

UNIVERZITA PARDUBICE  
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ  
ÚSTAV ORGANICKÉ CHEMIE A TECHNOLOGIE

**ESTERIFIKACE NEUTRÁLNÍCH AMINOKYSELIN  
S ATYPICKOU N-CHRÁNÍCÍ SKUPINOU A  
VYBRANÝCH 2-HYDROXY-N-  
FENYLBENZAMIDŮ**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

AUTOR: Petra SYROVCOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE: Ing. Aleš IMRAMOVSKÝ, Ph.D.

2012

UNIVERSITY OF PARDUBICE  
FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY  
DEPARTMENT OF ORGANIC CHEMISTRY AND TECHNOLOGY

**ESTERIFICATION OF NEUTRAL AMINO ACIDS  
WITH ATYPICAL N-PROTECTION GROUP AND  
CHOSEN 2-HYDROXY-N-PHENYLBENZAMIDES**

BACHELOR WORK

AUTHOR: Petra SYROVCOVÁ

SUPERVISOR: Ing. Aleš IMRAMOVSKÝ, Ph.D.

2012

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Petra Syrovcová**  
Osobní číslo: **C09261**  
Studijní program: **B2830 Farmakochemie a medicínální materiály**  
Studijní obor: **Farmakochemie a medicínální materiály**  
Název tématu: **Esterifikace neutrálních aminokyselin s atypickou *N*-chránicí skupinou a vybraných 2-hydroxy-*N*-fenylbenzamidů**  
Zadávající katedra: **Ústav organické chemie a technologie**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Na základě literární rešerše popište biologické vlastnosti kyslíkatých derivátů substituovaných 2-hydroxy-*N*-fenylbenzamidů.
2. Mikrobiální vlastnosti *N*-chráněných esterů aminokyselin a 2-hydroxy-*N*-fenylbenzamidů.
3. Návrh syntetických postupů vedoucích jednak k meziproductům a následně ke konečným esterům základních aminokyselin chráněných na dusíku atypickou chránicí skupinou a 2-hydroxy-*N*-fenylbenzamidů.
4. Experimentálně ověřit navržené syntetické a izolační postupy eventuálně provést jejich optimalizaci.
5. Vyhodnotit jednotlivé syntézy a navrhnout optimální syntézu derivátů tohoto typu.
6. Výsledky zpracujte formou závěrečné zprávy.


Rozsah grafických prací:  
Rozsah pracovní zprávy:  
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**  
Seznam odborné literatury:  
**Všechna dostupná chemická literatura.**

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Aleš Imramovský, Ph.D.**  
Ústav organické chemie a technologie

Datum zadání bakalářské práce: **24. února 2012**  
Termín odevzdání bakalářské práce: **22. června 2012**

  
prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.  
děkan

L.S.

  
prof. Ing. Miloš Sedlák, DrSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 24. února 2012

## PROHLÁŠENÍ

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 22. 6. 2012

.....

Petra Syrovcová

## **PODĚKOVÁNÍ**

Na tomto místě bych ráda poděkovala školiteli Ing. Aleši Imramovskému, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a věcné připomínky při realizaci této bakalářské práce. Dále bych ráda poděkovala své rodině, která mě ve všem podporovala.

## SOUHRN

Tato bakalářská práce se zabývá cílenou syntézou *N*-chráněných esterů aminokyselin a různě substituovaných 2-hydroxy-*N*-ferylbenzamidů (salicylanilidů). Salicylanilidy byly již dříve popsány také jako látky s antimikrobiální a antifungální aktivitou. Práce se také zabývá biologickými vlastnostmi dříve popsaných *O*-substituovaných derivátů salicylanilidů jako jsou acetáty, estery, benzoxaziny a karbamáty. Pozornost je zde také věnována antimikrobiálním vlastnostem *N*-chráněných esterů aminokyselin. Experimentální část se věnuje možným syntetickým cestám, vedoucím k esterům aminokyselin a vybraných salicylanilidů, s atypicky chráněným dusíkem aminokyseliny.

Klíčová slova:

Salicylanilidy, esterifikace aminokyselin, estery, karbamáty, acetáty, benzoxaziny

## SUMMARY

This bachelor work is focused on the synthesis of *N*-protected amino acid esters of *N*-substituted hydroxy benzamides (salicylanilides). These substances have been described previously as substances with antimicrobial and antifungal activity. Furthermore, biological properties previously described *O*-substituted salicylanilides such as acetates, esters, benzoxazepines and carbamates. Microbial property of *N*-protected amino acid esters were also described. In the experimental part of this work are presented synthetic pathways to obtain target molecules.

### Keywords

Salicylanilides, esterification of amino acids, esters, carbamates, acetates, benzoxazepines



# OBSAH

OBSAH .....	9
1. ÚVOD .....	11
2. CÍL PRÁCE.....	12
3. TEORETICKÁ ČÁST.....	13
3.1 Salicylanilidy .....	13
3.2 <i>O</i> -substituované deriváty salicylanilidů.....	14
3.2.1 Acetáty <i>N</i> -benzylbenzamidů .....	15
3.2.2 Estery <i>N</i> -chráněných aminokyselin a salicylanilidů .....	17
3.2.3 Benzoxaziny <i>N</i> -benzylbenzamidů .....	19
3.2.4 Karbamáty <i>N</i> -benzylbenzamidů .....	20
3.3 Návrhy syntetických cest.....	22
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	23
a. Příprava derivátu L-fenylalanin-isopropylchloroformiát.....	23
b. Příprava derivátu L-fenylalanin-isobutylchloroformiát .....	25
c. Syntéza Isopropyl 1-((2-(4-chlorfenylkarbamoyl)-4-chlorfenoxy)karbonyl)-2-fenylethylkarbamát .....	27
d. Syntéza isobutyl 1-((2-(4-chlorfenylkarbamoyl)-4-chlorfenoxy)karbonyl)-2-fenylethylkarbamát .....	29
e. Syntéza isobutyl 1-((2-(4-chlorfenylkarbamoyl)-4-chlorfenoxy)karbonyl)-2-fenylethylkarbamát .....	31
f. Syntéza isopropyl 1-((2-(3,4-dichlorfenylkarbamoyl)-4-chlorfenoxy)karbonyl)-2-fenylethylkarbamát .....	33
g. Syntéza isopropyl 1-((2-(4-chlorfenylkarbamoyl)-4-chlorfenoxy)karbonyl)-2-fenylethylkarbamát .....	35
h. Syntéza isopropyl 1-((2-(4-chlorfenylkarbamoyl)-4-chlorfenoxy)karbonyl)-2-fenylethylkarbamát .....	37
i. Syntéza isobutyl 1-((2-(3,4-dichlorfenylkarbamoyl)-4-chlorfenoxy)karbonyl)-2-fenylethylkarbamát .....	39
j. Syntéza isopropyl 1-((2-(4-chlorfenylkarbamoyl)-4-chlorfenoxy)karbonyl)-2-fenylethylkarbamát .....	41
k. Syntéza benzyl 1-((2-(3-chlorfenylkarbamoyl)-4-brom-6-chlorfenoxy)karbonyl)-2-fenylethylkarbamát .....	42
5. DISKUZE .....	44

6. ZÁVĚR .....	45
POUŽITÉ PŘÍSTROJE A ANALYTICKÉ METODY.....	46
SEZNAM POUŽITÝCH CHEMIKÁLÍ .....	47
POUŽITÉ ZKRATKY.....	48
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	50

## 1. ÚVOD

Substituované 2-hydroxy-*N*-fenylbenzamid (salicylanilidy) jsou látky se širokým spektrem biologických aktivit. Jejich nejvýznamnějšími vlastnostmi jsou antifungální a antimikrobiální působení. Jejich atypický mechanismus účinku, jim předurčuje roli potenciálních léčiv, zejména při zvyšujícím se nárůstu počtu zaznamenaných rezistencí různých mikrobiálních kmenů na současné léčiva, zejména [antibiotika](#).<sup>1</sup>

Mezi mikrobiální onemocnění můžeme zařadit i tuberkulózu (TBC). V současné době je odhadováno, že asi jedna třetina lidské populace je infikována *Mycobacterium tuberculosis*, z níž 10 % má aktivní [formu](#).<sup>2</sup> Tuberkulózu způsobují i jiné tzv. atypické kmeny tuberkulózy, z nichž můžeme jmenovat například *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium fortuitum* a *Mycobacterium kansasii*.

Léčba TBC spočívá v podání antituberkulotik. Jak již bylo zmíněno bakterie se časem vyvíjejí a stávají se proti určitým antituberkulotikům imunní. Rezistencí rozumíme odolnost mikroorganismů vůči antibiotikům. Existuje primární a sekundární rezistence. Primární rezistencí rozumíme geneticky podmíněnou necitlivost bakterií na antibiotika bez ohledu na předchozí kontakt s daným antibiotikem. Sekundární nebo-li získaná rezistence je závislá na předchozím podání antibiotik. Je také dána genetickou mutací bakterií. Znamená to tedy, že antibiotika na daný typ bakterie měly farmaceutický účinek, ale po častém používání se staly na tento typ bakterie [neúčinnými](#).<sup>3</sup> Tento typ rezistence bakterií je hlavním důvodem, proč stále musíme hledat a zkoumat nové látky s potenciální biologickou aktivitou.

## 2. CÍL PRÁCE

Cíle této bakalářské práce jsou popsány v následujících bodech:

Provést literární rešerši s cílem popsat biologické vlastnosti kyslíkatých derivátů substituovaných 2-hydroxy-*N*-fenylbenzamidů.

Popsat antimikrobiální vlastnosti *N*-chráněných esterů aminokyselin a 2-hydroxy-*N*-fenylbenzamidů.

Navrhnout syntetické postupy vedoucí k meziproductům a následně ke konečným esterům základních aminokyselin, chráněných na dusíku atypickou chránicí skupinou a 2-hydroxy-*N*-fenylbenzamidů.

Experimentálně ověřit navržené syntetické a izolační postupy, eventuálně provést jejich optimalizaci.

Vyhodnotit jednotlivé syntézy a navrhnout optimální syntézu derivátů tohoto typu.

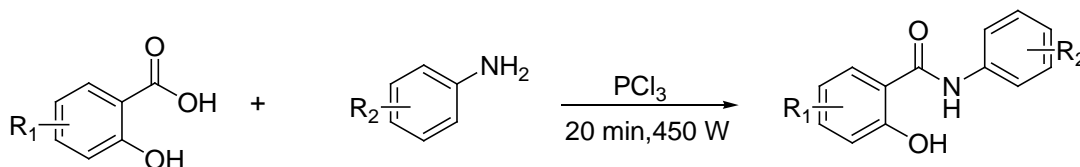
### 3. TEORETICKÁ ČÁST

#### 3.1 Salicylanilidy

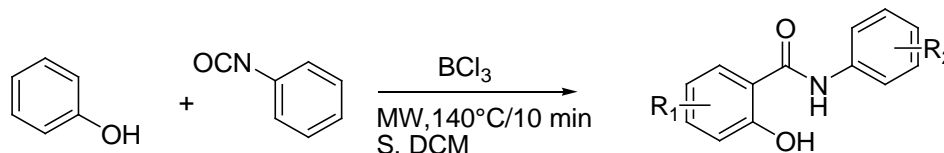
Salicylanilidy jsou skupinou sloučenin se širokou škálou biologických [aktivit](#).<sup>4</sup> Z nichž nejdůležitějšími aktivitami jsou [antimikrobiální](#),<sup>5</sup> [antifungální](#),<sup>6</sup> [anthelmintická](#)<sup>7</sup> a [herbicidní](#).<sup>8</sup> Jsou aktivní vůči gram pozitivním patogenům včetně Methicilin rezistentního *Staphylococcus aureus* a vankomycin rezistentního *Enterococcus faecium*. Jejich výhodou je atypický mechanismus [účinku](#).<sup>9</sup> Pro jejich účinek je nezbytná hydrofobní skupina na anilidové části, elektronakceptorní substituent na salicylové části a v neposlední řadě hydrofobicita, elektronové a strukturální parametry. Jejich mechanismus účinku je inhibice dvoukomponentových regulačních systémů bakterií.<sup>1</sup>

Možné syntézy salicylanilidů jsou uvedeny níže:

