

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA ORGANICKÉ A BIOORGANICKÉ CHEMIE

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**STUDIUM SUBSTITUOVANÝCH ARYLGUANIDINŮ  
JAKO POTENCIÁLNÍCH LÉČIV XIV.**

**JANA KOBOSILOVÁ**

**Vedoucí bakalářské práce: PharmDr. Karel Palát, CSc.**

**HRADEC KRÁLOVÉ, 2018**

## **Poděkování**

Děkuji PharmDr. Karlu Palátu CSc. Za odborné rady a pomoc jak při praktické tak v teoretické části. Děkuji doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. za změřením NMR spekter, PharmDr. Marcelovi Špulákovi, PhD. za změřením hmotnostních spekter a Ivě Vencové za měření IČ spekter.

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

V Hradci Králové dne 31.7.2018

Jana Kobosilová

# OBSAH

|  |    |
|--|----|
| ABSTRAKT.....  | 5  |
| ABSTRACT.....  | 6  |
| 1. ÚVOD A CÍL BAKALÁŘSKÉ PRÁCE.....  | 7  |
| 2. TEORETICKÁ ČÁST.....  | 12 |
| 2.1. Příprava sulfidů.....   | 12 |
| 2.2. Redukce nitrosloučenin.....   | 13 |
| 2.3. Příprava 2-(alkylsulfanyl)-5-methylanilinium-chloridu.....                  | 14 |
| 2.4. Příprava arylguanidinů.....   | 14 |
| 2.5. Celkové schéma syntézy.....   | 15 |
| 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....  | 16 |
| 3.1. Příprava aktivní mědi.....  | 17 |
| 3.2. Příprava hexadecyl(4-methyl-2nitrofenyl)sulfidu.....                        | 18 |
| 3.3. Příprava 2-(hexadecylsulfanyl)-5-methylanilinu.....                         | 22 |
| 3.4. Příprava 2-(hexadecylsulfanyl)-5-methylanilinium-chloridu.....              | 26 |
| 3.5. Příprava 2-[2-(hexadecylsulfanyl)-5-methylfenyl]guanidinium-nitratu.....    | 28 |
| 3.6. Příprava 2-[2-(hexadecylsulfanyl)-5-methylfenyl]-1,1-dimethylguanidinu..... | 33 |
| 4. DISKUSE.....  | 38 |
| 5. ZÁVĚR.....  | 39 |
| 6. POUŽITÁ LITERATURA.....   | 40 |

# ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra organické a bioorganické chemie

Autor: Jana Kobosilová

Školitel: PharmDr. Karel Palát, CSc.

Název bakalářské práce: Studium substituovaných arylguanidinů jako potenciálních léčiv XIV.

Vzhledem ke vzrůstajícím počtům onemocnění způsobenými fungálními patogeny a vzhledem ke zvýšené rezistenci těchto patogenů na již dostupné antifungální látky, je třeba hledat novou strukturu inhibující růst těchto patogenů.

V oblasti látek odvozených od guanidinů probíhá celosvětový výzkum, jehož se účastní také Farmaceutická fakulta v Hradci Králové.

V rámci mé bakalářské práce bylo nasyntetizováno pět dosud v literatuře nepopsaných látek:

hexadecyl(4-methyl-2-nitrofenyl)sulfid

2-(hexadecylsulfanyl)-5-methylanilin

2-(hexadecylsulfanyl)-5-methylanilinium-chlorid

2-[2-(hexadecylsulfanyl)-5-methylfenyl]guanidinium-nitrat

2-[2-(hexadecylsulfanyl)-5-methylfenyl]-1,1-dimethylguanidin

# ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Organic and Bioorganic Chemistry

Author: Jana Kobosilová

Supervisor: PharmDr. Karel Palát, CSc.

Title of bachelor thesis: Study of substituted arylguanidines as potential drugs XIV.

In view of the increasing number of fungal pathogens and the increased resistance of these pathogens to already available antifungal agents, a new structure inhibiting the growth of these pathogens must be sought.

In the area of guanidine-derived substances, a worldwide research is taking place, which is also attended by the Faculty of Pharmacy in Hradec Králové.

As part of my bachelor thesis, five previously unpublished substances have been synthesized:

hexadecyl (4-methyl-2-nitrophenyl) sulfide

2- (hexadecylsulfanyl) -5-methylaniline

2- (hexadecylsulfanyl) -5-methylanilinium chloride

2- [2- (hexadecylsulfanyl) -5-methylphenyl] guanidinium nitrate

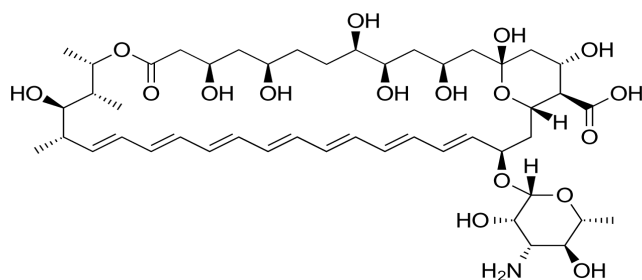
2- [2- (Hexadecylsulfanyl) -5-methylphenyl] -1,1-dimethylguanidine

# 1. ÚVOD A CÍL BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

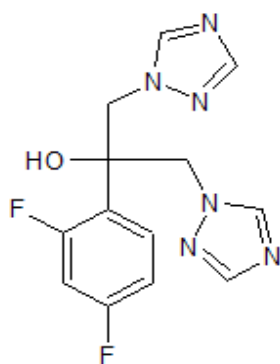
Mezi časté onemocnění patří infekce kůže a sliznic<sup>1</sup> vyvolané parazitickými houbami, nejčastěji to jsou dermatofytózy, onychomykozy a vulvovaginální kandidózy. Léčba závisí na etiologickém agens, rozsahu poškození a celkovém stavu pacienta.

Na lokální infekce se používají zejména antifungální látky<sup>1</sup> ze skupiny azolových antimykotik. Při rozsáhlejších systémových mykózách<sup>2</sup> se používají systémová antimykotika. Těžké systémové mykózy zahrnují kandidózu, aspergilózu, kryptokokózu a mukormykózu. Dosavadní systémová antimykotika zahrnují polyeny, antimetabolity, azoly, echinometabolity a ostatní skupiny.

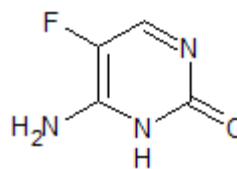
Skupina polyenů zahrnuje hlavně amfotericin B (I), jehož molekula je vázána na tukový nosič. Hlavními představiteli azolů jsou flukonazol (II), itrakonazol, ketokonazol a další. Mechanismus účinku těchto dvou skupin spočívá v poškození buněčné membrány mikromycet. Echinokandiny a pneumokandiny inhibují syntézu buněčné stěny. Flucytosin<sup>1</sup> (III) je představitelem skupiny antimetabolitů a mechanismus účinku spočívá v blokádě proteosyntézy v mykotické buňce.



I



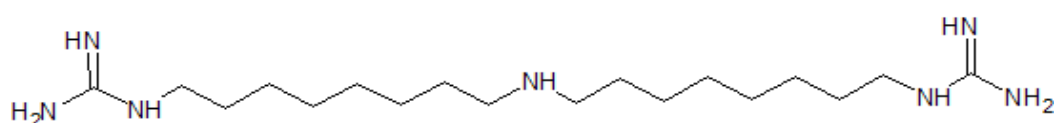
II



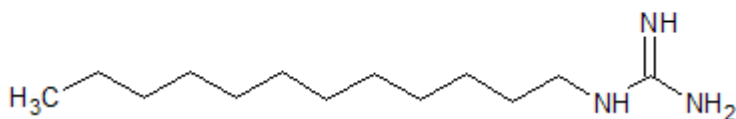
III

Vzhledem ke zvyšujícímu se výskytu systémových mykóz a ke vzniku nových rezistentních hub na antifungální léky, je potřeba hledat nové účinné antifungální struktury<sup>3</sup>. Intenzita těchto onemocnění se zvyšuje u imunokompromitovaných pacientů, u pacientů po transplantaci orgánů, u rakoviny nebo pacientů s získanou imunodeficiencí (HIV).

Guanidinové deriváty vykazují různou biologickou aktivitu<sup>4</sup>. Mimo jiné také antifungální a antibakteriální aktivity. Mezi guanidinové deriváty s antifungální aktivitou, již dříve popsané, patří molekuly guazitinu<sup>5</sup> (IV) či dodinu<sup>6</sup> (V). Tyto dvě látky poskytují účinnou a širokospektrou kontrolu mikroorganismů v průmyslových systémech a v zemědělství.



IV

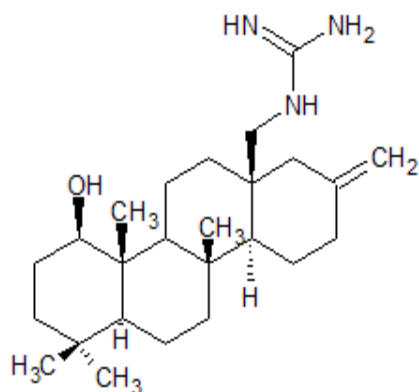


V

Součástí bakalářské práce byla rešerše v chemické databáze Scifinder. Úkolem rešerše bylo zjistit výzkum antifungálních látek v období od roků 2013-2018. Klíčovými slovními spojeními byly „antifungal guanidine“. Na toto spojení byly nalezeny dvě reference. Na další klíčový termín „antimycobacterial guanidine“ byly nalezeny tři reference.

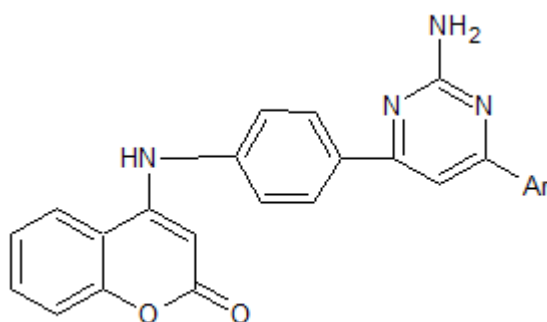
Scytoscarol (VI, str.9)<sup>7,8</sup> je přírodní sesterterpen nesoucí guanidinovou skupinu. Scytoscarol má prokázané antimikrobiální účinky vůči *Bacillus anthracis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* a *Mycobacterium tuberculosis* s hodnotami MIC v rozmezí od 2 do 110  $\mu$ M. Tato látka byla izolována z kultivované cyanobakterie *Scytonema sp.*



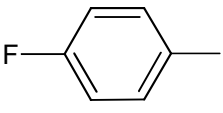
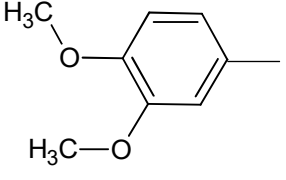
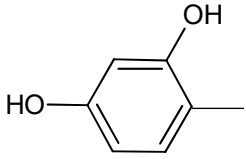


VI

Mezi další látky zkoumané kvůli svým různým biologickým aktivitám, mezi něž patří mimo jiné i antibakteriální a antifungální aktivity, jsou chalkony na bázi kumarinu<sup>9</sup> a jejich deriváty. Chalkony s navázaným pyrimidinovým jádrem v molekule (VII) obsahují guanidinovou skupinu. Mimo jiné i tyto látky byly testovány na antibakteriální a antifungální aktivitu proti gram pozitivním, gram negativním bakteriím a různým druhům patogeních hub. Pyrimidinová sloučenina VIIa vykazovala dobrou aktivitu vůči *Staphylococcus aureus*. Sloučeniny VIIb, VIIc vykazují vynikající účinnost proti *Klebsiella pneumoniae* a *Proteus vulgaris*. Antifungální aktivity byly testovány proti *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus clavatus* a *Candida albicans*. Jako standardní léčivo byl ve studii použit ketokonazol. Sloučenina VIIa dobře inhibuje *Aspergillus clavatus*. Zjistilo se, že sloučenina VIIa je z testovaných látek nejúčinnější proti *Aspergillus niger* a *Candida albicans*. Sloučenina VIId vykazovala dobrou účinnost proti *Aspergillus fumigatus*.

