyl-2-alkylsulfanyl)fenylguanidinů a dále 1-(5-methyl-2-dodecylsulfanyl)fenyl-3,3-dimethylguanidin. Dalším cílem byl pokus o vytvoření metodiky pro oxidaci sulfidického atomu síry v nasyntetizovaných molekulách.

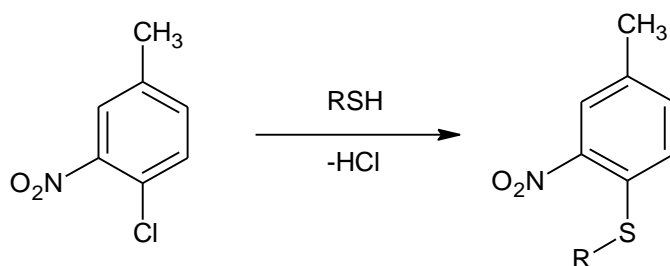
#### 2.1.1. Příprava sulfidů

V prvním kroku syntézy bylo zapotřebí připravit příslušné molekuly 4-alkylsulfanyl-3-nitrotoluenu. Jedná se o sulfidy, jež jsou chemicky obdobou etherů, atom kyslíku je však nahrazen atomem síry. Obecně lze jejich vzorec napsat jako  $R^1 - S - R^2$ . Dva volné elektronové páry na atomu síry dávají těmto látkám slabě bazický charakter.

Sulfidy lze připravovat několika způsoby. Mezi nejčastěji používané patří alkylace a arylace thiolů, které se v bazickém prostředí stávají nukleofilním činidlem, za což zodpovídá právě silně nukleofilní atom síry. Dále lze připravit například aromatické diarylsulfidy pomocí Friedel-Craftsovy arylace<sup>14,15</sup> dichlordisulfanu aromatickými uhlovodíky. Katalyzátorem těchto reakcí bývá chlorid hlinitý nebo železo.

V této experimentální práci byly sulfidy připraveny reakcí alkanthiolů s 4-chlor-3-nitrotoluenem v suchém dimethylformamidu, a to za přítomnosti uhličitanu draselného a čerstvě připravené aktivní mědi, jež plnila funkci katalyzátoru<sup>16,17</sup>.

Schéma reakce:



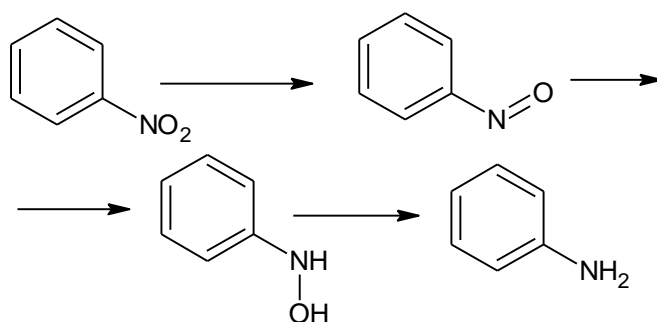


### 2.1.2. Redukce nitrosloúčenin

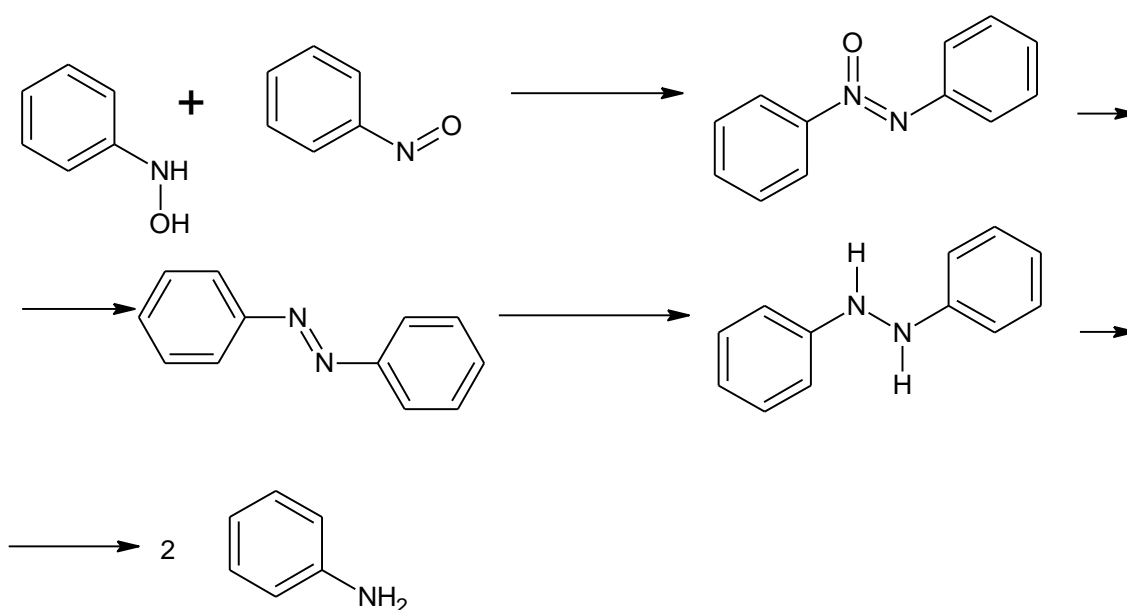
Při redukci nitrosloúčenin na aminy jsou jeden nebo oba atomy kyslíku nitroskupiny nahrazeny vodíkem. Tato reakce je závislá na pH prostředí a může probíhat dvěma způsoby<sup>18</sup>. V kyselém prostředí se za přítomnosti kyseliny chlorovodíkové provádí působením železa, cínu nebo zinku. Za těchto podmínek se nitroskupina redukuje na nitrososkupinu, která dále reaguje přes hydroxylaminovou skupinu na amin (viz schéma a). Alkalické prostředí podporuje spíše tvorbu bimolekulárních látek jako meziproductů. Provádí se působením zinku a hydroxidu sodného (viz schéma b).

Schéma reakce:

a)

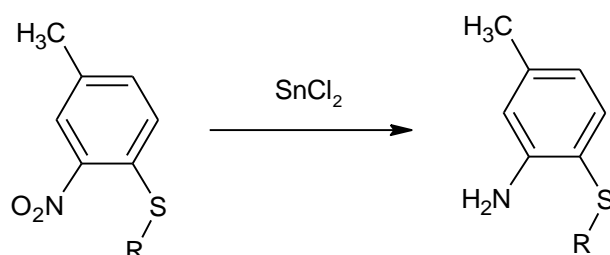


b)



Příprava 2-(alkylsulfanyl)-5-methylanilinů probíhala redukcí alkyl-(4-methyl-2-nitrophenyl)sulfidů z předchozího reakčního kroku působením chloridu cínatého. Reakce<sup>19</sup> probíhala v neutrálním prostředí bezvodého ethanolu pod inertní dusíkovou atmosférou.

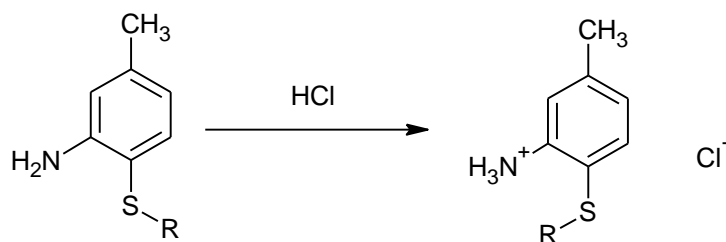
Schéma reakce:



### 2.1.3. Příprava 2-(alkylsulfanyl)-5-methylanilin-chloridů

Příprava 2-(alkylsulfanyl)-5-methylanilin-chloridů proběhla reakcí<sup>20</sup> etherového roztoku 2-(alkylsulfanyl)-5-methylanilinů se suchým plynným chlorovodíkem. Vzniklé produkty byly použity do následujících reakcí bez dalšího čištění.

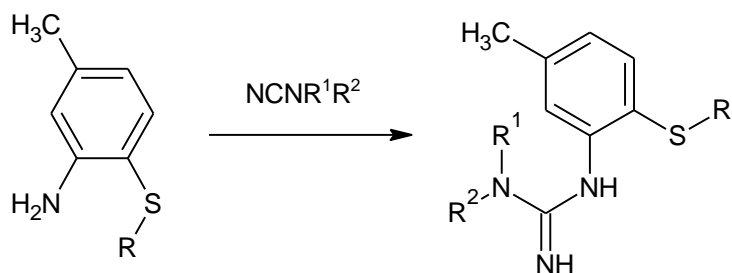
Schéma reakce:



### 2.1.4. Příprava arylguanidinů

Příprava arylguanidinů probíhala reakcí aminů s komerčně vyráběnými kyanamidy. Reakce probíhá za normálního či zvýšeného tlaku. Může se uskutečnit v roztoku (obvykle bezvodý ethanol) nebo případně v tavenině. Pro vznik guanidinů je optimální zachovat kyselé prostředí. Při pH výrazně větším než pět má kyanamid<sup>21</sup> tendenci dimerizovat, pH menší než čtyři vede k hydrolýze, případně aminolýze.

Schéma reakce:



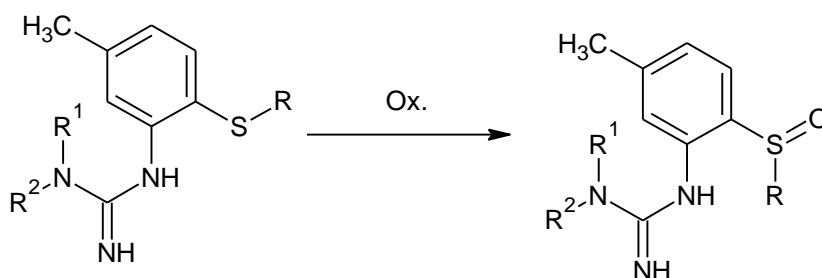
### 2.1.5. Oxidace sulfidů

Oxidace sulfidů může probíhat dvěma způsoby, podle toho, zda byl produkt zoxidován jednoduše na sulfoxid (viz schéma a) nebo zda oxidace proběhla do druhého stupně a dala tak vzniknout sulfonové kyselině (viz schéma b).

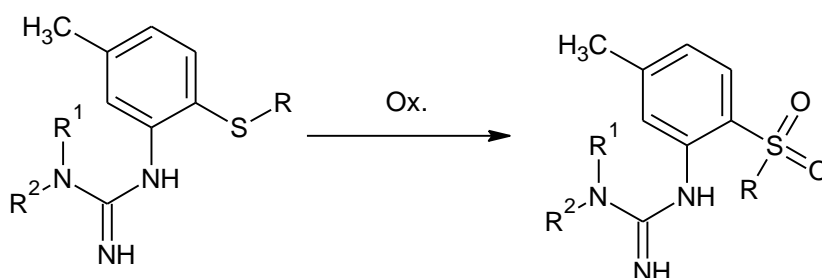
Oxidace nasyntetizovaných derivátů guanidinu byla v tomto případě uskutečněna pomocí manganistanu draselného<sup>22,23</sup> za vzniku sulfonu nebo peroxidu vodíku<sup>24</sup>, který vyžadoval přítomnost chloridu zirkoničitého, za vzniku sulfoxidu. Reakce s peroxidem probíhá velmi rychle, v řádu jednotek minut.

Schéma reakce:

a)



b)



## 2.1.6. Celkové schéma syntézy

Schéma syntézy je znázorněno na následujícím obr. XV.:

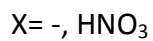
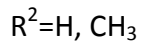
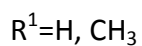
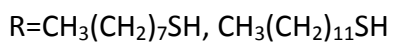
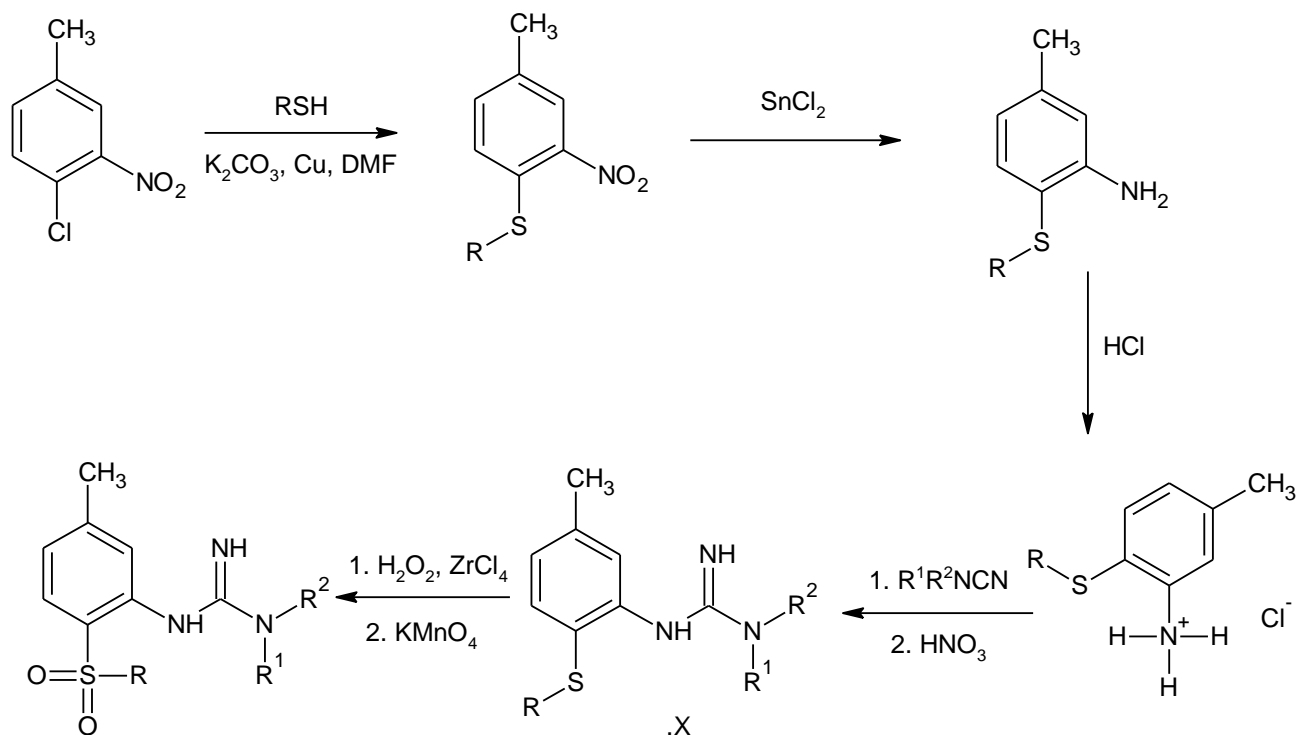


Schéma syntézy

XV

## 2.2. Mikrobiologická část

Hodnocení nových látek z hlediska biologické aktivity bylo prováděno na sérii patogenních i nepatogenních kmenů plísní na katedře biologických a lékařských věd Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

Ke stanovení antifungální aktivity bylo využito metody mikrodilučního bujónového testu *in vitro*. Tkáňovým médiem byl RPMI 1640 s glutaminem (SEVAPHARMA) pufovaný 0,165 mol.l<sup>-1</sup> morfolinopropansulfonovou kyselinou (MOPS, Sigma) na pH 7,0. Látky byly testovány na osmi kmenech potenciálně patogenních hub: *Candida albicans* (CA), *Candida tropicalis* (CT), *Candida glabrata* (CG), *Trichosporon asahii* (TA), *Aspergillus fumigatus* (AF), *Absidia corymbifera* (AC), *Trichophyton mentagrophytes* (TM).

Další testy proběhly na osmi kmenech bakterií: *Staphylococcus aureus* (SA), *Methicilin rezistentní Staphylococcus aureus* (MRSA), *Staphylococcus epidermidis* (SE), *Enterococcus sp.* (EF), *Escherichia coli* (EC), *Klebsiella pneumoniae* (KP), *Klebsiella pneumoniae ESBL pozitivní* (KP-E), *Pseudomonas aeruginosa* (PA).

### 3. Experimentální část

#### 3.1. Chemická část

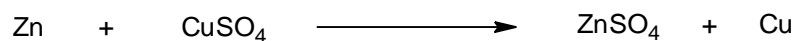
Při experimentech byly použity chemikálie z komerčních zdrojů. Oktanthiol a dodekantiol, 4-chlor-3-nitrotoluen, kyanamid, dimethylkyanamid (Sigma-Aldrich).

K měření teplot tání byl použit mikrovýhřevný stolek Nagema Boëtius . Teploty tání jsou uvedeny bez korekce. Infračervená spektra látek (dále IČ) byla měřena na spektrofotometrech Nicolet Impact 400 a Nicolet 6700 FT-IR. Spektra nukleární magnetické rezonance (dále NMR) byla měřena na NMR spektrofotometru Varian Mercury Vx BB 300 v laboratoři VNMR NET na katedře anorganické a organické chemie. Hmotnostní spektra látek (dále LRMS) byla měřena na spektrometru AGILENT Technologies 500 IonTrap v APCI módu.

Pro tenkovrstvou chromatografii byly jako stacionární fáze použity desky SILUFOL UV 254/336, mobilní fází pak byla soustava hexan : ethanol : triethylamin (8 : 2 : 1). Detekce byla prováděna pod UV lampou při vlnové délce 254 nm.

### 3.1.1. Příprava aktivní mědi<sup>25</sup>

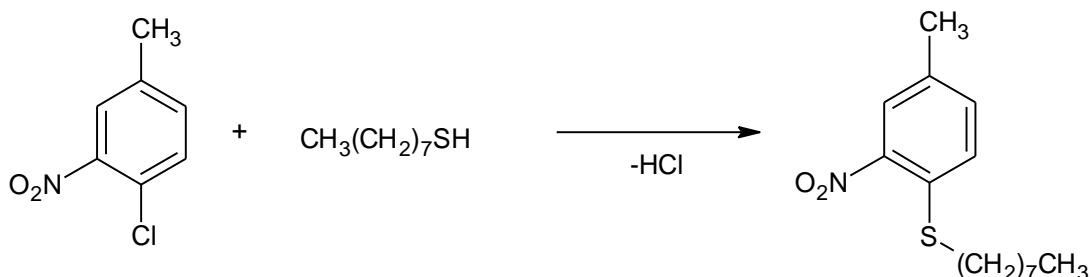
Molární hmotnost: 63,55 g.mol<sup>-1</sup>



60,00 g (0,240 mol) pentahydrátu síranu měďnatého bylo za horka rozpuštěno v 210 ml vody. Po vychladnutí bylo postupně do roztoku přidáno 18,00 g (0,275 mol) práškového zinku. Tato směs byla po dvou hodinách opakovaně dekantována horkou vodou. Pro odstranění nadbytečného zinku byla směs dále promývána 5% roztokem kyseliny chlorovodíkové, dokud neustal vývoj vodíku. Měď pak byla dále opět dekantována vodou až do neutrální reakce a konečně také třikrát absolutním ethanolem. Zfiltrovaná aktivní měď byla po vysušení ve vaku ihned použita do následující reakce.

### 3.1.2. Příprava oktyl-(4-methyl-2-nitrophenyl)sulfidu

Molární hmotnost: 281,41 g.mol<sup>-1</sup>



Ke směsi 10,00 g (7,7 ml, 0,0583 mol) 4-chlor-3-nitrotoluenu v 88 ml bezvodého N,N-dimethylformamidu bylo přidáno 15,3 g (0,118 mol) bezvodého uhličitanu draselného, 2,20 g (0,0350 mol) aktivní mědi a 10,24 g (0,070 mol) oktanthiolu. Směs byla zahřívána na olejové lázni na 150 °C po dobu devíti hodin.

Průběh reakce byl sledován pomocí tenkovrstvé chromatografie (stacionární fáze: silikagel, SILUFOL UV 254/366, mobilní fáze: hexan : ethanol : triethylamin = 8 : 2 : 1).

Po ukončení reakce byla směs ihned zfiltrována a po ochlazení byla přidána voda. Surový produkt byl ponechán v chladu krystalovat. Produkt byl opakovaně čištěn rekrystalizací z ethanolu.

Byla naměřena níže uvedená IČ, NMR a hmotnostní spektra: IČ-1, NMR-1a (<sup>1</sup>H NMR), NMR-1b (<sup>13</sup>C NMR) a LRMS-1.

