

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

J. Dvořák

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

Katedra anorganické a organické chemie



Vývoj nové skupiny potenciálních antituberkulotik

Rigorózní práce

Hradec Králové 2007

Hana Divišová

ABSTRACT V této rigorózní práci byly řešeny tři problémy. a) Syntéza a antimykobakteriální aktivity nových halogenovaných salicylanilidů substituovaných v poloze 4' rozvětveným alkylem. b) Syntéza a antimykobakteriální aktivita nových halogenovaných 3-(4-alkylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4-(3H)-dionů. c) Vliv záměny oxo skupiny za thioxo skupinu v předchozí skupině látek.

a) Bylo syntetizováno 8 halogenovaných derivátů 4'-alkylsalicylanilidů s rozvětveným alkylovým řetězcem. Tyto látky byly hodnoceny *in vitro* na antimykobakteriální aktivitu vůči *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium kansasii* a *Mycobacterium avium*.

b) Dále bylo syntetizováno 7 nových halogenovaných derivátů benzoxazindionů s rozvětveným řetězcem reakcí salicylanilidu s metylchlorformiátem. Antimykobakteriální aktivita syntetizovaných látek byla hodnocena vůči třem rozdílným kmenům mykobakterií. Nejúčinnější látkou této série byl 7-chlor-3-(4-*sek*-butylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4-(3H)-dion.

c) Dále byly syntetizovány látky 7-chlor-3-(4-isopropylfenyl)-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazin-2(3H)-on, 6-brom-3-(4-isopropylfenyl)-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazin-2(3H)-on, 6-brom-3-(4-*sek*-butylfenyl)-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazin-2(3H)-on, 6-chlor-3-(4-*sek*-butylfenyl)-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazin-2(3H)-on, 7-chlor-3-(4-isopropylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dithion, 6-brom-3-(4-*sek*-butylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dithion, 6-brom-3-(4-isopropylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dithion, 6-chlor-3-(4-*sek*-butylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dithion. Tyto látky byly hodnoceny *in vitro* na antimykobakteriální aktivitu proti *M. tuberculosis*, *M. kansasii* (dvěma kmenům) a *M. avium*. 6-Brom-3-(4-isopropylfenyl)-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazin-2(3H)-on a 6-brom-3-(4-*sek*-butylfenyl)-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazin-2(3H)-on vykazovaly největší aktivitu proti *M. tuberculosis* ze všech studovaných skupin. Jako srovnávací látka byl zvolen INH. Náhrada oxo skupiny za thioxo skupinu v pozici 4 u 3-(4-alkylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dionů vedlo ke zvýšení antimykobakteriální aktivity proti *M. tuberculosis*.

ABSTRACT Three problems of antimycobacterial compounds were solved in the rigorous work: a) It was synthesis and antimycobacterial study of new halogenated 4'-alkylsalicylanilides with branched alkyl in position 4'. b) Synthesis and antimycobacterial activity of new halogenated 3-(4-alkylphenyl)-1,3-benzoxazin-2,4-(3H)-diones. c) Influence of the replacement the oxo group by thioxo group in the last series of compounds.

a) Eight halogenated 4'-alkylsalicylanilide with branched alkyl were synthesized on the basis of our previous results. The compounds were tested for *in vitro* antimycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium kansasii* and *Mycobacterium avium*.

b) Seven new halogenated 3-(4-alkylphenyl)-1,3-benzoxazin-2,4-(3H)-diones were synthesized by reaction of salicylanilides and methyl chloroformate based on our previous studies. All the compounds were screened *in vitro* against three different strains of *Mycobacterium*. One of the compounds, 7-chloro-3-(4-*sec*-butylphenyl)-1,3-benzoxazin-2,4-(3H)-dione (3b) proved to be most active compound of the series.

c) Furthermore the series of 7-chlor-3-(4-isopropylphenyl)-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazin-2(3H)-one, 6-brom-3-(4-isopropylphenyl)-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazin-2(3H)-one, 6-brom-3-(4-*sec*-butylphenyl)-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazin-2(3H)-one, 6-chlor-3-(4-*sec*-butylphenyl)-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazin-2(3H)-one, 7-chlor-3-(4-isopropylphenyl)-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dithione, 6-brom-3-(4-*sec*-butylphenyl)-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dithione, 6-brom-3-(4-isopropylphenyl)-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dithione, 6-chlor-3-(4-*sec*-butylphenyl)-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dithione was synthesized. Compounds exhibited *in vitro* activity against *M. tuberculosis*, *M. kansasii* (two stains) and *M. avium*. 6-Brom-3-(4-isopropylphenyl)-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazin-2(3H)-one and 6-brom-3-(4-*sec*-butylphenyl)-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazin-2(3H)-one and are the most active against *M. tuberculosis* from the groups under study. The activity is similar to INH.

The compounds under study have the broad spectrum of activity against potential pathogenic strains. Replacement of the oxo group by thioxo group in position 4 in the series of 3-(4-alkylphenyl)-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-diones led to improvement in the antimycobacterial activity against *M. tuberculosis*.

1. ÚVOD	1
2. CÍL PRÁCE	4
3. TEORETICKÁ ČÁST	6
4. METODICKÁ ČÁST	11
4.1. MOŽNOSTI PŘÍPRAVY	
<i>N</i> -ALKYLFENYL-HALOGENSALICYLAMIDŮ	12
4.2. MOŽNOSTI PŘÍPRAVY	
3-ALKYLFENYL-BENZOXAZIN-2,4-(3 <i>H</i>)-DIONŮ	13
4.3. MOŽNOSTI PŘÍPRAVY	
HALOGEN-3-ALKYLFENYL-4-THIOXO-2 <i>H</i> -1,3BENZOXAZIN-2 (3 <i>H</i>)-ONŮ A HALOGEN-3-ALKYLFENYL-1,3-BENZOXAZIN-2,4(3 <i>H</i>)- DITHIONŮ.....	16
5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	18
5.1. POSTUP PŘÍPRAVY	
<i>N</i> -(4-ALKYLFENYL)-HALOGENSALICYLAMIDŮ	19
5.2. POSTUP PŘÍPRAVY	
3-(4-ALKYLFENYL)-1,3-BENZOXAZIN-2,4-(3 <i>H</i>)-DIONŮ	19
5.3. POSTUP PŘÍPRAVY	
HALOGEN-3-ALKYLFENYL-4-THIOXO-2 <i>H</i> -1,3-BENZOXAZIN-2 (3 <i>H</i>)-ONŮ A HALOGEN-3-ALKYLFENYL-1,3-BENZOXAZIN-2,4(3 <i>H</i>)- DITHIONŮ.....	20
5.4. FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÉ VLASTNOSTI LÁTEK	20
5.5. HODNOCENÍ ANTIMYKOBAKTERIÁLNÍ AKTIVITY	21
5.6. SYNTÉZA ROZVĚTVENÝCH DERIVÁTŮ	
<i>N</i> -(4-ALKYLFENYL)-HALOGENSALICYLAMIDŮ	22
5.6.1. <i>N</i> -(4-isopropylfenyl)-4-chlorsalicylamid. (T5721)	22
5.6.2. <i>N</i> -(4-isopropylfenyl)-5-chlorsalicylamid (T5722)	23
5.6.3. <i>N</i> -(4-isopropylfenyl)-5-bromsalicylamid (T5723)	24
5.6.4. <i>N</i> -(4- <i>sek</i> -butylfenyl)-4-chlorsalicylamid (T5728).....	25
5.6.5. <i>N</i> -(4- <i>sek</i> -butylfenyl)-5-chlorsalicylamid (T5729).....	26