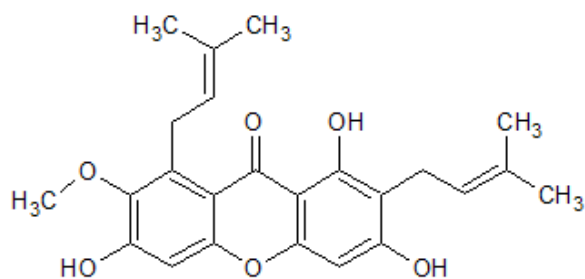


VII

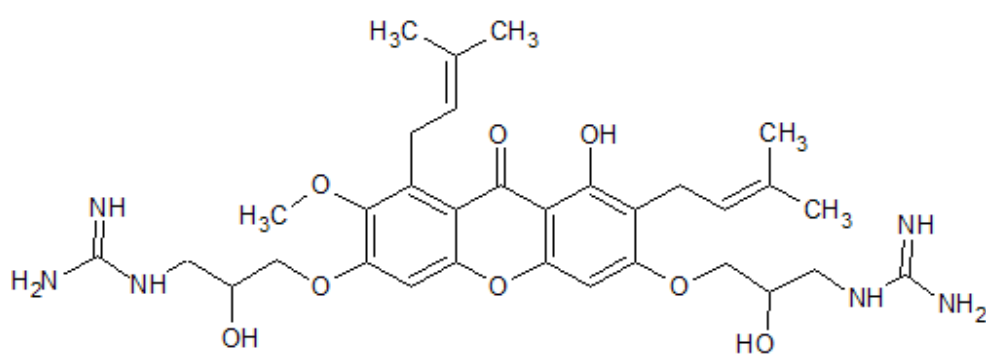
| Ar (a-c) – Aromatické aldehydy |  |
|--------------------------------|--|
| VII a                          |   |
| VII b                          |  |
| VII c                          |  |

Jednou z dalších látek testovaných na antimykotickou aktivitu a obsahující guanidinovou skupinu je polyhexamethylenguanidin hydrochlorid<sup>10</sup> (dále jen PHMGH). Antifungální aktivita PHMGH byla zkoumána proti *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Malassezia furfur*, *Trichosporon beigeli* a *Trichophyton rubrum*. Výsledky byly porovnávány s aktivitou již používaného léčiva amfotericinu B. PHMGH byl účinnější než amfotericin B proti druhům *Candida*. Proto se pro studii antifungálního mechanismu účinku zvolil jako modelový organismus *Candida albicans*. Test na mechanismus účinku ukázal, že PHMGH vytváří póry v plazmatické membráně. Velikost pórů je 2,3-3,3 nm a způsobuje ztrátu iontů. Dochází ke smrštování buněk a nakonec i k jejich zániku.

V jiné studii se syntetizovaly a testovaly látky kationtových xantonových amfifilik jako antifungálních činidel z přírodního  $\alpha$ -mangostinu<sup>11</sup> (VIII). V této studii se optimalizovaly analogy  $\alpha$ -mangostinu s cílem zvýšit jejich antifungální účinnost. Mezi vybrané účinné látky patří i sloučenina IX, která vykazovala antifungální účinnost proti širokému spektru houbových patogenů, včetně odolným kmenům *Candida albicans*, *Aspergillus* a *Fusarium*. Tato látka přímo narušuje buněčné membrány houbových patogenů a tím zabraňuje rozvoji rezistence na léčivo.

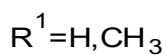
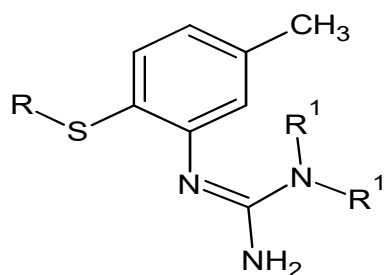


VIII



IX

**Cílem této bakalářské práce** bylo připravit nové, dosud nesyntetizované molekuly obsahující guanidinovou skupinu a doplňující sérii již připravených sloučenin obecného vzorce (X). Tyto látky byly testovány na antifungální a antimykrobakteriální aktivitu. Tato práce navazuje na předchozí bakalářské a diplomové práce, zabývající se také studiem substituovaných arylguanidininů jako potenciálních léčiv.



X

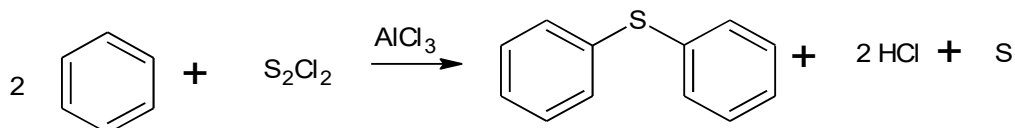
## 2. TEORETICKÁ ČÁST

V experimentální části této bakalářské práce bylo cílem nasynthetizovat 2-[2-(alkylsulfanyl)-5-methylfenyl]guanidinium-nitrat a 2-[2-(alkylsulfanyl)-5-methylfenyl]-1,1-dimethylguanidin.

### 2.1. Příprava sulfidů

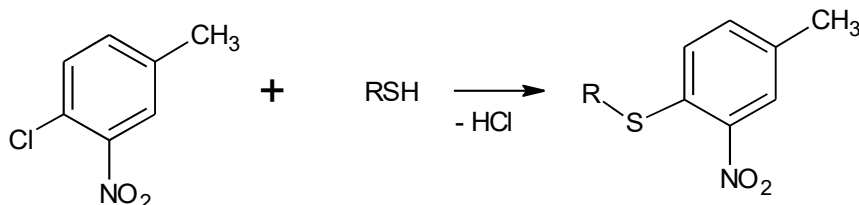
V prvním kroku naší syntézy bylo třeba nasynthetizovat příslušný alkyl(4-methyl-2-nitrofenyl)sulfid. Sulfidy jsou chemickou obdobou etherů. Obsahují místo atomu kyslíku atom síry ( $R^1-S-R^2$ ). Slabě bázičkový charakter dávají těmto látkám dva volné elektronové páry na atomu síry. Sulfidy lze připravit několika způsoby. Jedním z nich je Williamsonova syntéza<sup>12</sup>, kde reaguje thiol s bází a vzniká thiolátový anion ( $RS^-$ ). Tento thiolátový ion reaguje s alkylhalogenidem za vzniku sulfidu. Thiolátový ion je silně nukleofilní a výtěžky těchto syntéz bývají vysoké. Symetrické diarylsulfidy lze získat Friedel-Craftsovou arylací<sup>13</sup> chloridu siřného aromatickými uhlovodíky, za použití katalyzátoru chloridu hlinitého.

Schema Friedel-Craftsovy arylace:



V průběhu experimentální části této bakalářské práce byl sulfid připraven reakcí alkanthiolů s 4-chlor-3-nitrotoulenem<sup>14</sup> v suchém N,N-dimethylformamidu za přítomnosti bezvodého uhličitanu sodného a aktivní mědi použité jako katalyzátor.

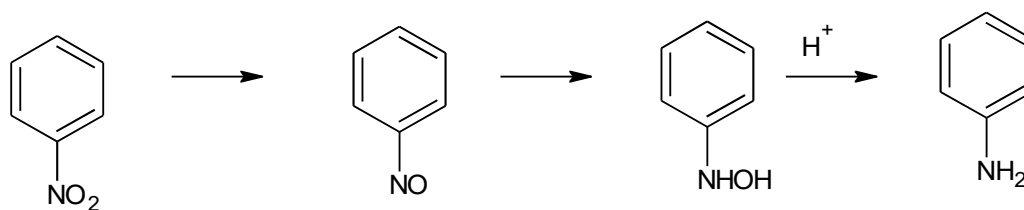
Schema reakce:



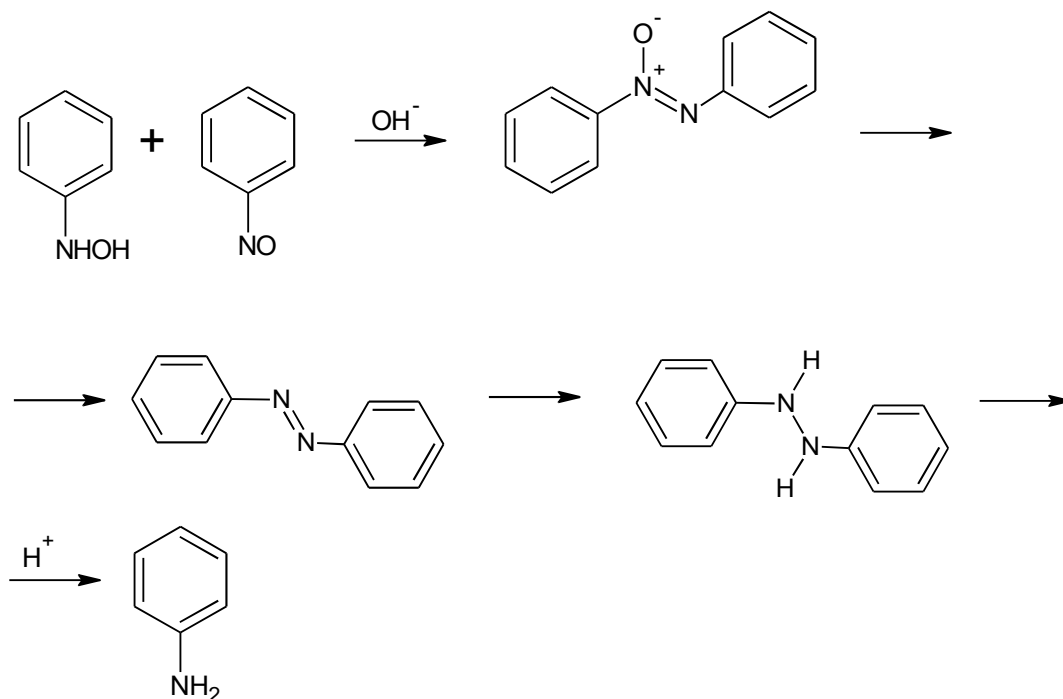
## 2.2. Redukce nitrosloúčenin

Redukce nitrosloúčenin<sup>15</sup> je důležitou reakcí pro syntézu aminů, kdy dochází k náhradě dvou atomů kyslíku za atomy vodíku. Reakce závisí na pH prostředí. V kyselém prostředí probíhá reakce přes hydroxyaminoskupinu za následného vzniku aminu (schema a). V alkalickém prostředí vzniká amin kondenzací nitroskupiny s hydroxylaminem, který vzniká přes azoxy- a hydrazosloúčeniny. Po okyselení vzniká konečný produkt amin. (schema b).

a)

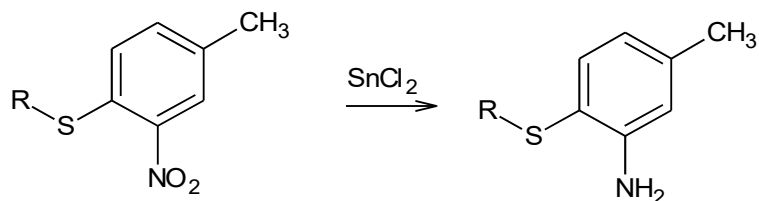


b)



Alkyl(4-methyl-2-nitrofenyl)sulfid získaný v předešlé reakci byl převeden působením chloridu cínatého v prostředí ethanolu<sup>16</sup> na 2-(alkylsulfanyl)-5-methylanilin. Reakce probíhala v neutrálním prostředí pod dusíkovou atmosférou.

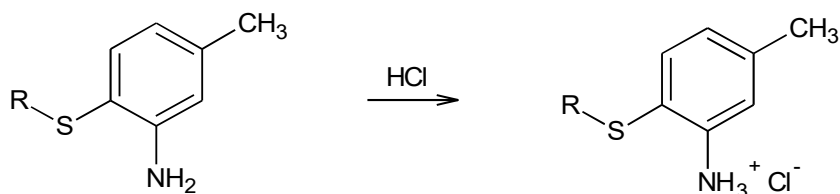
Schema reakce:



### 2.3. Příprava 2-(alkylsulfanyl)-5-methylanilinium-chloridu

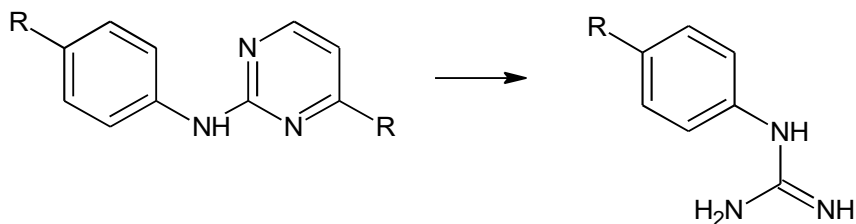
Příprava 2-(alkylsulfanyl)-5-methylanilinium-chloridu proběhla reakcí v předchozím kroku připraveného arylaminu s plynným chlorovodíkem<sup>17</sup> v suchém diethyletheru. Produkt anilinium-chlorid byl bez dalšího čištění použit do následující reakce.

Schema reakce:



### 2.4. Příprava arylguanidinů

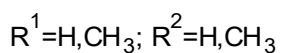
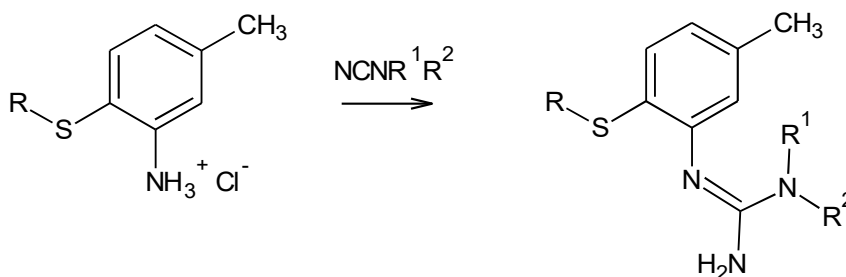
Novým způsobem syntézy substituovaných arylguanidinů je kyselé štěpení<sup>18</sup> 2-(arylamino)-4,6-dimethoxypyrimidinů, které byly připraveny spojením arylbromidů.