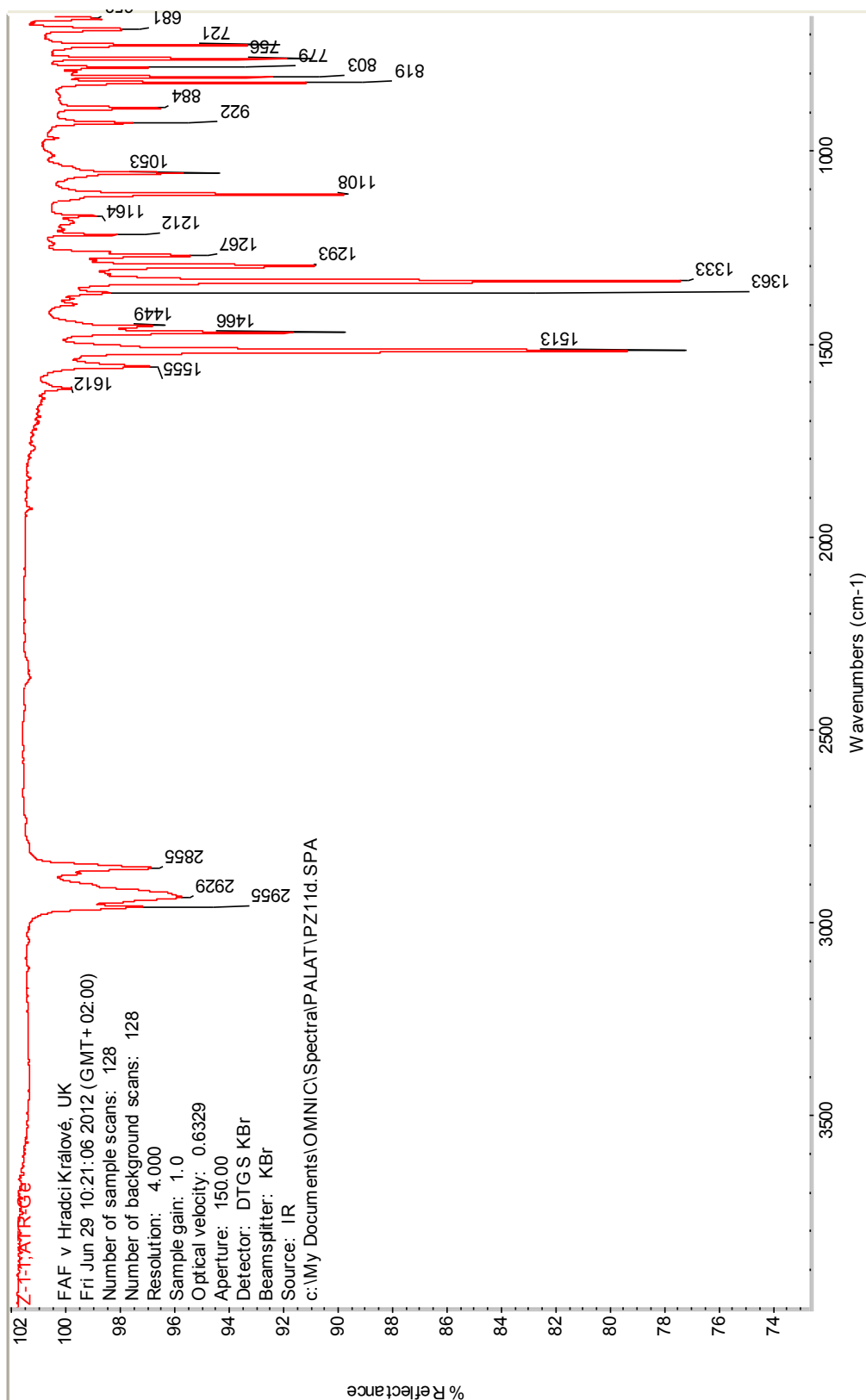
Výtěžek reakce: 14,3 g (87%)

Teplota tání produktu: 26,9 °C - 27,4 °C

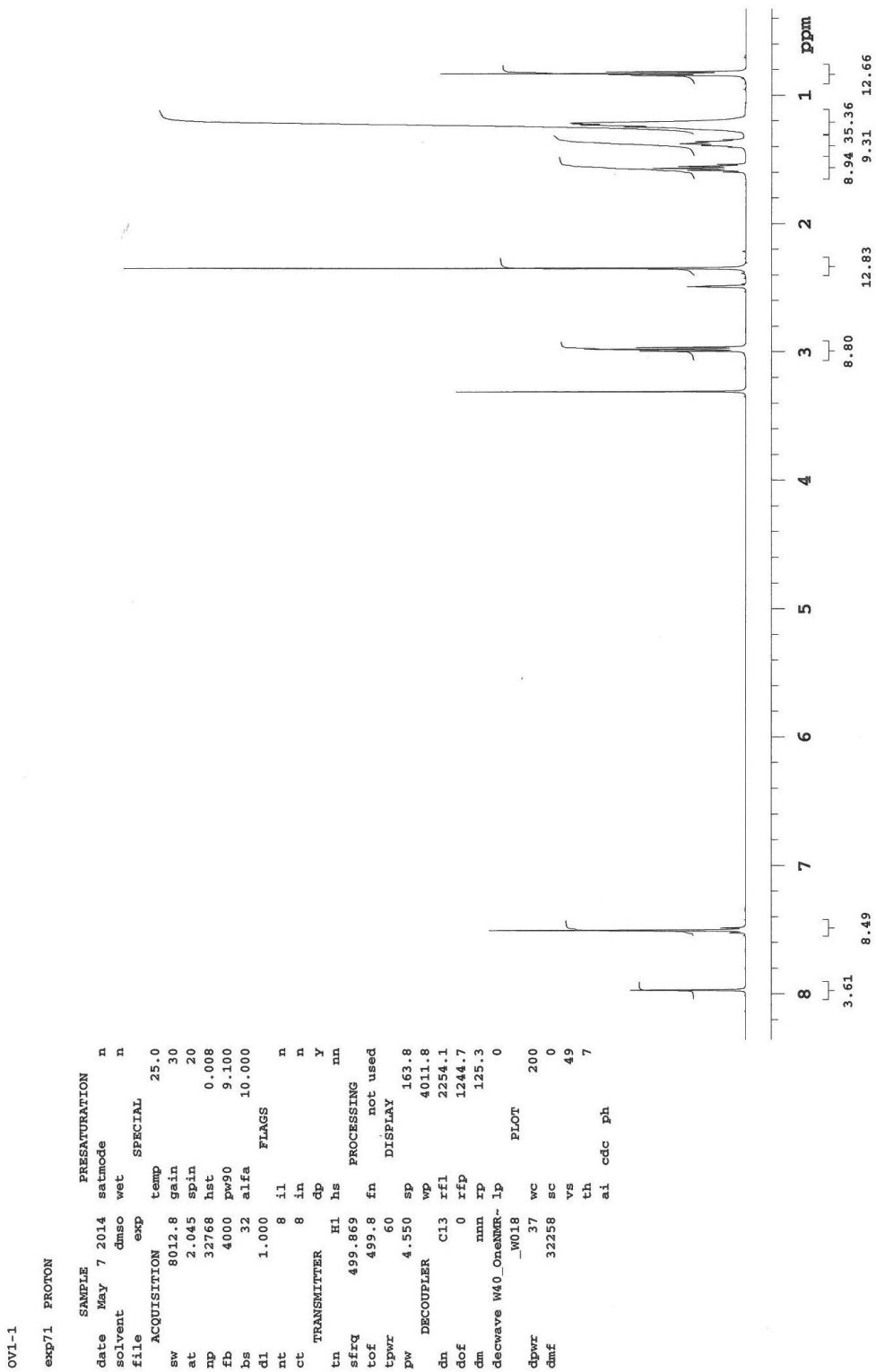
LRMS (APCI) m/z 282,3 [M+H]<sup>+</sup> (100%)



IČ-1: oktyl-(4-methyl-2-nitrofenyl)sulfid



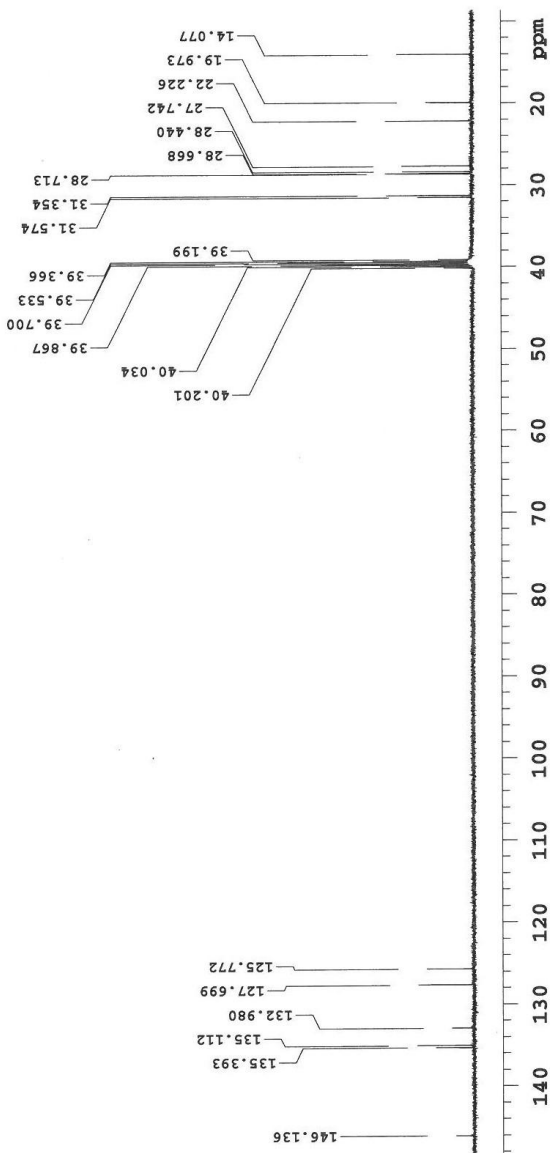
NMR -1a: oktyl-(4-methyl-2-nitrofenyl)sulfid



NMR-1b: oktyl-(4-methyl-2-nitrofenyl)sulfid

```

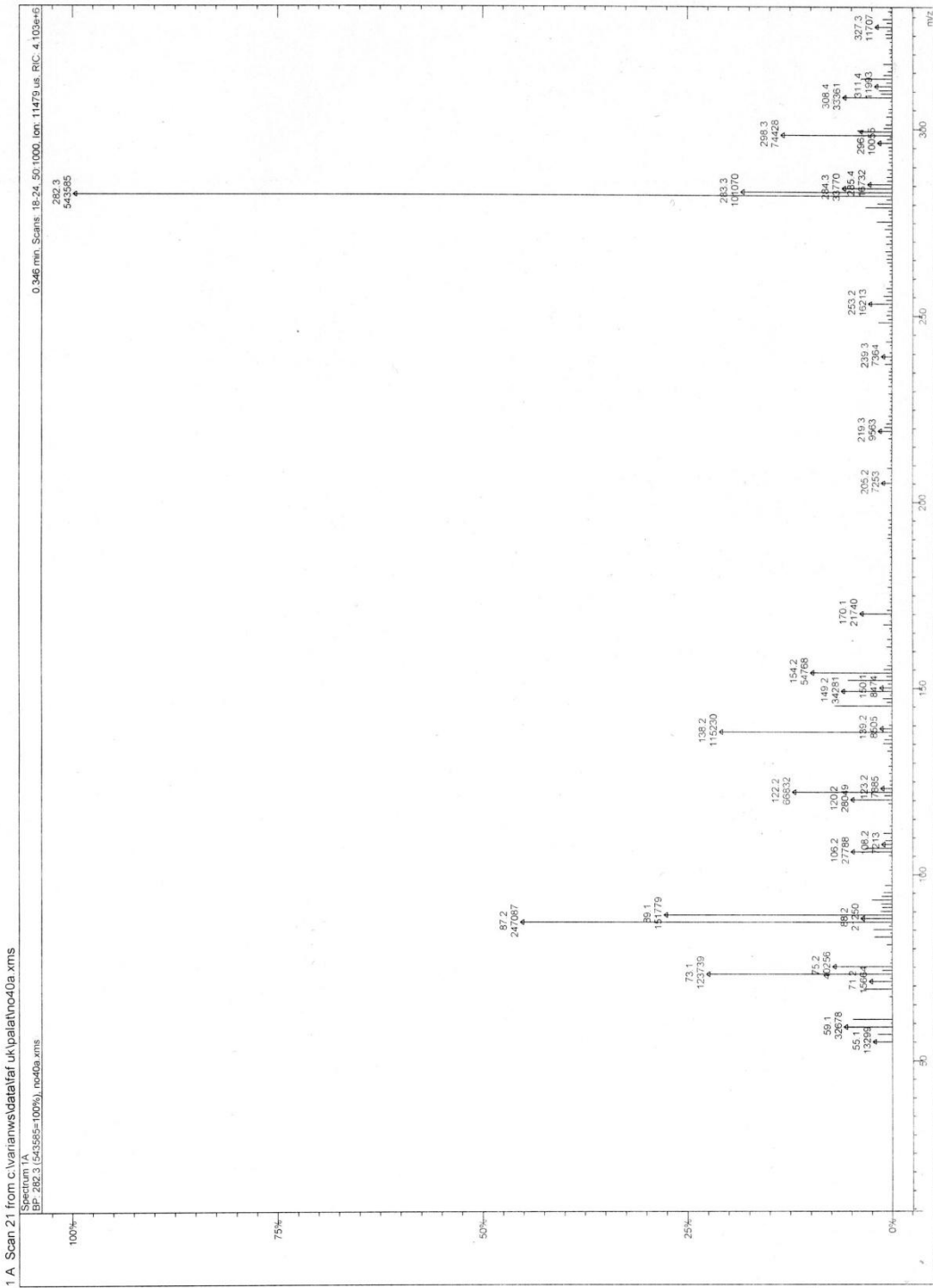
OVI1-1
exp72 CARBON
SAMPLE PRESATURATION
date May 7 2014 sstmode n
solvent dmso wet n
file exp SPECIAL
ACQUISITION temp 25.0
sw 31250.0 gain 30
at 1.049 spin 20
np 65536 hst 0.008
fb 17000 pw90 11.300
bs 1 alfa 10.000
d1 3.000 FLAGS
nt 1000 il n
ct 45 in n
TRANSMITTER C13 hs mn
tn 125.705 PROCESSING
tof 1913.9 lb 0.50
tpwr 55 fn not used
pw 5.650 DISPLAY
DECOUPLER sp 1092.3
dn H1 wp 17637.3
dof 0 rfl 6826.4
dm YYY rfp 4989.9
decwave w rp 41.5
dpr 41 lp PLOT 0
dme 12346 wc 200
sc 0
vs 40
th nm cdc ph 1
  
```



LRMS-1: oktyl-(4-methyl-2-nitrofenyl)sulfid

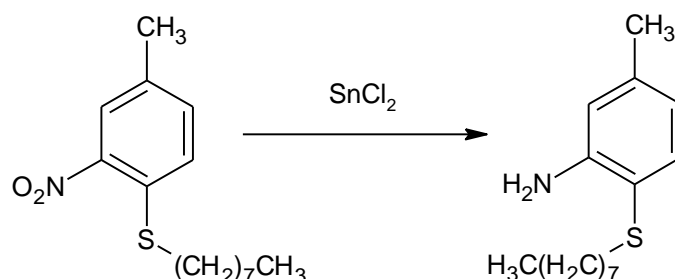
Print Date: 13 May 2014 16:11:48

Spectrum Plot - 5/13/2014 4:11 PM



### 3.1.3. Příprava 5-methyl-2-(oktylsulfanyl)anilinu

Molární hmotnost: 251,43 g.mol<sup>-1</sup>



5,00 g (0,0138 mol) 4-oktylsulfanyl-3-nitrotoluenu bylo smícháno s 20,55 g (0,088 mol) dihydrátu chloridu cínatého a 50 ml ethanolu (99,9%). Směs byla za stálého míchání pod zpětným chladičem v ochranné atmosféře dusíku zahřívána na 70 °C po dobu 5,5 hodiny. Průběh reakce byl kontrolován pomocí TLC (stacionární fáze: silikagel, SILUFOL UV 254/366, mobilní fáze: hexan : ethanol : triethylamin = 8 : 2 : 1).

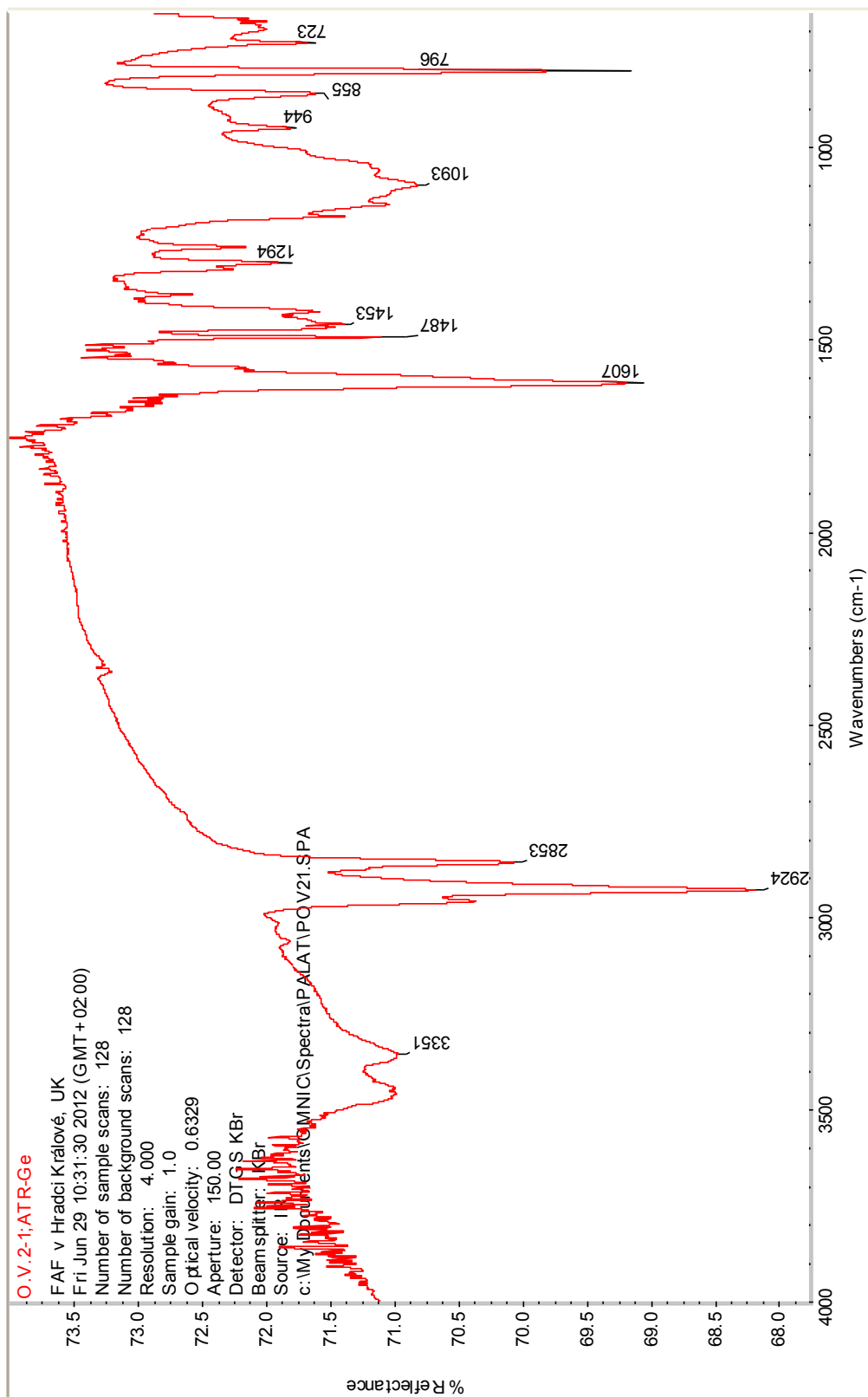
Po ukončení reakce byla směs ponechána vychladnout a poté byla zalkalizována roztokem hydroxidu sodného (10%). Produkt byl pětkrát vytřepáván do ethylacetátu a spojené organické fáze byly vysušeny bezvodým síranem sodným. Celá směs byla zfiltrována a rozpouštědlo vakuově oddestilováno. Produkt byl čištěn rekrytalizací z ethanolu.

Bylo naměřeno níže uvedené IČ spektrum IČ-2.

Výtěžek reakce: 4,0 g (89%)

Teplota tání produktu: 51,5 °C – 52,8 °C

IČ-2: 5-me4thyl-2-(oktylsulfanyl)anilin



### 3.1.4. Příprava 5-methyl-2-(oktylsulfanyl)anilinium chloridu

Molární hmotnost: 287,89 g.mol<sup>-1</sup>



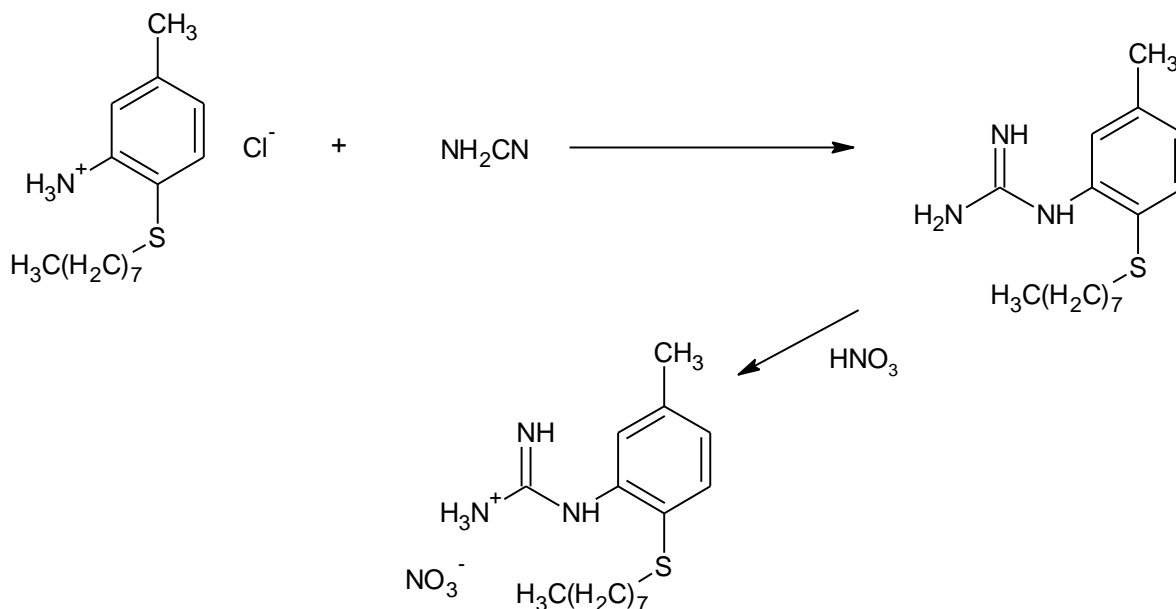
4,00 g (0,0159 mol) 5-methyl-2-(oktylsulfanyl)anilinu byly rozpuštěny v minimálním množství bezvodého diethyletheru a směs byla vložena do ledové lázně. Při stálém chlazení byla směs sycena plynným chlorovodíkem po dobu 23 minut. Po ukončení reakce byla směs na 72 hodin vložena do -20 °C. Vzniklé krystaly byly odfiltrovány a promyty suchým diethyletherem a bez dalšího čištění použity do následující reakce.