5.6.6. <i>N</i> -(4- <i>sek</i> -butylfenyl)-5-bromsalicylamid (T5730).....	27
5.6.7. <i>N</i> -(4- <i>terc</i> -butylfenyl)-4-chlorsalicylamid (T5508).....	28
5.6.8. <i>N</i> -(4- <i>terc</i> -butylfenyl)-5-chlorsalicylamid (T5512).....	29
5.7. SYNTÉZA ROZVĚTVENÝCH DERIVÁTŮ	
3-(4-ALKYLFENYL)-BENZOXAZIN-2,4-(3H)-DIONŮ	31
5.7.1. 6-Chlor-3-(4- <i>sek</i> -butylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (T5739) .	31
5.7.2. 7-Chlor-3-(4- <i>sek</i> -butylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (T5740)	32
5.7.3. 6-Brom-3-(4- <i>sek</i> -butylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (T5741)	33
5.7.4. 7-Chlor-3-(4-isopropylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (T5742).	34
5.7.5. 6-Chlor-3-(4-isopropylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (T5743).	35
5.7.6. 6-Chlor-3-(4- <i>terc</i> -butylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (T5573)	36
5.7.7. 7-Chlor-3-(4- <i>terc</i> -butylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (T5561)	37
5.8. SYNTÉZA ROZVĚTVENÝCH DERIVÁTŮ	
HALOGEN-3-(4-ALKYLFENYL)-4-THIOXO-2 <i>H</i> -1,3-BENZOXAZIN-2	
(3 <i>H</i>)-ONŮ A HALOGEN-3-(4-ALKYLFENYL)-1,3-BENZOXAZIN-	
2,4(3 <i>H</i>)-DITHIONŮ.....	39
5.8.1. 7-Chlor-3-(4-isopropylfenyl)-4-thioxo-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2 (3 <i>H</i>)-on	
(T6007)	39
5.8.2. 6-Brom-3-(4-isopropylfenyl)-4-thioxo-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2 (3 <i>H</i>)-on	
(T6009)	40
5.8.3. 6-Brom-3-(4- <i>sek</i> -butylfenyl)-4-thioxo-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2 (3 <i>H</i>)-on	
(T6011)	41
5.8.4. 6-Chlor-3-(4- <i>sek</i> -butylfenyl)-4-thioxo-2 <i>H</i> -1,3-benzoxazin-2 (3 <i>H</i>)-on	
(T6015)	42
5.8.5. 7-Chlor-3-(4-isopropylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4 (3 <i>H</i>)-dithion	
(T6008)	43
5.8.6. 6-Brom-3-(4-isopropylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4 (3 <i>H</i>)-dithion	
(T6010)	44
5.8.7. 6-brom-3-(4- <i>sek</i> -butylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4 (3 <i>H</i>)-dithion	
(T6012)	45
5.8.8. 6-chloro-3-(4- <i>sek</i> -butylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4 (3 <i>H</i>)-dithion	
(T6016)	46
6. VÝSLEDKY	48
7. DISKUZE	51
8. ZÁVĚR.....	54
9. POUŽITÁ LITERATURA.....	57
10. PŘÍLOHY	61

Za odborné vedení a poskytnutí cenných rad děkuji prof. RNDr. Karlu Waisserovi DrSc. a Mgr. Josefu Matykovi. Za měření NMR spekter jsem zavázána doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. Za měření IČ spekter děkuji paní Ivě Venkovské. Za měření antimykobakteriální aktivity vděčím MUDr. Jarmile Kaustové ze Zdravotního ústavu se sídlem v Ostravě. Za elementární analýzy jsem zavázána Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR.

1. ÚVOD

Tuberkulóza je onemocnění provázející člověka staletí, ale její původce mykobakterie popsal Robert Koch až v roce 1882.¹ Představovala hrozbu pro celé lidstvo, postihovala nejčastěji sociálně slabší, ale nevyhnula se ani dobře situovaným lidem. Mezi nejznámější, kteří byly sužováni touto chorobou, patří Karel Havlíček Borovský, Franz Kafka, Frederik Chopin a další.

Nejčastější formou přenosu tuberkulózy je vzdušná cesta (kapénkový přenos). Ne každý člověk však po kontaktu s nemocným musí nutně onemocnět, nemoc se projeví jen asi u 10 % k infekci vnímavých jedinců, u kterých se po různě dlouhé době rozvine aktivní tuberkulóza. Mnozí se ale stanou pouhými nosiči bez známek onemocnění, u nich při oslabení imunitního systému organismu, dojde k rozvoji choroby.

Mezi příznaky tohoto onemocnění patří bolest na hrudi, úbytek hmotnosti, unavenost, malátnost, poruchy spánku, noční pocení nebo pocení během odpoledního spánku, horečnaté stavy a dále kašel, který přetrvává déle než 3 týdny. Kašel je často s vykašláváním hlenového nebo hlenově-hnisavého sputa s příměsí krve. Onemocnění ale může probíhat i bezpříznakově.

Původce onemocnění nejčastěji *Mycobacterium tuberculosis* napadá většinou dýchací cesty nemocného, ale i jiné orgány. Tato mimoplicní tuberkulóza je méně častá. Prevence tohoto velice nakažlivého onemocnění je založena na aktivním vyhledávání, a následné léčbě infikovaných osob.

K základním diagnostickým vyšetřením je u plicní formy tuberkulózy rentgenologické vyšetření a dále novější zobrazovací techniky, jako je například počítačová tomografie. K odlišení tuberkulózy od jiných onemocnění, zejména od velmi častých nádorových změn plicní tkáně, se používá bronchoskopie. Rozhodujícím kritériem je bakteriologický průkaz původce onemocnění. Kultivace se provádí na agarových půdách², nebo v kapalné Šulově půdě. U části nemocných není tuberkulóza bakteriologicky

ověřená, mikroskopický nález i kultivace mykobakterií je negativní. U těchto pacientů je diagnóza stanovena na základě příznaků onemocnění.

V posledním desetiletí jsou kromě klasických metod využívány i nové metody urychlené detekce mykobakterií a metody průkazu nukleových kyselin mikroorganismů.

Pacienti jsou po dobu několika týdnů po stanovení diagnózy léčeni na lůžkové části plicní kliniky nebo ve specializované léčebně. Toto období je pro nemocného obtížné a náročné, protože je izolován od svého okolí a léčba je zdlouhavá. Léky, které se používají v terapiích tzv. antituberkulotika mají celou řadu vedlejších účinků, se kterými se musí pacient vyrovnat, protože úspěšnější léky zatím neexistují.

Nejúčinnějším léčebným režimem je šestiměsíční přímo kontrolovaná léčba. Během ní se po dobu 2 měsíců podávají antituberkulotika izoniazid, rifampicin, pyrazinamid a etambutol, v následující fázi pak izoniazid a rifampicin.

K recidivě tuberkulózy dochází u pacientů, kteří obtížnou životní situaci nezvládnou a léčbu přeruší. Toto přerušení může způsobit vznik rezistentních kmenů k preparátům používaných při léčbě. Dobře léčitelné onemocnění se tak stává nemocí jen obtížně zvládnutelnou chorobou. Léčba je pak obtížnější často neúspěšná, prognóza onemocnění je výrazně horší. Naše země je jako jediná z postkomunistických států zařazena do sféry nízkého výskytu tuberkulózy.

V ČR má výskyt onemocnění mírně klesající tendenci, relativně nejvyšší nemocnost je v nejvyšších věkových skupinách, nízká je u dětí a mladistvých. Českou republiku zatím výrazněji nepostihly ani nepříznivé vlivy migrace obyvatelstva po roce 1989, ani význačnější dopad infekce HIV a onemocnění AIDS, které byly příčinou vzestupu nebo stagnace tuberkulózy v některých západoevropských státech.

2. CÍL PRÁCE

Cílem mé práce bylo připravit látky, jejichž antimykobakteriální aktivita se blíží antimykobakteriální aktivitě izoniazidu, který je v současné době považován za jedno z nejúčinnějších antituberkulotik.

V pracovní skupině prof. Waissera mi byly svěřeny látky ze skupiny *N*-(4-alkylfenyl)halogensalicylamidů, 3-(4-alkylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4-(3*H*)-dionů a jejich sírné deriváty, konkrétně halogen-3-(4-alkylfenyl)-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazin-2 (3*H*)-onů a halogen-3-(4-alkylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithionů, protože v předchozích obdobích byl v pracovní skupině prof. Waissera nalezen poznatek, že zavedení skupiny thioxo- místo oxo- do struktury protituberkulózních benzoxazindionů vede k velkému zvýšení antimykobakteriální aktivity u těchto látek.^{3,4}

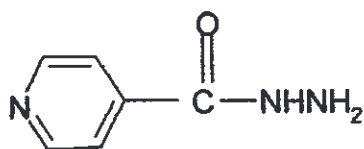
Z celého spektra těchto látek mi byly přiděleny látky s rozvětveným alkylovým řetězcem. Látky z této skupiny mají odlišný mechanismus účinku, než dosud známá antituberkulotika.⁵

Mým cílem byla syntéza těchto látek, potvrzení totožnosti, fyzikálně-chemických vlastností a odeslání na antimykobakteriální hodnocení na Krajskou hygienickou stanici v Ostravě.

3. TEORETICKÁ ČÁST

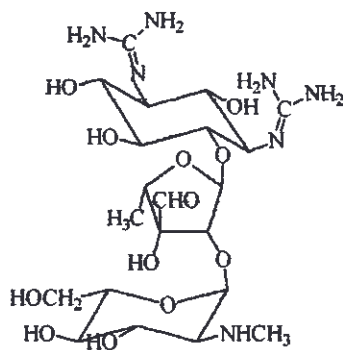
Díky významnému objevu antituberkulotik se tuberkulóza stala léčitelnou chorobou. Mezi antituberkulotika patří tyto látky: rifampicin, streptomycin, kapreomycin, cykloserin, dále chemoterapeutika isoniaziad, pyrazinamid, etambutol, ethionamid a kyselina para-aminosalicylová (PAS).