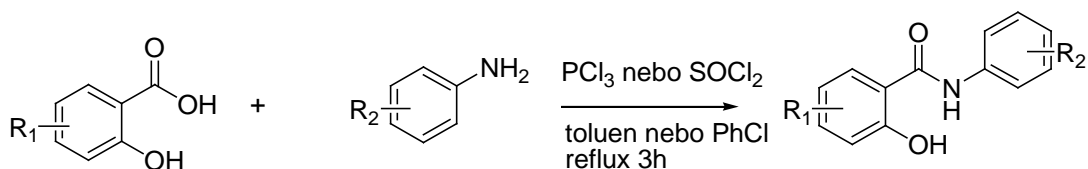
1. Přípravují se reakcí zvoleného anilinu s různě substituovanou kyselinou salicylovou v mikrovlnném reaktoru refluxováním v chlorbenzenu a přítomnosti  $\text{PCl}_3$ .<sup>12</sup>



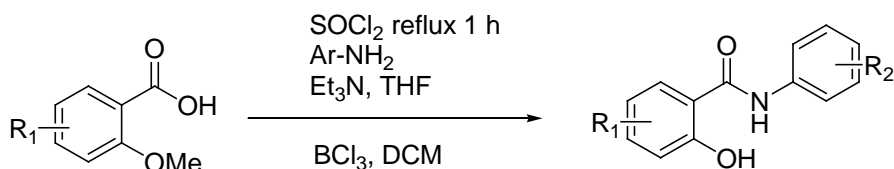
2. V této reakci reaguje fenol s isokyanátem v přítomnosti  $\text{BCl}_3$  za použití mikrovlnného záření, které zkracuje reakční čas na minuty.<sup>12</sup>



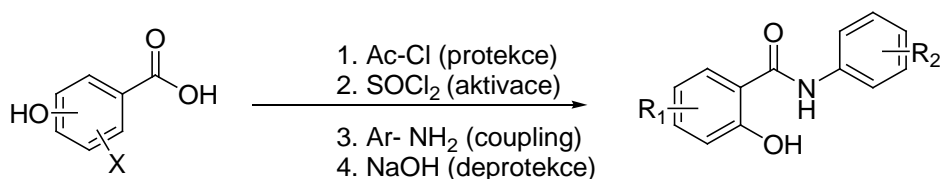
3. V této zmíněné reakci reaguje substituovaná salicylová kyselina v bezvodém anilinu v přítomnosti chloridu fosforečného nebo chloridu thionylu. Vzniklá směs je refluxována v chlorbenzenu nebo toluenu po dobu 3 h.<sup>12</sup>



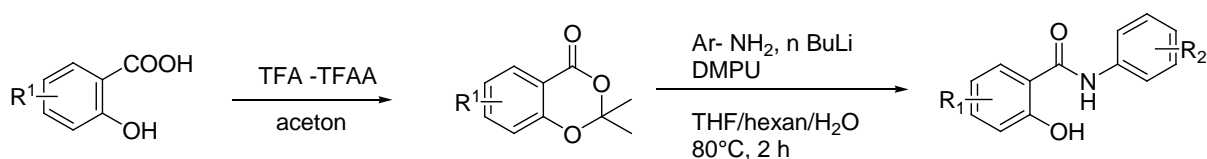
4. Hydroxylová skupina výchozí salicylové kyseliny byla ochráněna methylesterem. Salicylová kyselina byla aktivovaná chloridem thionylu. Následovala reakce anilinu při laboratorní teplotě.<sup>12</sup>



5. Karboxylová skupina substituované acetylsalicylové kyseliny byla aktivována chloridem thionylu. Dále proběhla reakce se substituovaným anilinem, následovaná deacetylací vodným roztokem hydroxidem sodného.<sup>12</sup>



6. V této reakci reaguje salicylová kyselina v acetonu se směsí trifluoroctové kyseliny a anhydridu kyseliny trifluoroctové za vzniku 2,2-dimethyl-4*H*-benzo[*d*][1,3]dioxin-4-on. Tato sloučenina je výchozí látkou pro následující reakci, kde podléhá reakci s anilinem v přítomnosti *n*-BuLi a 1,3-dimethyl-3,4,5,6-tetrahydro-2(1*H*)-pyrimidinon v tetrahydrofuranu.<sup>12</sup>



### 3.2 O-substituované deriváty salicylanilidů

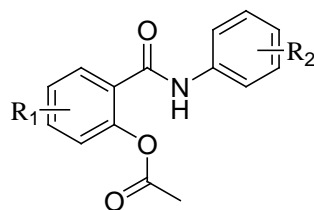
Hydroxy skupina salicylanilidů bývá v některých studiích označována jako původce nevhodných fyzikálně-chemických vlastností. Jejím maskováním daným typem skupin lze připravit látky typu [proléčiv](#).<sup>13</sup> Proléčiva (prekursory léčiv, prodrugs) jsou často používané látky ve farmakoterapii. Jsou to terapeutické látky, které podléhají biotransformaci dříve než

vyvolají farmakologický efekt, nebo-li biologicky aktivní látky, které jsou neúčinné při podání a v organismu jsou dále přeměňovány na jeden nebo více aktivních [metabolitů](#).<sup>10</sup> Aby mohlo dojít k uvolnění účinného salicylanilidu a k odstranění netoxické aminokyseliny z organismu, používají se k maskování –OH skupiny neutrální základní [aminokyseliny](#).<sup>2</sup> Zavedení aminokyselin do molekuly salicylanilidu tedy vede ke zlepšení fyzikálně-chemických vlastností jako je zlepšení rozpustnosti, vstřebávání a také k lepšímu přecházení přes mykobakteriální buněčnou stěnu, díky zvýšené lipofilitě. Cílem je také snížení toxicity, což bylo u některých obdobných látek také [prokázáno](#).<sup>11</sup> Další způsoby, maskování –OH skupiny byla tvorba acetátů, benzoxazinů, esterů a karbamátů.

### 3.2.1 Acetáty *N*-benzylbenzamidů

Acetáty jsou deriváty salicylanilidů, kde hydroxylová skupina fenolu je chráněna jednoduchou acetylovou [skupinou](#).<sup>12</sup> Acetáty byly testovány hlavně pro jejich antifungální a antituberkulotickou [aktivitu](#).<sup>13</sup> Některé acetáty prokázaly vyšší aktivitu než srovnávací standardní [léčivo](#).<sup>13</sup> V případě antifungální aktivity se jedná o flukonazol, v případě antituberkulotické aktivity se jedná o isoniazid. Acetáty *N*-benzylbenzamidů byly testovány proti *M. tuberculosis* 331/88, *M. avium* 330/88, *M. kansasii* 235/80 a *M. kansasii* 6500/96. Většina testovaných sloučenin vykazovala srovnatelnou aktivitu s isoniazidem a proti klinicky izolovanému kmenu *M. kansasii* 6500/96 a dobrou aktivitu proti netuberkulózním kmenům, u kterých byl isoniazid neaktivní. Substituce chlóru v meta pozici na acetylsalicylovém jádru ukázala pozitivní vliv na antituberkulotickou aktivitu a také substituce v pozici C<sub>4</sub>' nebo disubstituce v pozici C<sub>3</sub>' a C<sub>4</sub>' se zdála být důležitá pro vysokou aktivitu. Nejvyšší aktivitu proti *M. tuberculosis* ukázal 4-chlor-2-(3,4-dichlorfenylkarbamoyl)fenylacetát s toxicitou 0,82 [μg/ml]. Neaktivnější sloučeninou proti atypickým kmenům byl 4-chlor-2-[4-(trifluormethyl)fenylkarbamoyl]fenylacetát s toxicitou 12,60 [μg/ml]. Z hlediska antifungální aktivity byly acetáty *N*-benzylbenzamidů testovány proti *Candida albicans* ATCC 44859, *Candida tropicalis* 156, *Candida krusei* E28, *Candida glabrata* 20/1, *Trichosporon beigeli* 1188, *Aspergillus fumigatus* 231, *Absidia corymbifera* 272 a *Trichophyton mentagrophytes* 445. Nejvyšší aktivita testovaných sloučenin byla nalezena u *Trichophyton mentagrophytes* 445. Nejvyšší antifungální aktivitu ukázal 4-chlor-2-[4-(trifluormethyl)fenylkarbamoyl]fenylacetát. Všechny testované sloučeniny ukázaly vyšší aktivitu než flukonazol proti *Aspergillus fumigatus* 231, *Absidia corymbifera* 272. Srovnatelnou aktivitu s flukonazolem proti *Candida*

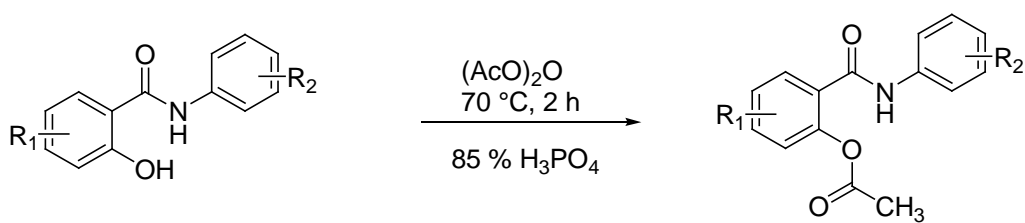
krusei E28 vykazovaly jen některé testované sloučeniny. U acetátů *N*-benzylbenzamidů byla také nalezena vyšší toxicita než u srovnávacího standardu isoniazidu.<sup>13</sup>



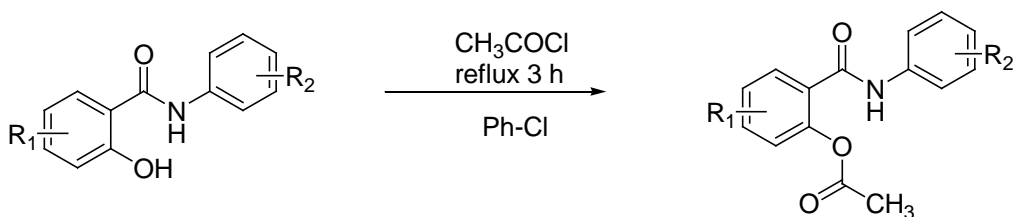
Acetát

Syntézy acetátů jsou uvedeny v následujícím schématu:

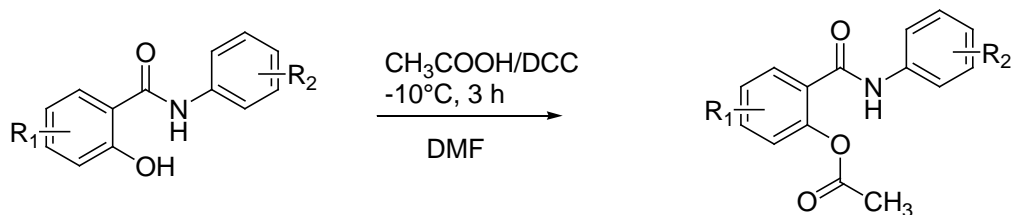
- 1) Nejvyužívanější reakční cesta pro přípravu acetátu je reakce fenylsalicylamidu v přítomnosti acetanhydridu a kyseliny fosforečné. Výtěžek této reakce je okolo 85%.<sup>12</sup>



- 2) V této syntéze je použit acetylchlorid místo acetanhydridu, avšak nevýhodou této syntézy je možný vznik *O,N*-diacetylovaných produktů.<sup>12</sup>

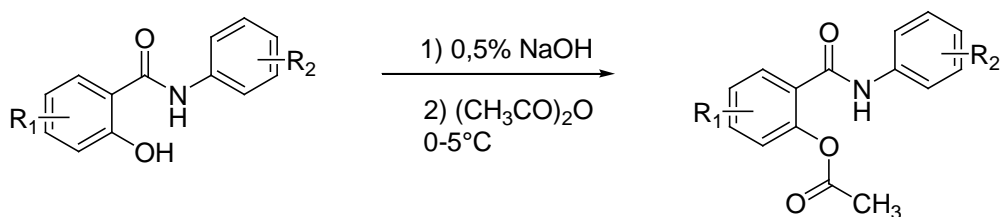


- 3) Další možností je reakce fenylsalicylamidu s kyselinou octovou v přítomnosti dicyklohexylkarbodiimidu za teploty -10 °C. Jako rozpouštědlo se zde používá dimethylformamid. Nevýhodou této reakce je vznik dicyklohexylmočoviny, která znečišťuje produkt a je z něho obtížně izolovatelná.<sup>12</sup>