Výtěžek: 3,5 g (77%)

### 3.1.5. Příprava 1-[5-methyl-2-(oktylsulfanyl)fenyl]guanidinium nitrátu

Molární hmotnost báze: 293,47 g.mol<sup>-1</sup>

Molární hmotnost dusičnanu: 356,48 g.mol<sup>-1</sup>



1,00 g (0,00347 mol) 5-methyl-2-(oktylsulfanyl)anilinium chloridu byl za laboratorní teploty důkladně promícháno s 0,14 g (0,00333 mol) kyanamidu a za stálého míchání byla tato směs tavena při teplotě 130 °C. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (stacionární fáze: silikagel, SILUFOL UV 254/366, mobilní fáze: hexan : ethanol : triethylamin = 8 : 2 : 1). Reakční čas byl 25 minut.

Po ukončení reakce byla vzniklá směs za horka rozpuštěna ve vodě a po vychlazení bylo přidáno několik kapek kyseliny dusičné do kyselé reakce (kontrola pH papírkem). Směs byla uložena do lednice ke krystalizaci. Produkt byl čištěn opakovanou rekrystalizací ze směsi voda : ethanol (5 : 1).

Byla naměřena níže uvedená IČ, NMR a hmotnostní spektra: IČ-3, NMR-2a (<sup>1</sup>H NMR), NMR-2b. (<sup>13</sup>C NMR) a LRMS-2.

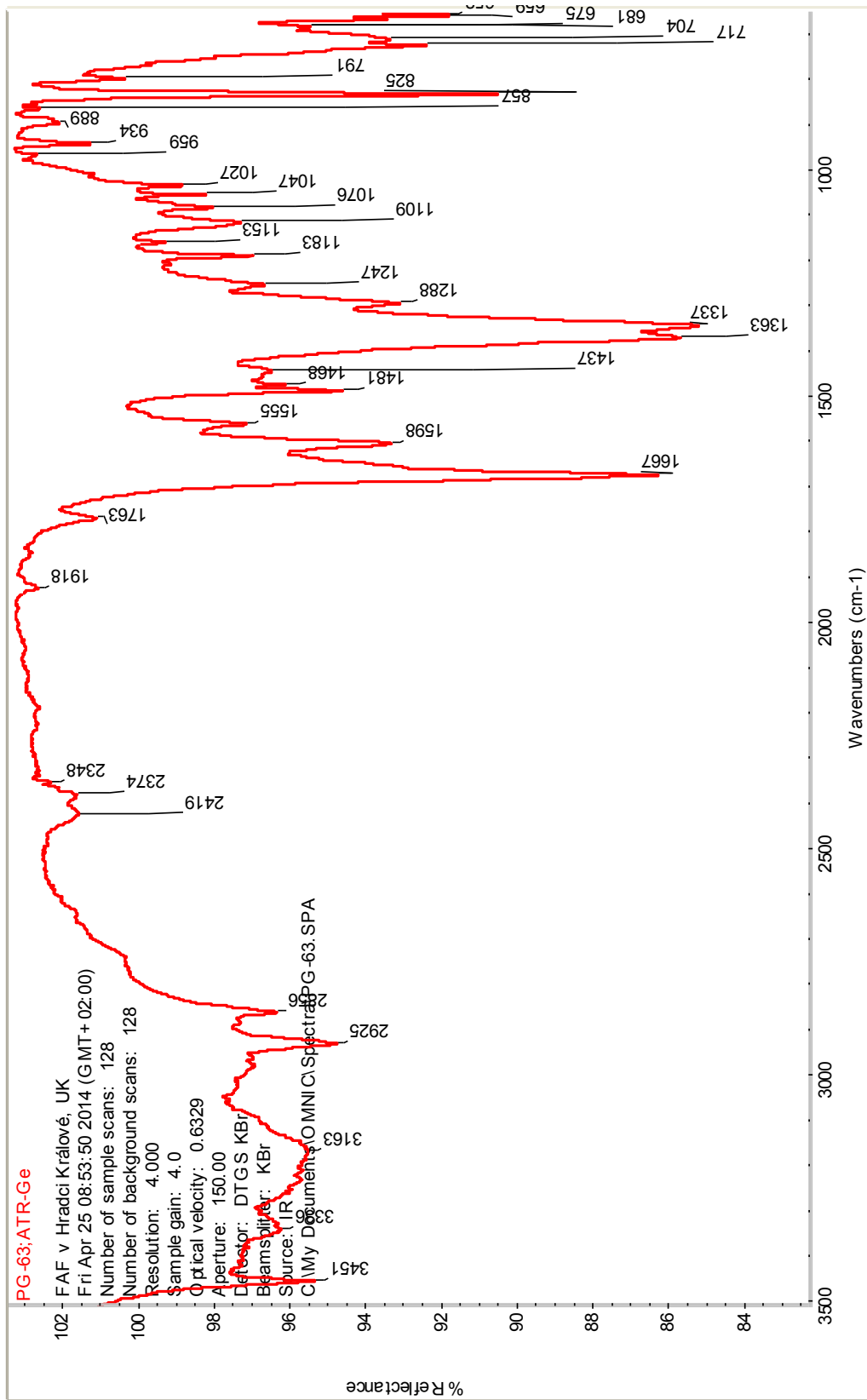
Výtěžek reakce: 0,7 g (57%)

Teplota tání produktu: 81,5 °C – 82,7 °C

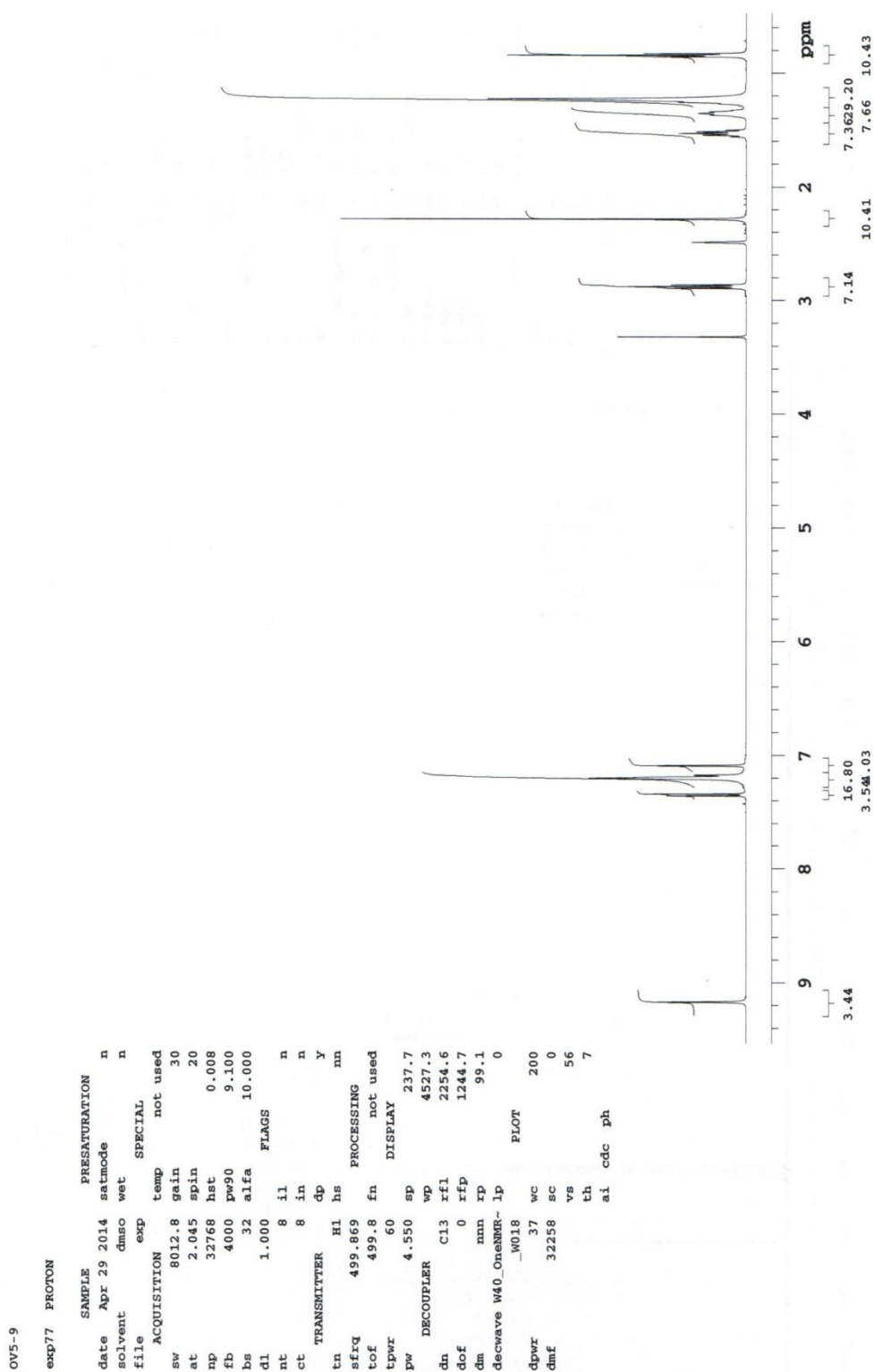
LRMS (APCI) m/z 294,4 [M+H]<sup>+</sup> (100%)



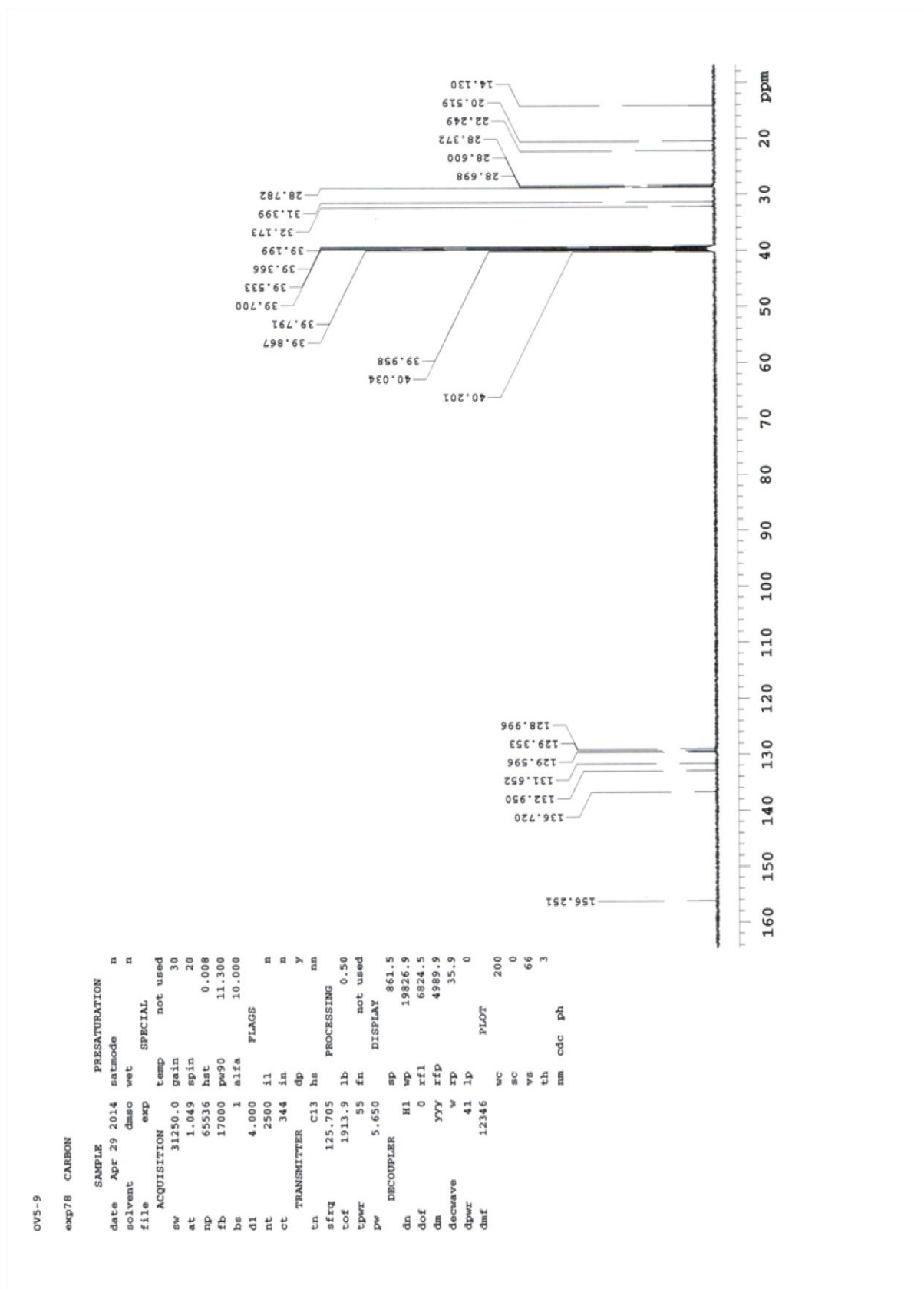
Č-3: 1-[5-methyl-2-(oktysulfanyl)phenyl]guanidinium nitrát



NMR-2a: 1-[5-methyl-2-(oktylsulfanyl)phenyl]guanidinium nitrát



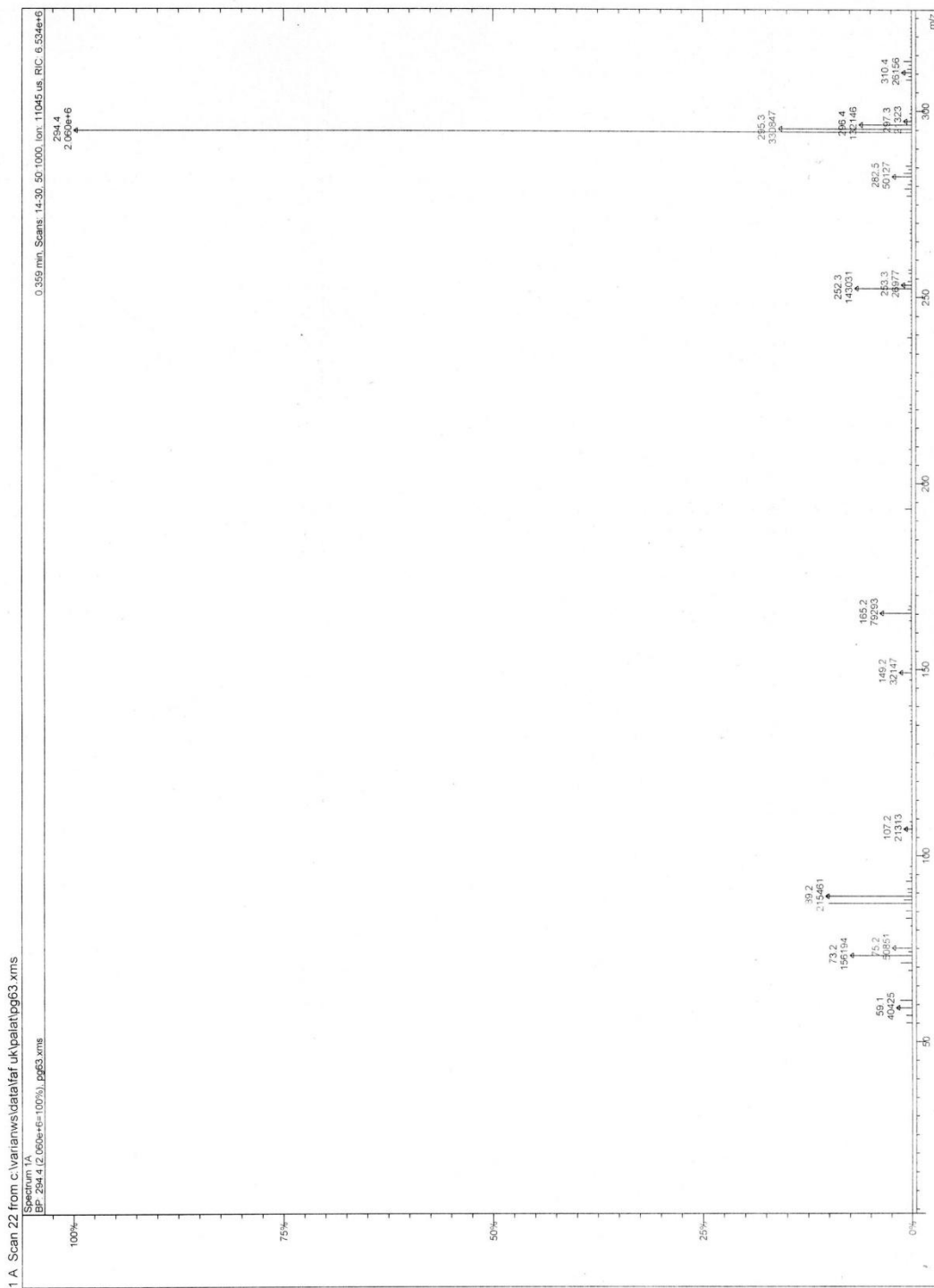
NMR-2b: 1-[5-methyl-2-(oktylsulfanyl)fenyl]guanidinium nitrát



LRMS-2: 1-[5-methyl-2-(oktylsulfanyl)fenyl]guanidinium nitrát

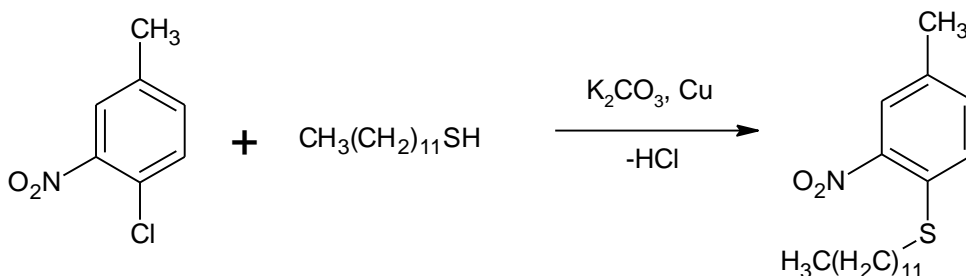
Print Date: 13 May 2014 15:17:56

Spectrum Plot - 5/13/2014 3:17 PM



### 3.1.6. Příprava dodecyl-(4-methyl-2-nitrofenyl)sulfidu

Molární hmotnost: 337,52 g.mol<sup>-1</sup>



K 20,00 g (0,117 mol) 4-chlor-3-nitrotoluenu bylo přidáno 175 ml bezvodého N,N-dimethylformamidu. K vytvořené směsi bylo přidáno 30,61 g (0,221 mol) bezvodého uhličitanu draselného, 4,45 g (0,070 mol) aktivní mědi a 28,31 ml (0,0141 mol) dodecanthiolu. Směs byla zahřívána na olejové lázni na 150 °C po dobu deseti hodin. Průběh reakce byl sledován pomocí tenkovrstvé chromatografie (stacionární fáze: silikagel, SILUFOL UV 254/366, mobilní fáze: hexan : ethanol : triethylamin = 8 : 2 : 1). Po ukončení reakce byla směs ihned zfiltrována a po ochlazení byla přidána voda. Surový produkt byl ponechán v chladu krystalovat 24 hodin. Produkt byl třikrát čištěn rekrystalizací z ethanolu.

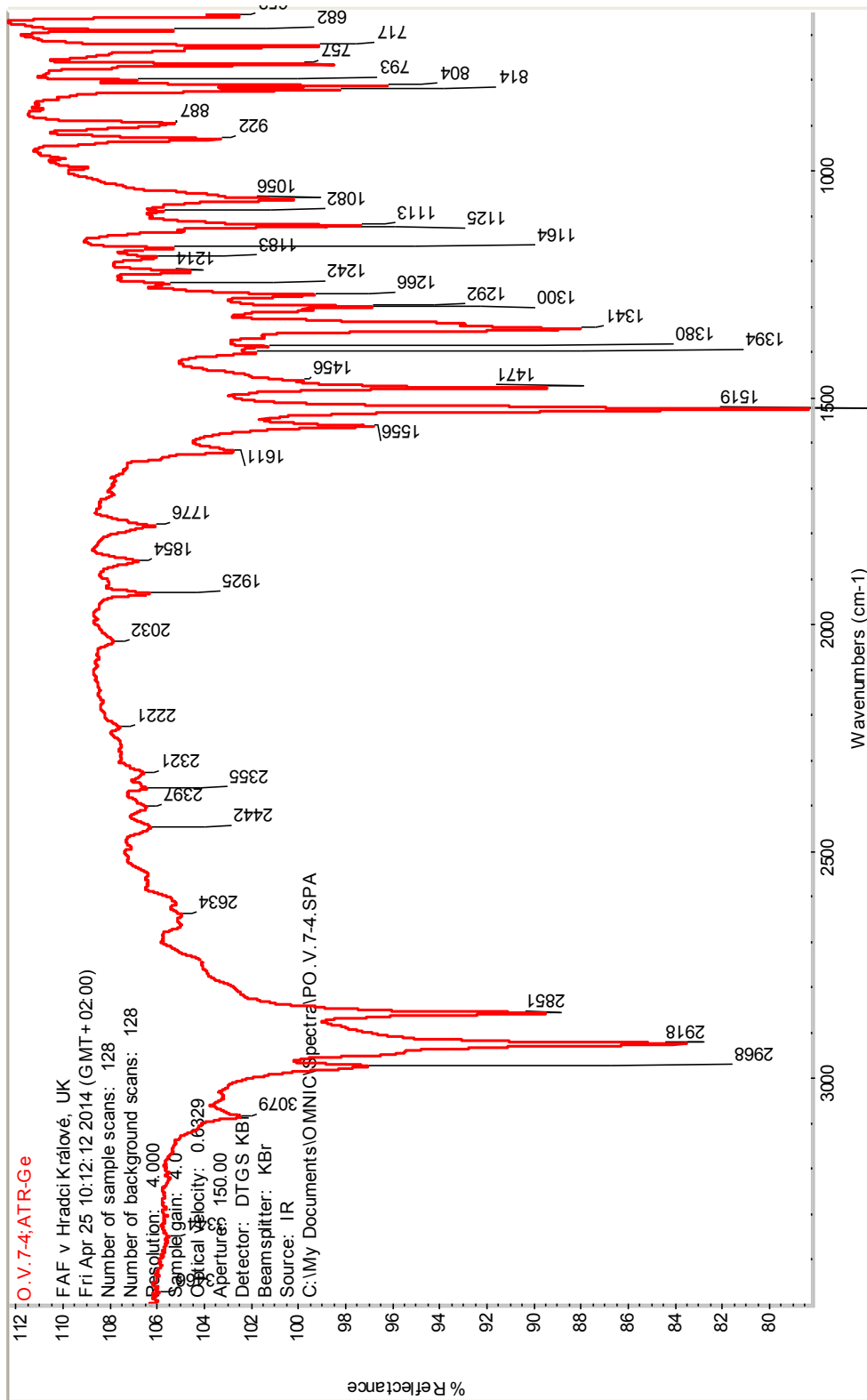
Byla naměřena níže uvedená IČ, NMR a hmotnostní spektra: IČ-4, NMR-3a (<sup>1</sup>H NMR), NMR-3b (<sup>13</sup>C NMR) a LRMS-3.