V současnosti je za nejúspěšnější antituberkulotikum považován isoniazid (1). Chemicky je to hydrazid kyseliny isonikotinové. Působí selektivně baktericidně na extra- i intra-celulární aktivně rostoucí *M. tuberculosis*, u neaktivních forem působí bakteriostaticky.⁶ K samotnému isoniazidu je většina mykobakterií rezistentní, proto se v léčbě využívá jeho kombinace s jinými antituberkulotiky. Mechanismus účinku isoniazidu spočívá v inhibici syntézy mykolových kyselin. Mykolové kyseliny jsou obsaženy pouze v buněčných stěnách mykobakterií a některých hub.



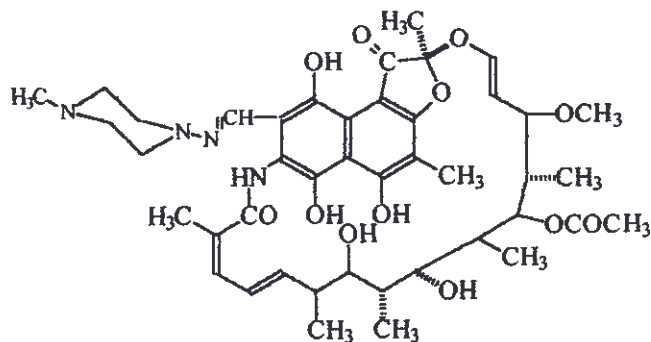
(1)

Dalším antituberkulotikem je Streptomycin (2). Ten patří do skupiny aminoglykosidových antibiotik. Jeho mechanismus účinku spočívá v inhibici syntézy proteinů vazbou na ribozomální podjednotku 30S.



(2)

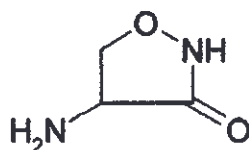
Neméně významný je také rifampicin (3), je to polosyntetické rifampicinové antibiotikum, jeho mechanismus účinku je založen na inhibici syntézy bakteriální RNA-polymerázy, tím léčivo zabrání transkripci RNA.



(3)

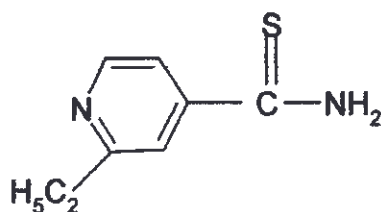
V minulosti se používala i jiná antituberkulotika jako například cykloserin, ethionamid a kyselina para-aminosalicylová

Cykloserin (4) je širokospektré antibiotikum, jeho mechanismus účinku je založen na inhibici syntézy alaninracemázy, a tím brání vzniku D-alaninu (nezbytného pro syntézu peptidoglykanu). Po určité době byl používán jako antituberkulotikum. Dnes je již z používání vyřazen pro nežádoucí vedlejší účinky.⁷



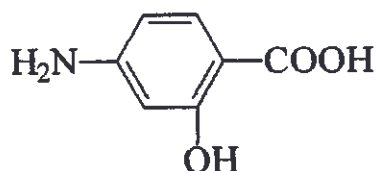
(4)

Ethionamid (5) se v současné době již také nepoužívá. Jeho mechanismus účinku je podobný isoniazidu.



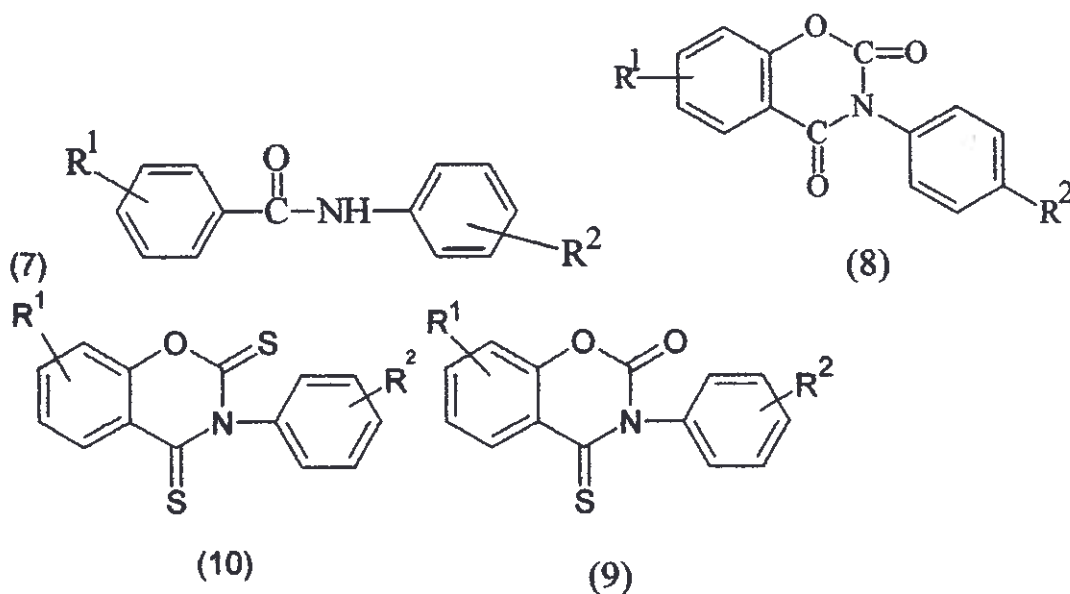
(5)

Kyselina para-aminosalicylová (6) nemá v současné době uplatnění jako antituberkulotikum. Její mechanismus účinku spočívá v inhibici syntézy listové kyseliny, která je důležitá pro růst bakterií.



(6)

Protože tuberkulóza patří mezi největší celosvětové problémy je nutné vyvíjet nová, účinnější antituberkulotika, která mají méně nežádoucích účinků než dosud používaná léčiva. Pracovní skupina prof. Waissera se zabývá syntézou látek ze skupin *N*-(4-alkylfenyl)halogensalicylamidů (7), 3-(4-alkylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4-(3*H*)-dionů (8), halogen-3-(4-alkylfenyl)-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazin-2 (3*H*)-onů (9) a halogen-3-(4-alkylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithionů (10).



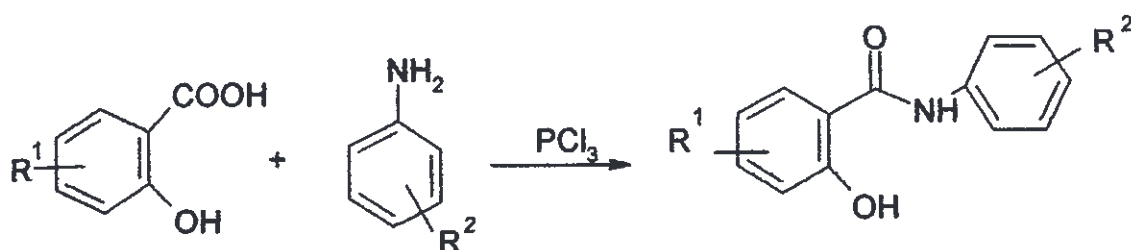
Jejich mechanismus účinku je pravděpodobně založen na inhibici dvoukomponentového systému bakterií.^{8,9,10} Tyto systémy, skládající se z histidinproteinkinázy a regulátoru odpovědi, jsou signální transindukční systémy, umožňující bakteriím vnímat změny v jejich životním prostředí a rychle na ně

odpovídat aktivací nebo represí genů. Vyskytují se u všech bakteriálních kmenů (včetně mykobaktérií) a u některých hub, ale ne u dalších eukaryotních organismů. Látky, které tyto systémy inhibují, jsou tedy schopny blokovat důležité bakteriální komunikační cesty, což nakonec může vést k odumření bakteriální buňky.¹¹ Dosud nejsou používány jako antituberkulotika. Protože jejich výzkumu se aktivně věnuje pracovní skupina prof.RNDr. Weissera , DrSc. na Farmaceutické fakultě Karlovy univerzity v Hradci Králové, je jim věnována i tato rigorózní práce.