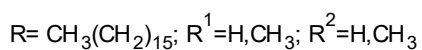
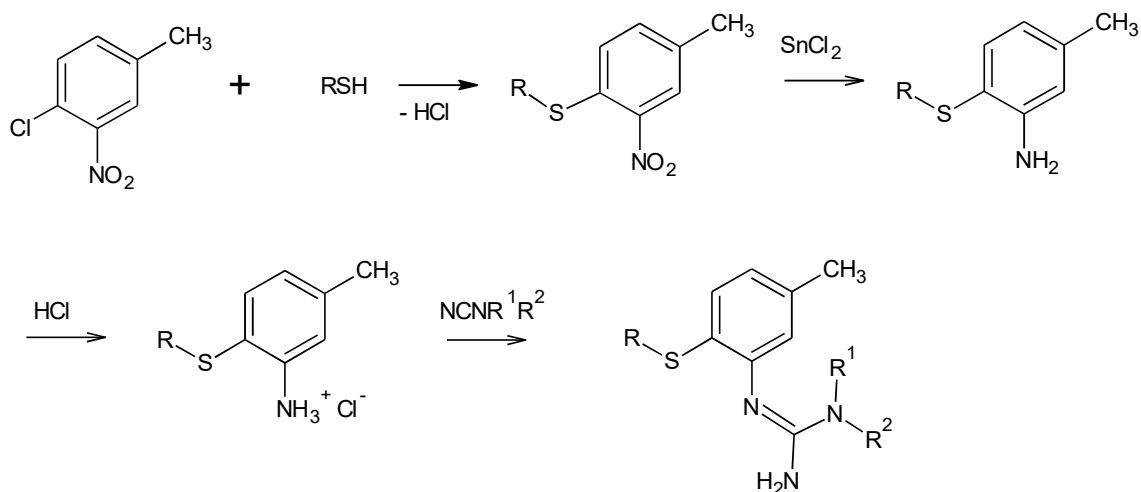
Mezi další metody přípravy arylguanidinů patří aminolýza 2-alkylisothiomočovín<sup>19</sup>. Při této reakci reaguje amin a 2-alkylisothiouroniová sůl, vzniká alkanthiol a odpovídající guanidin.

Metoda, která byla použita v experimentální části byla reakce amoniové soli (amoniaku) s kyanamidem<sup>20,21</sup>. Reakce probíhá v roztoku, případně v tavenině. Kyselé prostředí ve směsi usnadňuje vznik guanidinů.

Schéma reakce:



## 2.5. Celkové schéma syntézy



### 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Při experimentální části byly použity chemikálie (hexandekanthiol, 4-chlor-3-nitrotoluen, kyanamid a dimethylkyanamid) od firmy Sigma-Aldrich a rozpouštědla od firmy Penta.

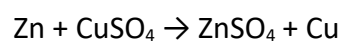
Na měření teplot byl použit mikrovýhřevný stolek Nagma Boëtius. Infračervená spektra (dále IČ) byla měřena na spektrofotometrech Nicolet Impact 400 a Nicolet 6700 FT-IR. Spektra nukleární magnetické rezonance (dále NMR) byla měřena na NMR spektrometru Varian VNMR S500 v laboratoři VNMR NET na katedře organické a bioorganické chemie. Jako rozpouštědla pro NMR byla použita deuteochloroform( $\text{CDCl}_3$ ) a dimethylsulfoxid (DMSO). Hmotnostní spektra látek (dále LRMS) byla měřena na spektrometru AGILENT Technologies 500 IonTrap v ESI módu.

Jako stacionární fáze v tenkovrstvé chromatografii byly použity desky SILUFOL UV 254/336. jako mobilní fáze byla použita soustava hexan:ethanol:triethylamin (8 : 1 : 0,5). Detekce probíhala pod UV lampou při vlnové délce 254 nm.



### 3.1. Příprava aktivní mědi

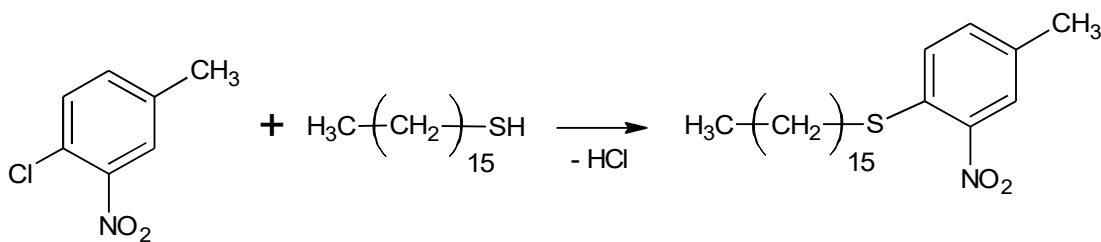
Molární hmotnost: 65,55 g/mol



Navážených 60,00 g (0,240 mol) pentahydrátu síranu měďnatého bylo rozpuštěno v 240 ml horké vody. K ochlazenému roztoku bylo postupně přidáváno 18,00 g (0,275 mol) práškového zinku. Po dvou hodinách byla směs dekantována třikrát horkou vodou a několikrát zředěnou kysenou chlorovodíkovou, do té doby, než ustal vývoj vodíku. Následně byla měď ještě dekantována vodou do neutrální reakce a nakonec třikrát ethanolem. Měď byla po odfiltrování a vysušení použita do další reakce.

### 3.2. Příprava hexadecyl(4-methyl-2nitrofenyl)sulfidu

Molární hmotnost: 393,63 g/mol



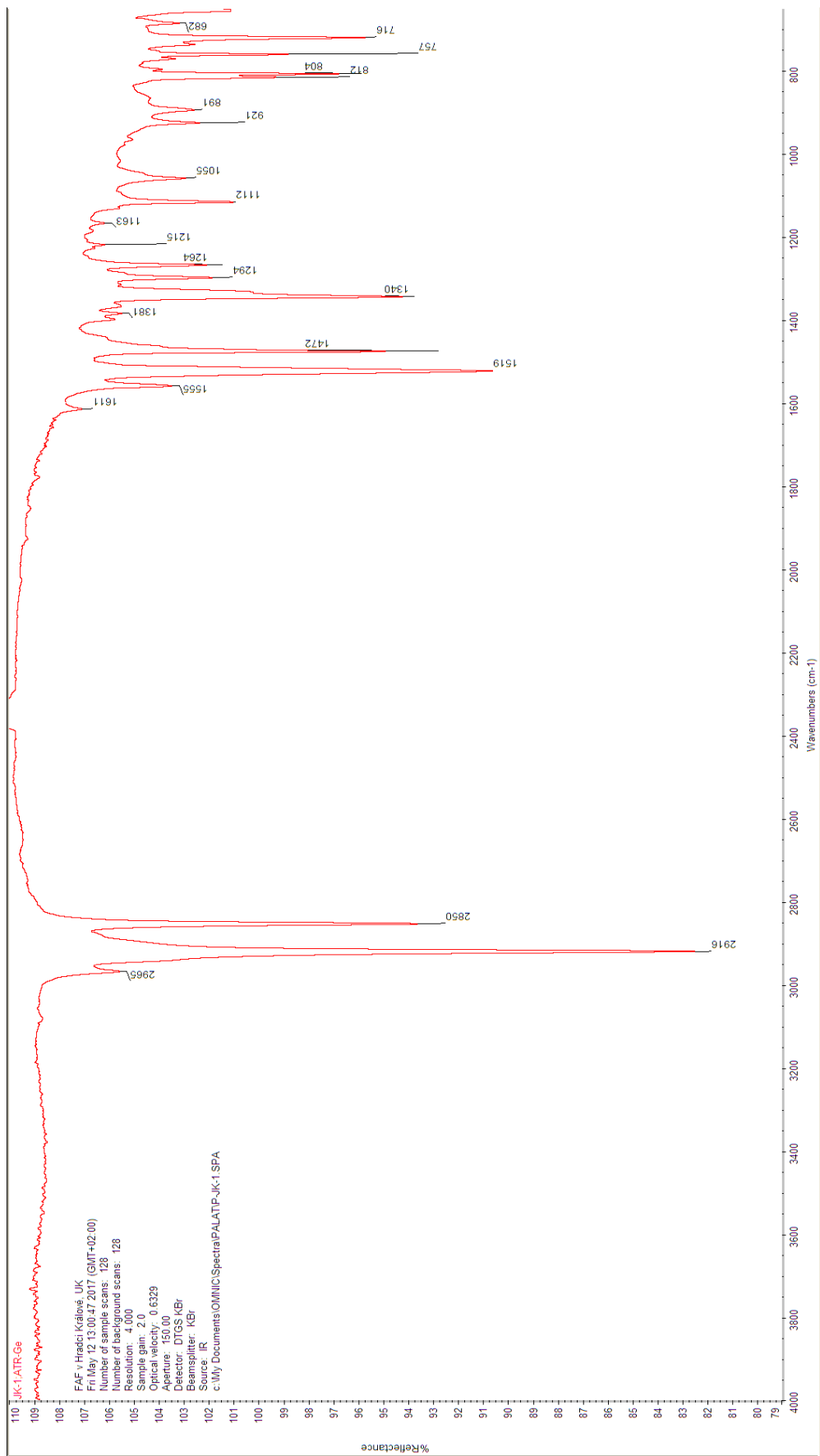
K 15,00 g (0,087 mol) 4-chlor-3-nitrotolenu bylo přidáno 130 ml suchého N,N - dimethylformamidu. Do směsi bylo dále přidáno 22,60 g (0,213 mol) bezvodého uhličitanu sodného a 3,30 (0,501 mol) aktivní mědi a dále 26,88 g (0,104 mol) hexadekanthiolu. Reakční směs byla zahřívána na olejové lázni při teplotě 155° C po dobu 15 hodin pod ochranou atmosférou dusíku. Průběh reakce byl kontrolován pomocí tenkovrstvé chromatografie. Po skončení reakce byla směs zfiltrována a po ochlazení byla k filtrátu přidána voda. Surový produkt byl ponechán v chladu krystalovat. Produkt byl opakovaně čištěn ze směsi ethanol-voda.

Výtěžek reakce: 27,74 g (80%)