Výtěžek reakce: 33,5 g (85%)

Teplota tání produktu: 45,0 °C – 46,5 °C

LRMS (APCI) m/z 338,4 [M+H]<sup>+</sup> (100%)

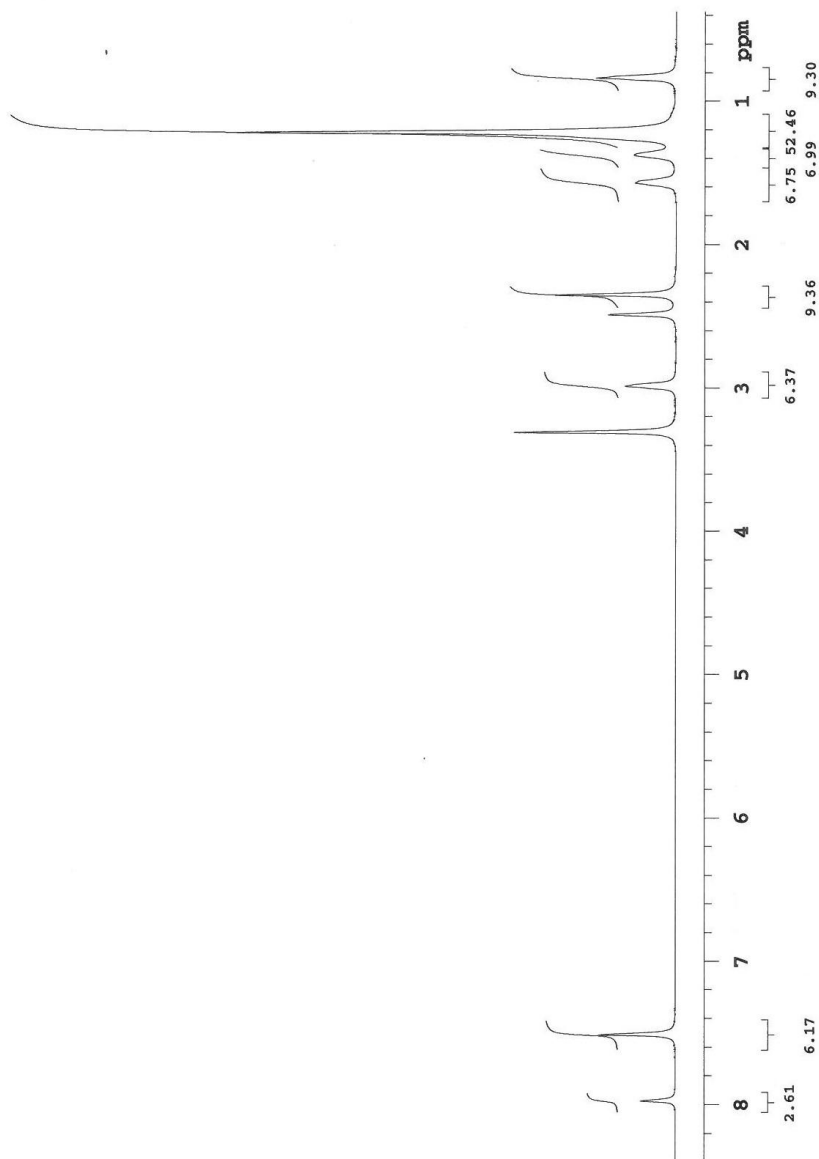
1Ā-4: dodecyl-(4-methyl-2-nitrofenyl)sulfid



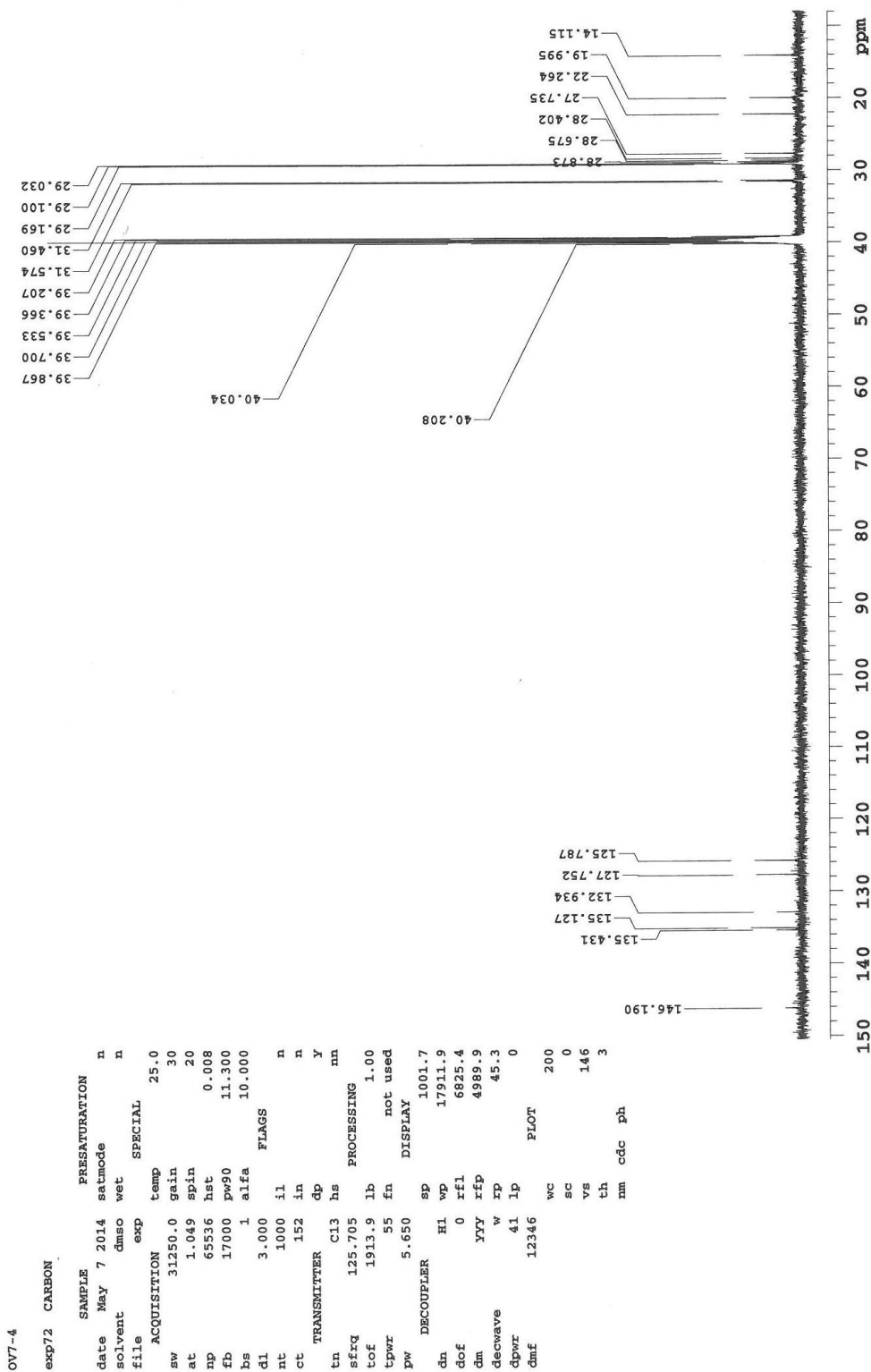
NMR-3a: dodecyl-(4-methyl-2-nitrophenyl)sulfid

```

OV7-4
exp71 PROTON
SAMPLE PRESATURATION
date May 7 2014 satmode n
solvent dmso wet n
file exp SPECIAL
ACQUISITION temp 25.0
sw 8012.8 gain 30
at 2.045 spin 20
np 32768 hst 0.008
fb 4000 pw90 9.100
bs 32 alfa 10.000
d1 1.000 FLAGS
nt 8 il n
ct 8 in n
TRANSMITTER dp Y
tn H1 hs mn
sfrq 499.869 PROCESSING
tof 499.8 fn not used
tpwr 60 DISPLAY
pw 4.550 sp 187.3
DECOUPLER wp 4005.9
dn C13 rf1 2254.1
dof 0 rf2 1244.7
dm nmn rp 119.6
decwave W40_OneNMR~ lp 0
PLOT
dpr 37 wc 200
dme 32258 sc 0
vs 156
th ai cdc ph 7
  
```



NMR-3b: dodecyl-(4-methyl-2-nitrofenyl)sulfid



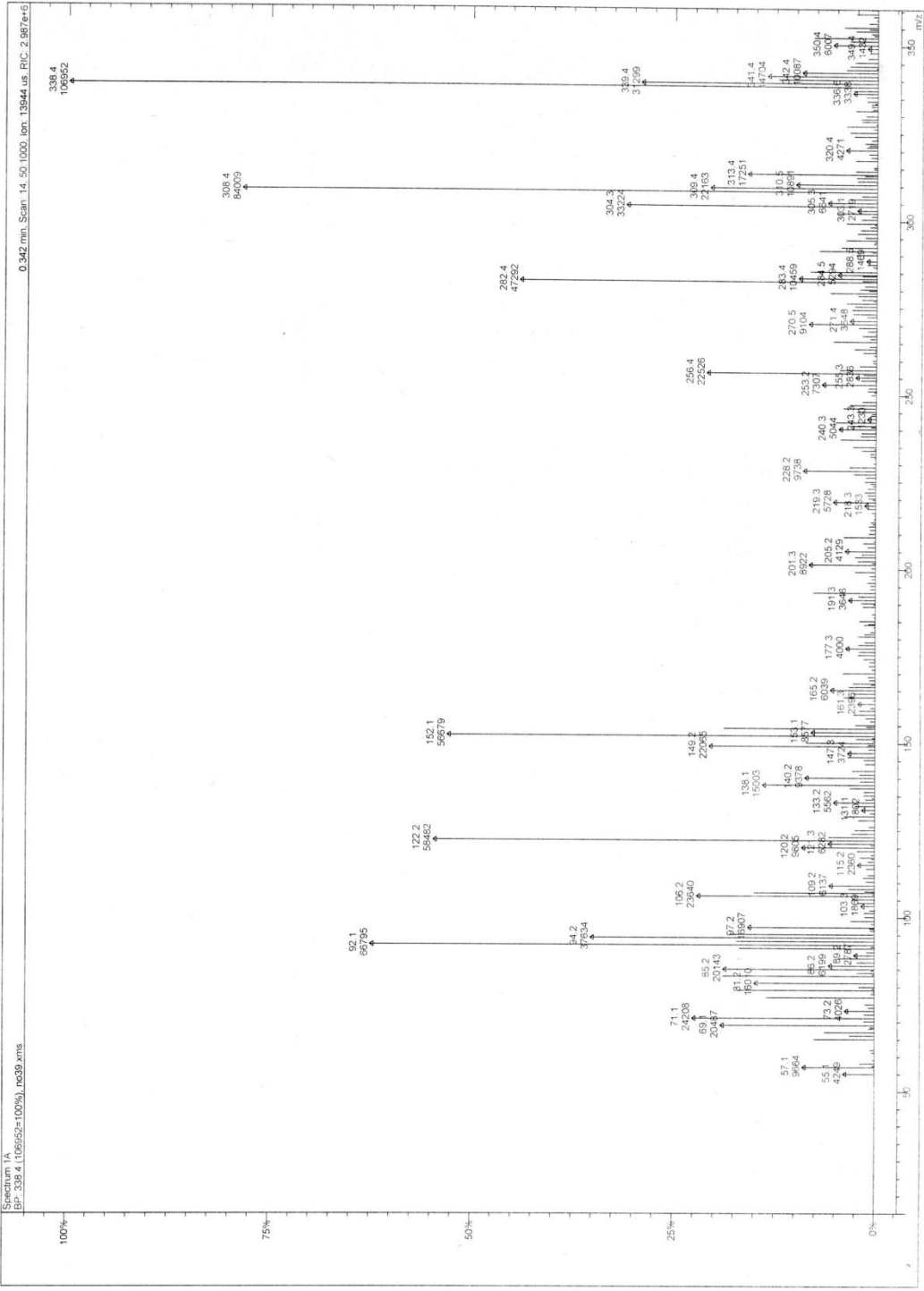


LRMS -3: dodecyl-(4-methyl-2-nitrofenyl)sulfid

Print Date: 13 May 2014 15:56:32

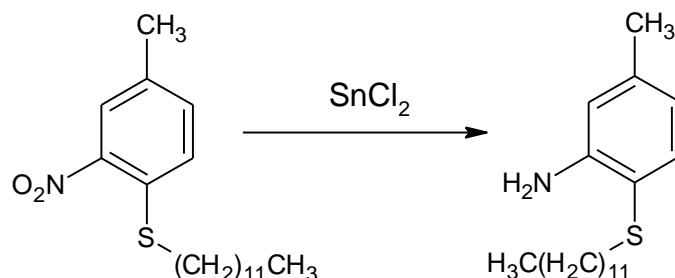
Spectrum Plot - 5/13/2014 3:56 PM

1 A Scan 14 from c:\varian\ms\data\far\uk\palat\ms39.ms



### 3.1.7. Příprava 5-methyl-2-(dodecylsulfanyl)anilinu

Molární hmotnost: 307,53 g.mol<sup>-1</sup>



10,00 g (0,0296 mol) dodecyl-(4-methyl-2-nitrophenyl)sulfidu bylo smícháno s 66,85 g (0,282 mol) dihydrátu chloridu cínnatého a 240 ml ethanolu (99,9%). Směs byla za stálého míchání pod zpětným chladičem v ochranné atmosféře dusíku zahřívána na 70° C po dobu pět hodin. Průběh reakce byl kontrolován pomocí TLC (stacionární fáze: silikagel, SILUFOL UV 254/366, mobilní fáze: hexan : ethanol : triethylamin = 8 : 2 : 1).

Po ukončení reakce byla směs ponechána vychladnout a poté byla zalkalizována roztokem hydroxidu sodného (10%). Produkt byl pětkrát vytřepáván do ethylacetátu a spojené organické fáze byly vysušeny bezvodým síranem sodným. Celá směs byla zfiltrována a rozpouštědlo vakuově oddestilováno. Produkt byl čištěn rekrytalizací z ethanolu.

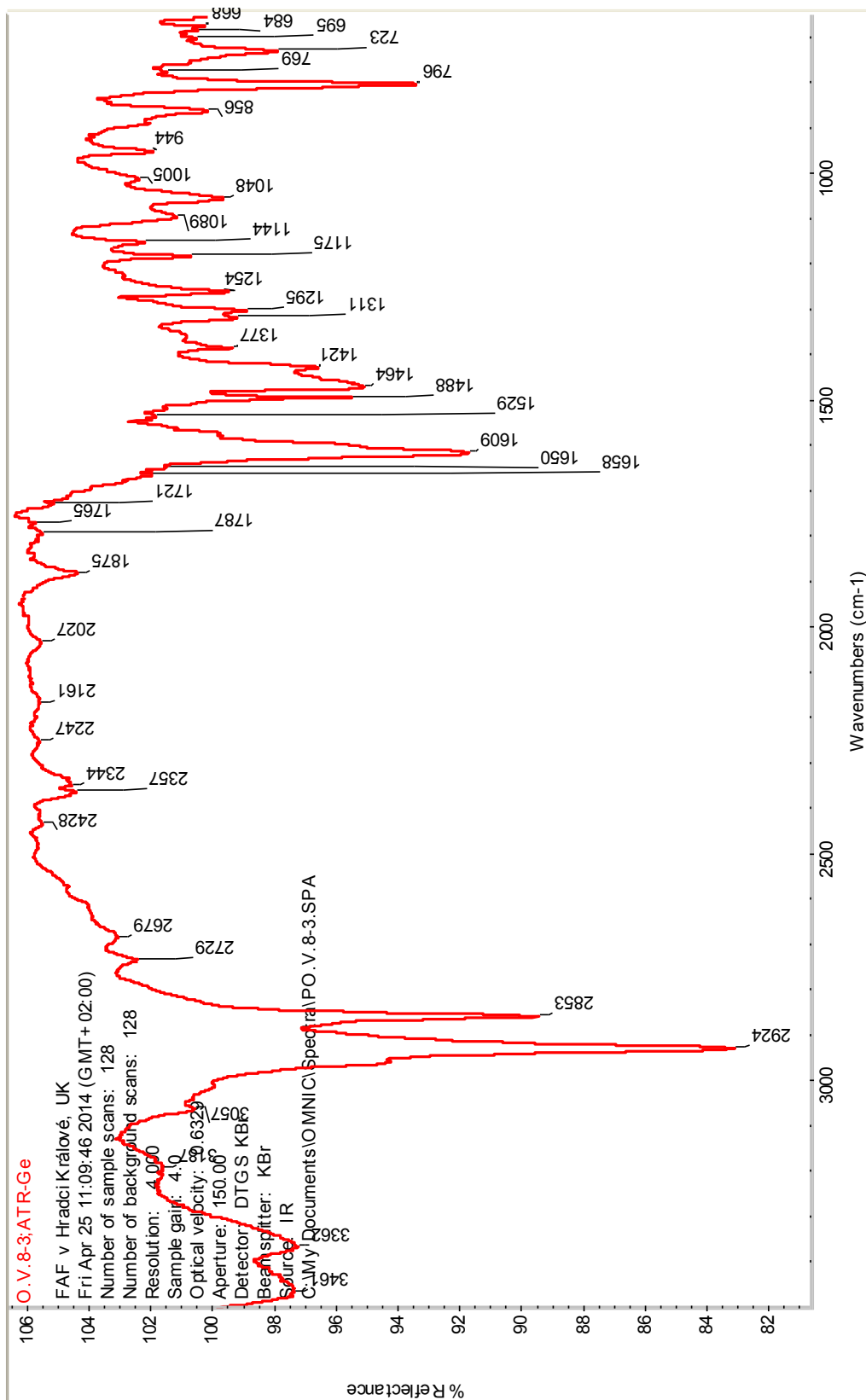
Byla naměřena níže uvedená IČ, NMR a hmotnostní spektra IČ-5, NMR-4a (<sup>1</sup>H NMR), NMR-4b (<sup>13</sup>C NMR) a -4.

Výtěžek reakce: 7,4 g (82%)

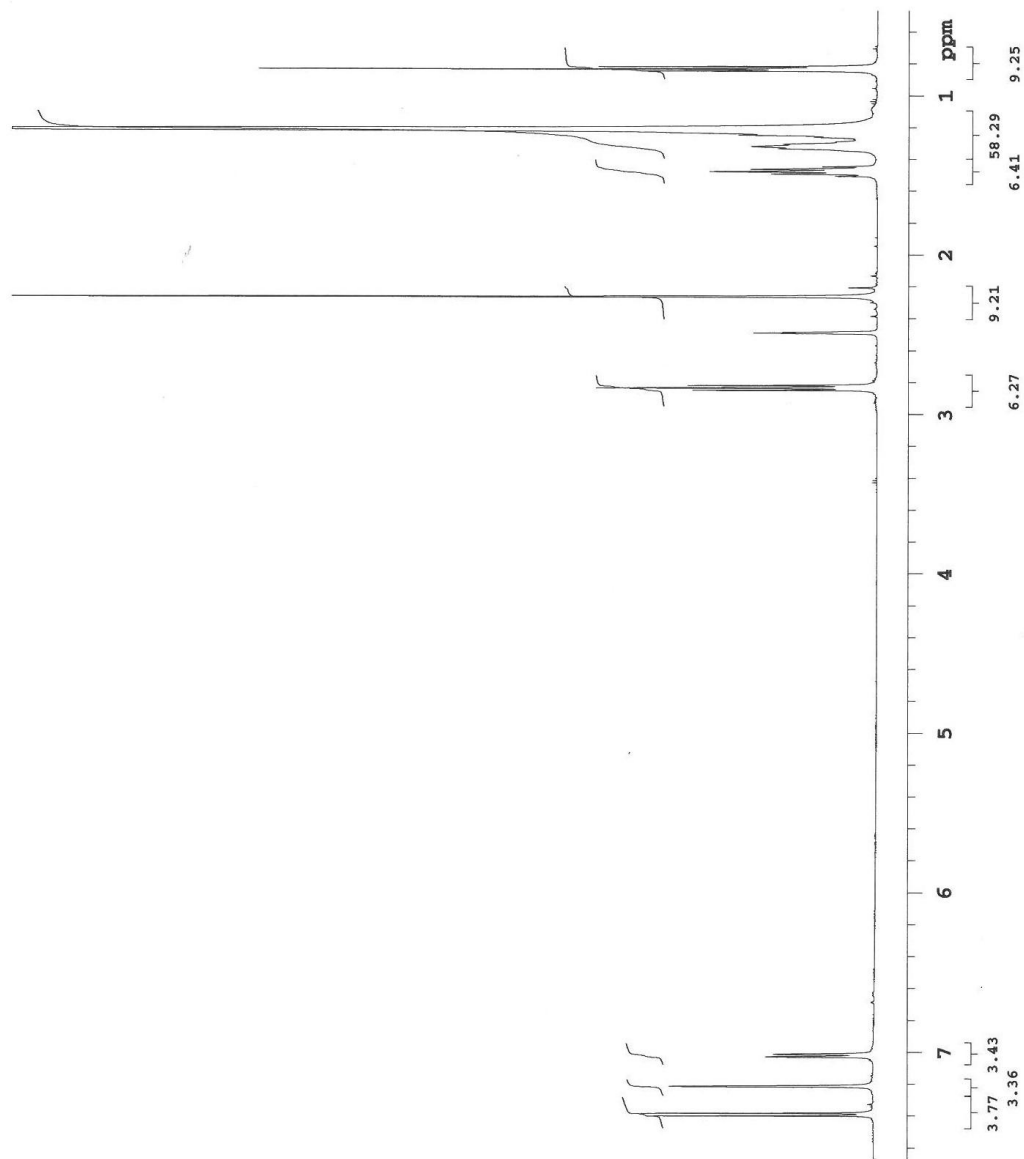
Teplota tání produktu: 91,0 °C – 92,9 °C

LRMS (APCI) m/z 308,5 [M+H]<sup>+</sup> (100%).