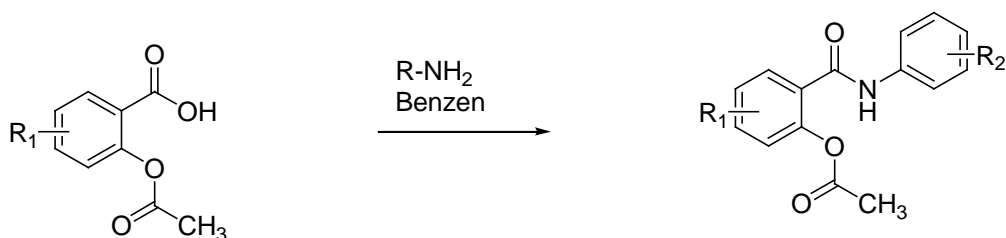




- 4) V této syntéze se nejdříve *N*-fenylsalicylamid převede na příslušnou sůl a poté je přidán acetanhydrid. Výhodou této syntézy je, že produkt je získáván ve vysoké čistotě a výtěžku.<sup>12</sup>



- 5) V poslední uvedené syntéze reaguje kyselina acetyl salicylová s anilinem v přítomnosti benzenu. Reakční směs je zahřívána 2 h pod refluxem za vzniku acetátu.<sup>12</sup>

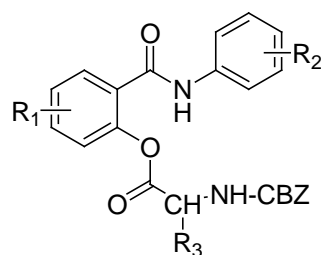


### 3.2.2 Estery *N*-chráněných aminokyselin a salicylanilidů

Estery jsou deriváty aminokyselin chráněných na dusíku benzyloxykarbonylem a substituovaných salicylanilidů. Serie těchto látek byla testována *in vitro* proti osmi fungálním kmenům, *Mycobacterium avium* 330/88, *Mycobacterium kansasii* 235/80, *Mycobacterium kansasii* 6509/96 a *Mycobacterium Tuberculosis* 331/88.<sup>14</sup> Tyto sloučeniny mají vysokou aktivitu proti *Aspergillus fumigatus*, *Absidia corymbifera* a *Trichophyton Mentagrophytes*. Jejich minimální inhibiční koncentrace IC<sub>50</sub> byla nižší, než kterou vykazoval srovnávací standard flukonazol.<sup>14</sup>

Skupina kolem J. Vinšové se aktivně zabývá jejich přípravou, vlastnostmi a účinky. Přípravují se esterifikací aminokyselin s vhodnými salicylanilidy. Tato reakce probíhá v přítomnosti *N,N*-dicyklohexylkarbodiimidu za nízkých teplot. Byly použity známé lipofilní aminokyseliny jako je glycin, R/S alanin, R/S valin a R/S fenylalanin.<sup>12</sup> Díky své lipofilitě snadno prochází fosfolipidovou membránou. Pokud reakce probíhala s vyššími kyselinami, docházelo k tvorbě esterů. Pokud byla použita nižší kyselina jako je například glycin nebo alanin nedocházelo k tvorbě esterů, nýbrž k nežádoucí tvorbě benzoxazepinu.<sup>13</sup> Bylo zjištěno, že lipofilita stoupá

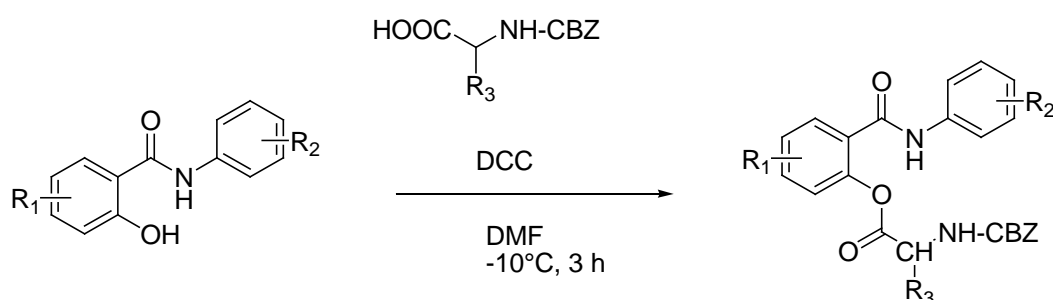
nejen v závislosti na typu použité aminokyseliny ( $H<CH_3<CH(CH_3)_2<CH_2C_6H_5$ ) ale také na substituovanosti anilidové části ( $Cl<Br<diCl$ ).<sup>2</sup> Připravené estery mohou být považovány za proléčiva salicylanilidů s lepší biologickou dostupností díky vyššímu stupni lipofility a efektivnějšímu transportu skrz buněčné membrány.



Ester

Estery *N*-chráněných aminokyselin a *N*-benzylbenzamidů byly testovány proti *M. tuberculosis* 331/88, *M. avium* 330/88, *M. kansasii* 235/80 a *M. kansasii* 6509/96.<sup>14</sup> Nejvyšší aktivitu proti *M. tuberculosis* vykazovaly (S)-4-chlor-2-(4-trifluormethylfenylkarbamoyl)-fenyl 2-benzyloxy-karbonylamino-propionát s minimální inhibiční koncentrací 3,13  $\mu\text{g/ml}$  a (S)-4-chlor-2-(3-chlorfenyl-karbamoyl)-fenyl 2-benzyloxykarbonylaminopropionát s minimální inhibiční koncentrací 3,13  $\mu\text{g/ml}$ . Jejich antifungální aktivita byla testována proti osmi fungálním kmenům a to proti *Candida albicans* ATCC 44859, *Candida tropicalis* 156, *Candida krusei* E28, *Candida glabrata* 20/1, *Trichosporon beigelii* 1188, *Aspergillus fumigatus* 231, *Absidia corymbifera* 272 a *Trichophyton mentagrophytes* 445. Minimální inhibiční koncentrace byla v rozmezí 62,5-1,95  $\mu\text{mol/L}$ . Všechny estery prokázaly nejvyšší aktivitu proti *Trichophyton mentagrophytes* 445 a většina z nich také vykazovala vyšší aktivitu než flukonazol, hlavně *Aspergillus fumigatus* 231 a *Absidia corymbifera* 272.<sup>14</sup> Estery mají srovnatelnou toxicitu s isoniazidem ( $\text{EC}_{50}$  je v rozmezí 82-120  $\mu\text{mol/L}$ )<sup>12</sup>.

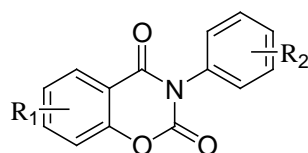
V následujícím schématu je uvedena syntéza esterů:<sup>12</sup>



Při syntéze bylo zjištěno, že klasická esterifikace selhává. Proto se tyto estery připravují esterifikací dle Steglicha, kdy se jako hlavní činidlo používá karbodiimid (DCC, DCI a EDC či EDC\*HCl).

### 3.2.3 Benzoxaziny *N*-benzylbenzamidů

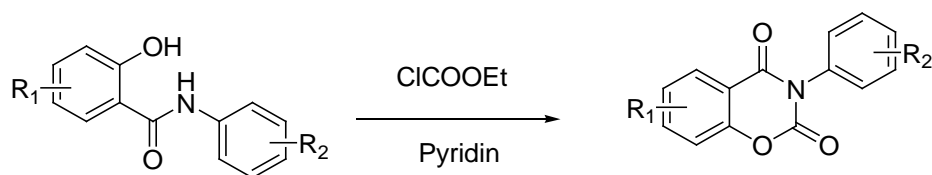
Jsou nejjednodušší deriváty salicylanilidů. Karbonylová skupina je zde součástí molekuly salicylanilidů. Byla objevena jejich antituberkulotická a antifungální aktivita. Připravují se reakcí fenylnsalicylátu s isokyanáty. Druhou možnou syntetickou cestou je reakce salicylové kyseliny s isokyanáty v přítomnosti trifluoracetátu, který zprostředkovává jejich reakci. Třetí možnou syntetickou cestou je paladiem katalyzované cyklokarbonylace jodfenolu.<sup>12</sup> Benzoxaziny byly testovány proti *M. tuberculosis*, *M. kansasii* 235/88 a *M. avium* 330/88, a proti klinicky izolovanému kmenu *Mycobacterium kansasii* 6509/96.



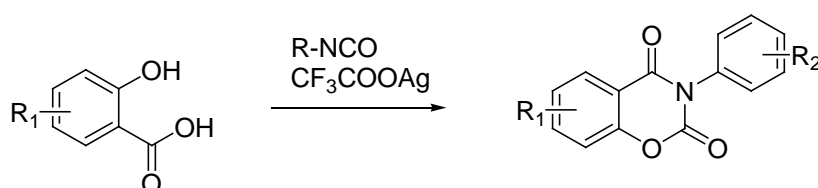
Benzoxazin-2,4 -dion

Syntézy benzoxazinů jsou uvedeny v následujícím schématu:<sup>12</sup>

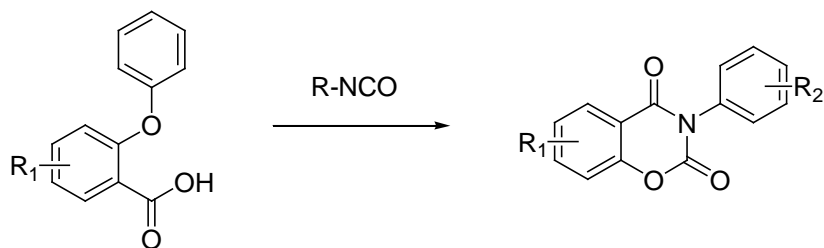
1. První možná syntetická a nejčastěji využívaná cesta je reakce *N*-fenylsalicylamidu s ethylchloroformiátem v prostředí pyridinu.<sup>12</sup>



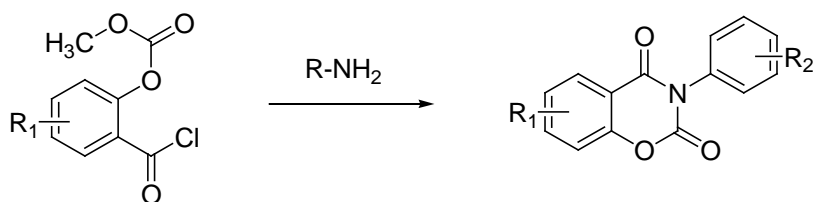
2. Druhou možnou syntetickou cestou je reakce kyseliny salicylové s isokyanátem v chloroformu a triethylaminu.<sup>12</sup>



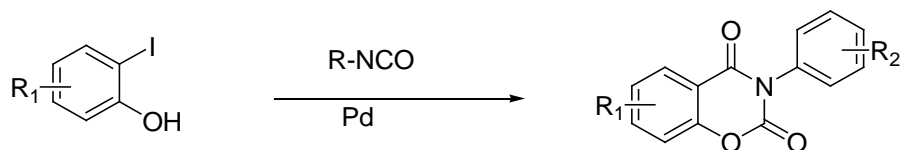
3. Tato reakce opět probíhá s isokyanátem.<sup>12</sup>



4. Náročnější syntéza byla popsána Heinischem et. al., který popsal reakci 2-(methoxykarboxyloxy) benzoyl chloridu s anilinem.<sup>12</sup>



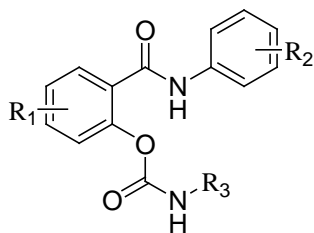
5. V poslední syntéze reaguje jodfenol s isokyanátem, kde je využito palladia jako katalyzátoru na cyklokarbonylaci.<sup>12</sup>