Teplota tání produktu: 58,2 - 61,5 °C

Byla naměřena IČ a NMR spektra: IČ JK 1, NMR JK 1a, NMR JK 1b

# IČ spektrum JK -1: hexadecyl(4-methyl-2-nitrofenyl)sulfid

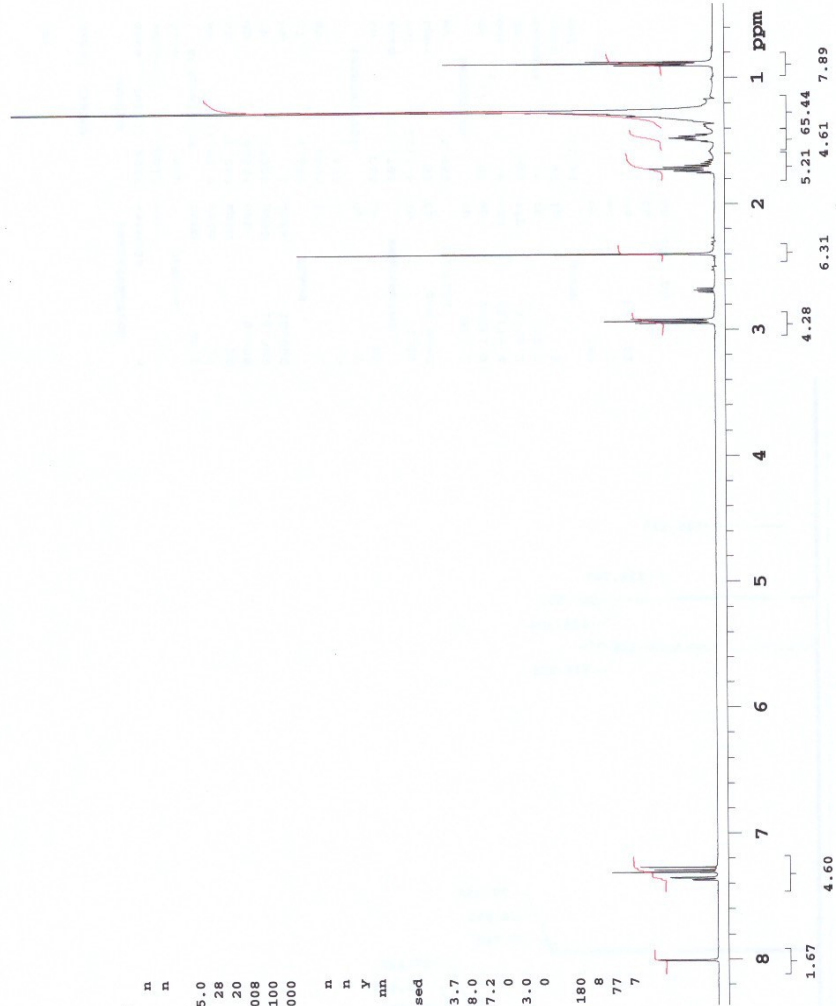


<sup>1</sup>H NMR spektrum JK 1a: hexadecyl(4-methyl-2-nitrofenyl)sulfid

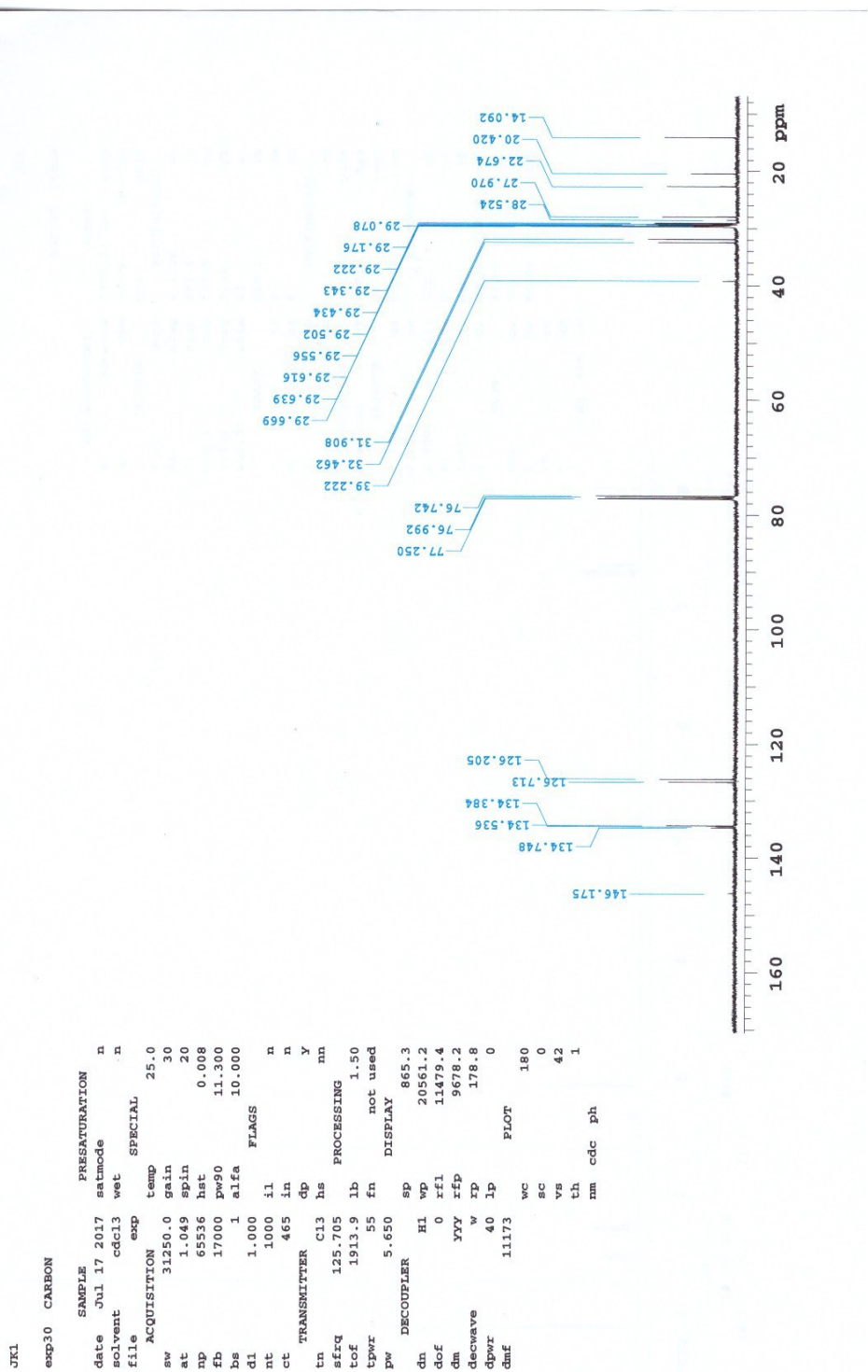
JK1  
exp30 PROTON

```

SAMPLE          PRESATURATION
date Jul 17 2017 satmode n
solvent cdcl3 wet n
file           exp SPECIAL
ACQUISITION    temp 25.0
sw 8012.8 gain 28
at 2.045 spin 20
pd 32768 hst 0.008
zb 4000 pw90 9.100
bs 32 alfa 10.000
dl 1.000
nt 8 il n
ct 8 in n
      dp y
      tn hs PROCESSING nn
sfrq 499.866
tof 499.9 fn not used
tpwr 60 DISPLAY
pw 4.550 sp 203.7
DECOUPLER C13 rfl 3978.0
dn 0 xfp 1007.2
dof 0
dm nnn fp 173.0
decwave W40_OneNMR- lp 0
      _W018 PLOT
dpwr 37 wc 180
dmf 32258 sc 8
      vs 77
      th ai cdc ph 7
    
```

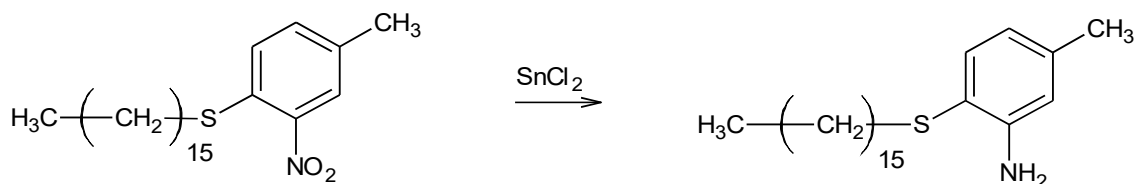


<sup>13</sup>C NMR spektrum JK 1b: hexadecyl(4-methyl-2-nitrofenyl)sulfid



### 3.3. Příprava 2-(hexadecylsulfanyl)-5-methylanilinu

Molární hmotnost: 363,65 g/mol



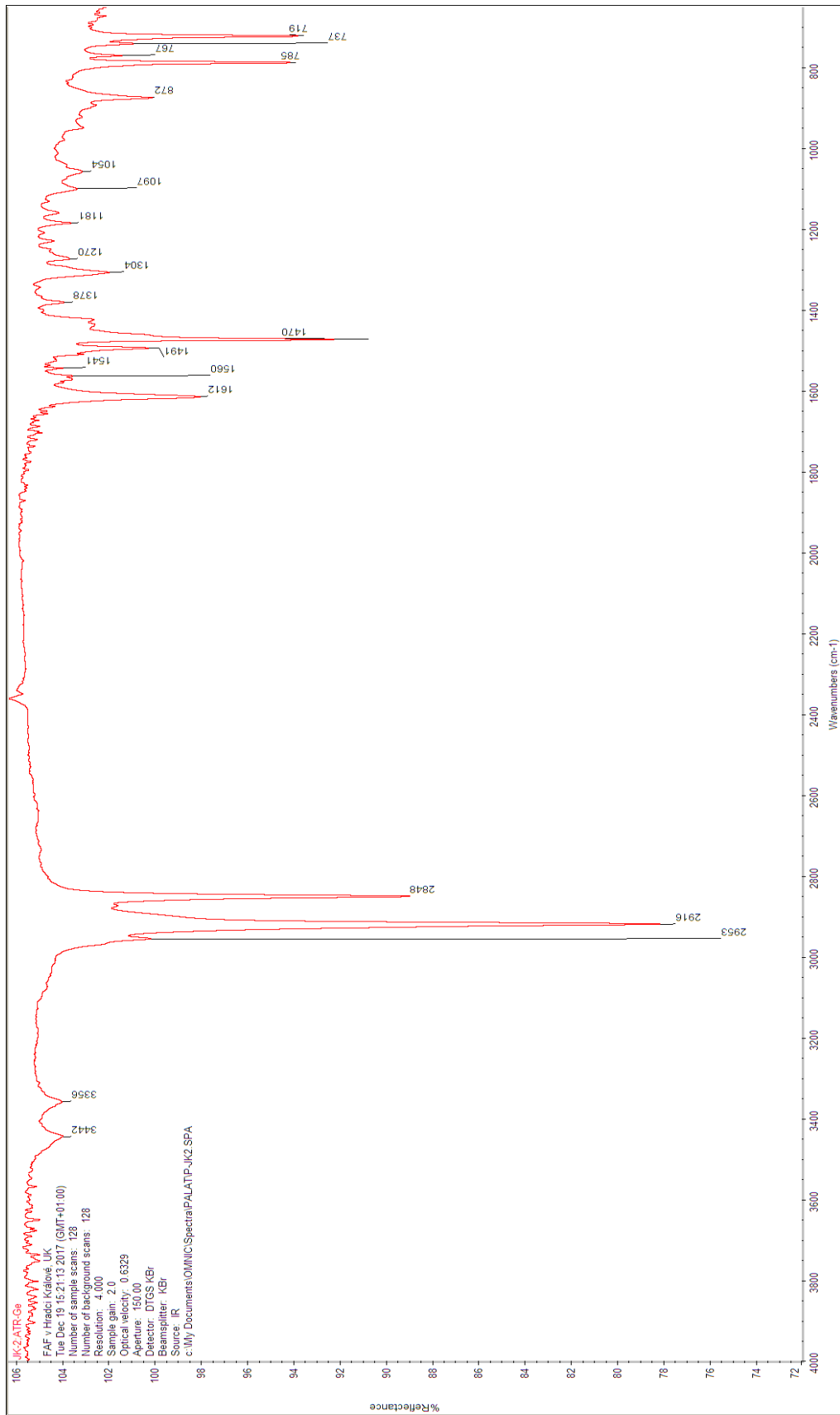
K 10,00 g (0,025 mol) hexadecyl(4-methyl-2-nitrofenyl)sulfidu bylo přidáno 28,65 g (0,127 mol) dihydrátu chloridu cínatého a 101 ml ethanolu. Reakční směs byla zahřívána při teplotě 70° C po dobu 4 hodin pod ochranou atmosférou dusíku. Průběh reakce byl kontrolován tenkovrstvou chromatografií. Po ochlazení byla reakční směs zalkalizována 10% roztokem hydroxidu sodného. Následně byla směs třikrát vytřepána do ethyl-acetátu. Organické fáze byly vysušeny bezvodým síranem sodným. Po přefiltrování bylo rozpouštědlo oddestilováno a produkt byl přečištěn z ethanolu.

Výtěžek reakce: 9,24 g (87%)