Ľ-5: 5-methyl-2-(dodecylsulfanyl)anilin



NMR-4a: 5-methyl-2-(dodecylsulfanyl)anilin



```

OV9-2
exp71 PROTON
SAMPLE PRESENTATION
date May 7 2014 satmode n
solvent dms0 wet n
file exp SPECIAL
ACQUISITION temp 25.0
sw 8012.8 gain 18
at 2.045 spin 20
np 32768 hst 0.008
fb 4000 pw90 9.100
bs 32 alfa 10.000
dl 1.000 FLAGS
nt 8 il n
ct 8 in n
TRANSMITTER H1 hs nm
strq 499.869 PROCESING
tof 499.8 fn not used
tpwr 60 DISPLAY
pw 4.550 sp 233.8
DECOUPLER wp 3601.0
dn C13 rf1 2254.6
dof 0 rfp 1244.7
dm nnn ip 118.2
decwave W40_OneNMR-1p 0
PLOT
dpr 37 WC 200
dmf 32258 sc 0
vs 383
th ai cdc ph 7
  
```

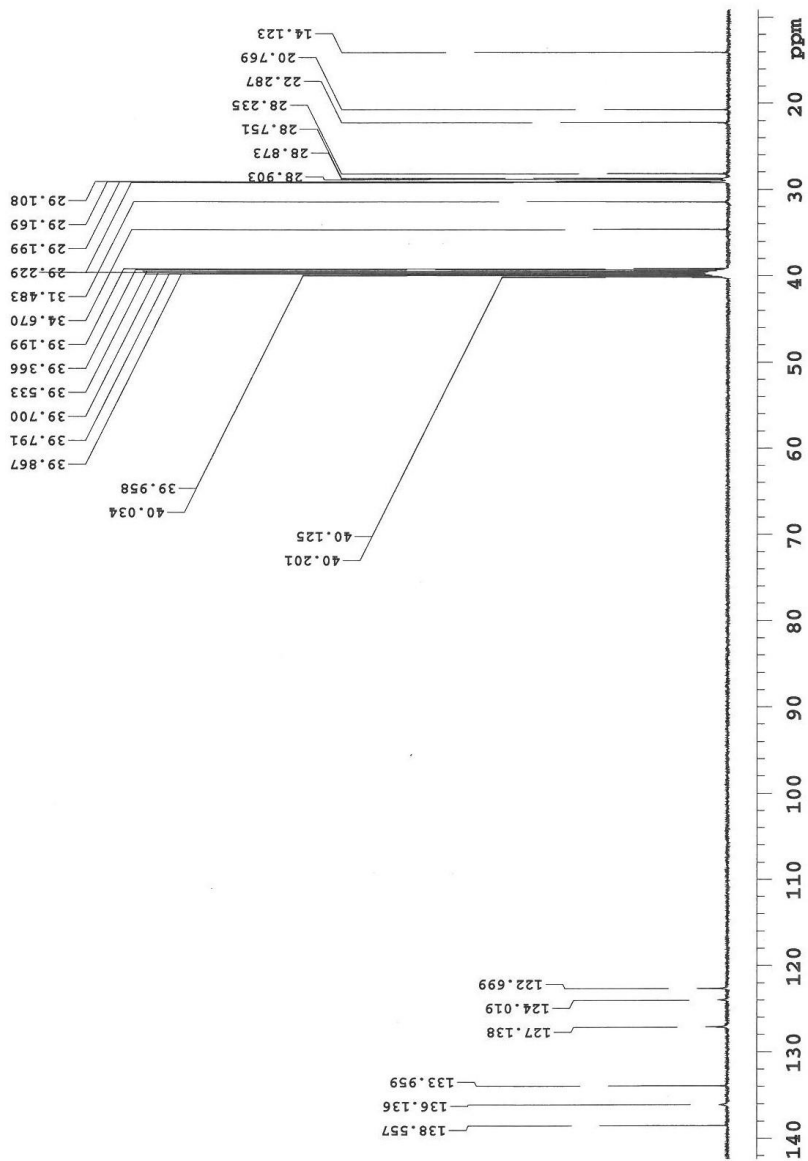
# NMR-4b: 5-methyl-2-(dodecylsulfanyl)anilin

OV9-2

exp72 CARBON

```

SAMPLE PRESATURATION
date May 7 2014 satmode n
solvent dmsd wet n
file exp SPECIAL
ACQUISITION temp 25.0
sw 31250.0 gain 30
at 1.049 spin 20
np 65536 hst 0.008
fb 17000 pw90 11.300
bs 1 alfa 10.000
dl 3.000
nt 1000 il n
ct 1000 in n
TRANSMITTER dp y
tn C13 hs nn
sfrq 125.705 PROCESSING
tof 1913.9 lb 0.50
tpwr 55 fn not used
PW 5.650 DISPLAY
DECOUPLER sp 1150.5
dn H1 wp 16744.6
dof 0 rfl 6823.5
dm jfy rfp 4989.9
decwave w rp 44.0
dpwr 41 lp 0
dmf 12346 PLOT
wc 200
sc 0
vs 119
th 1
nm cdc ph
    
```

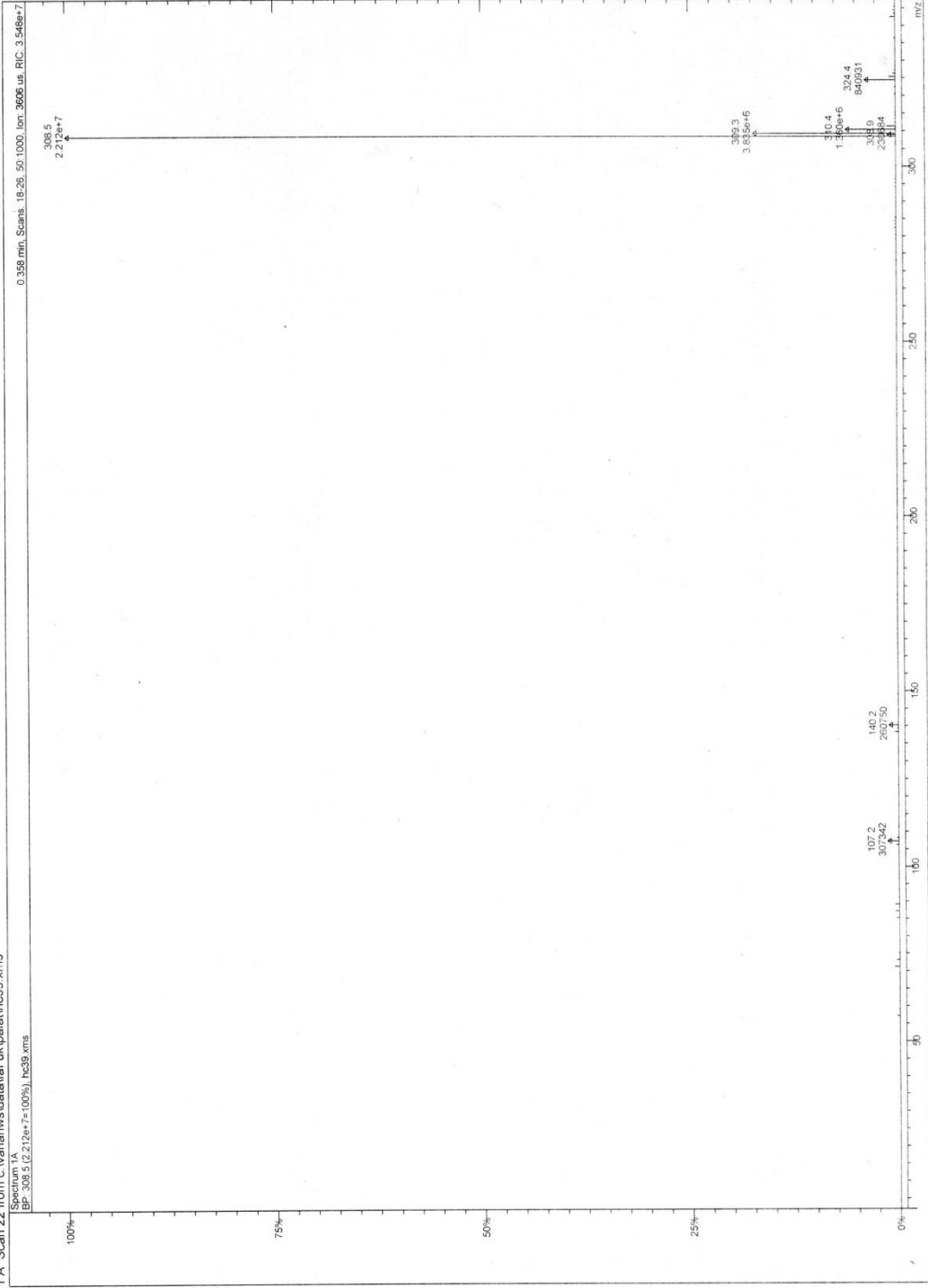


LRMS-4: 5-methyl-2-(dodecylsulfanyl)anilin

Print Date: 13 May 2014 15:31:02

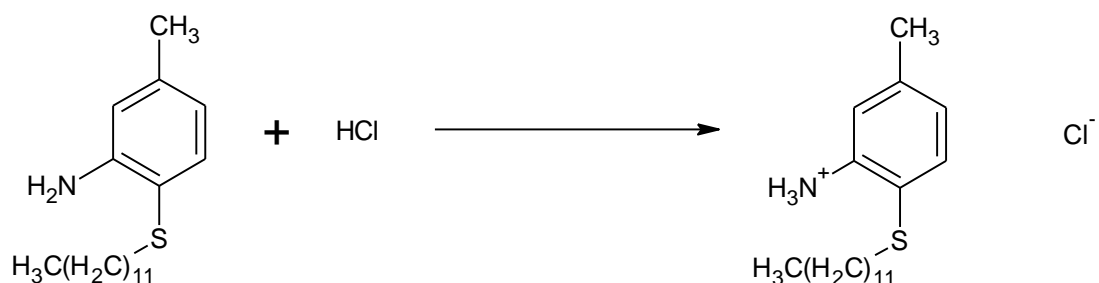
Spectrum Plot - 5/13/2014 3:31 PM

1 A Scan 22 from c:\varian\msdata\af uk\palathc39.xms  
BP: 308.5 (2.212e+7=100%), hc39.xms



### 3.1.8. Příprava 5-methyl-2-(dodecylsulfanyl)anilinium chloridu

Molární hmotnost: 343,99 g.mol<sup>-1</sup>

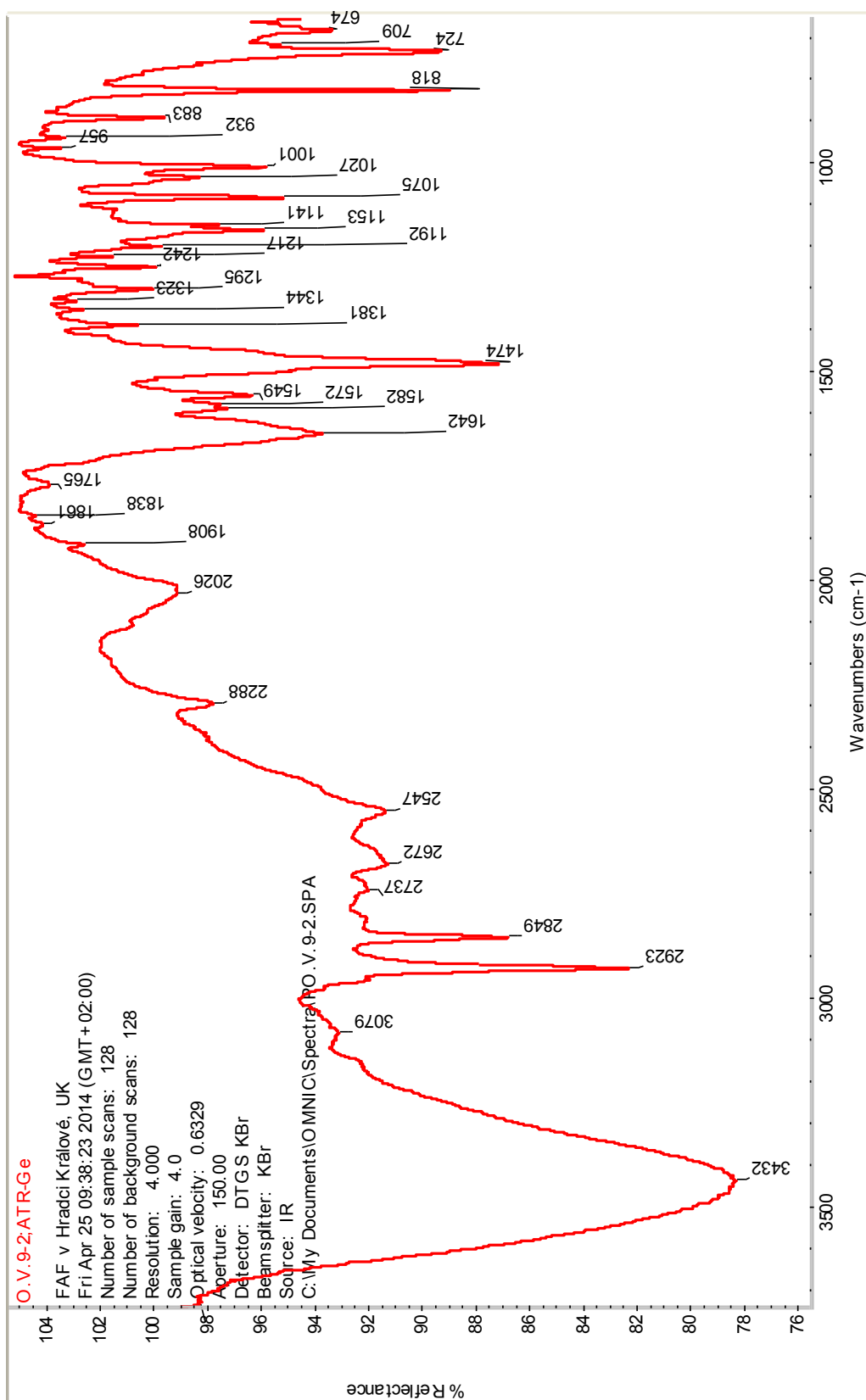


8,00 g (0,0260 mol) 5-methyl-2-(dodecylsulfanyl)anilinu bylo rozpuštěno v minimálním množství bezvodého diethyletheru a uloženo do ledové lázně. Při stálém chlazení byla směs sycena plynným chlorovodíkem po dobu 23 minut. Po ukončení reakce byla směs uložena do chladu. Vzniklé krystaly byly odfiltrovány a promyty suchým diethyletherem. Produkt byl bez dalšího čištění použit do následující reakce.

Bylo naměřeno níže uvedená IČ spektrum IČ-6.

Výtěžek reakce: 5,9 g (71%)

IČ-6: 5-methyl-2-(dodecylsulfanyl)anilinium chlorid

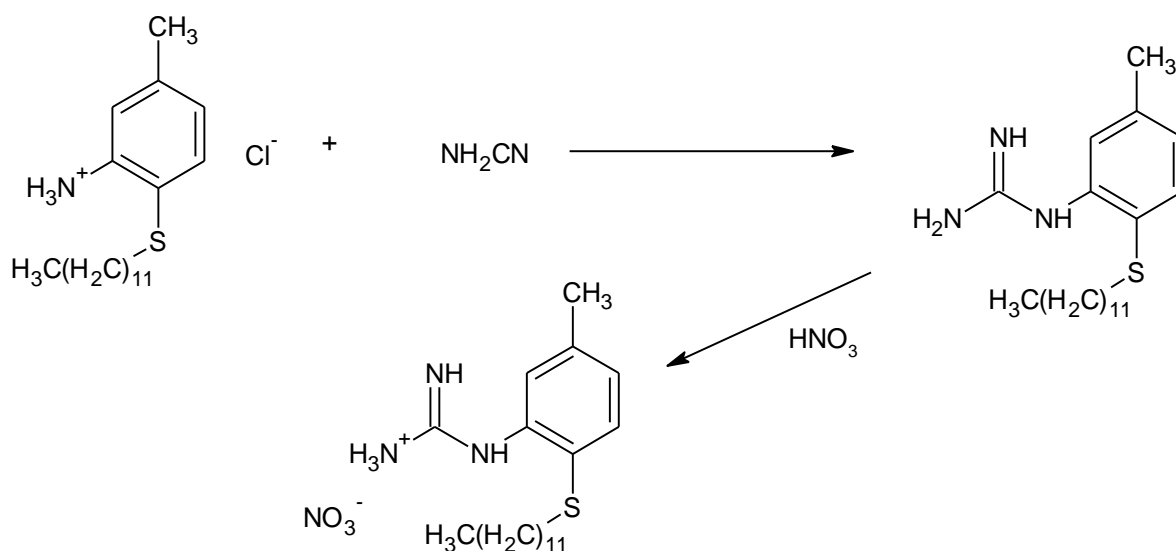




### 3.1.9. Příprava 1-[5-methyl-2-(dodecylsulfanyl)fenyl]guanidinium nitrátu

Molární hmotnost báze: 349,58 g.mol<sup>-1</sup>

Molární hmotnost dusičnanu: 412,59 g.mol<sup>-1</sup>



2,00 g ( $5,81 \times 10^{-3}$  mol) 4-methyl-2-dodecylsulfanylanilinium-chloridu bylo za laboratorní teploty důkladně promícháno s 0,24 g ( $5,58 \times 10^{-3}$  mol) kyanamidu a za stálého míchání taveno při teplotě 130 °C. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (stacionární fáze: silikagel, SILUFOL UV 254/366, mobilní fáze: hexan : ethanol : triethylamin = 8 : 2 : 1). Reakční čas byl 25 minut.

Po ukončení reakce byla vzniklá směs za horka rozpuštěna ve vodě a po vychlazení bylo přidáno několik kapek kyseliny dusičné do kyselé reakce (ověřeno pH papírkem). Směs byla uložena do chladu ke krystalizaci. Produkt byl čištěn opakovanou rekrystalizací ze směsi voda : ethanol (3 : 1).