### 3.2.4 Karbamáty N-benzylbenzamidů

Maskování fenolické hydroxylové skupiny isokyanátem v molekule salicylanilidů vede ke vzniku karbamátů. Tyto sloučeniny opět splňují požadavky pro snadný rozklad a uvolnění účinných látek v organismu. Lipofilita cílové molekuly může být ovlivňována alkylovým řetězcem isokyanátové molekuly. Byla u nich objevena potenciální antituberkulotická aktivita u atypických kmenů a u rezistentních kmenů.<sup>12</sup> Karbamáty N-benzylbenzamidů byly testovány proti *M. tuberculosis* 331/88, *M. kansasii* 235/88, *M. avium* 330/88, *M. kansasii* 6509/96 s hodnotami MIC mezi 0,5-2 mol/l. Karbamáty N-benzylbenzamidů byly také testovány vůči kmenům *M. tuberculosis* 7357/98, který je rezistentní na isoniazid, rifampicin, ethambutol, streptomycin, ofloxacin a ansamicin, *M. tuberculosis* 9449/06 rezistentní na isoniazid, streptomycin, rifampicin, ansamicin, *M. tuberculosis* Praha 1 rezistentní na

isoniazid, rifampicin, ethambutol, streptomycin, clofazimin, ansamicin a *M. tuberculosis* Praha 128, který je rezistentní k isoniazidu, rifampicinu, ethambutolu, streptomycinu, gentamycinu, clofaziminu, ansamicinu a amikacinu.<sup>12</sup>

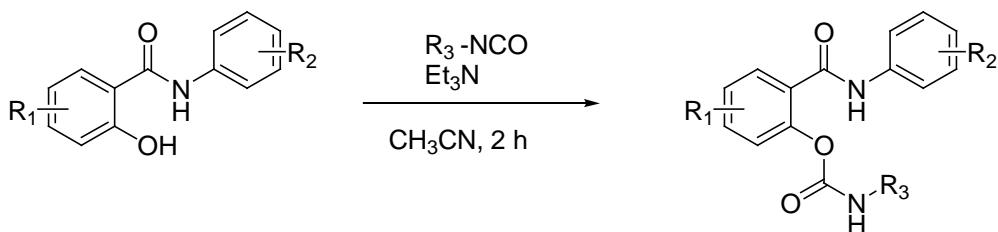


Karbamát

R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>=halogeny

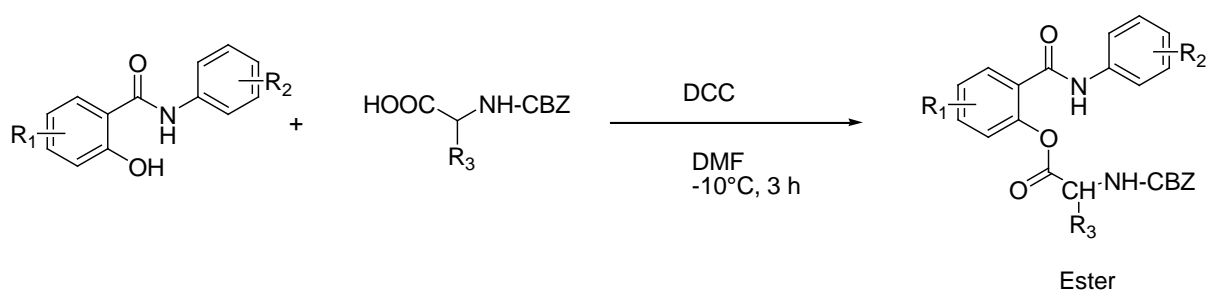
R<sub>3</sub>=alkyl

1) V následujícím schématu je uvedena syntéza karbamátů, kde reaguje *N*-fenylnsalicylamid s isokyanátem v acetonitrilu a v přítomnosti triethylaminu.<sup>12</sup>



### 3.3 Návrhy syntetických cest

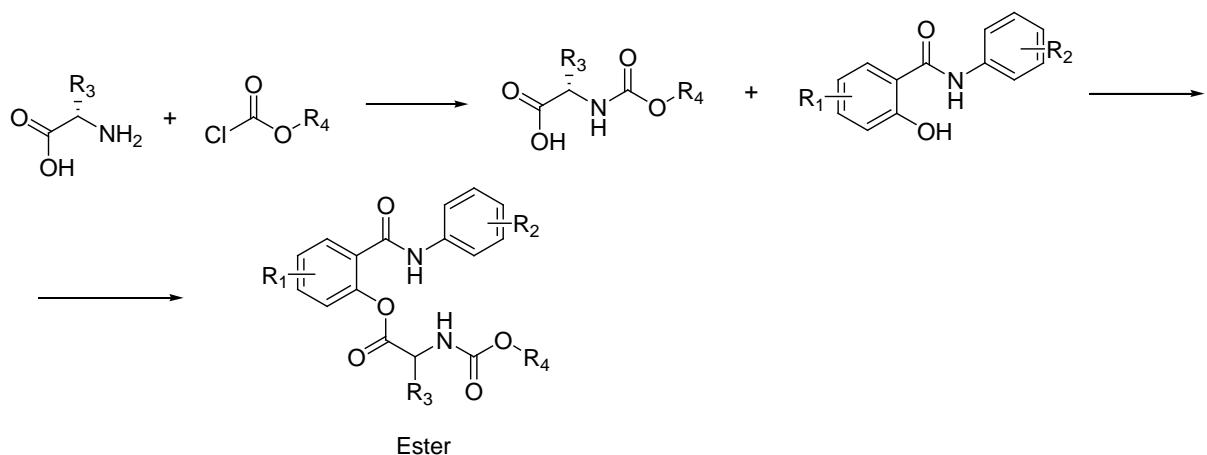
První návrh syntetické cesty byl již popsán v literární rešerši u přípravy esterů. Jedná se o esterifikaci aminokyseliny s vhodnými salicylanilidy. Reakce probíhá v dimethylformamidu V prvním kroku probíhá ochrana *N*-aminokyseliny s chloroformiátem za vzniku chráněné aminokyseliny, která za přítomnosti vhodného aktivačního činidla (*N,N*-dicyklohexylkarbodiimidu) poskytne žádaný produkt. Eventualní možností je reakce aktivované *N*-chráněné aminokyseliny se salicylanilidem.



$R_1, R_2 = \text{halogeny}$

$R_3 = \text{alkyl}$

Druhou možnou syntetickou cestou je reakce aktivované kyseliny se salicylanilidem Aktivace zde probíhá chloroformiátem, který vytváří reaktivní intermediát kyseliny. Ten následně reaguje s OH skupinou salicylanilidu.



$R_1, R_2 = \text{halogeny},$

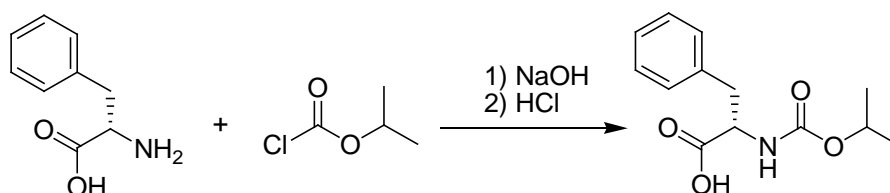
$R_3, R_4 = \text{alkyl}$

## 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### a. Příprava derivátu L-fenylalanin-isopropylchloroformiát

Kód reakce: PS. 1

Reakce:



Tabulka organických sloučenin:

Látka	Zkratka	Mr [g/mol]	n [mol]	m [g]	V [μl]	ρ [g/cm <sup>3</sup> ]	Bod tání [°C]
L-Fenylalanin	L-Phe	165,19	8,65*10 <sup>-3</sup>	<b>1,43</b>	-	-	275-283
Isopropylchloroformiát	i-PropCF	122,6	13,63*10 <sup>-3</sup>	<b>1,67</b>	1547	1,080	-
Síran sodný	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	142,04	-	-	-	-	888
Kyselina chlorovodíková	HCl	36,5	-	<b>2,4</b>	-	-	-
Produkt	PS. 1	251	8,65*10 <sup>-3</sup>	<b>T: 2,17</b>	-	-	80,1-81,9
Hydroxid sodný (23%)	NaOH	40	-	2,4	-	-	-
Ethylacetát	EtOAc	88,11	-	-	<b>45</b>	901	-
Destilovaná voda	H <sub>2</sub> O	18	-	2,1	-	-	-

Pracovní postup:

Ve 100 ml baňce byl v 2,1 ml destilované vody a ve 2,4 g 23% NaOH rozpuštěn L-Phe (předložen L-Phe, přidána voda a NaOH). Směs byla míchána 30 min a během této doby byla její teplota snížena na teplotu pod 10 °C. Poté byl během 15 minut současně přidáván isopropylchloroformiát a 2,4 g NaOH (23%). Po přidání látek byla směs při uvedené teplotě míchána dalších 45 minut. Reakční směs byla následně neutralizována 10% HCl na pH = 7 (cca 2,4 g 10% HCl). Došlo k vyloučení bílé sraženiny. Směs byla míchána dalších 15 min s kontrolou pH. Poté byla směs extrahována dvakrát ethylacetátem (30+15 ml) a následně ethylacetát byl dvakrát extrahován destilovanou vodou. Organická fáze byla oddělena, vysušena Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Směs byla zfiltrována z důvodu odstranění krystalického Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a oddestilována do sucha. Získaný olej byl pod N<sub>2</sub> uložen do lednice, kde do druhého dne ztuhl na bílou krystalickou látku.

Forma látky: bílá krystalická látka

Bod tání: 80,1-81,9 °C

m<sub>c</sub>: 1,478 g

NMR:

<sup>1</sup>H NMR (400,13 MHz, DMSO) δ: 12,68 (1H, brs, -COOH), 7,35 (1H, d,  $J = 8,5$  Hz, -NH), 7,29-7,17 (5H, m, Ar-H), 4,65 (1H, m, -CH-NH), 4,13 (1H, m, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3,03 (1H, m, -CH<sub>2</sub>-Ph), 2,82 (1H, m, -CH<sub>2</sub>-Ph), 1,13 (3H, d,  $J = 6,3$  Hz, -CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,06 (3H, d,  $J = 6,2$  Hz, -CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (100.62 MHz, DMSO) δ: 173,4, 155,7, 137,9, 129,0, 128,1, 126,3, 66,9, 55,4, 36,4, 21,95, 21,9.

Pozn: Reakce byla 3\* opakována s následujícími výtěžky

m<sub>1</sub>=1,445g    t<sub>t</sub> = 79,5- 90,2°C    výtěžek = 67 %

m<sub>2</sub>=1,478g    t<sub>t</sub> = 80,1- 81,9°C    výtěžek = 68 %

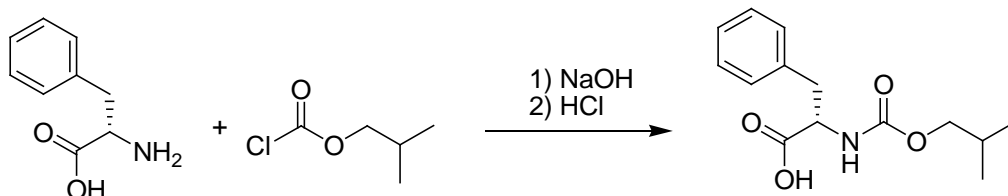
m<sub>3</sub>=1,22g    t<sub>t</sub> = 81,3-83,2°C    výtěžek = 56 %



## b. Příprava derivátu L-fenylalanin-isobutylchloroformiát

Kód reakce: PS. 2

Reakce:



Tabulka organických sloučenin:

Látka	Zkratka	Mr [g/mol]	n [mol]	m [g]	V [μl]	ρ [g/cm <sup>3</sup> ]	Bod tání [°C]
L-Fenylalanin	L-Phe	165,19	8,65*10 <sup>-3</sup>	<b>1,43</b>	-	-	275-283
Isobutylchloroformiát	i-ButCF	136,58	13,63*10 <sup>-3</sup>	<b>1,861</b>	1767	1,053	-
Síran sodný	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	142,04	-	-	-	-	888
Kyselina chlorovodíková	HCl	36,5	-	<b>2,4</b>	-	-	-
Produkt	PS. 2	265	8,65*10 <sup>-3</sup>	<b>T: 2,292</b>	-	-	90,5-94,3
Hydroxid sodný (23%)	NaOH	40	-	2,4	-	-	-
Ethylacetát	EtOAc	88,11	-	-	<b>45</b>	901	-
Destilovaná voda	H <sub>2</sub> O	18	-	2,1	-	-	-

Pracovní postup:

Ve 100 ml baňce byl v 2,1 ml destilované vody a v 2,4 g 23% NaOH rozpuštěn L-Phe (předložen L-Phe, přidána voda a NaOH). Směs byla míchána 30 min a během této doby byla její teplota snížena na teplotu pod 10 °C. Poté byl během 15 min současně přidáván isobutylchloroformiát a 2,4 g NaOH (23%). Po přidání látek byla směs při uvedené teplotě míchána dalších 45 min. Reakční směs byla následně neutralizována 10% HCl na pH = 7 (cca 2,4 g). Došlo k vyloučení bílé sraženiny. Směs byla míchána dalších 15 min s kontrolou na pH. Poté byla směs extrahována 2 krát ethylacetátem (30+15 ml) a následně ethylacetát byl 2 krát extrahován destilovanou vodou. Organická fáze byla oddělena, vysušena Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Směs byla zfiltrována a oddestilována do sucha. Získaný olej byl pod N<sub>2</sub> uložen do lednice, kde do druhého dne ztuhl na bílou krystalickou látku.