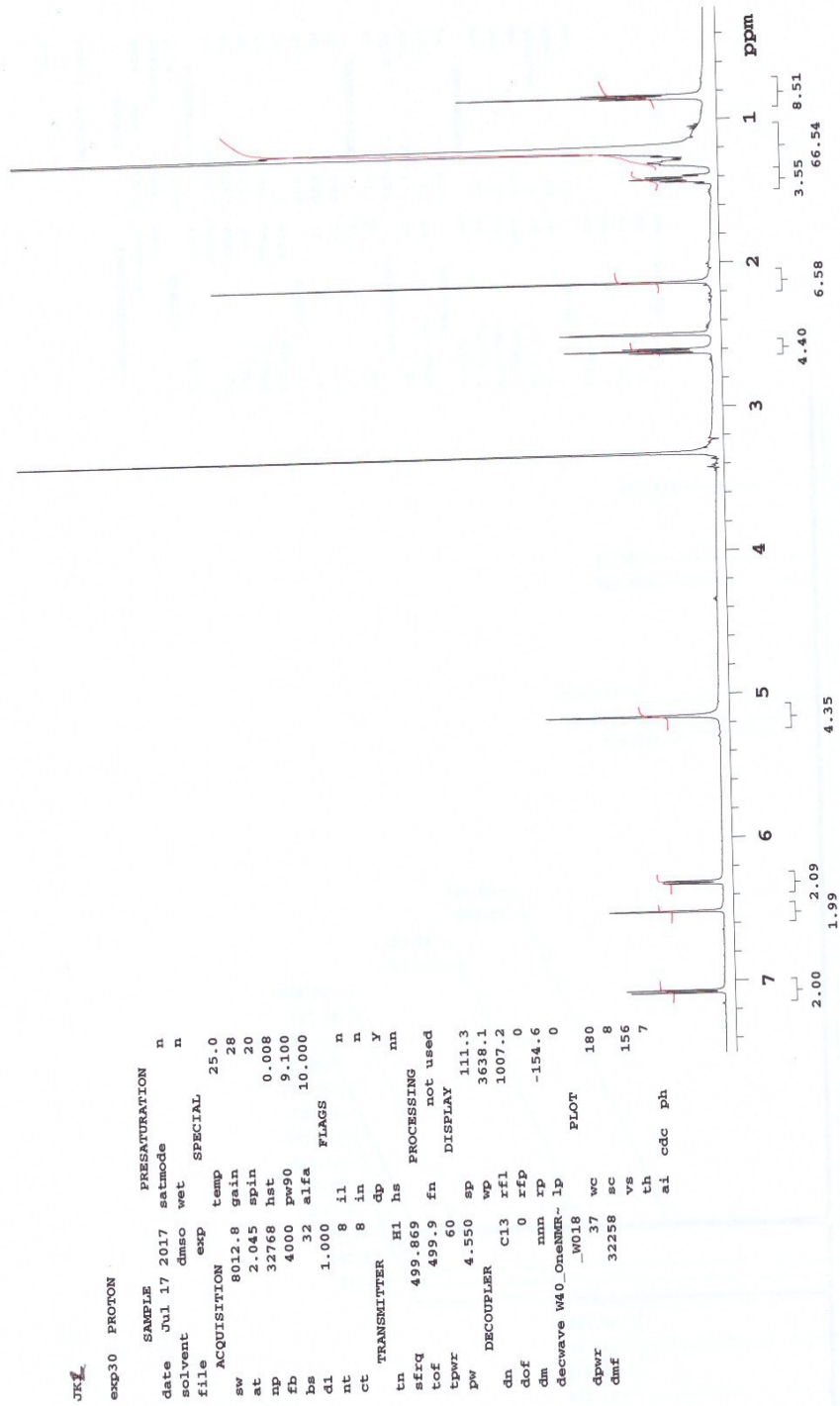
Teplota tání produktu: 32,0 – 32,5 °C

Byla naměřena IČ a NMR spektra: IČ JK 2, NMR JK 2a, NMR JK 2b

IČ spektrum JK -2: 2-(hexadecylsulfanyl)-5-methylanilin

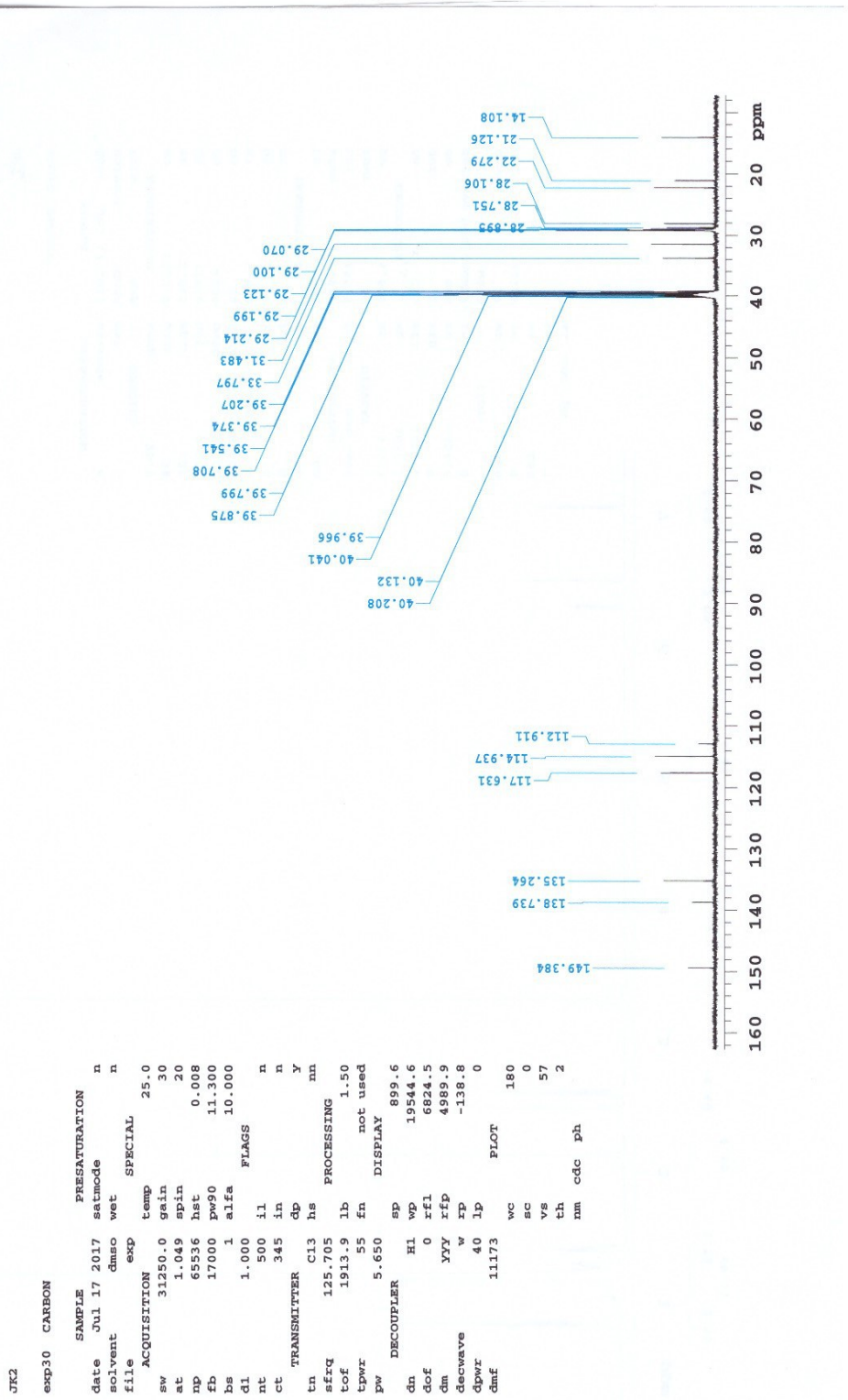


<sup>1</sup>H NMR spektrum JK 2a: 2-(hexadecylsulfanyl)-5-methylanilin



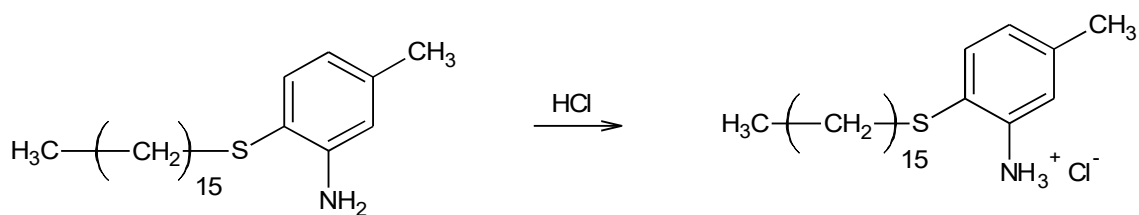


<sup>13</sup>C NMR spektrum JK 2b: 2-(hexadecylsulfanyl)-5-methylanilin



### 3.4. Příprava 2-(hexadecylsulfanyl)-5-methylanilinium-chloridu

Molární hmotnost: 400,103 g/mol

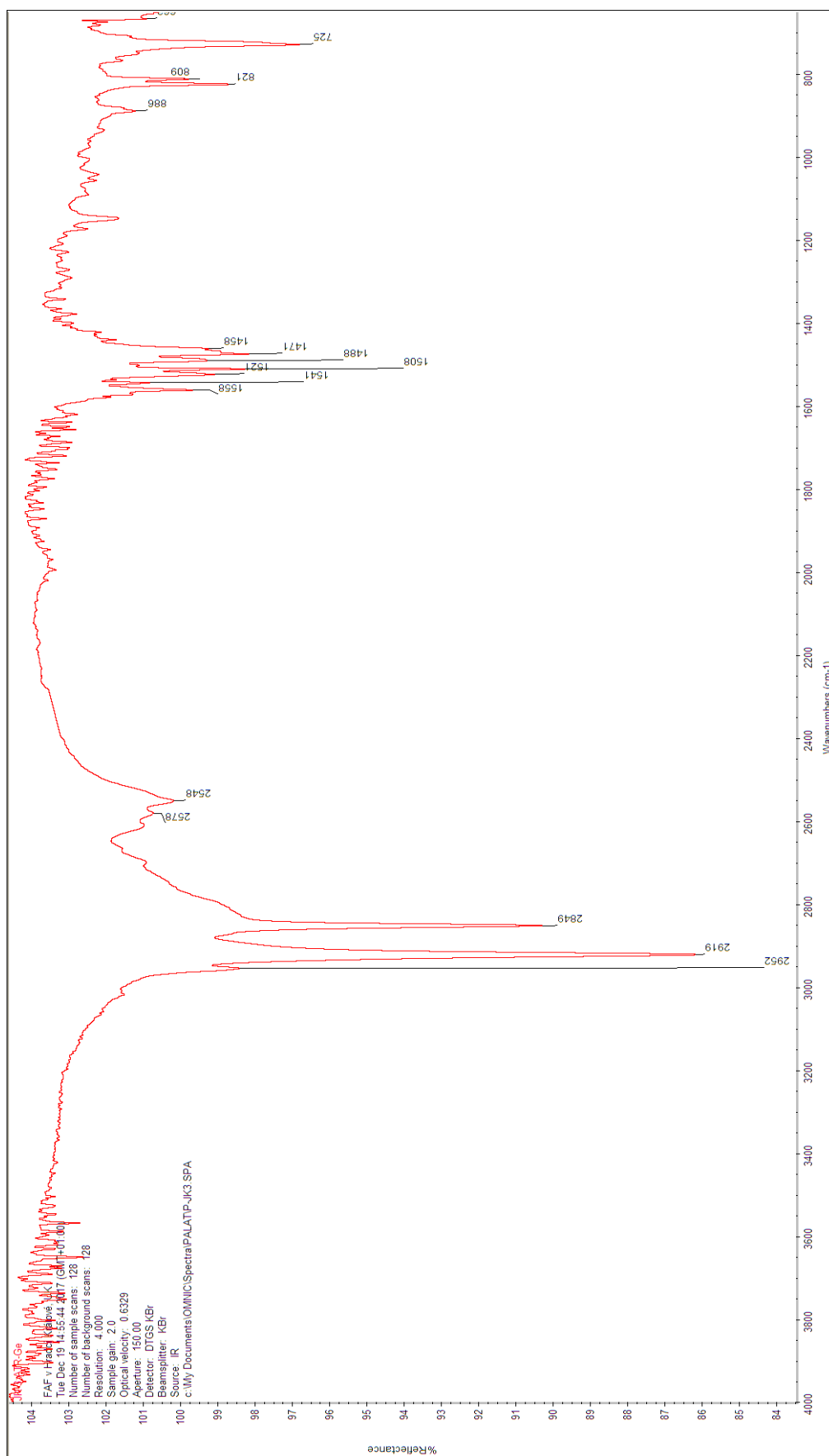


5,00 g (0,014 mol) 2-(hexadecylsulfanyl)-5-methylanilinu bylo rozpuštěno v 60 ml suchého diethyletheru za chlazení v ledové lázni, následně byla směs sycena plynným chlorovodíkem. Směs byla nechána v chladu krystalovat. Vzniklý produkt byl vakuově odfiltrován a použit do další reakce.

Výtěžek: 5,27 g (96%)

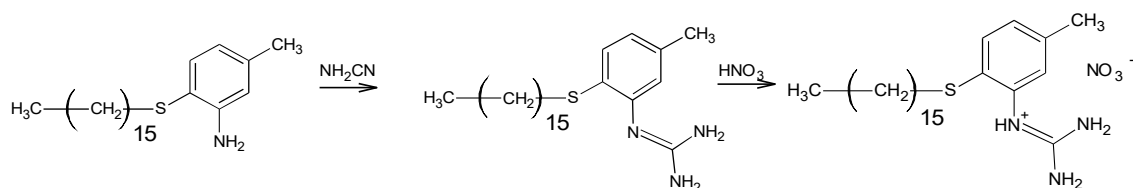
Bylo naměřeno IČ spektrum: IČ JK 3

IČ spektrum JK -3: 2-(hexadecylsulfanyl)-5-methylanilinium-chlorid



### 3.5. Příprava 2-[2-(hexadecylsulfanyl)-5-methylfenyl]guanidinium-nitratu

Molární hmotnost: 468,61 g/mol



0,14 g ( $3,5 \cdot 10^{-4}$  mol) 2-(hexadecylsulfanyl)-5-methylanilinium-chloridu bylo smícháno s 0,0175 g ( $4,22 \cdot 10^{-4}$  mol) kyanamidu při laboratorní teplotě. Směs byla poté zahřívána po dobu 45 minut při teplotě  $120^\circ\text{C}$ . Průběh reakce byl kontrolován tenkovrstvou chromatografií. Po ochlazení byla tavenina rozpuštěna v teplé vodě. Následně byla okyselena kyselinou dusičnou do kyselé reakce a byla ponechána v chladu krystalovat. Krystaly byly vakuově odfiltrovány a opakovaně čištěny ze směsi ethanol-voda.