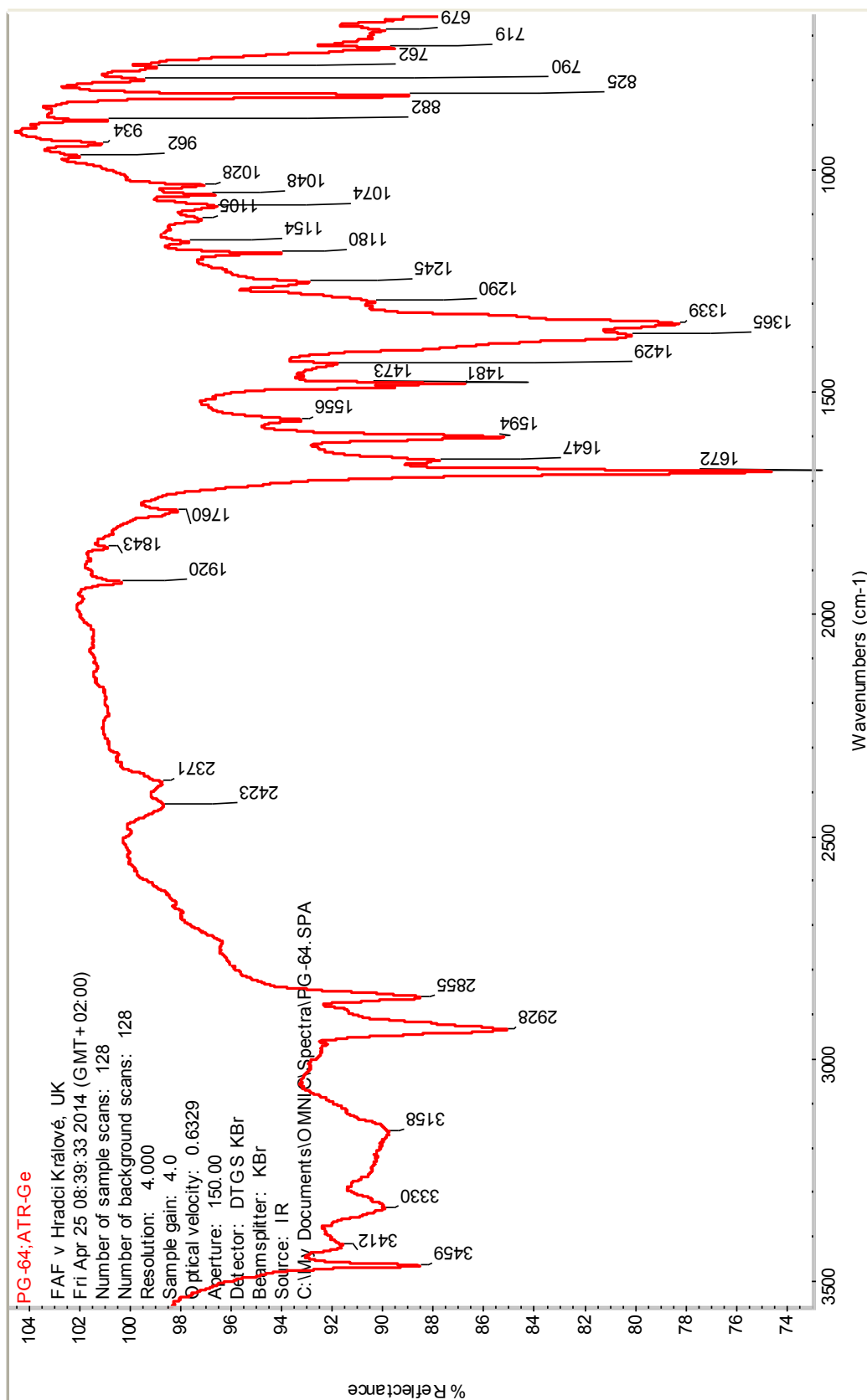
Byla naměřena níže uvedená IČ, NMR a hmotnostní spektra IČ-7, NMR-5a (<sup>1</sup>H NMR), NMR-5b (<sup>13</sup>C NMR) a LRMS-5.

Výtěžek reakce: 1,65 g (81%)

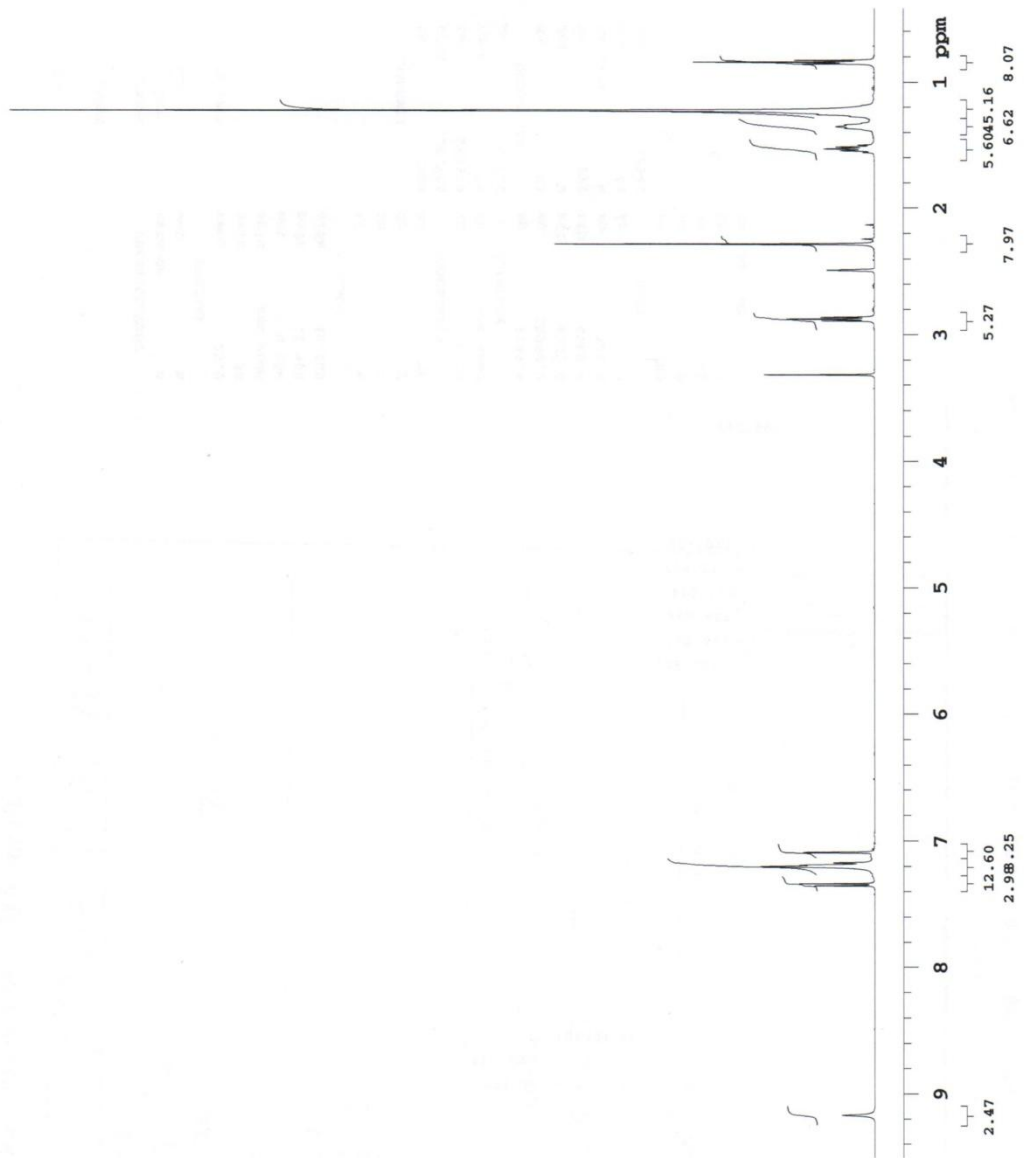
Teplota tání produktu: 73,5 °C - 75,0 °C

LRMS (APCI) m/z 350,5 [M+H]<sup>+</sup> (100%)

1Č-7: 1-[5-methyl-2-(dodecylsulfanyl)fenyl]guanidinium nitrát



NMR-5a: 1-[5-methyl-2-(dodecylsulfanyl)fenyl]guanidinium nitrát

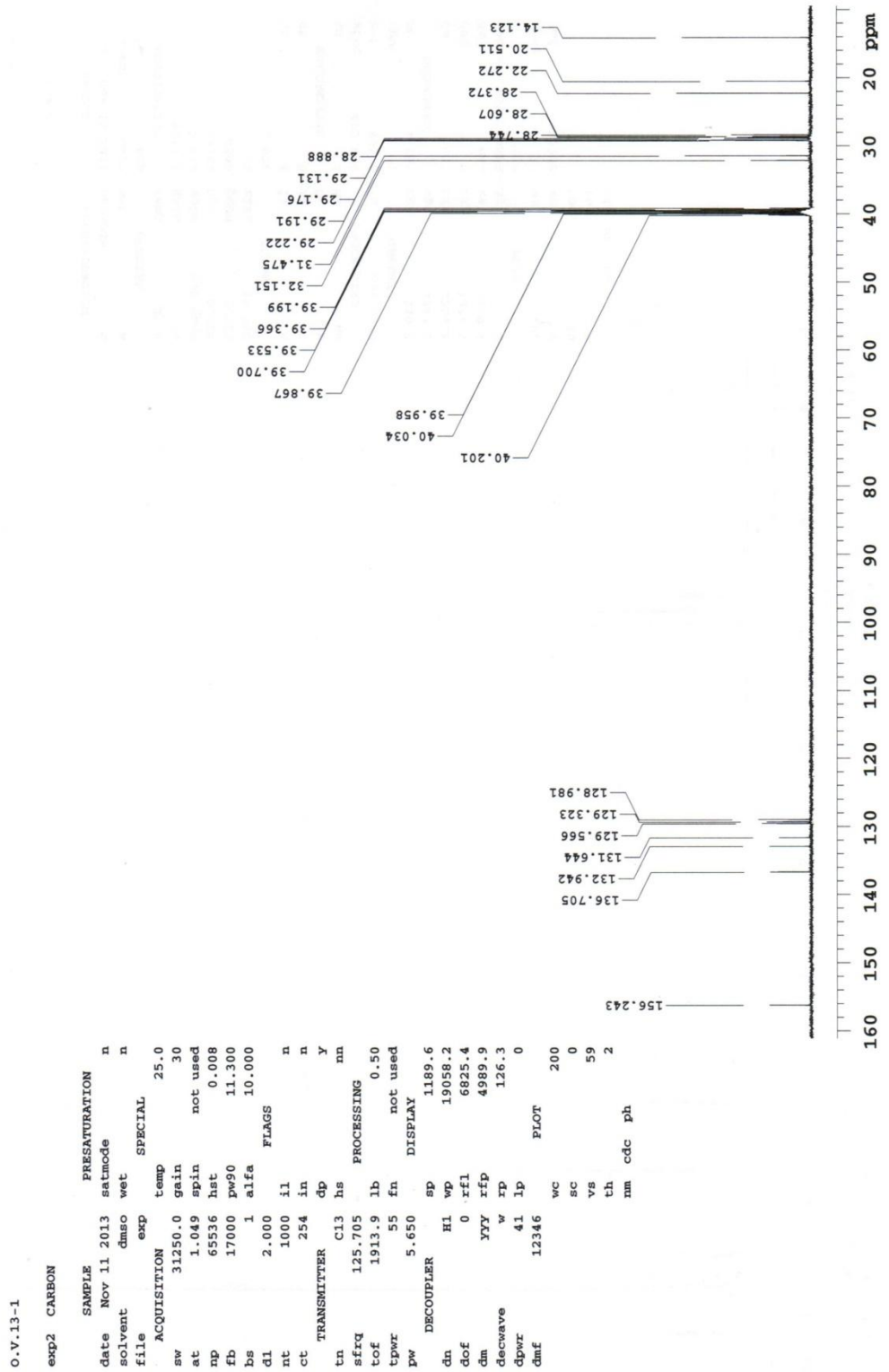


O.V.13-1

exp1 PROTON

date	Nov 11 2013	satmode	n
solvent	dmsd	wet	n
file	exp	SPECIAL	
ACQUISITION			
sw	8012.8	gain	30
at	2.045	spin	not used
np	32768	hst	0.008
fb	4000	pw90	9.100
bs	32	alfa	10.000
d1	1.000	FLAGS	
nt	8	il	n
ct	8	in	n
tn	TRANSMITTER	H1	hs
sfrq	499.869	dp	Y
tof	499.8	fn	not used
tpwr	60	DISPLAY	
pw	4.550	sp	210.3
de	DECOUPLER	wp	4543.9
dn	C13	rf1	2254.6
dof	0	rfp	1244.7
dm	nmn	fp	-139.4
de	decwave W40_OneNMR-	lp	0
dpwr	_W018	WC	200
dmf	32258	SC	0
		VS	45
		TH	7
		AI	cdc
		PH	

NMR-5b: 1-[5-methyl-2-(dodecylsulfanyl)fenyl]guanidinium nitrát

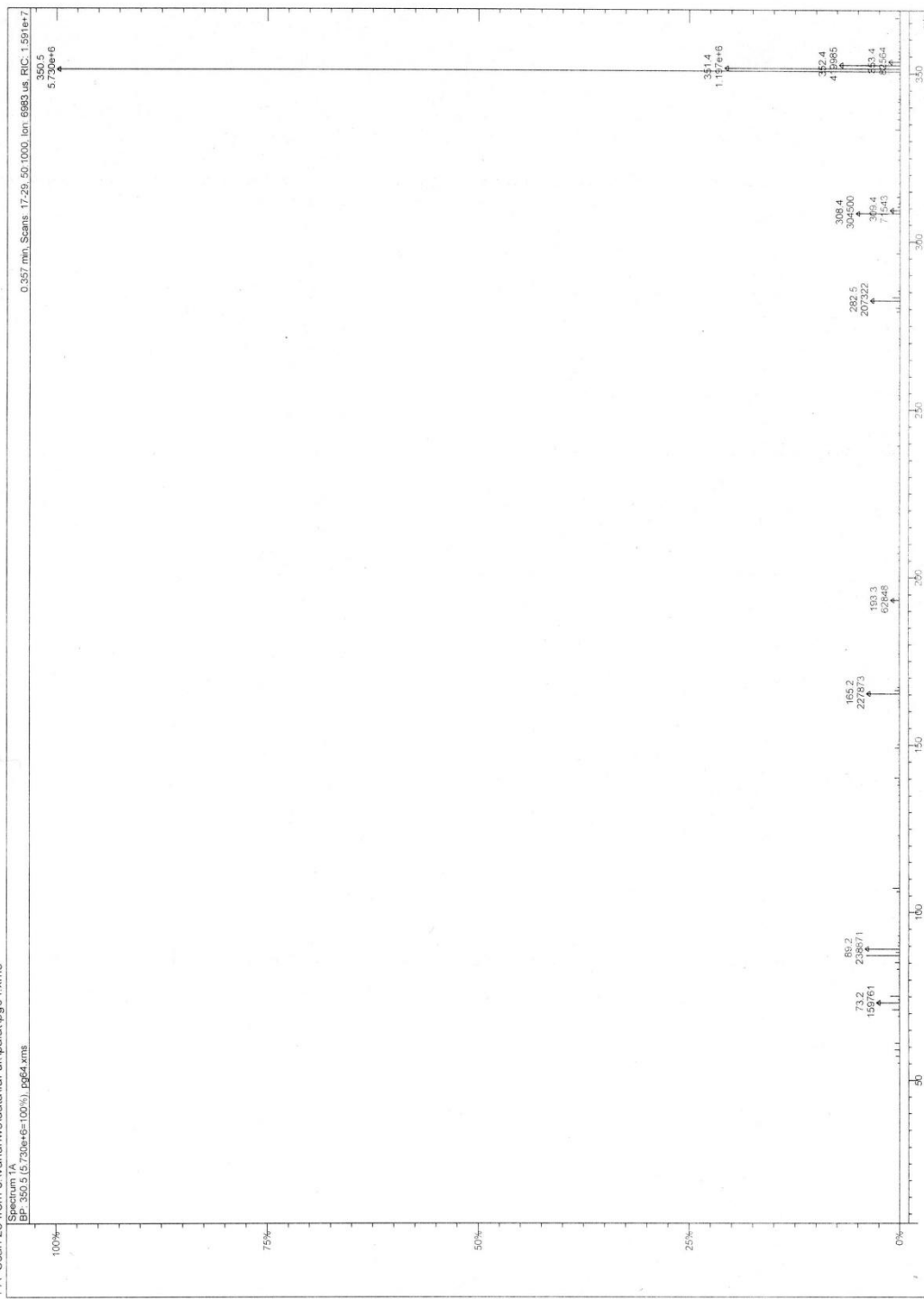


LRMS-5: 1-[5-methyl-2-(dodecylsulfanyl)fenyl]guanidinium nitrát

Print Date: 13 May 2014 15:02:36

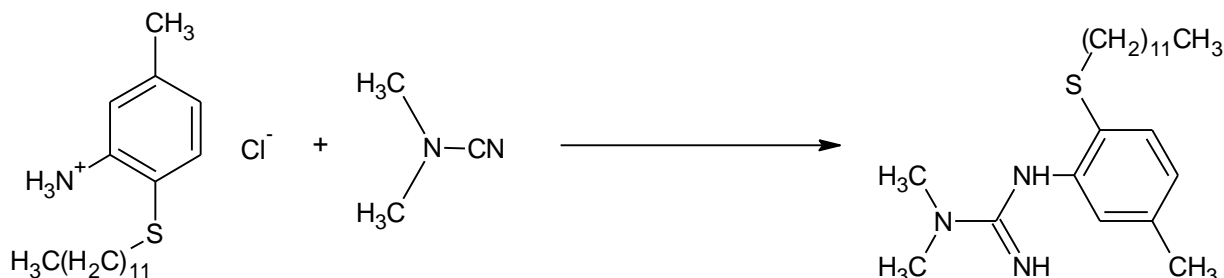
Spectrum Plot - 5/13/2014 3:02 PM

1 A Scan 23 from c:\varian\sw\data\af uk\palat\pg64.xms



### 3.1.10. Příprava 1-[5-methyl-2-(dodecylsulfanyl)fenyl]-3,3-dimethylguanidinu

Molární hmotnost: 377,63 g.mol<sup>-1</sup>



2,00 g ( $5,81 \times 10^{-3}$  mol) 4-methyl-2-dodecylsulfanylanilinium-chloridu bylo za laboratorní teploty důkladně promícháno s 0,41 g ( $5,85 \times 10^{-3}$  mol) dimethylkyanamidu a za stálého míchání taveno při teplotě 130 °C. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (stacionární fáze: silikagel, SILUFOL UV 254/366, mobilní fáze: hexan : ethanol : triethylamin = 8 : 2 : 1). Reakční čas byl 30 minut.

Po ukončení reakce byla reakční směs rozpuštěna v horké vodě a po ochlazení byla směs zalkalizována 10% roztokem NaOH. Produkt byl pětikrát vytřepán do ethylacetátu. Spojené organické fáze byly sušeny bezvodým síranem sodným a byly vakuově odpařeny. Získaný produkt byl rozpuštěn v hexanu a uložen do chladu na 48 hodin ke krystalizaci. Produkt byl čištěn opakovanou rekrystalizací z hexanu.

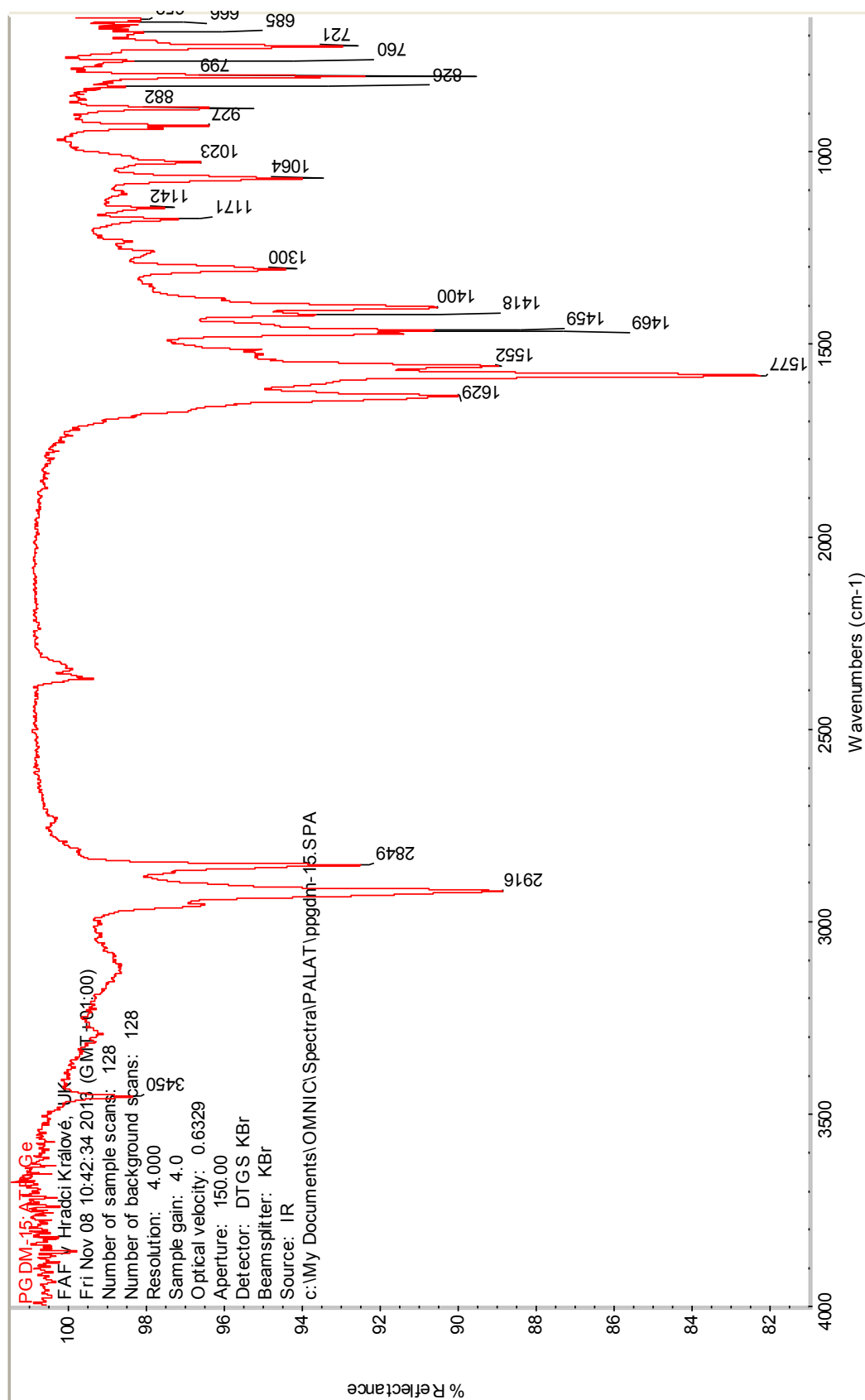
Byla naměřena níže uvedená IČ, NMR a hmotnostní spektra: IČ-8, NMR-6a (<sup>1</sup>H NMR), NMR-6b (<sup>13</sup>C NMR) a LRMS-6.