4. METODICKÁ ČÁST

4.1. Možnosti přípravy *N*-alkylfenylhalogensalicylamidů

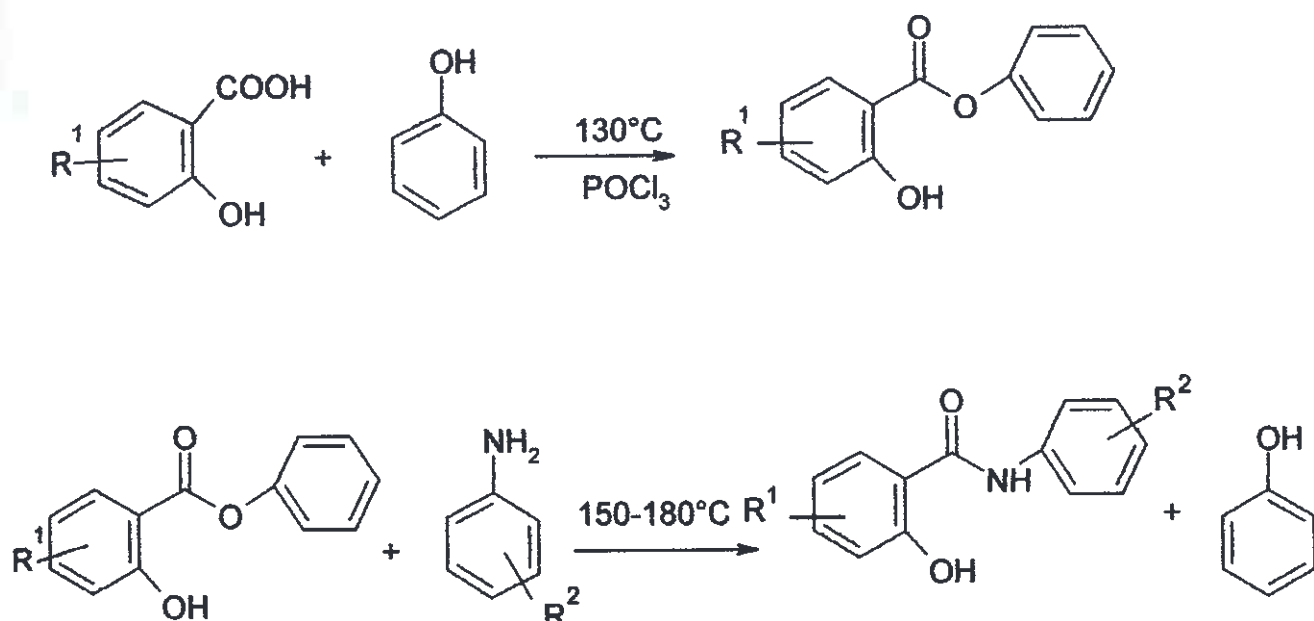
Výchozími látkami jsou příslušně substituovaná kyselina salicylová a příslušně substituovaný anilin, jako rozpouštědlo se používá chlorbenzen nebo toluen, dalším reakčním činidlem je chlorid fosforitý, produktem je *N*-alkylfenylhalogensalicylamid^{12,13} [schéma 1].



[schéma 1]

Reakce substituované kyseliny salicylové s příslušným anilínem proběhne za vzniku *N*-alkylfenylhalogensalicylamidu i v pyridinu za přítomnosti chloridu fosforitého.¹³

Další možností přípravy *N*-alkylfenylhalogensalicylamidu je tavení fenylesteru substituované kyseliny salicylové s odpovídajícím anilínem [schéma 2] za teploty 150-180°C.¹⁴ Při reakci se uvolňuje fenol, který se musí při dalším postupu odstranit.^{15,16}

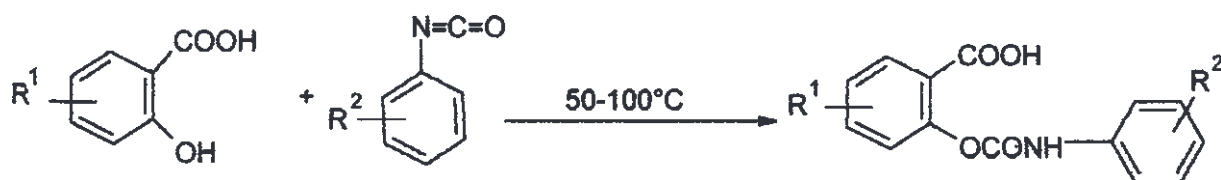


[schéma 2]

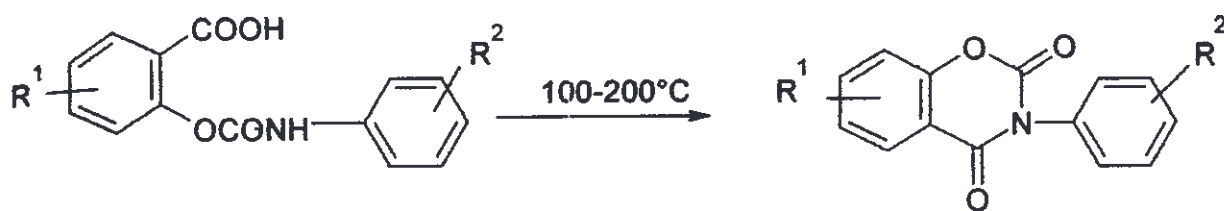
4.2. Možnosti přípravy

3-alkylfenyl-1,3-benzoxazin-2,4-(3*H*)-dionů.

Jako výchozí látku pro přípravu 3-alkylfenyl-1,3-benzoxazin-2,4-(3*H*)-dionů lze použít kyselinu salicylovou, která reaguje s příslušným fenylisokyanátem v poměru 1:1 při teplotě 50-100 °C v organickém rozpouštědle (toluen, chloroform, benzen)¹⁷ Produktem reakce [schéma 3] je substituovaná 2- fenylkarbamoyloxy-benzoová kyselina. K cyklizaci této kyseliny za vzniku 3-alkylfenyl-1,3-benzoxazin-2,4-(3*H*)-dionů dochází při teplotě 100-200°C [schéma 4]. Jako rozpouštědlo se používá tetralin (dekalin)¹⁷

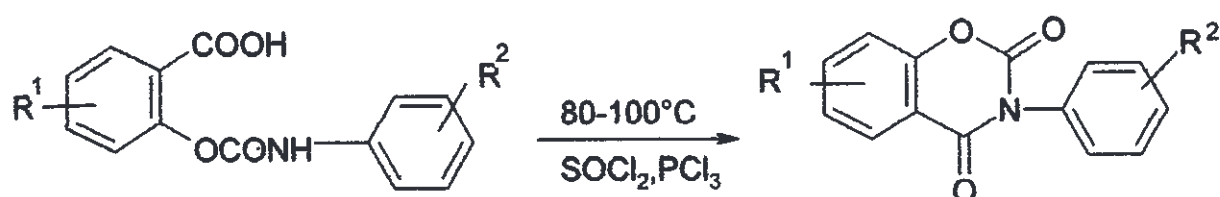


[schéma 3]



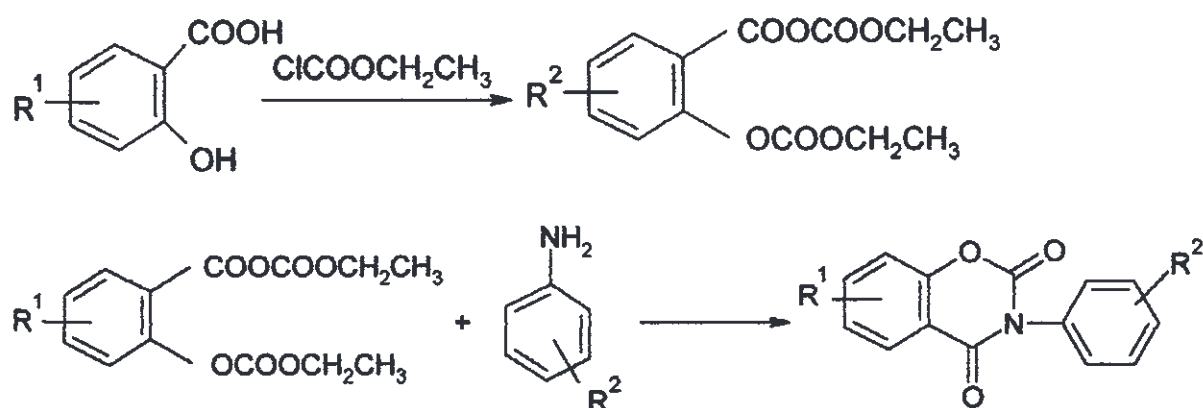
[schéma 4]

Zahřívání 2-fenylkarbamoyloxy-benzoové kyseliny s chloridem fosforitým, nebo chloridem thionylu lze provést uzavření cyklu v teplotním rozmezí 80-100 °C¹⁷ [schéma 5].



[schéma 5]

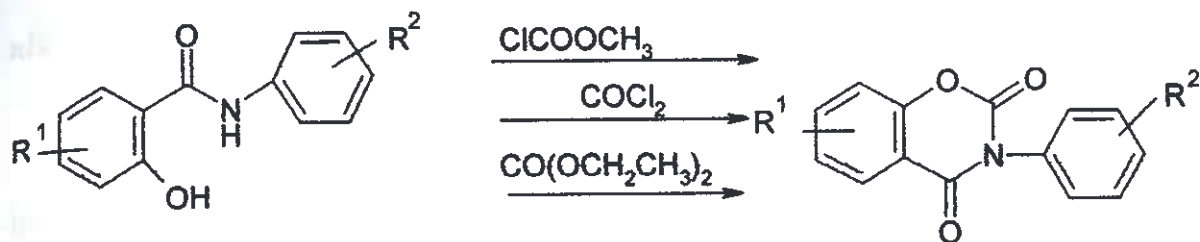
Za vzniku 3-alkylfenyl-1,3-benzoxazin-2,4-(3H)-dionů může také reagovat příslušně substituovaná kyselina salicylová za chlazení v tetrahydrofuranu za přítomnosti triethylaminu s etylchloroformiátem v dvoumolárním nadbytku za vzniku meziprojektu, ke kterému se po 20 minutách přidá příslušně substituovaný anilín¹⁷ [schéma 6].