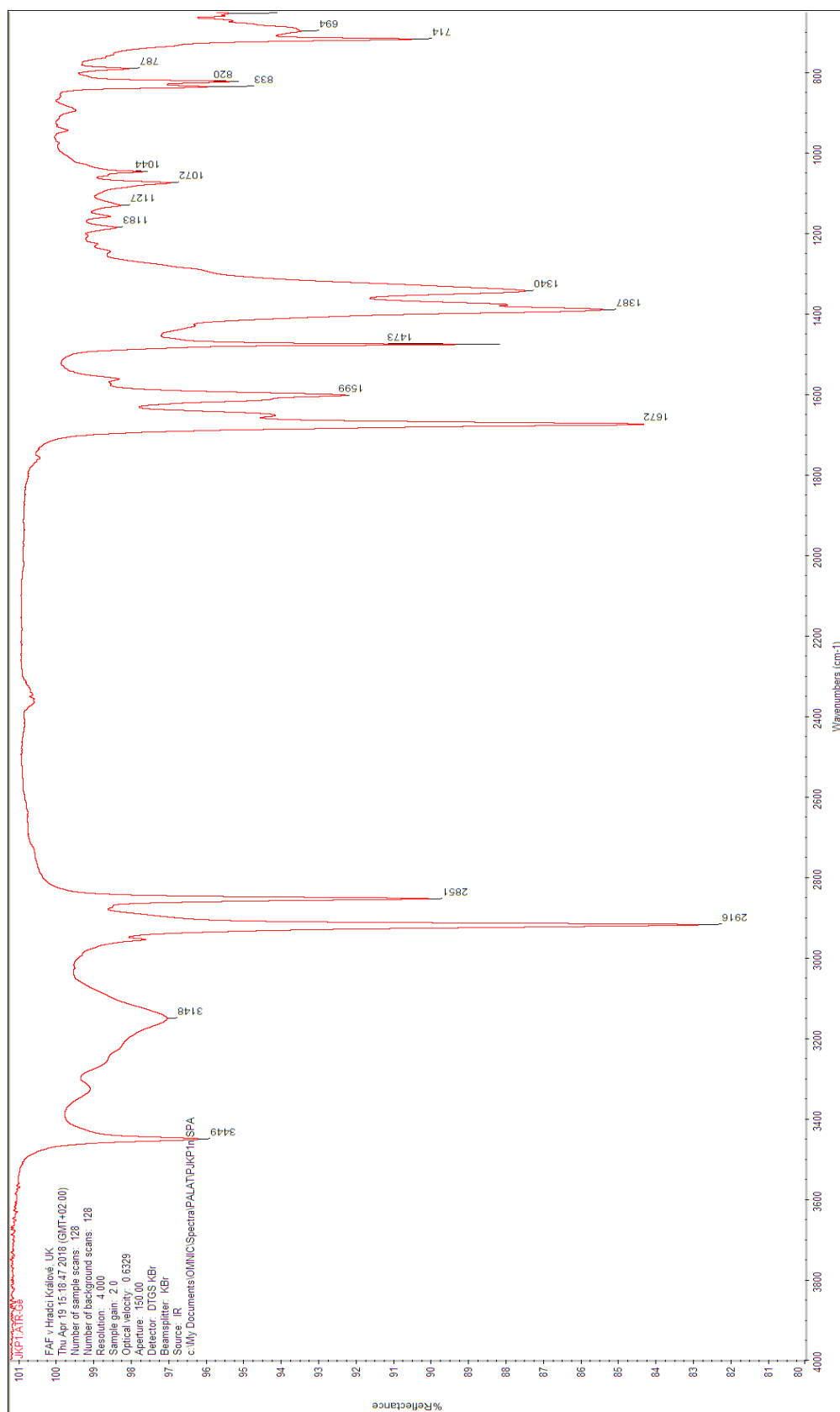
Výtěžek: 0,07 g (44%)

Teplota tání:  $56,4 - 59,5^\circ\text{C}$

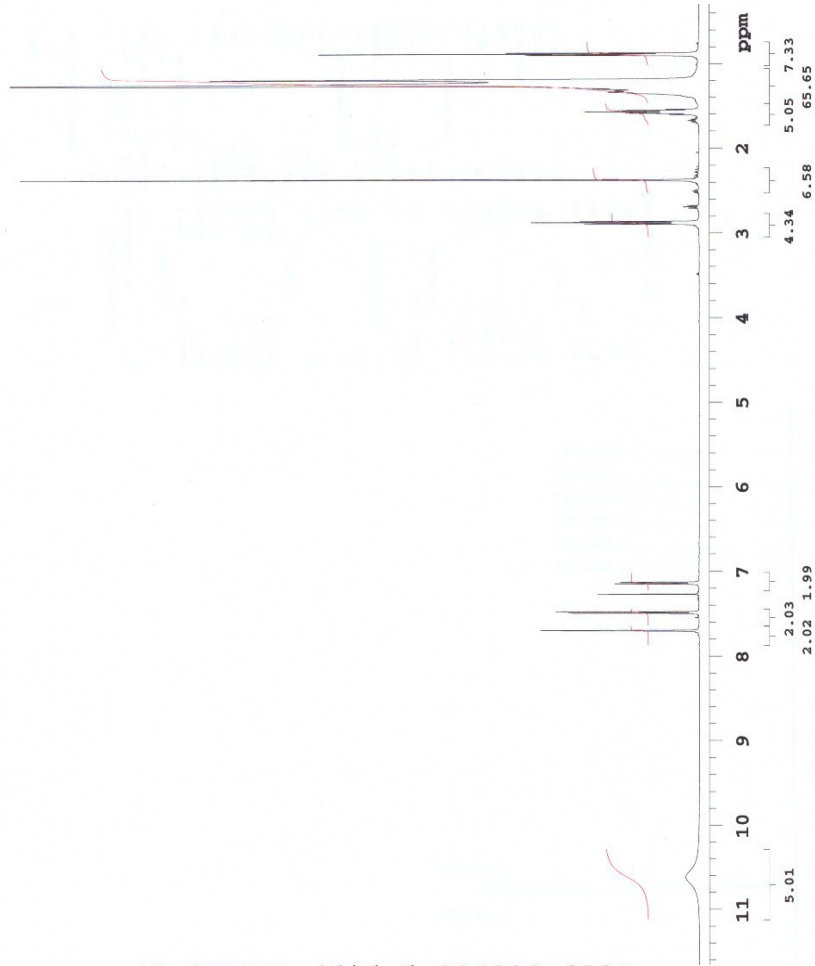
Byla změřena IČ, NMR a hmotnostní spektra: IČ JK P1, NMR JK P1a, NMR JK P1b, LRMS JKP1

LRMS(ESI)  $m/z$  406,4  $[\text{M}+\text{H}]^+$

IČ spektrum JK -P1: 2-[2-(hexadecylsulfanyl)-5-methylfenyl]guanidinium-nitrat



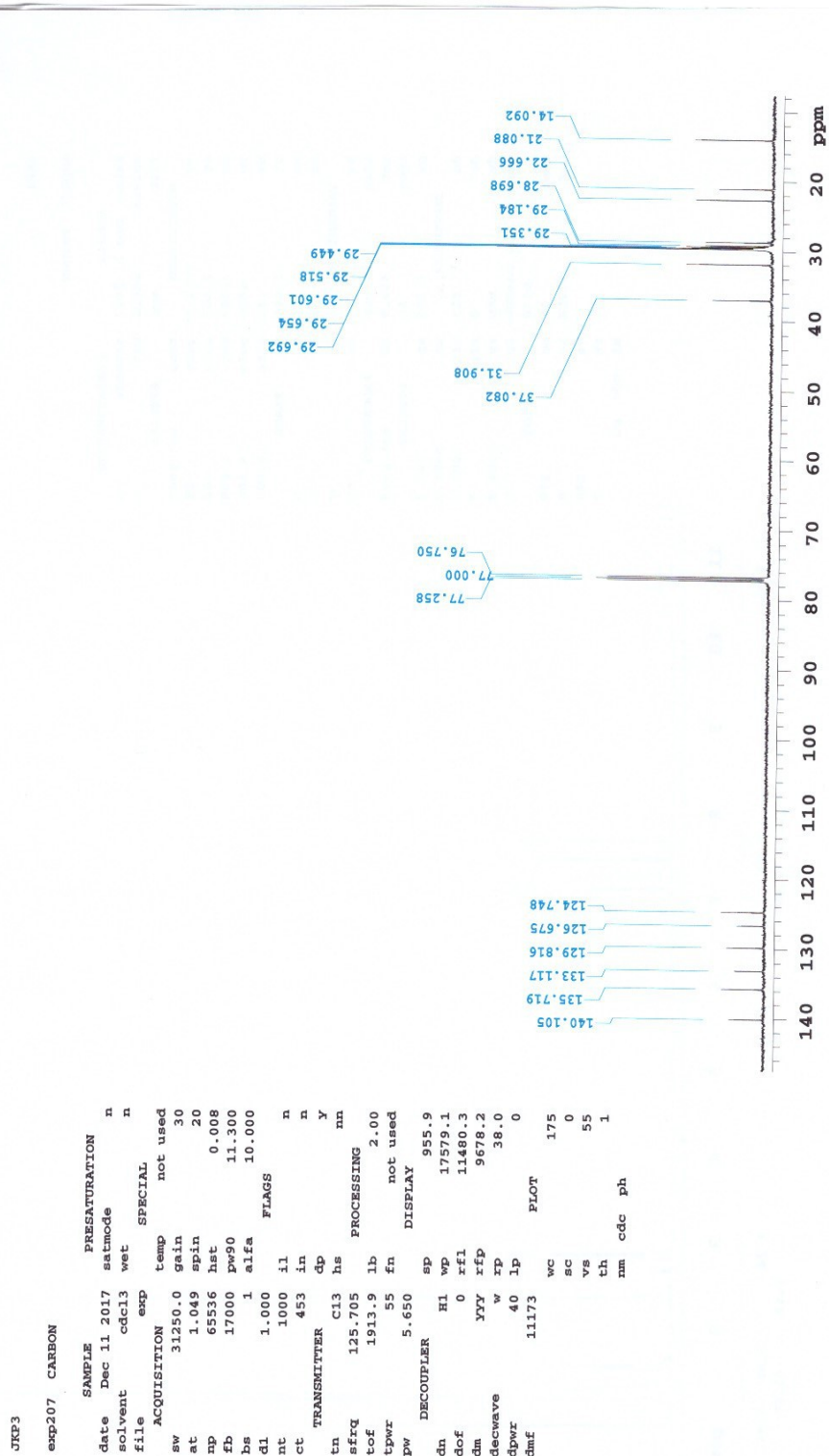
<sup>1</sup>H NMR spektrum JK P1a: 2-[2-(hexadecylsulfanyl)-5-methylfenyl]guanidinium-nitrat



```

JKP3
exp207 PROTON
SAMPLE PREPARATION
date Dec 11 2017 satmode n
solvent cdcl3 wet
file exp SPECIAL
ACQUISITION temp not used
sv 8012.8 gain 28
at 2.045 spin 20
np 32768 hst 0.008
fb 4000 pw90 9.100
di 1.000 32 alfa 10.000
nt 8 il n
ct 8 in n
TRANSMITTER dp y
tn H1 hs
sfrq 499.866 hs PROCESSING
tof 499.9 fn not used
tpwr 60 DISPLAY
pw 4.550 SP 147.0
DECOUPLER wp 5678.0
dn C13 rf1 1007.2
dof 0 rfp 0
dm man fp -121.9
Decwave W40_OneMKR-1p PLOT
dpwr 37 wc 175
dmf 32258 sc 8
vs 149
th ai cdc ph
  
```

<sup>13</sup>C NMR spektrum JK P1b: 2-[2-(hexadecylsulfanyl)-5-methylfenyl]guanidinium-nitrat