Výtěžek reakce: 1,45 g (66%)

Teplota tání produktu: 45,5 °C - 46,5 °C

LRMS (APCI) m/z 378,6 [M+H]<sup>+</sup> (100%)

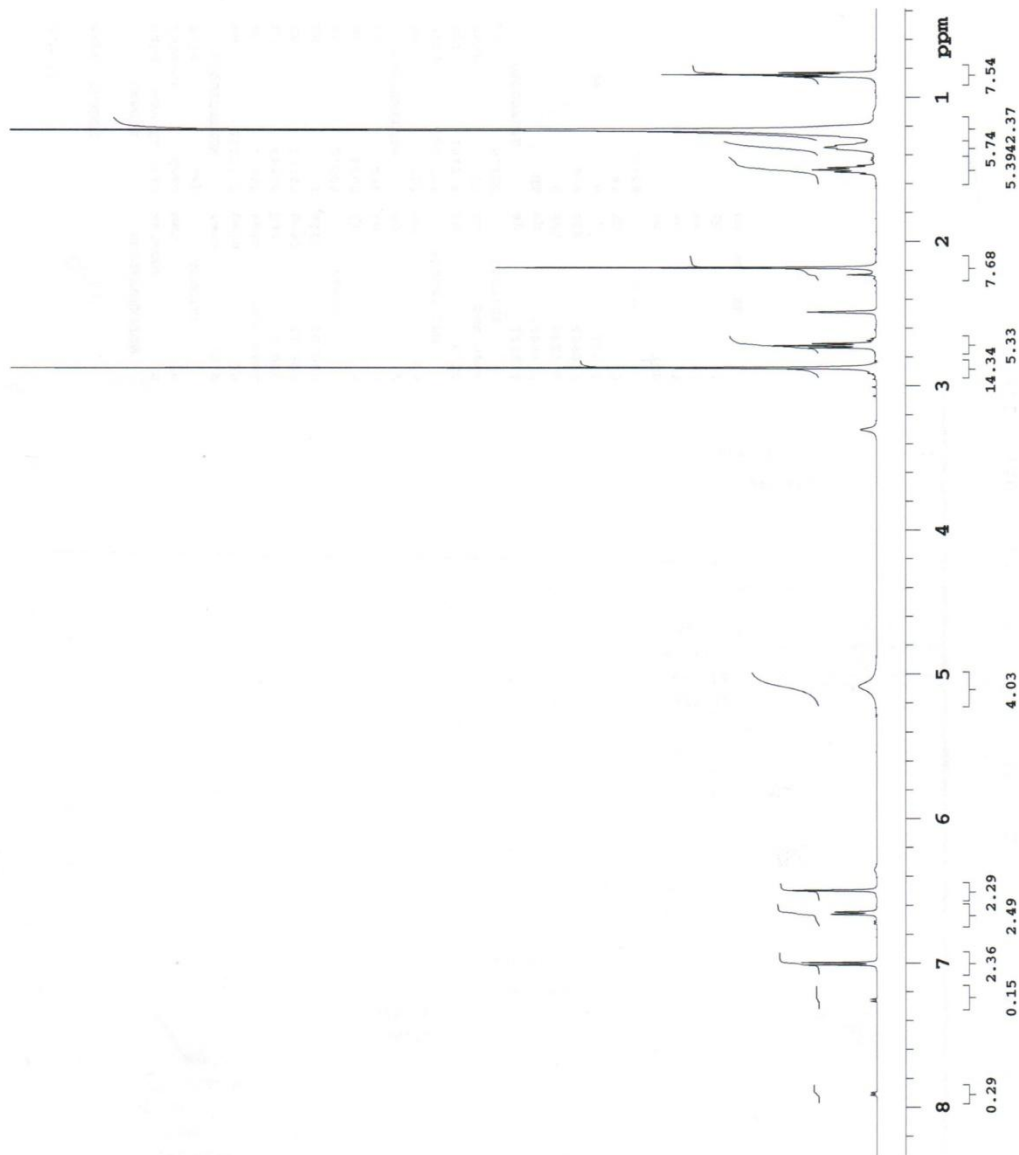
č.8: 1-[5-methyl-2-(dodecylsulfanyl)fenyl]-3,3-dimethylguanidin



NMR-6a: 1-[5-methyl-2-(dodecylsulfanyl)phenyl]-3,3-dimethylguanidin

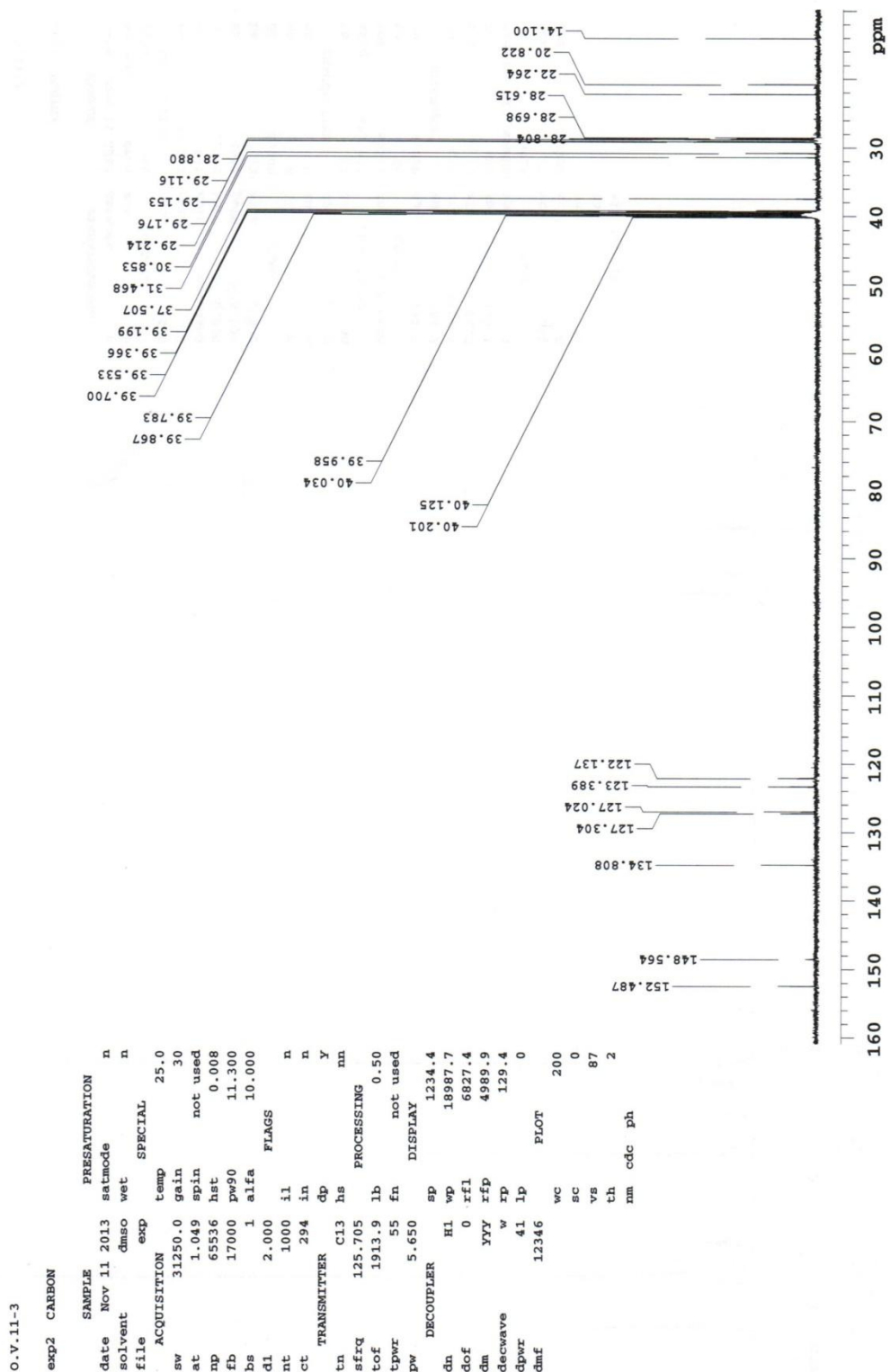
```

O.V.11-3
exp1 PROTON
SAMPLE PRESATURATION
date Nov 11 2013 satmode n
solvent dmsc wet n
file exp SPECIAL
ACQUISITION temp 25.0
sw 8012.8 gain 30
at 2.045 spin not used
np 32768 hst 0.008
fb 4000 pw90 9.100
bs 32 alfa 10.000
di 1.000
nt 8 il n
ct 8 in n
TRANSMITTER dp y
tn H1 hs nn
sfrq 499.869 PROCESSING
tof 499.8 fn not used
tpwr 60 DISPLAY
pw 4.550 sp 192.7
DECOUPLER wp 3984.9
dn C13 rfl 2254.6
dof 0 rfp 1244.7
dm nnn rp -135.1
decwave W40_OneNMR- lp 0
PLOT
dpwr 37 wc 200
dmf 32258 sc 0
vs 74
th ai cdc ph
  
```





NMR-6b: 1-[5-methyl-2-(dodecylsulfanyl)fenyl]-3,3-dimethylguanidin

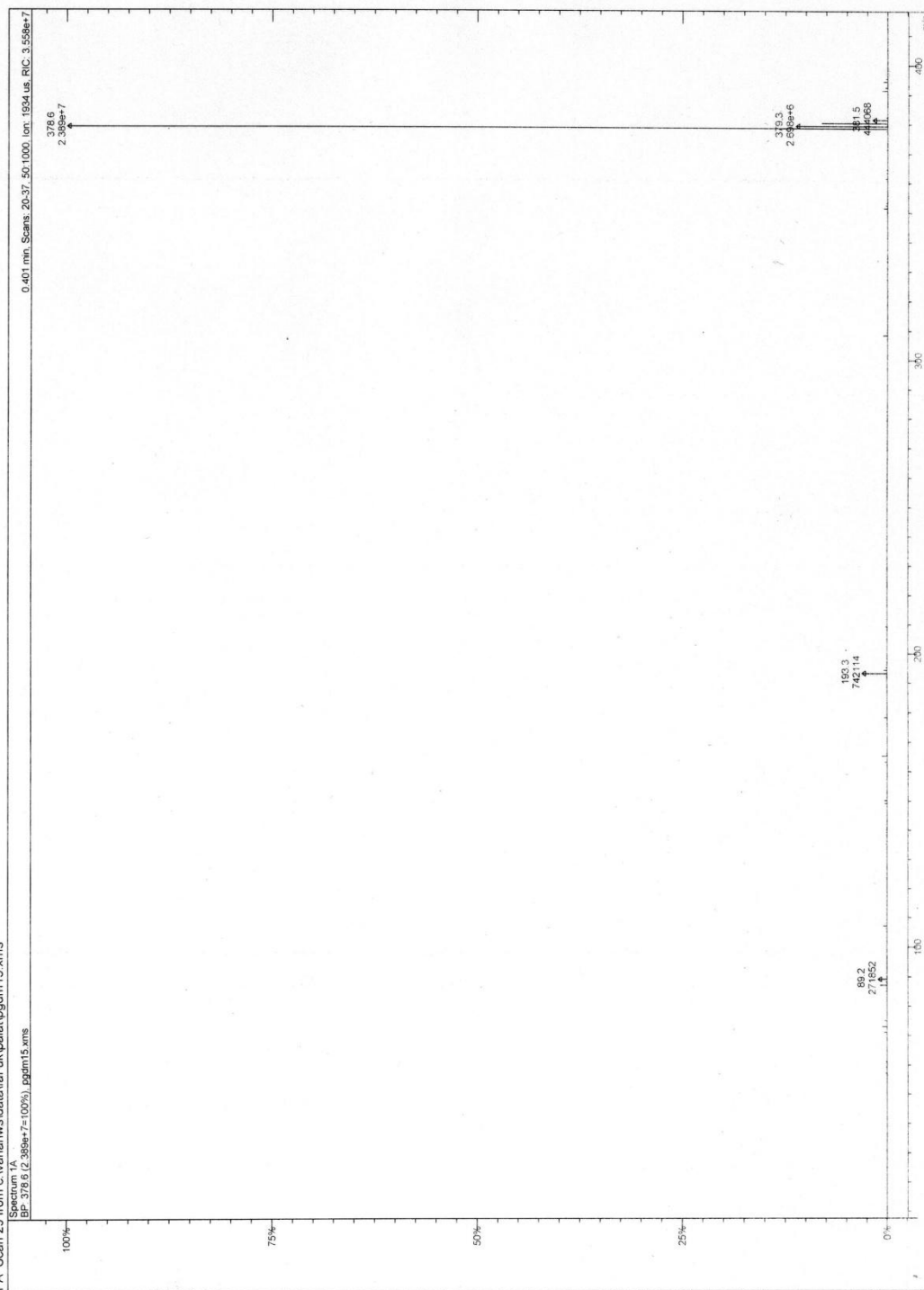


LRMS-6: 1-[5-methyl-2-(dodecylsulfanyl)fenyl]-3,3-dimethylguanidin

Print Date: 13 May 2014 14:52:17

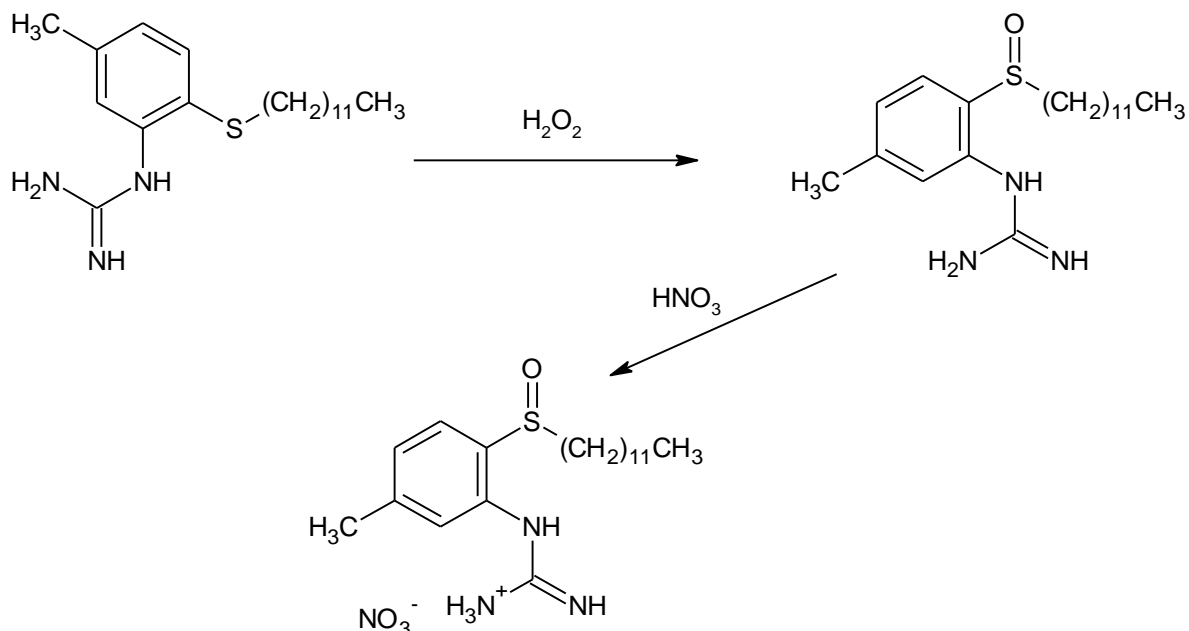
Spectrum Plot - 5/13/2014 2:50 PM

1 A Scan 29 from c:\varian\sw\data\af uk\palat\pccim15.xml  
Spectrum 1A  
BP: 376.6 (2.39e+7=100%), pccim15.xml



### 3.1.11. Příprava 1-(5-methyl-2-dodecylsulfinyl)fenylguanidinium nitrátu

Molární hmotnost: 381,55 g.mol<sup>-1</sup>



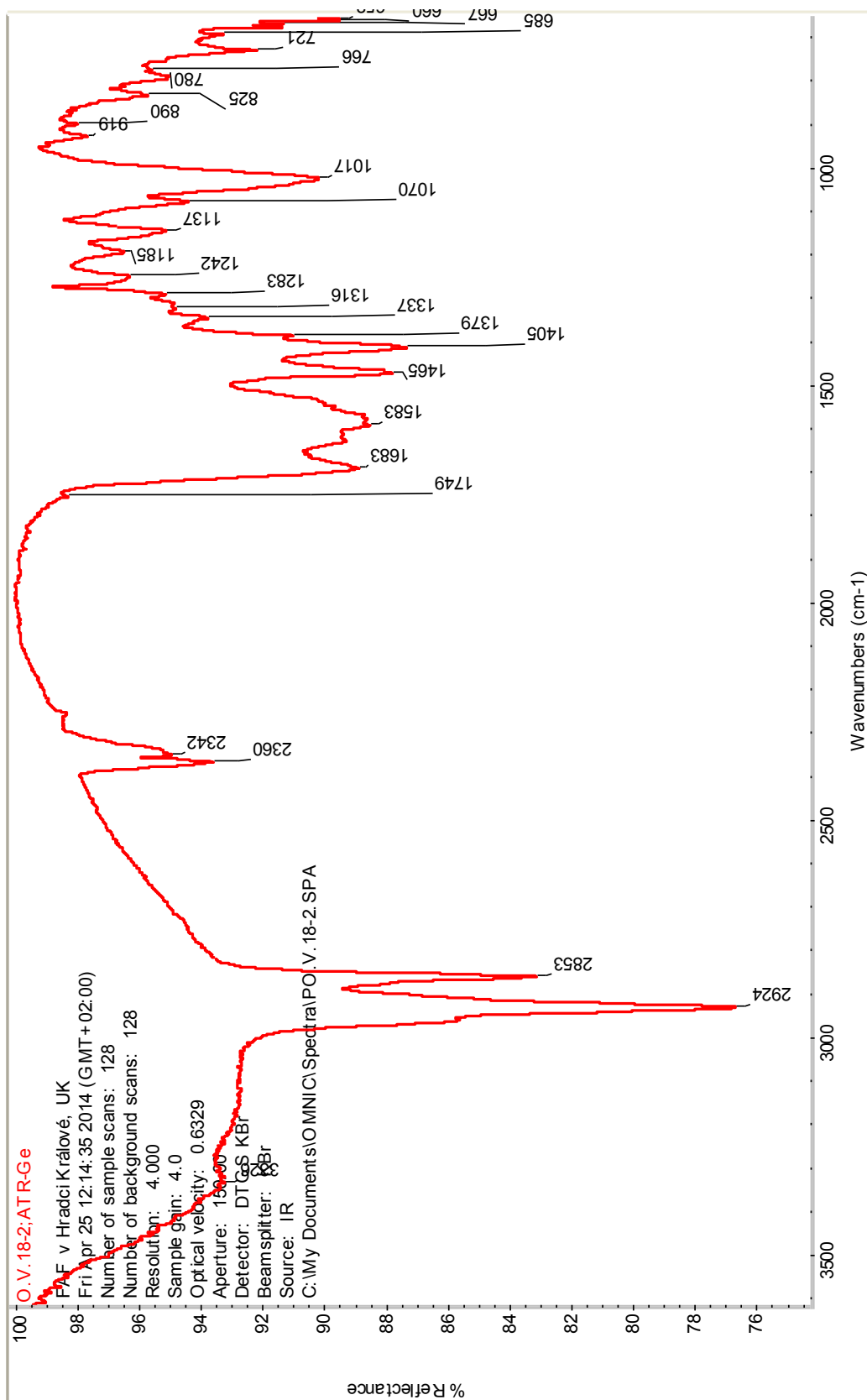
Ke směsi 0,10 g ( $0,286 \times 10^{-3}$  mol) 1-(5-methyl-2-dodecylsulfanyl)fenylguanidinium nitrátu, 0,13 g ( $0,575 \times 10^{-3}$  mol) chloridu zirkoničitého a 7,0 ml methanolu bylo za stálého míchání přidáno 0,19 g (30%,  $5,59 \times 10^{-3}$  mol, 0,16 ml) peroxidu vodíku. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (stacionární fáze: silikagel, SILUFOL UV 254/366, mobilní fáze: hexan : ethanol : triethylamin = 8 : 2 : 1).

Reakce byla po třech minutách ukončena přidáním 20 ml vody. Produkt byl vytřepáván pětkrát do ethylacetátu a spojené organické fáze byly vakuově odpařeny. Pro neúspěšnost rekrystalizace z vody, ethanolu nebo jejich směsí v různých poměrech byl produkt čištěn a dělen na sloupcové chromatografii (stacionární fáze: prášková celulóza, mobilní fáze ethanol : voda = 2 : 1). Přes opakovanou snahu o přečištění se nepodařilo získat látku v krystalické formě.

Bylo naměřeno níže uvedené IČ spektrum IČ-9.

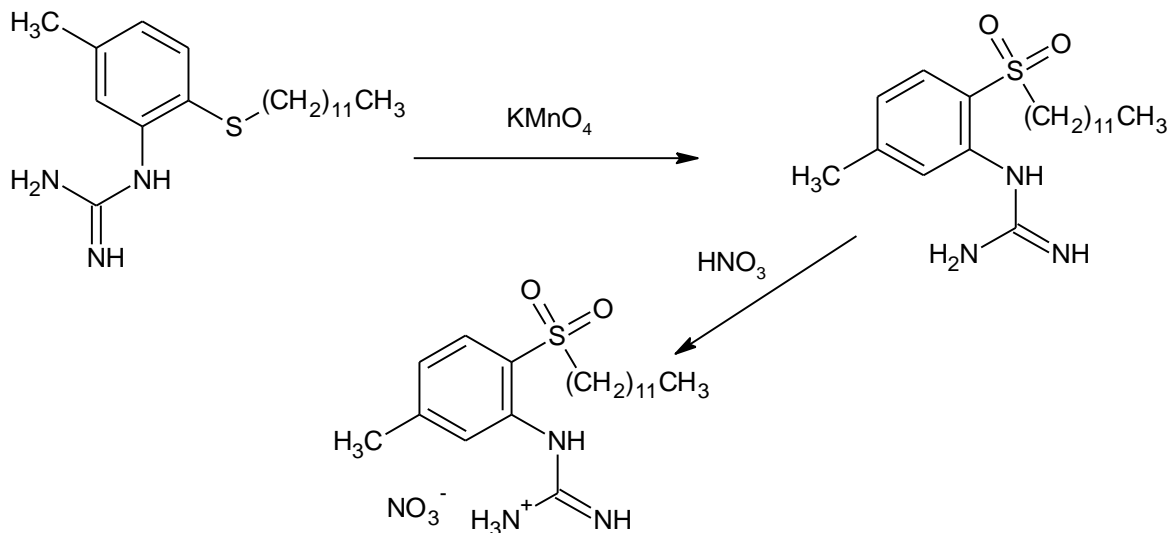
IČ spektrum:  $\nu(\text{S}=\text{O})$ : 1017 cm<sup>-1</sup>.