[6]

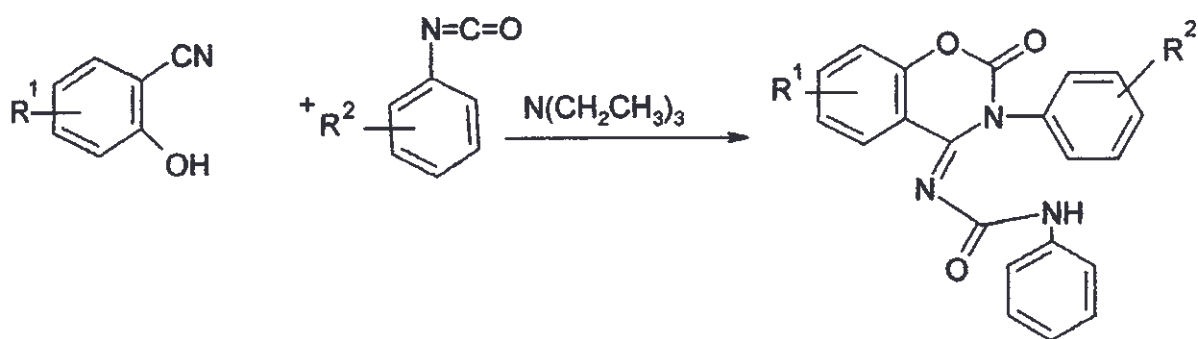
Další možností přípravy 3-alkylfenyl-1,3-benzoxazin-2,4-(3H)-dionů je cyklizační reakce, kde výchozí látkou je příslušně substituovaný N-alkylfenylhalogensalicylamid. Ten reaguje za varu v přítomnosti pyridinu

s nadbytkem etylchloroformiátu, fosgenu, nebo diethylkarbonátu za vzniku *N*-alkylfenylhalogensalicylamidů¹⁸ [schéma 7].

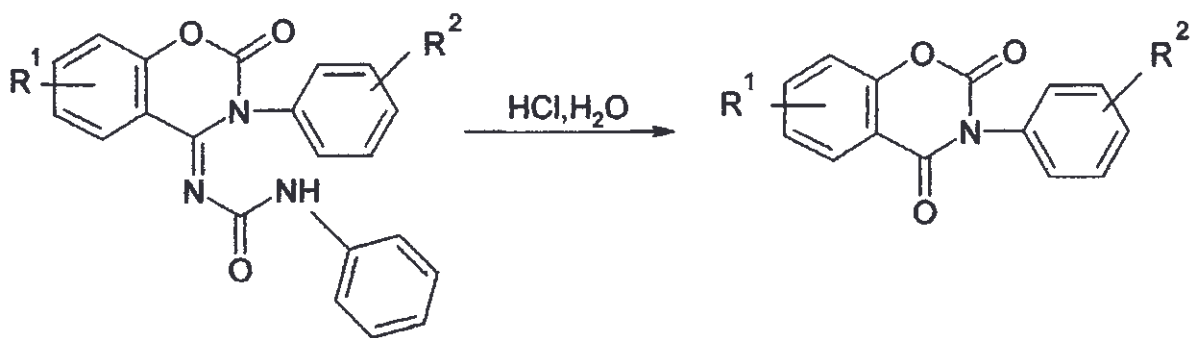


[schéma 7]

Reakcí příslušně substituovaného 2-hydroxybenzonitrilu s odpovídajícím fenylisokianátem v toluenu za přítomnosti triethylaminu [schéma 8] a následné hydrolýze produktu [schéma 9] lze využít k přípravě 3-alkylfenyl-1,3-benzoxazin-2,4-(3*H*)-dionů.¹⁹



[schéma 8]

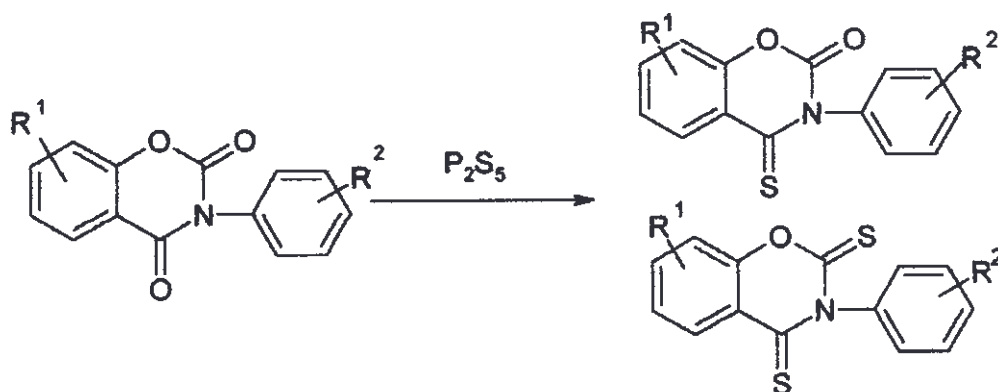


[schéma 9]

4.3. Možnosti přípravy

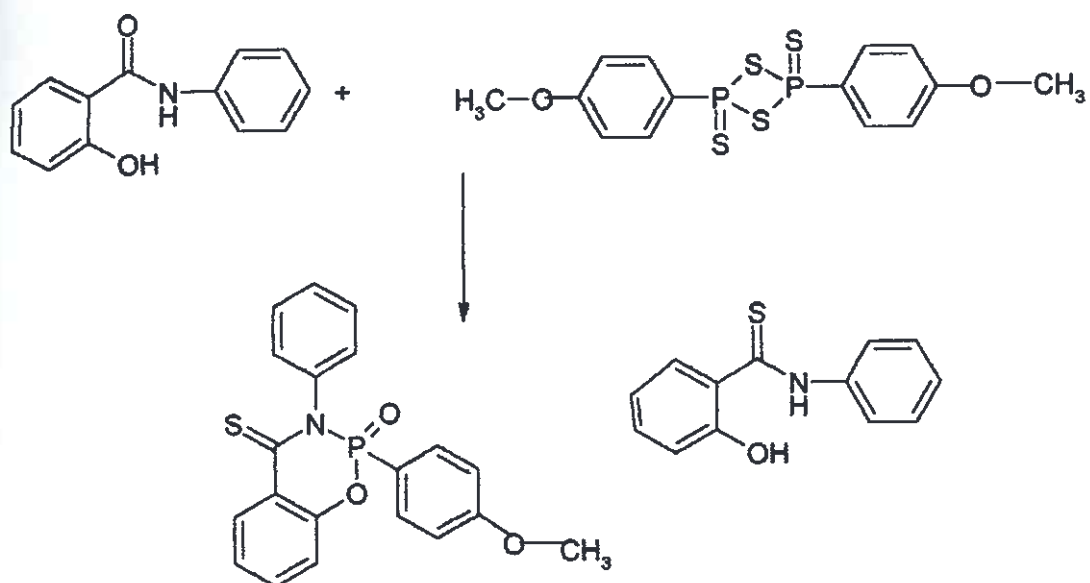
halogen-3-alkylfenyl-4-thioxo-2*H*-1,3benzoxazin-2 (3*H*)-onů a halogen-3-alkylfenyl-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithionů

Substituci karbonylové skupiny za thiokarbonylovou lze provést reakcí benzoxazinu se sulfidem fosforečným.²⁰ Reakce probíhá za varu v toluenu, benzenu, nebo pyridinu.¹⁸ Nebo je místo rozpouštědla možné použít metodu tavení, tím lze výrazně zkrátit reakční dobu. Při této reakci vznikne směs monosírných a disírných produktů [schéma 10]



[schéma 10]

Karbonylovou skupinu na thiokarbonylovou je možné převést také použitím Lawessonova činidla.²¹ [schéma 11]. Jako rozpouštědlo se používá hexamethylfosfodiamid $[(CH_3)_2N]_3P(O)$. Použitím tohoto rozpouštědla se odstranil problém s rozpustností Lawessonova činidla a minimalizoval se vznik bočních reakcí na hydroxy a aminoskupině. Reakci lze také provést v suchém toluenu nebo benzenu.



[schéma 11]

Pro přípravu *N*-(4-alkylfenyl)halogensalicylamidů byla zvolena metoda využívající reakci substituované kyseliny salicylové s příslušně substituovaným anilínem (kapitola 4.1. [schéma 1]), jako rozpouštědlo byl použit toluen, pro přípravu 3-(4-alkylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4-(3*H*)-dionů byla zvolena metoda, která využívá reakce *N*-(4-alkylfenyl)halogensalicylamidů s nadbytkem metylchlorformiátu v prostředí pyridinu (kapitola 4.2. [schéma 7]), a pro přípravu halogen-3-alkylfenyl-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazin-2 (3*H*)-onů a halogen-3-alkylfenyl-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithionů jsem zvolila metodu popsanou v kapitole 4.3. [schéma 10]. Se všemi těmito metodami byly na pracovišti velmi dobré zkušenosti.