Forma látky: bílá krystalická látka

Bod tání: 90,5-94,3 °C

m<sub>c</sub>: 1,665 g

NMR:

<sup>1</sup>H NMR (400,13 MHz, DMSO) δ: 12,73 (1H, brs, -COOH), 7,46 (1H, d, *J* = 8,4 Hz, -NH), 7,28-7,18 (5H, m, Ar-H), 4,15 (1H, m, -CH-NH), 3,66 (2H, m, -CH<sub>2</sub>-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3,05 (1H, m, -CH<sub>2</sub>-Ph), 2,83 (1H, m, -CH<sub>2</sub>-Ph), 1,13 (3H, d, *J* = 6,3 Hz, -CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,76 (1H, m, -CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0,83 (3H, d, *J* = 6,3 Hz, -CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 0,82 (3H, d, *J* = 6,3 Hz, -CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (100.62 MHz, DMSO) δ: 173,4, 156,2, 138,0, 129,0, 128,1, 126,3, 69,7, 55,4, 36,4, 27,6, 18,8.

Pozn: Reakce byla 3\* opakována s následujícími výtěžky:

m<sub>1</sub> = 1,665 g      t<sub>t</sub> = 81-92,5 °C      výtěžek = 73 %

m<sub>2</sub> = 2,256 g      t<sub>t</sub> = 90,5-94,3 °C      výtěžek = 49 %

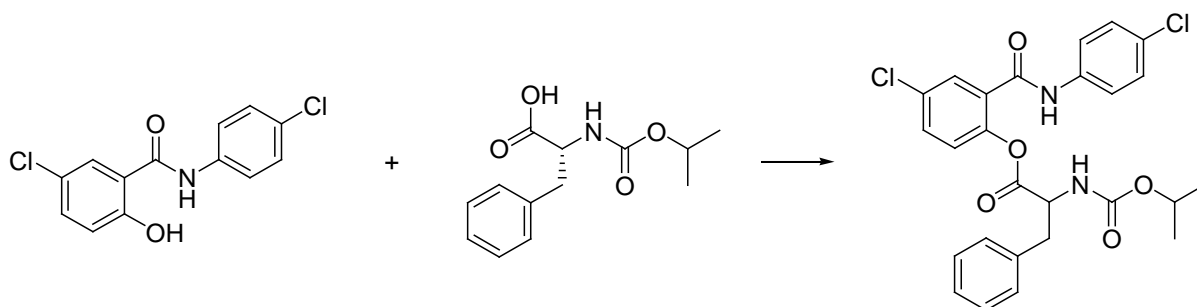
(z dvojnásobného množství)

m<sub>3</sub> = 0,473      t<sub>t</sub> = 81-92,5 °C      výtěžek = 21 %

c. Syntéza Isopropyl 1-((2-(4-chlorfenylkarbamoyl)-4-chlorofenoxy)karbonyl)-2-fenyletylkarbamát

Kód reakce: PS. 3

Reakce:



Tabulka organických sloučenin:

Látka	Zkratka	Mr [g/mol]	n [mol]	m [g]	V [ml]	$\rho$ [g/cm <sup>3</sup> ]	Bod tání [°C]
5,4'-dichlorsalicylanilid	DiClSal	281,001	$1,779 \cdot 10^{-3}$	<b>0,5</b>	-	-	227-229,3
L-fenylalanil- isopropylchloroformiát	L-phe- iPropCF	251	$1,779 \cdot 10^{-3}$	<b>0,4466</b>	-	-	80,1-81,9
<i>N,N'</i> - dicyklohexylkarbodiimid	DCC	206,33	$1,957 \cdot 10^{-3}$	<b>0,4038</b>	-	-	33-35
Produkt	PS. 3	514	$1,779 \cdot 10^{-3}$	<b>T: 0,91</b>	-	-	163,9-165,2
<i>N,N'</i> -dimethylformaamid	DMF	73,	-	-	-	-	-
Ethylacetát	EtOAc	88,	-	-	15	0,897	-
Hexan	Hex	86,	-	-	-	0,6548	-

Pracovní postup:

V 50 ml baňce bylo předloženo 0,5 g 5,4'-dichlorsalicylanilidu a rozpuštěno v *N,N*-Dimethylformamidu. Vzniklá směs byla umístěna na magnetickou míchačku a ochlazena na -10 °C. Dále bylo přidáno 0,45 g L-fenylalaninisopropylchloroformiátu a posléze byl ve 3 dávkách přidán *N,N'* Dicyklohexylcarbodiimid (1,1 ekvi). Směs byla nechána do 2. dne. Následně byla provedena filtrace na fritě, filtrát byl oddestilován na odparce (80°C). Po oddestilování bylo do směsi přidáno 15 ml etylacetátu a směs byla zfiltrována. Filtrát byl oddestilován a látka byla 3\*krystalována ze směsi etylacetát-hexan. Po zkrystalování byly

krystaly odsáty na fritě a vysušeny na sušičce. Během této reakce bylo provedeno několik TLC (toluen- etylacetát) (4:1). Směs se nepodařilo opakovanou krystalizací rozdělit.

Forma látky: bílá vatovitá látka

Bod tání: 163,9-165,2 °C

$m_{\text{surový produkt}}$  = 0,84 g,  $m_c$  = 0,05 g    % výtěžek = 6 %

TLC:  $R_{fk} = 2,1/4 = 0,525$

CHN:

Teor.: C 60,59 %                    H 4,69 %                    Cl 13,76 %                    N 5,44 %

Exp.: C 62,36±0,15 %            H 5,75±0,09 %            Cl 11,51± 0,28 %            N 6,62±0,10 %

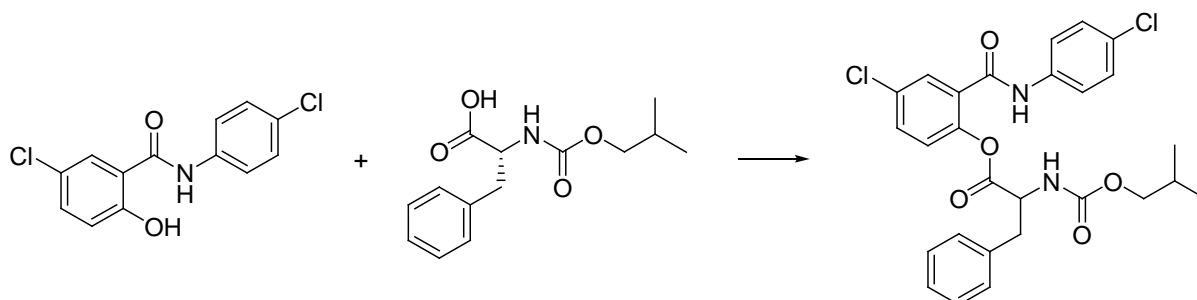
Pozn: Reakce byla opakována s následujícím výtěžkem:

$m = 0,4$  g     $t_f = 162,3-166,1$  °C    výtěžek = 44 %

**d. Syntéza isobutyl 1-((2-(4-chlorfenylkarbamoyl)-4-chlorfenoxy)karbonyl)-2-fenylethylkarbamát**

Kód reakce: PS. 4

Reakce:



Tabulka organických sloučenin:

Látka	Zkratka	Mr [g/mol]	n [mol]	m [g]	V [ml]	$\rho$ [g/cm <sup>3</sup> ]	Bod tání [°C]
5,4'-dichlorsalicylanilid	DiClSal	281,001	$1,779 \cdot 10^{-3}$	<b>0,5</b>	-	-	227-229,3
L-fenylalanil- isobutylchloroformiát	L-phe- iButCF	265	$1,779 \cdot 10^{-3}$	<b>0,472</b>	-	-	90,5-94,3
<i>N,N'</i> - dicyklohexylkarbodiimid	DCC	206,33	$1,957 \cdot 10^{-3}$	<b>0,403</b>	-	-	33-35
Produkt	PS. 4	528	$1,779 \cdot 10^{-3}$	<b>T: 0,939</b>	-	-	175,2-181,4
<i>N,N'</i> -dimetylformaamid	DMF	73,09	-	-	-	-	-
Ethylacetát	EtOAc	88,11	-	-	15	0,897	-
Hexan	Hex	86,18	-	-	-	0,654	-

Pracovní postup:

V 50 ml baňce bylo předloženo 0,5 g 5,4'-dichlorsalicylanilidu a rozpuštěno v *N,N*-Dimethylformamidu. Vzniklá směs byla umístěna na magnetickou míchačku a ochlazená na -10 °C. Dále bylo přidáno 0,472 g L-fenylalaninisobutylchloroformiátu a posléze byl ve 3 dávkách přidán *N,N'* Dicyklohexylcarbodiimid (1,1 ekvi). Směs byla nechána do 2. dne. Následně byla provedena filtrace na fritě, filtrát byl oddestilován na odparce (80°C). Po oddestilování bylo do směsi přidáno 30 ml etylacetátu a směs byla zfiltrována. Filtrát byl částečně oddestilován a byl přidán hexan. Směs byla dále dělena kolonovou chromatografií (EtOAc-Tol) (0,5-4,5). Látky obsažené v reakční směsi se touto metodou nepovedlo rozdělit. Během této reakce bylo provedeno několik TLC (toluen- etylacetát) (4:0,5).

Forma látky: bílá krystalická látka

TLC:  $R_{fk}=2,8/4,4= 0,636$

Pozn: Reakce byla 2\* opakována bez dělení kolonovou chromatografií, ale s použitím krystalizace s následujícím výtěžkem: Směs se nepodařilo opakovanou krystalizací rozdělit.

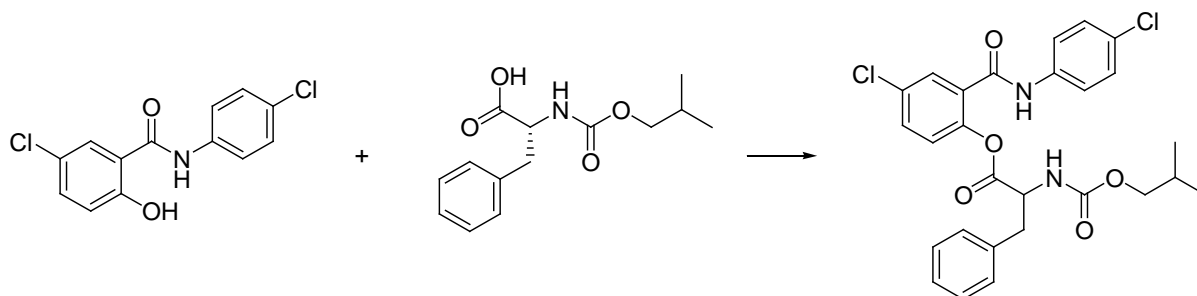
$m_2 = 0,133 \text{ g}$   $t_t=175,2-181,4 \text{ } ^\circ\text{C}$  výtěžek = 14 %

$m_3 = 0,245 \text{ g}$   $t_t=157,1-159,3 \text{ } ^\circ\text{C}$  výtěžek = 26 %

e. Syntéza isobutyl 1-((2-(4-chlorfenylkarbamoyl)-4-chlorfenoxy)karbonyl)-2-fenylethylkarbamát

Kód reakce: PS. 4 – 2. syntetická cesta

Reakce:



Tabulka organických sloučenin:

Látka	Zkratka	Mr [g/mol]	n [mol]	m [g]	V [ml]	$\rho$ [g/cm <sup>3</sup> ]	Bod tání [°C]
5,4'-dichlorsalicylanilid	DiClSal	281,001	1,779*10 <sup>-3</sup>	<b>0,5</b>	-	-	227-229,3
L-fenylalanil- isobutylchloroformiát	L-phe- iButCF	265	1,779*10 <sup>-3</sup>	<b>0,472</b>	-	-	90,5-94,3
<i>N</i> -(3-dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylkarbodiimid	EDCI	191,7	1,774*10 <sup>-3</sup>	<b>0,34</b>	-	-	-
1- hydroxybenzotriazol hydrát	Hobt	135,19	1,58*10 <sup>-2</sup>	<b>0,24</b>	-	-	-
Produkt	PS. 4-2	528	1,779*10 <sup>-3</sup>	<b>T: 0,939</b>	-	-	163,8-167,2
<i>N,N'</i> -dimetylformaamid	DMF	73,09	-	-	-	-	-
Ethylacetát	EtOAc	88,11	-	-	15	0,897	-
Hexan	Hex	86,18	-	-	-	0,6548	-

Pracovní postup:

Ve 100 ml baňce bylo předloženo 0,5 g 5,4'-dichlorsalicylanilidu a rozpuštěno v *N,N*-Dimethylformamidu. Vzniklá směs byla umístěna na magnetickou míchačku a ochlazená na -10 °C. Dále bylo přidáno 0,472 g L-fenylalaninisobutylchloroformiátu a posléze bylo přidáno 0,34 g EDCI a 0,24 g 1- hydroxybenzotriazolhydrát. Směs byla nechána do 2. dne. Dále byla reakční směs nalita na 40 ml destilované vody, kdy vznikla mléčná suspenze. Ta pak byla extrahována ethylacetátem. Ten byl oddělen a 2\* extrahován destilovanou vodou. Organická fáze byla vysušena bezvodým síranem sodným. Následně byla provedena 2\*

krystalizace ze směsi ethylacetát – hexan. Krystaly byly odsáty na fritě a vysušeny na sušičce. Během této reakce bylo provedeno několik TLC (toluen- etylacetát) (4 : 0,5). Směs se nepodařilo opakovanou krystalizací rozdělit.