IČ-9: 1-(5-methyl-2-dodecylsulfinyl)fenylguanidinium nitrát



### 3.1.12. Příprava 1-(5-methyl-2-dodecylsulfonyl)fenylguanidinium nitrátu

Molární hmotnost: 381,55 g.mol<sup>-1</sup>



0,20 g ( $0,572 \times 10^{-3}$  mol) 1-(5-methyl-2-dodecylsulfonyl)fenylguanidinium nitrátu bylo rozpuštěno v 70,0 ml vody. Po rozpuštění bylo přidáno 0,05 g (0,0316 mol) manganistanu draselného a za stálého míchání byla směs ponechána reagovat několik minut. Průběh reakce byl sledován pomocí TLC (stacionární fáze: silikagel, SILUFOL UV 254/366, mobilní fáze: hexan : ethanol : triethylamin = 8 : 2 : 1). Po ukončení reakce bylo přidáno několik kapek kyseliny dusičné a ponecháno v lednici krystalovat. Krystaly se ani po opakovaném čištění aktivním uhlím nepodařilo získat a produkt se pravděpodobně začal rozkládat.

### 3. Mikrobiologická část

Tři nasyntetizované látky, uvedené níže v příložené Tabulce 1 (str. 63), byly testovány na vybraných kmenech potenciálně patogenních hub: *Candida albicans* (CA), *Candida tropicalis* (CT), *Candida glabrata*, (CG), *Candida krusei* (CK) *Trichosporon beigelii* (TB), *Aspergillus fumigatus* (AF), *Absidia corymbifera* (AC), *Trichophyton mentagrophytes* (TM).

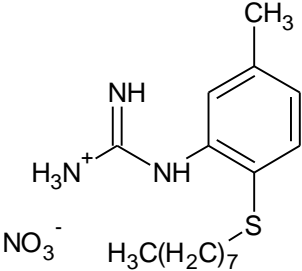
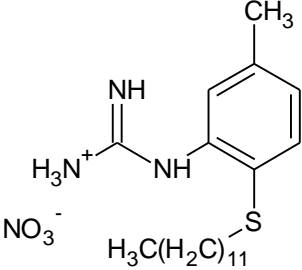
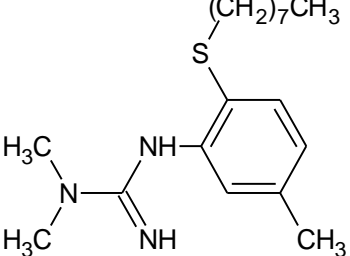
Další testy proběhly na osmi kmenech bakterií: *Staphylococcus aureus* (SA), *Methicilin rezistentní Staphylococcus aureus* (MRSA), *Staphylococcus epidermidis* (SE), *Enterococcus sp.* (EF), *Escherichia coli* (EC), *Klebsiella pneumoniae* (KP), *Klebsiella pneumoniae ESBL pozitivní* (KP-E), *Pseudomonas aeruginosa* (PA). Účinnost těchto kmenů bakterií byla porovnávána s aktivitou vybraných antibiotik (neomycin (neom), bacitracin (bac) a penicilin (pen)).

Minimální inhibiční koncentrace daných sloučenin (MIC,  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ) testovaných na osmi vybraných kmenech plísní jsou uvedeny níže v příložené Tabulce 2 (str. 64).

Minimální inhibiční koncentrace daných sloučenin (MIC,  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ) testovaných na osmi vybraných kmenech bakterií jsou uvedeny níže v příložené Tabulce 3 (str. 65).

MIC byla měřena pro  $\text{IC}_{80}$  (inhibiční koncentrace; koncentrace vyvolávající 80% inhibici daného parametru).

**Tabulka 1: Přehled testovaných nasyntetizovaných látek.**

kód	název	vzorec
a	1-[5-methyl-2-(oktylsulfanyl)phenyl]guanidinium nitrát	
b	1-[5-methyl-2-(dodecylsulfanyl)phenyl]guanidinium nitrát	
c	1-[5-methyl-2-(dodecylsulfanyl)phenyl]-3,3-dimethylguanidin	

**Tabulka 2: Účinek testovaných látek na osm vybraných kmenů plísní v porovnání s dodinem (dod) a ketokonazolem (ket).**

Plísně						
KMEN (kód)	čas	Testovaná látka (kód)- MIC/IC <sub>80</sub>			Referenční hodnoty MIC/IC <sub>80</sub>	
		a	b	c	dod	ket
CA	24h	62,5	15,62	3,9	7,81	<0,24
	48h	62,5	15,62	3,9	7,81	<0,24
CT	24h	31,25	15,62	3,9	3,91	1,95
	48h	31,25	15,62	3,9	3,91	3,91
CK	24h	31,25	15,62	3,9	3,91	0,98
	48h	31,25	15,62	3,9	3,91	0,98
CG	24h	31,25	7,81	3,9	7,81	0,49
	48h	31,25	7,81	3,9	7,81	0,49
TB	24h	62,25	15,62	3,9	7,81	<0,24
	48h	62,25	15,62	3,9	7,81	<0,24
AF	24h	62,25	15,62	3,9	7,81	7,81
	48h	62,25	15,62	3,9	15,63	7,81
AC	24h	250	125	15,62	62,5	31,25
	48h	250	125	15,62	62,5	31,25
TM	24h	15,62	7,81	3,9	15,63	0,98
	48h	15,62	7,81	3,9	15,63	0,98

*MIC - minimální inhibiční koncentrace*

*IC<sub>80</sub> - inhibiční koncentrace; koncentrace vyvolávající 80% inhibici daného parametru*



**Tabulka 3: Účinek testovaných látek na osm vybraných kmenů bakterií v porovnání s antibiotiky neomycinem (neom), bacitracinem (bac) a penicilinem (pen).**

Bakterie							
KMEN (kód)	čas	Testovaná látka (kód)- MIC/IC <sub>80</sub>			Referenční hodnoty MIC/IC <sub>80</sub>		
		a	b	c	neom	bac	pen
SA	24h	3,9	1,95	0,98	3,9	15,62	0,24
	48h	3,9	1,95	0,98	3,9	31,25	0,24
MRSA	24h	3,9	1,95	1,95	0,98	15,62	125
	48h	3,9	1,95	1,95	0,98	31,25	125
SE	24h	1,95	1,95	0,98	3,9	15,62	31,25
	48h	1,95	1,95	0,98	7,81	31,25	125
EF	24h	15,62	3,9	1,95	250	31,25	7,81
	48h	15,62	3,9	1,95	250	31,25	15,62
EC	24h	31,25	7,81	15,62	0,98	>500	125
	48h	31,25	7,81	15,62	0,98	>500	125
KP	24h	31,25	15,62	15,62	0,98	>500	250
	48h	31,25	15,62	15,62	0,98	>500	500
KP-E	24h	31,25	15,62	15,62	0,98	>500	>500
	48h	31,25	15,62	15,62	0,98	>500	>500
PA	24h	31,25	15,62	15,62	7,81	>500	>500
	48h	31,25	15,62	15,62	15,62	>500	>500

*MIC - minimální inhibiční koncentrace*

*IC<sub>80</sub> - inhibiční koncentrace; koncentrace vyvolávající 80% inhibici daného parametru*

## 4. Diskuze

V prvním kroku syntézy byly reakcí alkanthiolu (oktanthiol, dodekathiol) s 4-chlor-3-nitrotoluenem připraveny produkty oktyl-(4-methyl-2-nitrofenyl)sulfid a dodecyl-(4-methyl-2-nitrofenyl)sulfid. Reakce s oktanthiolem probíhala rychleji díky kratšímu alkanovému řetězci.

Obě reakce proběhly ve velmi dobrých výtěžcích (87%, 85%). Produkty byly čištěny krystalizací z ethanolu při  $-20^{\circ}\text{C}$  a jejich čistota byla kontrolována teplotou tání a TLC.

Dalším krokem byla redukce nitroskupiny na amin, která probíhala bez obtíží s vysokou výtěžností pohybující se okolo 80%.

Pro syntézu guanidinů bylo potřeba převést aminy na amoniové soli, které dále reagovaly s kyanamidem nebo dimethylkyanamidem. Reakce probíhaly dobře. Problémy nastaly při rekrystalizaci, neboť bylo obtížné nalézt vhodné rozpouštědlo. Nakonec se pro nemethylované guanidiny osvědčila kombinace vody a ethanolu v různých poměrech s přidáním několika kapek kyseliny dusičné. Výsledný nitrát krystaloval lépe než base. Pro dimethylovaný guanidin byl vhodný hexan. Při použití hexanu bylo nutné produkt zalkalizovat a následně vytřepat do ethylacetátu a následně vysušit a vakuově odpařit, což mohlo způsobit nižší výtěžek.

Dalším důvodem z počátku neúspěšné krystalizace byla pravděpodobně i malá čistota produktů, které byly poté přečišťovány aktivním uhlím a opakovanou krystalizací. Metoda sloupcové chromatografie na silikagelu nebo práškové celulóze se pro čištění látek neosvědčila z důvodu naadsorbování produktu na silikagel nebo naopak příliš rychlé promytí na celulóze. Konečné výtěžky dosahovaly přibližně 60%.

Atom síry v molekulách derivátů guanidinů byl dále oxidován pomocí dvou metod. Prvním oxidačním činidlem byl manganistan draselný, který oxidoval výchozí látku na sulfon. Tato reakce nevedla k zisku oxidované látky s odpovídající čistotou, již by bylo možné izolovat krystalizací. Oddělení na sloupcové chromatografii nebylo možné provést. Opakované pokusy o rekrystalizaci vedly pravděpodobně k rozkladu látky.

Metoda oxidace peroxidem probíhala lépe a rychleji než s manganistanem. Produktem této reakce byl sulfoxid, který měl tendenci ve formě nitrátu krystalovat lépe než sulfon z reakce s manganistanem. Totožnost této látky lze předpokládat z naměřeného IČ spektra IČ-9 (str. 60), na kterém je vidět valenční vibrace S=O skupiny při  $1017\text{ cm}^{-1}$ . Vzhledem k

velmi malé výtěžnosti a nedostatku výchozí látky nebylo možné látku 1-(5-methyl-2-dodecylsulfanyl)fenylguanidinium nitrát získat v krystalické formě v takovém množství, které by umožnilo charakterizaci a testování.

Charakterizace látek a ověřování struktury bylo provedeno pomocí TLC, IČ, NMR a LRMS spektrometrie a teploty tání. NMR spektra jsou uvedena pouze u v literatuře dosud nepopsaných látek.

Látky byly testovány na antifungální a antibakteriální aktivitu pomocí mikrodilučního bujónového testu. Hodnoty uvedené v Tabulce 2 (str. 64) a Tabulce 3 (str. 65) dokazují, že všechny zkoumané látky jsou proti vybraným patogenům účinné.

Látka 1-[5-methyl-2-(dodecylsulfanyl)phenyl]-3,3-dimethylguanidin je dle výsledků nejúčinnější proti plísnovým patogenům. MIC se pohybovala v rozmezí 3,9 – 15,62  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ . Méně aktivní je 1-[5-methyl-2-(dodecylsulfanyl)phenyl]guanidinium nitrát a nejméně 1-[5-methyl-2-(oktylsulfanyl)phenyl]guanidinium nitrát. Z toho lze usuzovat, že se zvyšující se lipofilitou těchto látek roste také jejich účinnost.

Zkoumané látky můžeme označit jako fungicidní a baktericidní, což vyplývá ze shodných výsledků po 24 i 48 hodinách testování. Při testování antifungálních účinků vykazovala látka 1-[5-methyl-2-(dodecylsulfanyl)phenyl]-3,3-dimethylguanidin nejlepší výsledky. Ve všech případech je účinnější než srovnávaná látka dodin. V porovnání s ketokonazolem je látka 1-[5-methyl-2-(dodecylsulfanyl)phenyl]-3,3-dimethylguanidin účinnější pouze proti *Absidia Corymbifera*.

Na všechny testované bakteriální kmeny byla ve všech případech, kromě *E. coli*, opět nejúčinnější látka 1-[5-methyl-2-(dodecylsulfanyl)phenyl]-3,3-dimethylguanidin. Ve srovnání s účinností antibiotik na vybraných bakteriálních kmenech byla tato látka ve všech případech mnohokrát účinnější než bacitracin. U bakteriálních kmenů *Staphylococcus aureus* a *Staphylococcus epidermis* byla účinnost testované látky vyšší než u neomycinu. Ve srovnání s penicilinem by tato látka ve všech případech kromě kmenu *Staphylococcus aureus* výrazně účinnější.

Testování na vybraných bakteriálních kmenech ukázalo rovněž zvyšující se aktivitu v závislosti na lipofilitě získaných látek. V porovnání s aktivitami vybraných antibiotik vykazují nově nasyntetizované látky velmi dobrou účinnost proti většině patogenů. Neaktivněji opět působila látka 1-[5-methyl-2-(dodecylsulfanyl)phenyl]-3,3-dimethylguanidin, a to v MIC 0,98 – 15,62  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ .

Vzhledem k tomu, že podle výsledků stoupá aktivita s narůstající lipofilitou, mohly by na provedený výzkum navázat další studie, které by objasnily mechanismus účinku těchto látek, a které by ověřily jejich schopnost vyšší inhibice růstu patogenních organismů s narůstající délkou postranních řetězců.

## 5. Závěr

V rámci diplomové práce bylo nasyntetizováno celkem sedm v literatuře dosud nepopsaných látek:

1-[5-methyl-2-(oktylsulfanyl)fenyl]guanidinium nitrát

1-[5-methyl-2-(dodecylsulfanyl)fenyl]guanidinium nitrát

1-[5-methyl-2-(dodecylsulfanyl)fenyl]-3,3-dimethylguanidin

oktyl-(4-methyl-2-nitrofenyl)sulfid

5-methyl-2-(oktylsulfanyl)anilin

dodecyl-(4-methyl-2-nitrofenyl)sulfid

5-methyl-2-(dodecylsulfanyl)anilin

Látky 1-[5-methyl-2-(oktylsulfanyl)fenyl]guanidinium nitrát, 1-[5-methyl-2-(dodecylsulfanyl)fenyl]guanidinium nitrát a 1-[5-methyl-2-(dodecylsulfanyl)fenyl]-3,3-dimethylguanidin byly testovány na antifungální a antimikrobiální aktivitu na katedře biologických a lékařských věd na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové. Bylo zjištěno, že narůstající lipofilita zvyšuje antifungální a antibakteriální aktivitu.

Na provedený výzkum by mohly navázat další studie, které by objasnily mechanismus účinku těchto látek, a které by ověřily jejich schopnost vyšší inhibice růstu patogenních organismů s narůstající délkou postranních řetězců.

## 6. Seznam použité literatury

1. Flevari, A.; Theodorakopoulou, M.; Veleglaki, A.; Armaganidis, A.; Dimopoulos, G.: Treatment of invasive candidiasis in the elderly: a review. *Clinical Interventions in Aging*, **2013**, *8*, 1199-1208.
2. Buchta, V.; Slezák, R.; Špaček, J.; Košťálová, M.: Současné možnosti léčby kožních a slizničních mykóz, *Klinická farmakologie a farmacie*, **2008**, *22* (2), 72-80.
3. Braunerová, G.; Buchta, V.; Silva, L.; Kuneš, J.; Palát, K.: Synthesis and in vitro antifungal activity of 4-substituted phenylguanidinium salts, *Farmaco*, **2004**, *59* (6), 443-450.
4. Guanidine derivatives, Dutch Pat., 6511047, ref. Chem. Abstr. 65, 15242b, (1959).
5. Lamb, G.: Dodecylguanidine salts as fruit-tree fungicides, U.S. Patent. 2 886 7562, ref. *Chemical Abstract* 53, 8525j, **1959**.
6. Manetti, F.; Castagnolo, D.; Raffi, F.; Zizzari, A. T.; Rajamäki, S.; D'arezzo, S.: Synthesis of new linear guanidines and macrocyclic amidinourea derivatives endowed with high antifungal activity against *Candida* spp. and *Aspergillus* spp., *Journal of Medicinal Chemistry*, **2009**, *52* (23), 7376-7379.
7. Espinoza-Moraga M.; Njuguna, N. M.; Mugumbate, G.; Caballero, J.; Chibale, K.; D'arezzo, S.: In silico comparison of antimycobacterial natural products with known antituberculosis drugs. *Journal of Chemical Information and Modeling*, **2013**, *53* (3), 649-660.
8. Mo, S., Kronic, A.; Pegan, S. D.; Franzblau, S.G.; Orjala, J.; D'arrezzo, S.; Visca, P.: An antimicrobial guanidine-bearing sesterterpene from the cultured cyanobacterium *Scytonema* sp., *Journal of Natural Products*, **2009**, *72* (11), 2043-2045.
9. Belanger, A. E.; Besra, G. S.; Ford, M. E.; Mikusova, K.; Belisle, J. T.; Brennan, P. J.; Inamine J. M.: The embAB genes of *Mycobacterium avium* encode an arabinosyl transferase involved in cell wall arabinan biosynthesis that is the target for the antimycobacterial drug ethambutol, *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **1996**, *93* (21), 11919-11924.
10. Hua, H. M.; Peng, J.; Dunbar, D. C.; Schinazi, R. F.; De Castro Andrews, A. G.: Batzelladine alkaloids from the caribbean sponge *Monanchora unguifera* and the significant activities against HIV-1 and AIDS opportunistic infectious pathogens, *Tetrahedron*, **2007**, *63* (45), 11179-11188.
11. Ahmed, N.; Brahmabhatt, K. G.; Khan, S. I.; Jacob, M.; Tekwani, B. L.; Sabde, S.; Mitra, D.; Singh, I. P.; Khan, I. A.; Bhutani, K. K.: Synthesis and biological evaluation of tricyclic

guanidine analogues of batzelladine K for antimalarial, antileishmanial, antibacterial, antifungal and anti-HIV activities, *Chemical Biology*, **2012**, 72 (11), 491-498.

12. Ali, M. A.; Mamogaran E.; Govindasamy, J.; Sellapan, V.: Bis dihydropyrimidine: synthesis and antimycobacterial activity, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, **2011**, 26 (1), 149-153.

13. Thevissen, K.; Pellens, K.; De Bruckner, K.; Francois, I. E. J. A.; Chow, K. K.: Novel fungicidal benzylsulfanyl-phenylguanidines: synthesis and antimycobacterial activity, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, **2011**, 21 (12), 3686-3692.

14. Palát K. Jr.: Anthelmintika benzimidazolového a arylguanidinového typu, *Československá farmacie*, **1989**, 38, 376-383.

15. Tagaki, W.: Sulfides, Organic chemistry of sulphur (Ed. S. Oae): Plenum Press, New York, **1977**, 231–302.

16. Rajsner, M.; Metysova, J.; Svatek, E.; Miksik, F.; Protiva, M.: The 6- an 7-fluoro derivate of chloroprothixene, Neurotropic and psychotropic agents LXXVIII., *Collection of Czechoslovak Chemical Communications.*, **1975**, 40, 719-737.

17. Uher, M.; Antos, K.; Kristian, P.; Drobnica, L.: The synthesis and infrared spectra of (p-isocyanatophenyl)alkyl sulfides and (p-isocyanatophenyl)alkyl sulfones, Isothiocyanates XVIII., *Chemické Zvesti*, **1967**, 21, 44-56.

18. Becker, H. et al.: Organická syntéza (Organikum): Academia, Praha, **1971**, 546

19. Bellamy F. D., Ou, K.: Selective reduction of aromatic nitro compounds with stannous chloride in non acidic and non aqueous medium, *Tetrahedron Letters*, **1984**, 25, 839.

20. Palát, K., Ješina, V., Dušek, V., Vrba, Č.: Studies on local anestetik. XXV. Basic esters of diphenylcarbamic acids, II, *Československá farmacie*, **1959**, 8, 569.

21. Lihotzky, R.: Cyanamide. Ullmann's Encyklopedie der technischen Chemie, 4. Auflage, Band 9, Verlag Chemie, Weinheim, **1975**, s. 642-645

22. Gokel, G. W.; Gerdes, H. M.; Dishong, D. M.: Sulfur Heterocycles. 3. Heterogeneous, Phase Transfer and Acid Catalyzed Potassium Permanganate Oxidation of Sulfides to Sulfones and a survey of their C-13 NMR Spectra, *Journal of Organic Chemistry*, **1980**, 45 (18), 3634-3639

23. Dash, S.; Patel, S.; Mishra, B. K.: Oxidation by permanganate: Synthetic and mechanistic aspects, *Tetrahedron*, **2009**, 65, 707-739.

24. Bahrami, K.: Selective oxidation of sulfides to sulfoxides and sulfones using hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) in the presence of zirconium tetrachloride, *Tetrahedron Letters*, **2006**, 47 (12), 2009-2012.
25. Marko, M., Krasnec, L'.: Základy preparatívnej organickúj chemie I., Slovenské vydavateľ'stvo technickúj literatúry, Bratislava, **1962**, 144.