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1. POSTUP PŘÍPRAVY

N-(4-ALKYLFENYL)HALOGENSALICYLAMIDŮ

Výchozí látkou byla substituovaná kyselina salicylová (0,02 mol) a příslušně substituovaný anilín (0,02 mol). Kyselina byla rozpuštěna ve 100 ml toluenu, pak byl přidán anilín a chlorid fosforitý (0,01 mol). Směs byla zahřívána pod zpětným chladičem k varu 3 hodiny. Poté byl toluen oddestilován na rotační vakuové odparce. Na závěr byla provedena rekrystalizace v etanolu, výtěžek reakce 52-79%.

5.2. POSTUP PŘÍPRAVY

3-(4-ALKYLFENYL)-1,3-BENZOXAZIN-2,4-(3*H*)-DIONŮ

Výchozí látkou byl příslušný *N*-(4-alkylfenyl)halogensalicylamid (40 mmol), ten byl rozpuštěn v 20 ml pyridinu. Tato směs byla umístěna do ledové lázně. Pak bylo opatrně za míchání přikapáván metylchloroformiát (48 mmol). Po 10 minutách byla odstraněna ledová lázeň a směs byla zahřívána pod zpětným chladičem 1 hodinu. Po ukončení zahřívání byla směs nechána stát 20 hodin. Pak byla převedena do 50 ml roztoku 5% kyseliny chlorovodíkové. Došlo k vysrážení surového produktu. Sraženina byla odfiltrována a převedena do 40 ml roztoku 5% hydroxidu sodného a byla opět odfiltrována. Vzniklý produkt byl rekrystalizován v 96% ním roztoku etanolu, výtěžek reakce 55-65%.

5.3. POSTUP PŘÍPRAVY

HALOGEN-3-ALKYLFENYL-4-THIOXO-2H-1,3-BENZOXAZIN-2 (3H)- ONŮ A HALOGEN-3-ALKYLFENYL-1,3-BENZOXAZIN-2,4(3H)- DITHIONŮ

Výchozí látkou byl příslušně substituovaný benzoxazindion (0,002 mol), který byl smíchán s P_2S_5 (0,002 molu) a taven při 200 °C v kovové lázni, 5 minut. Směs se zbarvila do červena, pak byla zchlazena. Do baňky se ztuhlou taveninou byl nalit chloroform, tavenina se rozpustila. Poté byla tavenina rozpuštěná v chloroformu vytřepána s 5 % roztokem $NaHCO_3$. Směs monosírného a disírného derivátu byla rozdělena na chromatografické koloně. Jako mobilní fáze byla použita soustava toluen -hexan (1:3). Vniklé produkty byly rekrystalizovány v ethanolu. Výtěžky reakce byly 49-60 %.

5.4. FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÉ VLASTNOSTI LÁTEK

Připravené produkty byly sušeny v sušící pistolí nad oxidem fosforečným při teplotě 78,4 °C a tlaku 142 mBar. Jejich teploty tání byly měřeny na Kofflerově bloku.

Dále byly látky předány k dalším strukturním hodnocením. Byla měřena uhlíková a vodíková spektra nukleární magnetické rezonance. Pro měření byl použit přístroj VARIAN MERCURY-VX BB 300. Uhlíková spektra byla měřena při frekvenci 75 MHz a vodíková při frekvenci 300 MHz. Jako rozpouštědlo byl použit dimetylsulfoxid. Hodnoty chemických posunů byly vztaženy k nepřímému standardu tetrametylsilanu. Signál rozpouštědla má hodnotu 2,49 ppm pro 1H spektra a 39,7 ppm pro ^{13}C spektra. Infračervená spektra byla měřena na přístroji NICOLET IMPACT 400. Ve formě tablet bromidu draselného (0,7 g látky, 400 mg KBr). Pro strukturu syntetizovaných

látek měla velký význam hodnota vlnočtu $\nu(\text{C}=\text{O})$ v infračervených spektrech. Elementární analýza byla provedena na Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR v Praze.

5.5. HODNOCENÍ ANTIMYKOBAKTERIÁLNÍ AKTIVITY

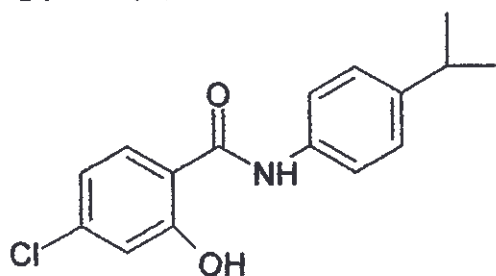
Hodnocení antimykobakteriální aktivity bylo prováděno Krajskou hygienickou stanicí v Ostravě MUDr. Jarmilou Kaustovou. K hodnocení byly použity kmeny z České sbírky mikroorganismů *M. tuberculosis* My 331/88, *M. kansasii* My 235/80, *M. avium* My 331/88 a jeden kmen *M. kansasii* 6 509/96 byl izolován od pacienta. Jako kontrolní testovací preparát byl použit izoniazid.

5.6. SYNTÉZA ROZVĚTVENÝCH DERIVÁTŮ *N*-(4-ALKYLFENYL)HALOGENSALICYLAMIDŮ

V této kapitole je uveden seznam připravených látek, *T* čísla, dále pak teplota tání, molekulový vzorec, použité chemikálie, hodnoty vlnočtu absorpčních maxim $\nu(\text{C}=\text{O})$ v IČ spektru, analýza ^{13}C , ^1H a výsledky elementární analýzy.

Bylo syntetizováno osm derivátů *N*-(4-alkylfenyl)halogensalicylamidů.

5.6.1. *N*-(4-isopropylfenyl)-4-chlorsalicylamid (T5721)



$M_r=289,76$

Sumární vzorec: $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{ClNO}_2$, teplota tání: 218-219°C

Použité chemikálie: kyselina 4-chlorsalicylová

4-isopropylanilín

chlorid fosforitý

toluen

etanol 96%ní

Hodnota vlnočtu absorpčního maxima $\nu(\text{C}=\text{O})$ v IČ spektru: 1616 cm^{-1} .

^1H NMR (300 MHz) δ 12.21 (1H, bs, NH), 10.32 (1H, bs, OH), 7.96 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H6), 7.64-7.54 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.28-7.18 (2H, m, AA',

BB', H3', H5'), 7.08-6.98 (2H, m, H3, H5), 2.94-2.78 (1H, m, CH), 1.18 (6H, t, $J=6.9$ Hz, CH₃)

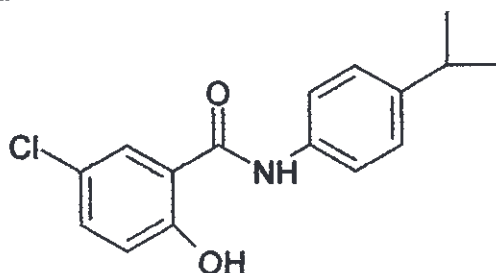
¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 165.7, 159.5, 144.7, 137.6, 135.9, 130.9, 126.7, 121.2, 119.4, 117.0, 33.1, 24.1

Elementární analýza (vypočtené/ naměřené hodnoty): C 66,32/66,21 %

H 5,57/5,55 %

N 4,83/4,44 %

5.6.2 *N*-(4-isopropylfenyl)-5-chlorsalicylamid (T 5722)



$M_r=289,76$

Sumární vzorec: C₁₆H₁₆ClNO₂, teplota tání: 181-185°C

Použité chemikálie: kyselina 5-chlorsalicylová

4-isopropylanilín

chlorid fosforitý

toluen

etanol 96%ní

Hodnota vlnočtu absorpčního maxima $\nu(\text{C=O})$ v IČ spektru: 1620 cm⁻¹

¹H NMR (300 MHz) δ 11.96 (1H, bs, NH), 10.35 (1H, bs, OH), 7.98 (1H, d, $J=2.6$ Hz, H6), 7.64-7.55 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.46 (1H, dd, $J=8.8$ Hz,

$J=2.6$ Hz, H4), 7.27-7.19 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 7.00 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H3), 2.94-2.78 (1H, m, CH), 1.19 (6H, d, $J=6.9$ Hz, CH₃)

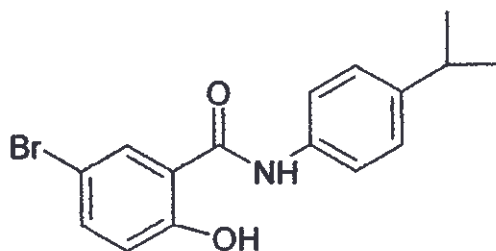
¹³C NMR (75 MHz, DMSO) δ 165.2, 157.4, 144.8, 135.8, 133.3, 128.4, 126.7, 122.9, 121.2, 119.3, 33.1, 24.1