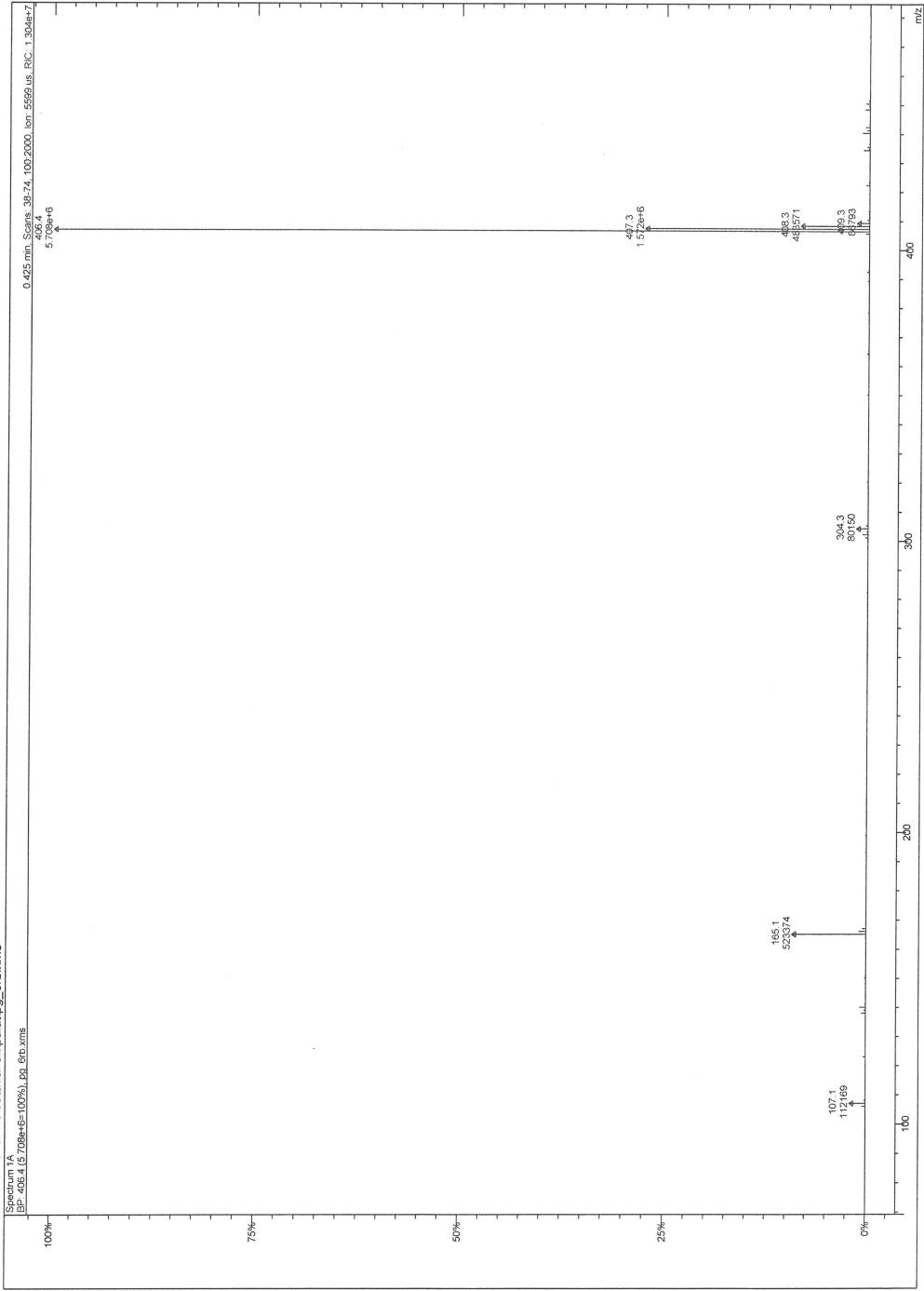


LRMS JK P1: 2-[2-(hexadecylsulfanyl)-5-methylfenyl]guanidinum-nitrat

Print Date: 28 Jun 2018 13:48:20

Spectrum Plot - 6/28/2018 1:48 PM

1 A Scan 56 from c:\varian\sw\data\af uk\paia\pg\_6rb.xml

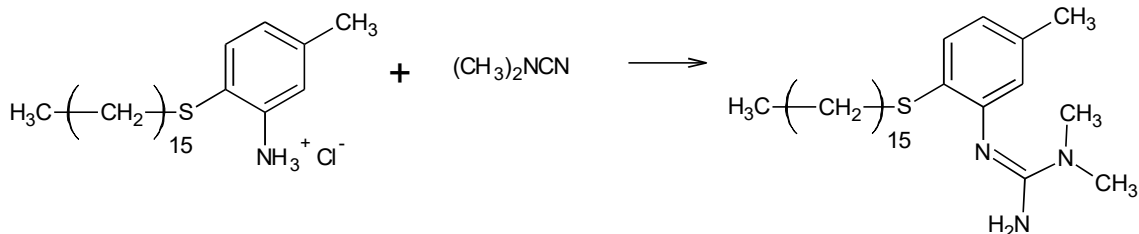


0%



### 3.6. Příprava 2-[2-(hexadecylsulfanyl)-5-methylfenyl]-1,1-dimethylguanidinu

Molární hmotnost: 433,68 g/mol



2,03 g (0,005 mol) 2-(hexadecylsulfanyl)-5-methylanilinium-chloridu bylo smícháno s 0,61 ml (0,0057 mol) dimethylcyanamidu při laboratorní teplotě. Směs byla dále zahřívána po dobu 45 minut při teplotě 120°C. Průběh reakce byl kontrolován tenkovrstvou chromatografií. Po ochlazení byla vzniklá hmota rozpuštěna ve vodě a zalkalizována 10% roztokem hydroxidu sodného. Směs byla pětikrát vytřepána do ethyl-acetátu. Spojené organické fáze byly vysušeny bezvodým síranem sodným a vakuově oddestilovány. Surový produkt byl opakovaně čištěn krystalizací z hexanu.

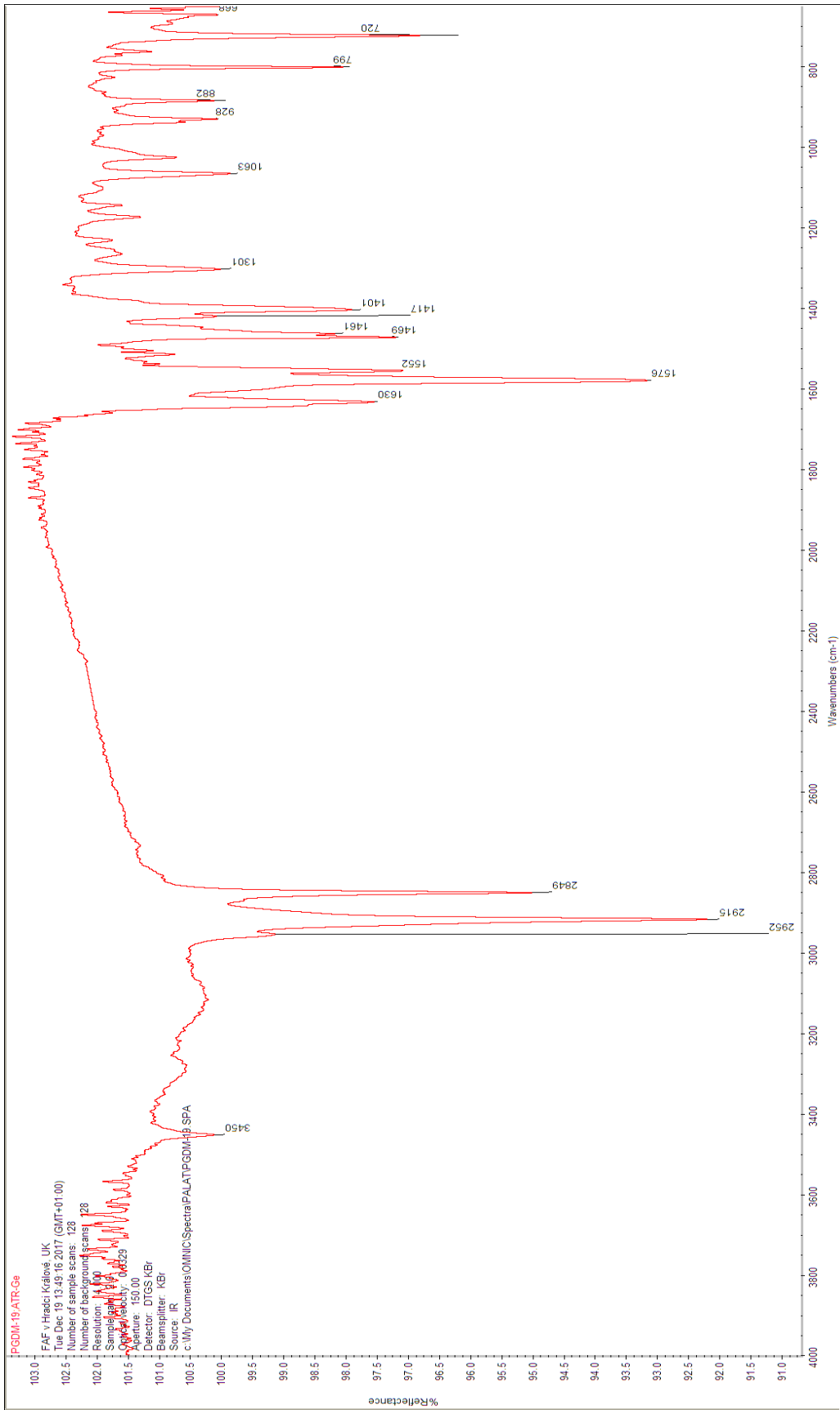
Výtěžek: 1,06 g (42%)

Teplota tání: 58,8 – 59,1°C

Byla změřena IČ a NMR a hmotnostní spektra: IČ JK P2, NMR JK P2a, NMR JK P2b, LRMS JK P2

LRMS (ESI) m/z 434,7 [M+H]<sup>+</sup>

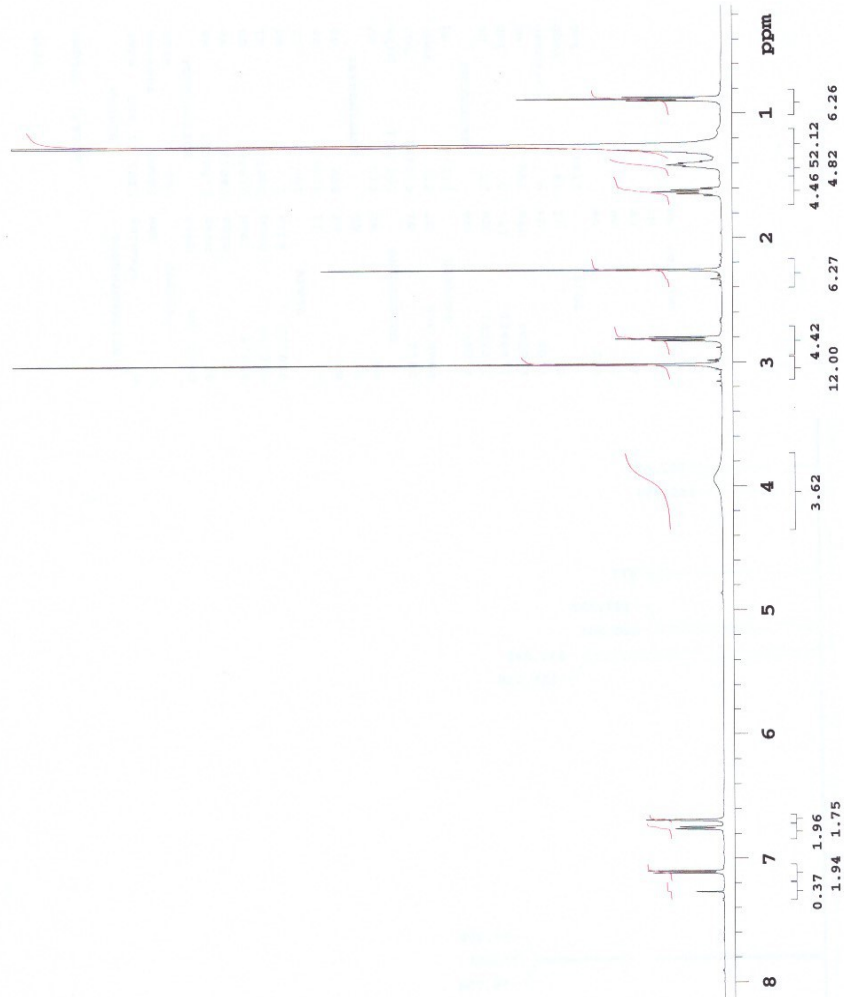
IČ spektrum JK -P2: 2-[2-(hexadecylsulfanyl)-5-methylfenyl]-1,1-dimethylguanidin



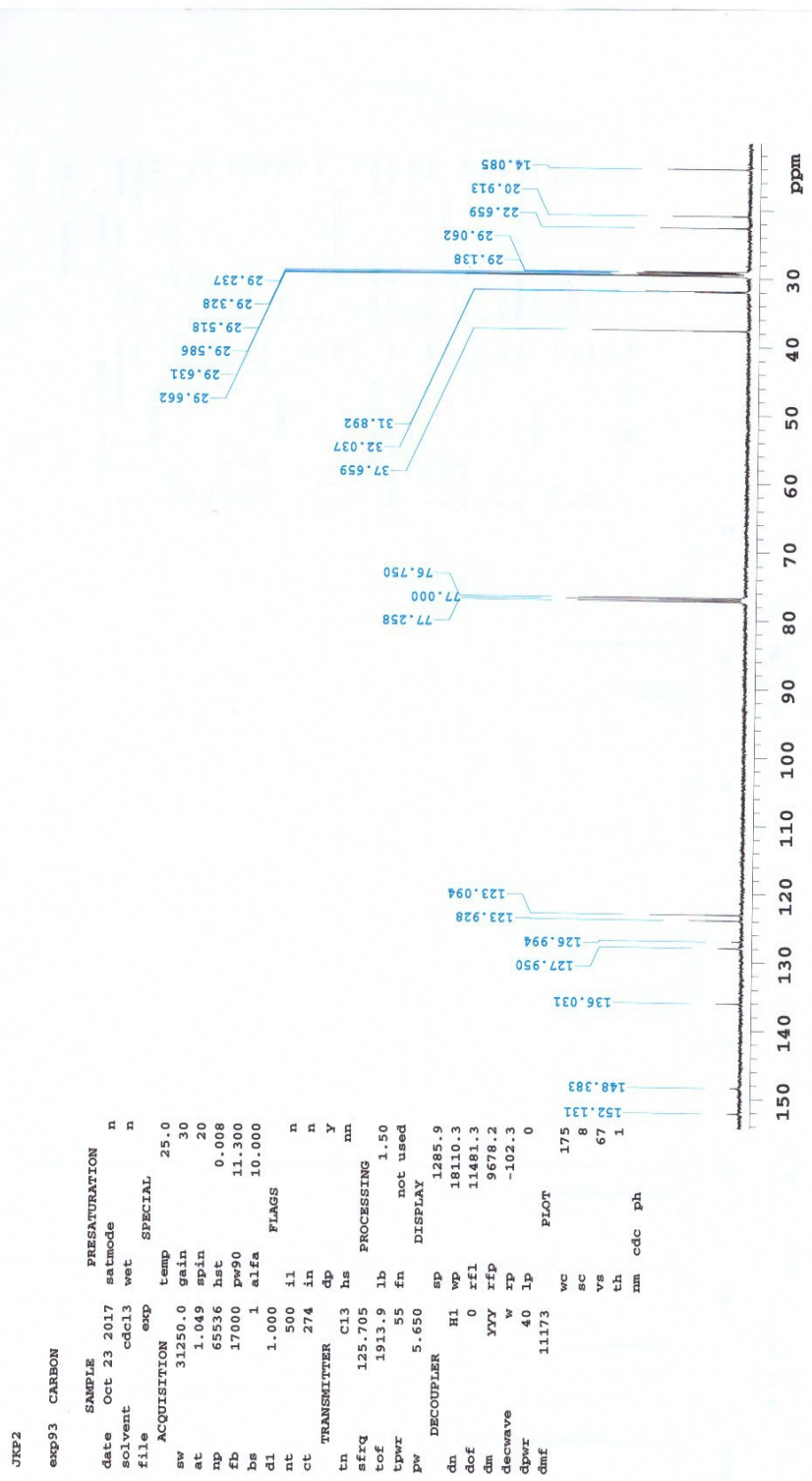
<sup>1</sup>H NMR spektrum JK P2a: 2-[2-(hexadecylsulfanyl)-5-methylfenyl]-1,1-dimethylguanidin

```

JKF2
exp207 PROTON
SAMPLE PRESATURATION
date Dec 11 2017 satmode n
solvent cdcl3 wet n
file exp SPECIAL
ACQUISITION temp not used
sw 8012.8 gain 22
at 2.045 spin 20
np 32768 hst 0.008
fb 4000 pw90 9.100
d1 1.000 32 alfa 10.000
nt 8 il n
ct 8 in n
TRANSMITTER HI Y
tn HI hs mn
sfrq 499.866 PROCESSING
tof 499.9 fn not used
tpwr 60 DISPLAY
pw 4.550 SP 61.9
DECOUPLER W9 4032.3
dn C13 rfl 1007.2
dof 0 rfp 0
dm nnn xp -119.6
decwave W40_OneNMR- lp 0
PLOT
dpwr 37 WC 175
dmf 32258 SC 8
vs 93
th ai cdc ph 7
    
```