Forma látky: bílá krystalická látka

Bod tání: 163,8-167,2 °C

TLC:  $R_{fk}=2,8/4,4= 0,636$

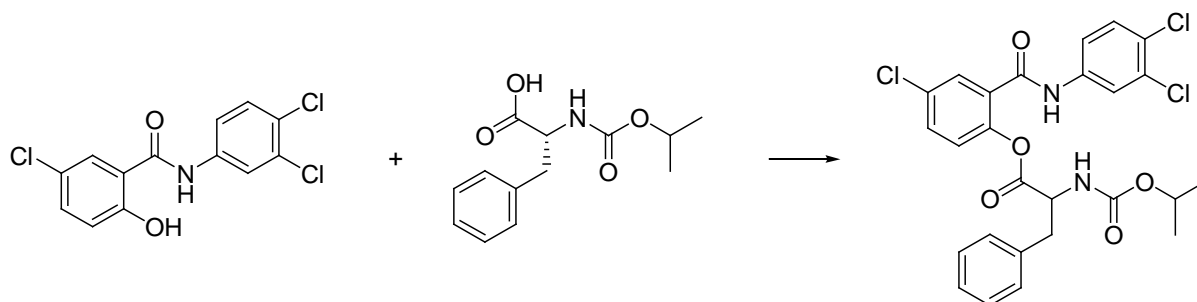
$m_{\text{před krystalizací}}$  = 0,941 g,  $m_c = 0,587$  g      výtěžek = 63 %



**f. Syntéza isopropyl 1-((2-(3,4-dichlorfenylkarbamoyl)-4-chlorfenoxy)karbonyl)-2-fenylethylkarbamát**

Kód reakce: PS. 5

Reakce:



Tabulka organických sloučenin:

Látka	Zkratka	Mr [g/mol]	n [mol]	m [g]	V [ml]	$\rho$ [g/cm <sup>3</sup> ]	Bod tání [°C]
5,4,3-trichlorsalicylanilid	TriClSal	314,9	1,58*10 <sup>-3</sup>	<b>0,5</b>	-	-	249-250
L-fenylalanil- isopropylchloroformiát	L-phe- iPropCF	251	1,58*10 <sup>-3</sup>	<b>0,398</b>	-	-	80,1-81,9
<i>N,N'</i> - dicyklohexylkarbodiimid	DCC	206,33	1,745*10 <sup>-3</sup>	<b>0,36</b>	-	-	33-35
Produkt	PS. 5	547,9	1,58*10 <sup>-3</sup>	<b>T: 0,865</b>	-	-	151,9-153,2
<i>N,N'</i> -dimethylformaamid	DMF	73,09	-	-	-	-	-
Ethylacetát	EtOAc	88,11	-	-	15	0,897	-
Hexan	Hex	86,18	-	-	-	0,6548	-

Pracovní postup:

V 50 ml baňce bylo předloženo 0,5 g 5,4,3-trichlorsalicylanilidu a rozpuštěno v *N,N*-Dimethylformamidu. Vzniklá směs byla umístěna na magnetickou míchačku a ochlazená na -10 °C. Dále bylo přidáno 0,398 g L-fenylalaninisopropylchloroformiátu a posléze byl ve 3 dávkách přidán *N,N'* Dicyklohexylcarbodiimid (1,1 ekvi). Směs byla nechána do 2. dne. Následně byla provedena filtrace na fritě, filtrát byl oddestilován na odparce (80 °C). Po oddestilování bylo do směsi přidáno 15 ml Etylacetátu a směs byla zfiltrována. Filtrát byl oddestilován a látka byla 2\*krystalována ze směsi etylacetát-hexan. Po zkrystalování byly krystaly odsáty na fritě a vysušeny na sušičce. Během této reakce bylo provedeno několik TLC (toluen- etylacetát) (4:1).

Forma látky: bílá vatovitá látka

Bod tání: před krystalizací – 149,2-153,7 °C  
po 1. krystalizaci – 148,8-150,6 °C (NMR)  
po 2. krystalizaci – 151,9-153,2 °C

m<sub>c</sub>: 0,045 g výtěžek = 5 %

TLC: R<sub>fk</sub>=2,3/4,3= 0,535

NMR:

<sup>1</sup>H NMR (400,13 MHz, DMSO) δ: 10,76 (1H, brs, -CO-NH-), 8,09 (1H, d, J = 1,8 Hz, Ar-H), 7,80 (1H, d, J = 2,6 Hz, Ar-H), 7,73 (1H, d, J = 7,9 Hz, -CH-NH-), 7,68 (1H, dd, J = 8,8 Hz, J = 2,5 Hz, Ar-H), 7,64-7,58 (2H, m, Ar-H), 7,26-7,18 (6H, m, Ar-H), 4,64 (1H, m, -CH-NH), 4,42 (1H, m, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3,17 (1H, m, -CH<sub>2</sub>-Ph), 2,90 (1H, m, -CH<sub>2</sub>-Ph), 1,01 (3H, d, J = 6,2 Hz, -CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,06 (3H, d, J = 6,1 Hz, -CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

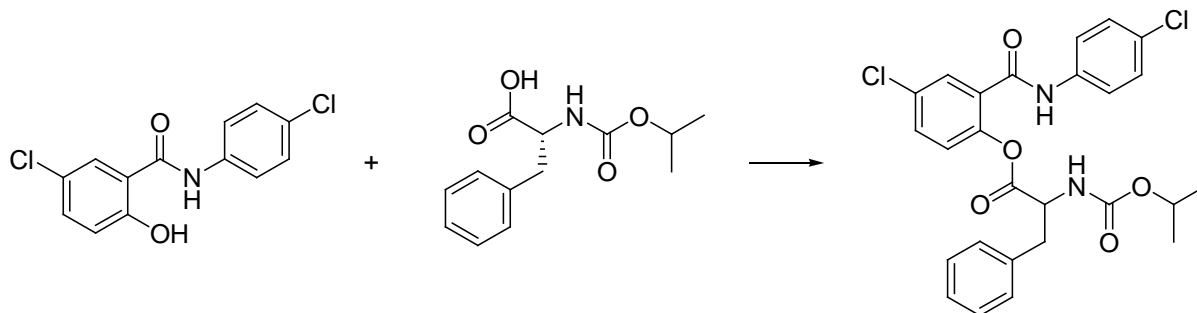
CHN:

Teor.: C 56,80 %	H 4,22 %	Cl 19,34 %	N 5,09 %
Exp.: C 56,97±0,12 %	H 4,17±0,09 %	Cl 19,58± 0,09 %	N 4,97±0,07 %

**g. Syntéza isopropyl 1-((2-(4-chlorfenylkarbamoyl)-4-chlorfenoxy)karbonyl)-2-fenylethylkarbamát**

Kód reakce: PS. 6 – 1.část

Reakce:



Tabulka organických sloučenin:

Látka	Zkratka	Mr [g/mol]	n [mol]	m [g]	V [μl]	ρ [g/cm <sup>3</sup> ]	Bod tání [°C]
5,4'-dichlorsalicylanilid	DiiClSal	281	6,05*10 <sup>-4</sup>	<b>0,17</b>	-	-	227-229,3
L-fenylalanil- isopropylchloroformiát	L-phe- iPropCF	251	6,05*10 <sup>-4</sup>	<b>0,15</b>	-	-	80,1-81,9
Isopropylchloroformiát	iPropCF	122,6	6,05*10 <sup>-4</sup>	<b>0,073</b>	67,5	1,0801	-
Produkt	PS.6 - 1.část	514	6,05*10 <sup>-4</sup>	<b>T: 0,31</b>	-	-	73,9-79,2
Toluen	Tol	92,14	-	-	-	-	-
Ethylacetát	EtOAc	88,11	-	-	-	0,897	-
Hexan	Hex	86,18	-	-	-	0,6548	-

Pracovní postup:

V 50 ml baňce bylo předloženo 0,15 g L-fenylalaninisopropylchloroformiátu a rozpuštěno v toluenu. Dále bylo přidáno 67,5 μl isopropylchloroformiátu. Vzniklá směs byla umístěna na magnetickou míchačku a ochlazena na -10 °C. Po chvíli byl přidán roztok 5,4'-dichlorsalicylanilidu (0,17g 5,4'-dichlorsalicylanilidu + DMF). Směs byla nechána do 2. dne. Dále byla směs oddestilována na odparce a zkrystalována ze směsi ethylacetát - hexan. Po zkrystalování byly krystaly odsáty na fritě a vysušeny na sušičce. Během této reakce bylo provedeno několik TLC (toluen- etylacetát) (4 : 0,5). Směs se nepodařilo opakovanou krystalizací rozdělit.

Forma látky: bílá vatovitá látka

Bod tání: 73,9 - 79,2 °C

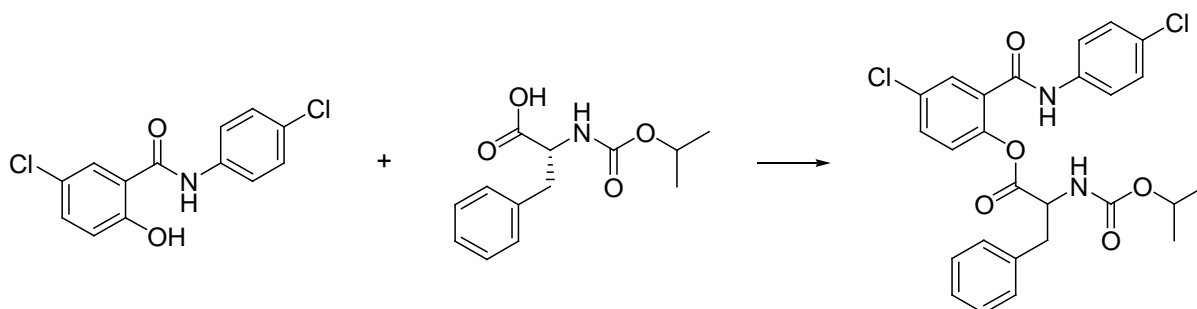
TLC:  $R_{fk} = 2,3/4,2 = 0,548$

m<sub>c</sub>: 0,185 g      výtěžek = 60 %

**h. Syntéza isopropyl 1-((2-(4-chlorfenylkarbamoyl)-4-chlorfenoxy)karbonyl)-2-fenylethylkarbamát**

Kód reakce: PS. 6 – 2.část

Reakce:



Tabulka organických sloučenin:

Látka	Zkratka	Mr [g/mol]	n [mol]	m [g]	V [μl]	ρ [g/cm <sup>3</sup> ]	Bod tání [°C]
5,4'-dichlorsalicylanilid	DiClSal	281	6,05*10 <sup>-4</sup>	<b>0,17</b>	-	-	227-229,3
L-fenylalanil- isopropylchloroformiát	L-phe- iPropCF	251	6,05*10 <sup>-4</sup>	<b>0,15</b>	-	-	80,1-81,9
Isopropylchloroformiát	iPropCF	122,6	6,05*10 <sup>-4</sup>	<b>0,073</b>	67,5	1,0801	-
Produkt	PS.6 - 1.část	514	6,05*10 <sup>-4</sup>	<b>T: 0,31</b>	-	-	225,1-229,1
Toluen	Tol	92,14	-	-	-	-	-
N,N'-dimetylformaamid	DMF	73,09	-	-	-	-	-
Ethylacetát	EtOAc	88,11	-	-	<b>30</b>	901	-
Triethylamin	(Et) <sub>3</sub> N	101,19	-	-	-	-	-

Pracovní postup:

V 50 ml baňce bylo předloženo 0,15 g L-fenylalaninisopropylchloroformiátu a rozpuštěno v toluenu. Dále bylo přidáno 67,5 μl isopropylchloroformiátu. Vzniklá směs byla umístěna na magnetickou míchačku a ochlazená na -10 °C. Po chvíli byl přidán roztok 5,4'-dichlorsalicylanilidu (0,17g 5,4'-dichlorsalicylanilidu + DMF) a ekvimolární triethylamin. Směs byla nechána do 2. dne. Dále byla směs zředěna vodou a extrahována 2x ethylacetátem. Následovala dvojnásobná extrakce 5% kyselinou citrónovou, dvojnásobná extrakce solankou a dvojnásobná extrakce destilovanou vodou. Směs byla vysušena bezvodým síranem sodným a oddestilována na odparce. Krystaly byly vysušeny na sušičce. Během této reakce bylo

provedeno několik TLC (toluen- etylacetát) (4 : 0,5). Směs se nepodařilo opakovanou krystalizací rozdělit.

Forma látky: bílá vatovitá látka

Bod tání: 225,1-229,1 °C

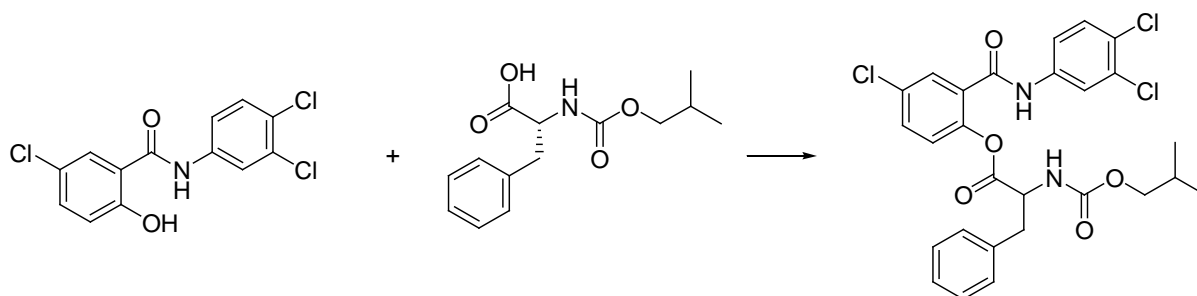
TLC:  $R_{fk}=2,4/4,1=0,585$

m<sub>c</sub>: 0,045 g výtěžek = 15 %

**i. Syntéza isobutyl 1-((2-(3,4-dichlorfenylkarbamoyl)-4-chlorfenoxy)karbonyl)-2-fenylethylkarbamát**

Kód reakce: PS. 7

Reakce:



Tabulka organických sloučenin:

Látka	Zkratka	Mr [g/mol]	n [mol]	m [g]	V [ml]	$\rho$ [g/cm <sup>3</sup> ]	Bod tání [°C]
5,4,3-trichlorsalicylanilid	TriClSal	314,9	$1,58 \cdot 10^{-3}$	<b>0,5</b>	-	-	249-250
L-fenylalanil- isobutylchloroformiát	L-phe- iButCF	265	$1,58 \cdot 10^{-3}$	<b>0,421</b>	-	-	80,1-81,9
<i>N,N'</i> - dicyklohexylkarbodiimid	DCC	206,33	$1,745 \cdot 10^{-3}$	<b>0,36</b>	-	-	33-35
Produkt	PS. 7	561,9	$1,58 \cdot 10^{-3}$	<b>T: 0,888</b>	-	-	153,8 - 178,2
<i>N,N'</i> -dimethylformaamid	DMF	73,09	-	-	-	-	-
Ethylacetát	EtOAc	88,11	-	-	15	0,897	-
Hexan	Hex	86,18	-	-	-	0,6548	-

Pracovní postup:

V 50 ml baňce bylo předloženo 0,5 g 5,4,3-trichlorsalicylanilidu a rozpuštěno v *N,N*-dimethylformamidu. Vzniklá směs byla umístěna na magnetickou míchačku a ochlazena na -10 °C. Dále bylo přidáno 0,421 g L-fenylalaninisobutylchloroformiátu a posléze byl ve 3 dávkách přidán *N,N'* Dicyklohexylcarbodiimid (1,1 ekvi). Směs byla nechána do 2. dne. Následně byla provedena filtrace na fritě, filtrát byl oddestilován na odparce (80°C). Po oddestilování bylo do směsi přidáno 15 ml etylacetátu a směs byla zfiltrována. Filtrát byl oddestilován a látka byla 2\*krystalována ze směsi etylacetát-hexan. Po zkrystalování byly krystaly odsáty na fritě a vysušeny na sušičce. Během této reakce bylo provedeno několik TLC (toluen- etylacetát) (4:0,5). Směs se nepodařilo opakovanou krystalizací rozdělit.

Forma látky: bílá vatovitá látka

Bod tání: 153,8 - 178,2 °C

m<sub>c</sub>: 0,242 g výtěžek = 27 %

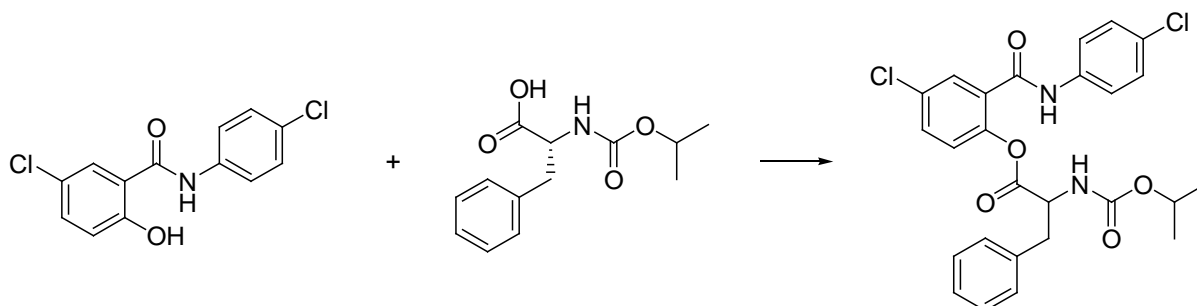
TLC:  $R_{fk} = 3,1/4,4 = 0,705$



**j. Syntéza isopropyl 1-((2-(4-chlorfenylkarbamoyl)-4-chlorfenoxy)karbonyl)-2-fenylethylkarbamát**

Kód reakce: PS. 8

Reakce:



Tabulka organických sloučenin:

Látka	Zkratka	Mr [g/mol]	n [mol]	m [g]	V [μl]	ρ [g/cm <sup>3</sup> ]	Bod tání [°C]
5,4'-dichlorsalicylanilid	DiClSal	281	1,779*10 <sup>-3</sup>	<b>0,5</b>	-	-	227-229,3
L-fenylalanil- isopropylchloroformiát	L-phe- iPropCF	251	1,779*10 <sup>-3</sup>	<b>0,45</b>	-	-	80,1-81,9
4-dimethylaminopyridin	4-Pyr	122,17	4,44*10 <sup>-4</sup>	<b>0,0543</b>	-	-	112-113
<i>N,N</i> -dicyklohexylkarbodiimid	DCC	206,33	1,972*10 <sup>-3</sup>	<b>0,407</b>	-	-	33-35
Produkt	PS. 8	514	1,779*10 <sup>-3</sup>	<b>T: 0,91</b>	-	-	-
hexan	Hex	86,18	-	-	-	-	-
<i>N,N</i> '-dimethylformaamid	DMF	73,09	-	-	-	-	-
ethylacetát	EtOAc	88,11	-	-	<b>15</b>	901	-

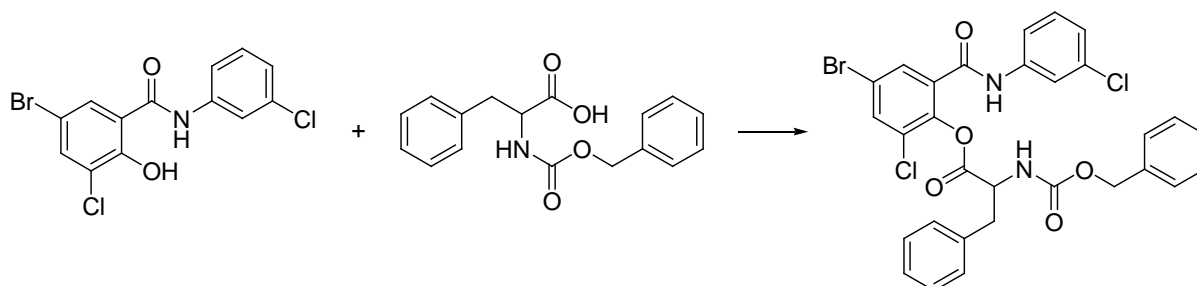
Pracovní postup:

V 50 ml baňce bylo předloženo 0,5 g 5,4'-dichlorsalicylanilidu a rozpuštěno v *N,N*-dimethylformamidu. Vzniklá směs byla umístěna na magnetickou míchačku a ochlazená na -10 °C. Dále bylo přidáno 0,45 g L-fenylalaninisopropylchloroformiátu a posléze bylo přidáno 0,0543 g 4-dimethylaminopyridinu. Dále byl ve 3 dávkách nadávkován *N,N*'-dicyklohexylcarbodiimid (1,1 ekvi). Směs byla nechána do 2. dne. Následně byla provedena filtrace na fritě, filtrát byl oddestilován na odparce (80°C). Po oddestilování bylo do směsi přidáno 15 ml etylacetátu a směs byla zfiltrována. Filtrát byl oddestilován a látka byla 2\*krystalována ze směsi etylacetát-hexan. Produkt se nepodařilo izolovat.

**k. Syntéza benzyl 1-((2-(3-chlorfenylkarbamoyl)-4-brom-6-chlorfenoxy)karbonyl)-2-fenylethylkarbamát**

Kód reakce: PS. 9

Reakce:



Tabulka organických sloučenin:

Látka	Zkratka	Mr [g/mol]	n [mol]	m [g]	V [ml]	$\rho$ [g/cm <sup>3</sup> ]	Bod tání [°C]
5-brom-3,4'-dichlorsalicylanilid	5-Br-3,4'diClSal	359,904	$1,667 \cdot 10^{-3}$	<b>0,6</b>	-	-	-
N-Carbobenzyloxy-L-fenylalanin	N-cbz	299,32	$1,667 \cdot 10^{-3}$	<b>0,499</b>	-	-	85-88
N,N'-dicyklohexylkarbodiimid	DCC	206,33	$1,832 \cdot 10^{-3}$	<b>0,378</b>	-	-	33-35
Produkt	PS. 9	641,224	$1,667 \cdot 10^{-3}$	<b>T:1,069</b>	-	-	160,4-164,1
N,N'-dimethylformaamid	DMF	73,09	-	-	-	-	-
Ethylacetát	EtOAc	88,11	-	-	15	0,897	-
Hexan	Hex	86,18	-	-	-	0,6548	-

Pracovní postup:

V 50 ml baňce bylo předloženo 0,6 g 5-brom-3,4'-dichlorsalicylanilidu a rozpuštěno v *N,N*-dimethylformamidu. Vzniklá směs byla umístěna na magnetickou míchačku a ochlazená na -10 °C. Dále bylo přidáno 0,499 g *N*-Carbobenzyloxy-L-fenylalaninu a posléze byl ve 3 dávkách přidán *N,N'*-Dicyklohexylcarbodiimid (1,1 ekvi). Směs byla nechána do 2. dne. Následně byla provedena filtrace na fritě, filtrát byl oddestilován na odparce (80°C). Po oddestilování bylo do směsi přidáno 15 ml etylacetátu a směs byla zfiltrována. Filtrát byl oddestilován a látka byla 2\*krystalována ze směsi etylacetát-hexan. Po zkrystalování byly krystaly odsáty na fritě a vysušeny na sušičce. Během této reakce bylo provedeno několik TLC (toluen- etylacetát) (4:0,5). Směs se nepodařilo opakovanou krystalizací rozdělit.