Elementární analýza (vypočtené/ naměřené hodnoty): C 66,32/66,44 %

H 5,57/5,51 %

N 4,83/4,43 %

5.6.3. *N*-(4-isopropylfenyl)-5-bromsalicylamid (T5723)



$M_r=334,22$

Sumární vzorec: C₁₆H₁₆BrNO₂, teplota tání: 197-198°C

Použité chemikálie: kyselina 5-bromsalicylová

4-isopropylanilín

chlorid fosforitý

toluen

etanol 96%ní

Hodnota vlnočtu absorpčního maxima $\nu(\text{C=O})$ v IČ spektru: 1621 cm⁻¹

^1H NMR (300 MHz) δ 11.98 (1H, bs, NH), 10.35 (1H, bs, OH), 8.10 (1H, d, $J=2.5$ Hz, H6), 7.63-7.56 (2H, m, AA', BB', overlapped, H2', H6'), 7.57 (1H, dd, overlapped, $J=8.8$ Hz, $J=2.5$ Hz, H4), 7.28-7.18 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 6.94 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H3), 2.94-2.78 (1H, m, CH), 1.19 (6H, d, $J=6.9$ Hz, CH_3)

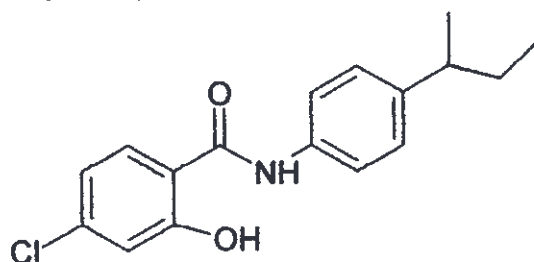
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 165.2, 157.8, 144.7, 136.1, 135.8, 131.3, 126.7, 121.2, 119.9, 119.8, 110.3, 33.1, 24.1

Elementární analýza (vypočtené/ naměřené hodnoty): C 57,50/57,34 %

H 4,83/4,72 %

N 4,19/3,85 %

5.6.4. *N*-(4-*sek*-butylfenyl)-4-chlorsalicylamid (T5728)



$M_r=303,79$

Sumární vzorec: $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{ClNO}_2$, teplota tání: 200-205°C

Použité chemikálie: kyselina 4-chlorsalicylová

4-*sek*-butylanilín

chlorid fosforitý

toluen

etanol 96%ní

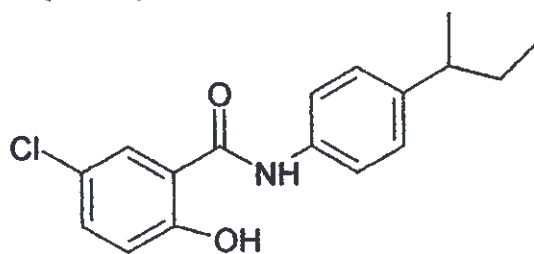
Hodnota vlnočtu absorpčního maxima $\nu(\text{C}=\text{O})$ v IČ spektru: 1621 cm^{-1}

^1H NMR (300 MHz) δ 10.32 (1H, bs, OH), 7.96 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H6), 7.64-7.54 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.23-7.13 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 7.05-6.99 (2H, m, H3, H5), 2.64-2.50 (1H, m, CH), 1.60-1.46 (2H, m, CH₂), 1.17 (3H, d, $J=7.1$ Hz, CH₃), 0.75 (3H, t, $J=7.1$ Hz, CH₃)

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 165.7, 159.5, 143.4, 137.6, 135.9, 130.9, 127.3, 121.2, 119.3, 117.1, 117.0, 40.6, 30.8, 22.0, 12.3

Elementární analýza (vypočtené/ naměřené hodnoty): C 67,21/67,23 %
H 5,97/5,94 %
N 4,61/4,40 %

5.6.5. *N*-(4-*sek*-butylfenyl)-5-chlorsalicylamid (T5729)



$M_r=303,29$

Sumární vzorec: C₁₇H₁₈ClNO₂, teplota tání: 157-159°C

Použité chemikálie: kyselina 5-chlorsalicylová

4-*sek*-butylanilín

chlorid fosforitý

toluen

etanol 96%ní

Hodnota vlnočtu absorpčního maxima $\nu(\text{C}=\text{O})$ v IČ spektru: 1621 cm^{-1}

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 165.2, 157.3, 143.5, 135.9, 133.3, 128.5, 127.3, 122.9, 121.2, 119.4, 119.3, 40.6, 30.8, 22.0, 12.3

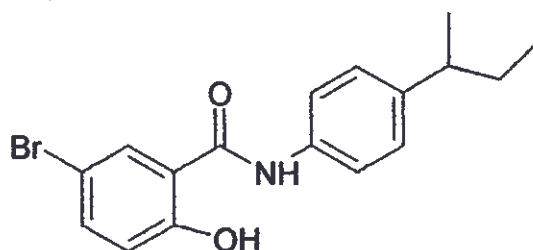
^1H NMR (300 MHz) δ 11.87 (1H, bs, NH), 10.35 (1H, bs, OH), 7.98 (1H, d, $J=2.6$ Hz, H6), 7.63-7.56 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.45 (1H, dd, $J=8.8$ Hz, $J=2.6$ Hz, H4), 7.22-7.14 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 7.00 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H3), 2.64-2.51 (1H, m, CH), 1.61-1.46 (2H, m, CH₂), 1.17 (3H, d, $J=7.1$ Hz, CH₃), 0.75 (3H, t, $J=7.1$ Hz, CH₃)

Elementární analýza (vypočtené/ naměřené hodnoty): C 67,21/67,03 %

H 5,97/5,99 %

N 4,61/4,31 %

5.6.6. *N*-(4-*sek*-butylfenyl)-5-bromsalicylamid (T5730)



$M_r=348,29$

Sumární vzorec: $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{BrNO}_2$, teplota tání: $163\text{-}165^\circ\text{C}$

Použité chemikálie: kyselina 5-bromsalicylová

4-*sek*-butylanilín

chlorid fosforitý

toluen

etanol 96%ní

Hodnota vlnočtu absorpčního maxima $\nu(\text{C}=\text{O})$ v IČ spektru: 1621 cm^{-1}

^1H NMR (300 MHz) δ 11.97 (1H, bs, NH), 10.35 (1H, bs, OH), 8.10 (1H, d, $J=2.5$ Hz, H6), 7.64-7.56 (2H, m, AA', BB', overlapped, H2', H6'), 7.57 (1H, dd, overlapped, $J=8.8$ Hz, $J=2.5$ Hz, H4), 7.22-7.15 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 6.95 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H3), 2.63-2.51 (1H, m, CH), 1.60-1.46 (2H, m, CH₂), 1.17 (3H, d, $J=7.1$ Hz, CH₃), 0.75 (3H, t, $J=7.1$ Hz, CH₃)

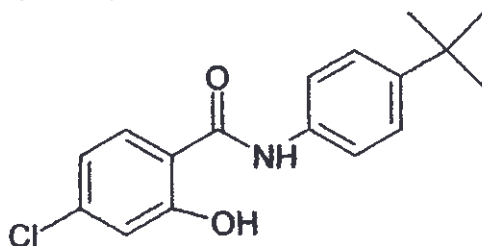
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 165.1, 157.8, 143.4, 136.1, 135.9, 131.3, 127.3, 121.2, 120.0, 119.7, 110.3, 40.6, 30.8, 22.0, 12.3

Elementární analýza (vypočtené/ naměřené hodnoty): C 58,63/58,17 %

H 5,21/4,91 %

N 4,02/3,75 %

5.6.7 *N*-(4-*tert*-butylfenyl)-4-chlorsalicylamid (T5508)



$M_r=303,79$

Sumární vzorec: $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{ClNO}_2$, teplota tání: $232\text{-}233^\circ\text{C}$

Použité chemikálie: kyselina 4-chlorsalicylová

4-*tert*-butylanilín

chlorid fosforitý

toluen

etanol 96%ní

Hodnota vlnočtu absorpčního maxima $\nu(\text{C}=\text{O})$ v IČ spektru: 1623 cm^{-1}

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 12.21 (1H, bs, NH), 10.33 (1H, s, OH), 7.96 (1H, d, $J=9.1$ Hz, H6), 7.63-7.56 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.41-7.33 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 7.05-7.00 (2H, m, H3, H5), 1.27 (9H, s, CH₃).

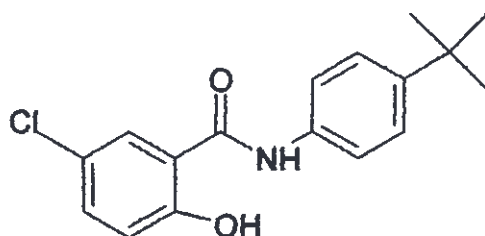
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 165.7, 159.5, 146.9, 137.6, 135.6, 130.9, 125.6, 120.9, 119.4, 117.1, 34.3, 31.4.