<sup>13</sup>C NMR spektrum JK P2b: 2-[2-(hexadecylsulfanyl)-5-methylfenyl]-1,1-dimethylguanidin

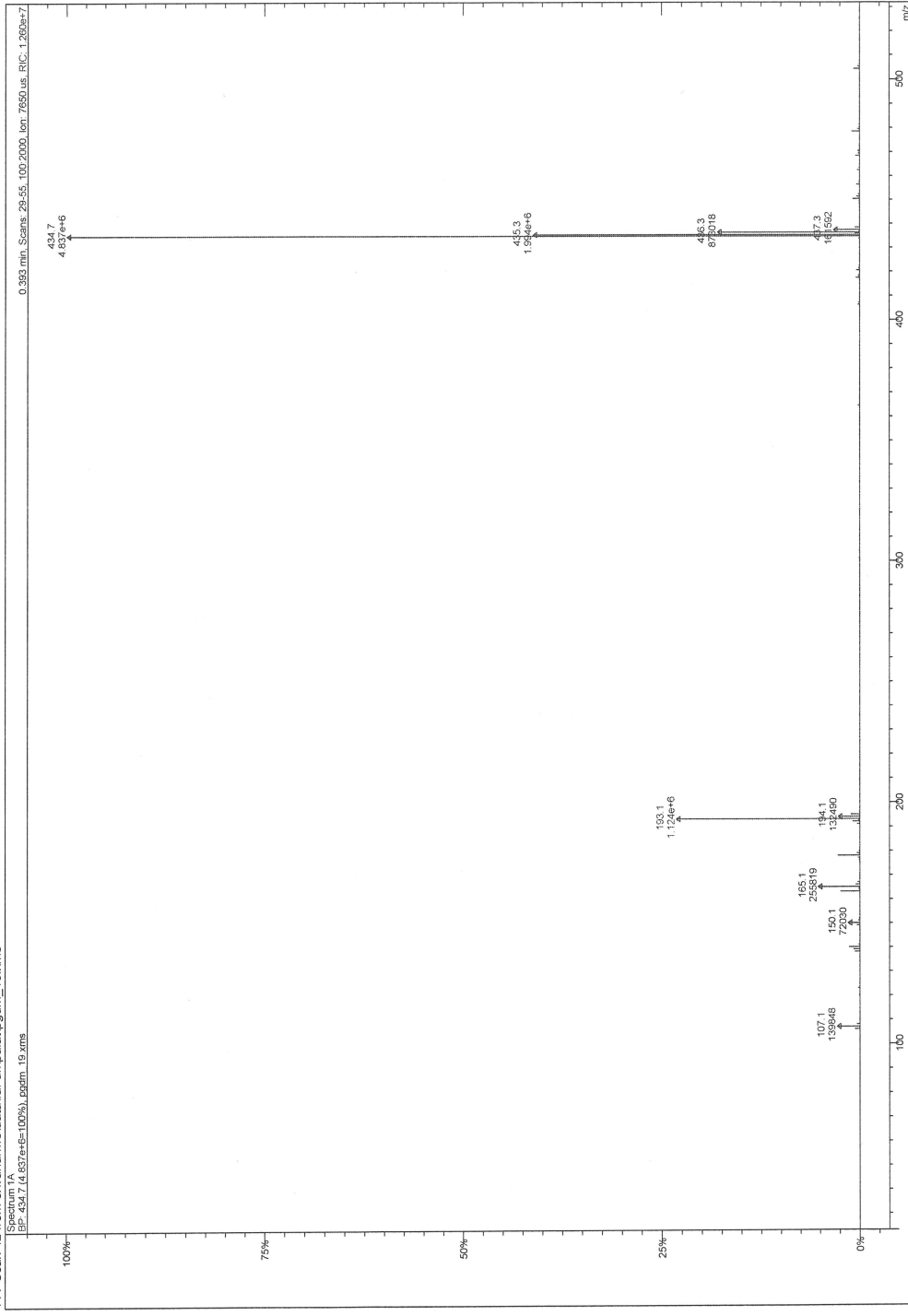


LRMS JK P2: 2-[2-(hexadecylsulfanyl)-5-methylphenyl]-1,1-dimethylguanidin

Print Date: 27 Jun 2018 16:05:47

Spectrum Plot - 6/27/2018 4:05 PM

1 A Scan 42 from c:\varian\sw\data\lari uk\palat\logdm\_19.xml



Agilent

## 4. DISKUSE

Prvním krokem syntézy byla reakce hexandekanthiolu s 4-chlor-3-nitrotoluenem. Vzniklý hexadecyl(4-methyl-2-nitrofenyl)sulfid byl nasyntetizován ve výtěžku 80%. Produkt byl několikrát čištěn krystalizací ze směsi ethanol-voda. Čistota byla kontrolována pomocí tenkovrstvé chromatografie a teplotou tání.

Druhým krokem byla redukce nitroskupiny na aminoskupinu. Reakce probíhala bez potíží ve výtěžcích kolem 86%.

Dalším krokem byl převod aminu na amoniovou sůl. Reakce byla prováděna sycením plynným chlorovodíkem za chlazení v ledové lázni. Výtěžky reakce byly vysoké-96%.

Posledním krokem syntézy byla reakce amoniové soli s kyanamidem nebo dimethylkyanamidem. Výtěžky reakcí byly nižší kolem 43%. Průběh reakcí byl kontrolován tenkovrstvou chromatografií. Problémy u nemethylovaných guanidinů nastaly při rekrystalizaci, kde jsme potřebovali najít vhodné rozpouštědlo. Vysledný nemethylovaný guanidin byl rozpuštěn ve směsi ethanol-voda a okyselen několika kapkami kyseliny dusičné. Nižší výtěžky mohly být způsobené též opakovanou krystalizací. Dimethylovaný guanidin byl izolován odlišným způsobem. Surový produkt dispergovaný ve vodě byl zalkalizován roztokem hydroxidu sodného a následně byl několikrát vytřepán do ethyl-acetátu. Po vysušení roztoku a odpaření rozpouštědla na vakuové odparce byly získány krystaly, které byly opakovaně přečištěny krystalizací z hexanu. Tento postup mohl způsobit nižší výtěžek.

Látka 2-[2-(hexadecylsulfanyl)-5-methylfenyl]-1,1-dimethylguanidin byla na katedře biologických a lékařských věd na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové testována na antifungální a antimikrobiální aktivitu. Bylo zjištěno, že tato látka má antimikrobní účinek proti *Staphylococcus aureus* (MIC/IC<sub>95</sub> za 24h = 15,62 μmol/l; za 48h = 62,5 μmol/l), *Staphylococcus epidermidis* (MIC/IC<sub>95</sub> za 24h = 31,25 μmol/l; za 48h = 125 μmol/l) a *Enterococcus faecalis* (MIC/IC<sub>95</sub> za 24h = 31,25 μmol/l; za 48h = 125 μmol/l). Antifungální aktivita proti testovaným kmenům *Candida spp.*, *Aspergillus spp.*, *Absidia corimbifera* a *Trichophyton interdigitale* se neprokázala. Látka 2-[2-(hexadecylsulfanyl)-5-methylfenyl]guanidinum-nitrat byla taktéž poslána na testování na antifungální a antimikrobiální aktivitu. Tato látku se však nepodařilo rozpustit v DMSO, proto testování neproběhlo.

## 5. ZÁVĚR

V rámci této bakalářské práce bylo nasyntetizováno pět dosud v literatuře nepopsaných látek:

hexadecyl(4-methyl-2-nitrofenyl)sulfid

2-(hexadecylsulfanyl)-5-methylanilin

2-(hexadecylsulfanyl)-5-methylanilinium-chlorid

2-[2-(hexadecylsulfanyl)-5-methylfenyl]guanidinum-nitrat

2-[2-(hexadecylsulfanyl)-5-methylfenyl]-1,1-dimethylguanidin

## 6. POUŽITÁ LITERATURA

1. Buchta, V.; Slezák, R.; Špaček, J.; Košťálová, M.: Současné možnosti léčby kožních a slizničních mykóz, *Klin. Farmakol. Farm.* 2008, 22(2), 72-80.
2. Hanuš Rozsypal: Systémová antimykotika, *Klin. Farmakol. Farm.* 2008, 22(1), 40-44.
3. Braunerová, G.; Buchta, V.; Silva, L.; Kuneš, J.; Palát, K.: Synthesis and in vitro antifungal activity of 4-substitued phenylguanidinium salts, *Farmaco*, 2004, 59 (6), 443-450.
4. Sączewski, F.; Balewski, L.: Biological activities of guanidine compounds, 2008 – 2012 update, *Expert Opin. Ther. Patents*, 2013, 23(8), 965-995.
5. 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., *J. Med. Chem.*, 2009, 52(53), 7376-7379.
6. Lamb, G.: Dodecylguanidine salts as fruit-tree fungicides, *US Pat.* 2867562.
7. Mo, S.; Kronic, A.; Pegan, S. D.; Franzblau, S.G.; Orjala, J.; D'arrezzo, S.; Visca, P.: An antimicrobial guanidine-bearing sesterpene from the cultured cyanobacterium *Scytonema* sp., *J. Nat. Prod.*, 2009, 72 (11), 2043-2045.
8. 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., *J. Chem. Inf. Model.*, 2013, 53 (3), 649-660.
9. Patel D., Kumari P., Patel N.B.: In vitro antimicrobial and antimycobacterial activity of some chalcones and their derivatives., *Med. Chem. Res.*, 2013, 22, 726-744.
10. Choi H., Kim K. J., Lee D. G.: Antifungal activity of the cationic antimicrobial polymer-polyhexamethylene guanidine hydrochloride and its mode of action., *Fungal Biol.*, 2017, 121, 53-60.
11. Shuimu Lin, Wan Ling Wendy Sin, Jun-Jie Koh, Fanghui Lim, Lin Wang, Derong Cao, Roger W. Beuerman, Li Ren, Shouping Liu: Semisynthesis and Biological Evaluation of Xanthone Amphiphilics as Selective, Highly Potent Antifungal Agents to Combat Fungal Resistance., *J. Med. Chem.*, 2017, 60, 10135-10150.
12. McMurry J.: *Organická chemie*, Vutium, Brno 2004, s.655.



13. Červinka O., Dědek V., Ferles M.: Organická chemie. SNTL, Praha 1980, s.384.
14. M. Uher, K. Antos, P. Kristian, L. Drobica: Izotiokyanáty (XVIII) Syntéza a infračervené spektrá (p-izotiokyanátofenyl)-alkylsulfidov a (p-izotiokyanátofenyl)alkylsulfónov, Chem. Zvesti 1967, 21, 44-56.
15. H. Becker a kol.: Organická syntéza (Organikum). Academia, Praha 1971, s.546.
16. Bellamy, F. D.; Ou, K.: Selective reduction of aromatic nitro compounds with stannous chloride in non acidic and non aqueous medium, Tetrahedron Lett., 1984, 25(8), 839.
17. Palát K., Ješina V., Dušek V., Vrba Č.: Studies on local anesthetics. XXV. Basic esters of diphenylcarbamic acids, II, Českoslov. Farm., 1959, 8, 569.
18. Shaw, Julian W.; Grayson, David H.; Rozas, Isabel ;:Cleavage of 2-(Arylamino)-4,6-dimethoxypyrimidines To Yield Arylguanidines, Eur. J. Org. Chem., 2014, 3565–3569.
19. Kiselev, L. A.; Shvetsova-Shilovskaya, K. D.; Khanina, L. N.; Meľnikov, N. N.: Organic insectofungicides. II. Derivatives of guanidine., Zh. Org. Khim., 1968, 4(3), 469.
20. R.H. McKee: On the oxygen ethers of urea, Am. Chem. J., 1901, 26, 209-264.
21. Goldin, Stanley M.; Fischer, James B.; Knapp, Andrew Gannett; Reddy, N. Laxma; Berlove, David; Durant, Graham J.; Katragadda, Subbarao; Hu, Lain-yen; Magar, Sharad; Fan, Wenhong; et al.: Therapeutic guanidines, U.S. (2001), US 6288123.