Forma látky: bílá vatovitá látka

Bod tání: 160,4 - 164,1 °C

m<sub>c</sub>: m<sub>1</sub>=0,237 g

m<sub>2</sub>=0,056 g

m<sub>3</sub>=0,034 g

m<sub>c</sub>=0,047 g výtěžek = 4 %

TLC: R<sub>fk</sub>=3,2/4,3= 0,744

## 5. DISKUZE

V této bakalářské práci byly připraveny deriváty salicylanilidů s aminokyselinami. Cíleně bylo syntetizováno 9 sloučenin. Některé syntézy byly vícekrát opakovány, aby bylo dosaženo požadovaného množství konečných produktů. Nejčastěji využívanou syntézou byla ta, kdy reagoval salicylanilid s aminokyselinou za nízké teploty v přítomnosti *N,N*-dicyklohexylkarbodiimidu za vzniku příslušného esteru. Reakce s karbodiimidem probíhá, ale nejsme schopni látku vyčistit vůbec a nebo jen s minimální výtěžkem. Dále jsme používali alternativní metodu, aktivace karboxylové kyseliny chloroformiátem, ale ani v tomto případě se nám nepodařilo požadované látky připravit. K izolaci produktů byly použity známé čisticí operace a separační metody, z nichž můžeme zmínit krystalizaci, kolonovou chromatografii či extrakci. Izolace esterů aminokyselin a salicylanilidů byla obtížná. Důvodem je nízká stabilita produktů a jejich podobnost s výchozími látkami. Kolonovou chromatografií se látky nepodařilo rozdělit pravděpodobně z důvodu mírné kyselosti silikagelu, který rozkládá esterovou vazbu. Krystalizací jsme těžko dosahovali požadované čistoty, ačkoliv požadovaný produkt byl v reakční směsi majoritní složkou, jak ukázala nukleární magnetická rezonance. Na NMR spektru byly také vidět vzniklé nečistoty výchozí látky (salicylanilidu) a nečistoty vznikající z esterifikačního činidla (DCC) dicyklohexylkarbodimochoviny. Domnívám se, že důvodem, proč se nepodařilo izolovat některé látky v požadované čistotě je v izolační metodice, nikoliv v reakci samotné.

## 6. ZÁVĚR

Na počátku bakalářské práce byla provedena obsáhlá literární rešerše týkající se biologických aktivit salicylanilidů a jejich *O*-substituovaných derivátů. V již publikované literatuře bylo zjištěno široké spektrum biologických aktivit, přičemž nejvíce a nejdéle zkoumanými jsou antimikrobiální a antifungální. Byly také popsány mikrobiální vlastnosti *N*-chráněných esterů aminokyselin a 2-hydroxy-*N*-fenylobenzamidů. U jednotlivých *O*-substituovaných derivátů (acetáty, estery, benzoxaziny a karbamáty) byly popsány syntetické cesty vedoucí k cíleným produktům. Experimentálně byly syntetizovány estery salicylanilidů s aminokyselinami. Jejich antibakteriální a antifungální aktivita je důležitým základem pro vznik nových pro léčiv, které by mohli být účinné proti tuberkulóze a různým fungálním kmenům. Těmito látkami jsme se zabývali, protože jsme chtěli zjistit, jak se změní aktivita těchto látek, když zaměníme alkyl za benzyl. Bylo zajímavé, že klasické estery s benzyloxykarbonylem šli připravit, ale ty s isopropyloxykarbonylem ne. Domnívám se, že estery s benzyloxykarbonylem jsou stabilnější ze sterických důvodů *N*-benzyloxykarbonylskupiny. Estery, které se podařilo připravit a jsou v požadované čistotě budou podrobeny biologickým testům. Z výsledků uvidíme jak a zda-li se změní jejich biologická aktivita oproti chráněným esterům.

## POUŽITÉ PŘÍSTROJE A ANALYTICKÉ METODY

NMR spektroskopie-NMR spektra byla měřena v dimethylsulfoxidu při teplotě 300 K na přístroji Bruker Avance III 400, pulzní metodou s Furierovou transformací.  $^1\text{H}$  spektra byla měřena při frekvenci 400,13 MHz,  $^{13}\text{C}$  spektra při 100,62 MHz.

CHN analýza byla provedena na přístroji EA 1108 CHN firmy Fisons Instruments

Rotační vakuová odparka-Heidolph, Laborota 4000 efficient

UV lampa-A.Krüss Optronic GmbH Germany, typ UV 240. Vlnové délky záření 366 nm a 254 nm

Hmotnostní spektra byla měřena na sestavě firmy Agilent Technologies (plynový chromatogram 6890N s hmotnostním detektorem 5973 Network)

TLC deska- TLC Silica gel 60 F254,25 pcs. Aluminium sheets 20x20 cm, Merck KGaA.

## SEZNAM POUŽITÝCH CHEMIKÁLIÍ

ethylacetát čistý, 99,5%

hexan čistý, 95%

hydroxid sodný, 98%

*N,N'*-dicyklohexylkarbodiimid

síran sodný, bezvodý

toluen čistý, 99%

*N,N*-dimethylformamid

5,4'-dichlorsalicylanilid

L-fenylalanil-isopropylchloroformiát

isopropylchloroformiát

*N*-Carbobenzyloxy-L-fenylalanin

5-brom-3,4'-dichlorsalicylanilid

4-dimethylaminopyridin

5,4,3-trichlorsalicylanilid

triethylamin

L-fenylalanil-isobutylchloroformiát

*N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylkarbodiimid

1-hydroxybenzotriazole hydrát

L-Fenylalanin

isobutylchloroformiát

kyselina chlorovodíková

destilovaná voda

## POUŽITÉ ZKRATKY

AC	<i>Absidia corymbifera</i> 272
(AcO) <sub>2</sub> O	anhydrid kyseliny octové
AF	<i>Aspergillus fumigatus</i> 231
Ala	alanin
CA	<i>Candida albicans</i> ATCC 44859
CG	<i>Candida glabrata</i> 20/1
CK	<i>Candida Krusei</i> E28
CT	<i>Candida tropicalis</i> 156
d	den
DCC	<i>N,N'</i> -dicyklohexylkarbodiimid
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamid
Et <sub>3</sub> N	triethylamin
EtOAc	ethylacetát
FLU	flukonazol
Gly	glycin
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	kyselina fosforečná
IC <sub>50</sub>	koncentrace léčiva (testované látky), při které je dosaženo 50% inhibice růstu pozorovaných buněk (např. bakteriálních nebo houbových)
INH	isoniazid
L-Phe	L-fenylalanin
M.	<i>Mycobacterium</i>
MIC	minimální inhibiční koncentrace
NMR	nukleární magnetická rezonance



PCl <sub>3</sub>	chlorid fosforitý
TB	<i>Trichosporon beigeli</i> 1188
TLC	tenkovrstvá kapalinová chromatografie
TM	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> 445
Val	valin

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

---

<sup>1</sup> Vinšová, J.; Imramovský, A. Salicylanilidy - Stále aktuální skupina s potenciální antibakteriální aktivitou. *Czech. Slov. Farm.* **2004**, 53 (5), 294–299.

<sup>2</sup> Imramovský, A.; Vinšova, J.; Ferriz, J.M.; Doležal, R.; Jampílek, J.; Kaustová, J.; Kunc, F. New antituberculotics originated from salicylanilides with promising *in vitro* activity against atypical mycobacterial strains. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, 17(10), 3572-3579.

<sup>3</sup> Spížek, J. Rezistence na antibiotika. *Vesmír* 78 1999, 27-32.

<sup>4</sup> Krátký, M.; Vinšová, J. Antiviral Activity of Substituted Salicylanilides – A Review. *Mini-Reviews in Medicinal chemistry* **2011**, 11, 956–967.

<sup>5</sup> Singh, H.; Singh, A.K.; Sharma, S.; Iyer, R.N. Synthesis of 5-chloro-3'-nitro-4-substituted salicylanilides, a new series of anthelmintic and antimicrobial agents. *J. Org. Chem.*, 1977, 1977, 20(6), 826-829

<sup>6</sup> Waisser, K.; Perina, M.; Holy, P.; Pour, M.; Bures, O.; Kunes, J.; Klimesova, V.; Buchta, V.; Kubanova, P.; Kaustova, J. Antimycobacterial and antifungal isosters of salicylamides. *Arch. Pharm.(Weinheim)*, 2003, 336(6-7), 322-335.

<sup>7</sup> Sjogren, E.B.; Rider, M.A.; Nelson, P.H.; Bingham, S.; Poulton, A.L.; Emanuel, M.A.; Komuniecki, R. Synthesis and biological activity of a series of diaryl substituted alpha-cyano-beta hydroxypenamides, a new class of anthelmintic agents. *J. Med. Chem.*, 1991, 34(11), 3295-3301.

<sup>8</sup> Yasui, K., Goto, T., Ito, S., Ueno, C.:JP, 1998; 028708; ref. Chem. Abstr., 1998; 29, 45856.

<sup>9</sup> Macielag, M. J., Demers, J. P., Fraga-Spano, S. A. et al.: *J. Med. Chem.*, 1998; 4, 2939.

---

<sup>10</sup> Imramovský, A.; Vinšova, J. Intramolekulární cyklizace využívané k uvolňování účinných látek z proléčiv Chem. Listy 2005, 21-29.

<sup>11</sup> Krátký, M.; Vinšová, J.; Buchta, V.; Horvati, K.; Bösze, S.; Stolaříková, J. New amino acid esters of salicylanilide active against MDR-TB and other microbes. European Journal of Medicinal Chemistry 2010, 45, 6106-6113.

<sup>12</sup> Imramovský, A.; Pauk, K.; Pejchal, V.; Hanusek, J. Salicylanilides and Their Derivates as Perspective Anti-tuberculosis Drugs: Synthetic Routes and Biological Evaluations. Mini-Reviews in Organic Chemistry 2011, 8 (2), 211–220.

<sup>13</sup> Vinšova, J.; Imramovský, A.; Buchta, V.; Ceckova, M.; Doležal, M.; Staud, F.; Jampílek, J.; Kaustová, J. Salicylanilide Acetates: Synthesis and Antibacterial Evaluation. Molecules 2007, 12(1), 1-12.

<sup>14</sup> Imramovský, A.; Vinšova, J.; Ferriz, J.M.; Buchta, V.; Jampílek, J. Salicylanilide ester s of N-protected amino acids as novel antimicrobial agents Bioorg. Med. Chem. Lett. 2009, 19(2), 348-351.

---

## ÚDAJE PRO KNIHOVNICKOU DATABÁZI

Název práce	Esterifikace neutrálních aminokyselin s atypickou <i>N</i> -chránicí skupinou a vybraných 2-hydroxy- <i>N</i> -fenylobenzamidů
Autor práce	Petra Syrovcová
Obor	Farmakochemie a medicínální materiály
Rok obhajoby	2012
Vedoucí práce	Ing. Aleš Imramovský, Ph.D.
Anotace	Tato bakalářská práce se zabývá cílenou syntézou <i>O</i> -substituovaných derivátů různě substituovaných 2-hydroxy- <i>N</i> -fenylobenzamidů. Obdobné typy látek byly již dříve popsány jako látky s potenciální biologickou aktivitou. Dále se také zabývá biologickými vlastnostmi kyslíkatých derivátů salicylanilidů jako jsou acetáty, karbamáty a benzoxaziny a mikrobiálními vlastnostmi <i>N</i> -chráněných esterů aminokyselin. V Experimentální části jsou uvedené možné syntetické cesty vedoucí k cílovým látkám.
Klíčová slova Key words	Salicylanilidy, esterifikace aminokyselin, estery, karbamáty, acetáty, benzoxaziny Salicylanilides, esterification amino acids, esters, carbamates, acetates, benzoxazepines