Elementární analýza (vypočtené/ naměřené hodnoty): C 67,21/67,17 %

H 5,97/6,08 %

N 5,97/ 5,59 %

5.6.8 *N*-(4-*terc*-butylfenyl)-5-chlorsalicylamid (T5512)



$M_r=303,79$

Sumární vzorec: $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{ClNO}_2$, teplota tání: $221\text{-}222^\circ\text{C}$

Použité chemikálie: kyselina 5-chlorsalicylová

4-*terc*-butylanilín

chlorid fosforitý

toluen

etanol 96%ní

Hodnota vlnočtu absorpčního maxima $\nu(\text{C}=\text{O})$ v IČ spektru: 1627 cm^{-1}

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 11.97 (1H, bs, NH), 10.37 (1H, s, OH), 7.98 (1H, d, $J=2.6$ Hz, H6), 7.64-7.56 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.46 (1H, dd, $J=8.9$ Hz, $J=2.6$ Hz, H4), 7.41-7.33 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 7.00 (1H, d, $J=8.9$ Hz, H3), 1.27 (9H, s, CH₃).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 165.2, 157.4, 147.0, 135.6, 133.3, 128.5, 125.6, 122.9, 120.9, 119.4, 34.3, 31.4.

Elementární analýza (vypočtené/ naměřené hodnoty): C 67,21/67,08 %

H 5,97/5,93 %

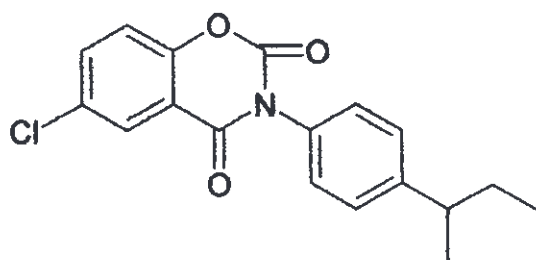
N 5,97/ 5,42 %

5.7. SYNTÉZA ROZVĚTVENÝCH DERIVÁTŮ

3-(4-ALKYLFENYL)-1,3-BENZOXAZIN-2,4-(3H)-DIONŮ

Bylo syntetizováno sedm derivátů 3-(4-alkylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4-(3H)-dionů

5.7.1. 6-Chlor-3-(4-*sek*-butylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (T5739)



$M_r=329,79$

Sumární vzorec: $C_{18}H_{16}ClNO_3$, teplota tání: 192-199°C

Použité chemikálie: *N*-(4-*sek*-butylfenyl)-5-chlorsalicylamid

metylester kyseliny chlormravenčí

bezvodý pyridin

etanol 96%ní

Hodnoty vlnočtu $\nu(C=O)$ absorpčních maxim v infračervených spektrech:
1773,1704 cm^{-1}

1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7.95-7.86 (2H, m, H5, H7), 7.56 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H8), 7.38-7.26 (4H, m, H2', H3', H5', H6'), 2.75-2.58 (1H, m, CH), 1.66-1.51 (2H, m, CH₂), 1.23 (3H, d, $J=7.1$ Hz, CH₃), 0.81 (3H, t, $J=7.1$ Hz, CH₃)

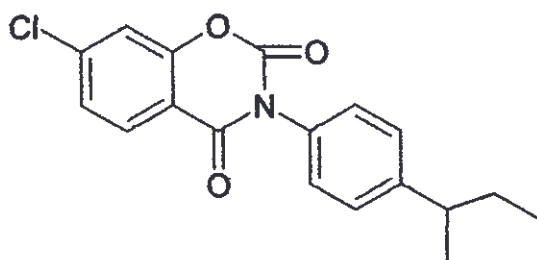
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 160.0, 151.5, 148.0, 147.5, 136.1, 132.8, 129.4, 128.4, 127.7, 126.5, 118.9, 116.7, 40.8, 30.7, 21.8, 12.3

Elementární analýza (vypočtené/ naměřené hodnoty): C 65,56/65,32 %

H 4,89/4,90 %

N 4,25/4,06 %

5.7.2. 7-Chlor-3-(4-*sek*-butylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dion (T5740)



$M_r=329,79$

Sumární vzorec: $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{ClNO}_3$, teplota tání: 136-137°C

Použité chemikálie: *N*-(4-*sek*-butylfenyl)-4-chlorsalicylamid

metylester kyseliny chlormravenčí

bezvodý pyridin

etanol 96%ní

Hodnoty vlnočtu $\nu(\text{C}=\text{O})$ absorpčních maxim v infračervených spektrech:
1776,1696 cm^{-1}

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7.98 (1H, d, $J=8.2$ Hz, H5), 7.75 (1H, d, $J=1.9$ Hz, H8), 7.52 (1H, dd, $J=8.2$ Hz, $J=1.9$ Hz, H6), 7.37-7.24 (4H, m, H2', H3', H5', H6'), 2.74-2.59 (1H, m, CH), 1.66-1.51 (2H, m, CH_2), 1.22 (3H, d, $J=7.1$ Hz, CH_3), 0.81 (3H, t, $J=7.1$ Hz, CH_3)

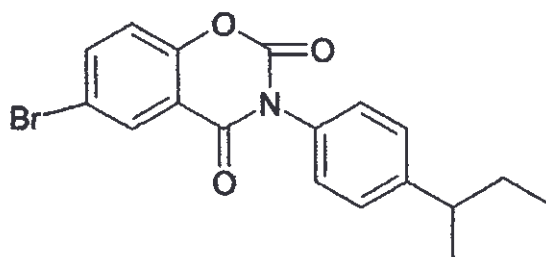
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 160.3, 153.3, 148.0, 147.6, 140.5, 132.8, 129.2, 128.4, 127.7, 125.8, 116.8, 114.2, 40.8, 30.7, 21.8, 12.3

Elementární analýza (vypočtené/ naměřené hodnoty): C 65,56/65,27 %

H 4,89/4,90 %

N 4,25/4,07 %

5.7.3. 6-Brom-3-(4-*sek*-butylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dion (T5741)



$M_r=374,24$

Sumární vzorec: $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{BrNO}_3$, teplota tání: 208-209°C

Použité chemikálie: *N*-(4-*sek*-butylfenyl)-5-bromsalicylamid

metylester kyseliny chlormravenčí

bezdový pyridin

etanol 96%ní

Hodnoty vlnočtu $\nu(\text{C}=\text{O})$ absorpčních maxim v infračervených spektrech:

1770,1703 cm^{-1}

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.07-7.98 (2H, m, H5, H7), 7.49 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H8), 7.37-7.26 (4H, m, H2', H3', H5', H6'), 2.75-2.59 (1H, m, CH), 1.66-1.52 (2H, m, CH₂), 1.22 (3H, d, $J=7.1$ Hz, CH₃), 0.81 (3H, t, $J=7.1$ Hz, CH₃)

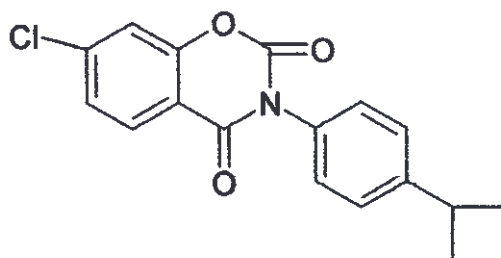
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 159.9, 151.9, 148.0, 147.5, 138.9, 132.8, 129.4, 128.4, 127.7, 119.2, 117.1, 117.0, 40.8, 30.7, 21.8, 12.3

Elementární analýza (vypočtené/ naměřené hodnoty): C 57,77/57,54 %

H 4,31/4,27 %

N 3,74/3,50 %

5.7.4. 7-Chlor-3-(4-isopropylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (T5742)



$M_r=315,76$

Sumární vzorec: C₁₇H₁₄ClNO₃, teplota tání: 180-183°C

Použité chemikálie: *N*-(4-isopropylfenyl)-4-chlorsalicylamid

metylester kyseliny chlormravenčí

bezvodý pyridin

etanol 96%ní

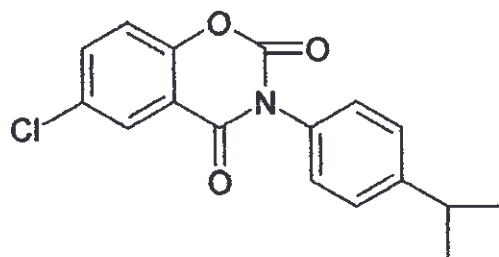
Hodnoty absorpčních maxim: 1770,1704 cm⁻¹

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7.98 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H5), 7.74 (1H, d, $J=1.8$ Hz, H8), 7.51 (1H, dd, $J=8.5$ Hz, $J=1.8$ Hz, H6), 7.41-7.27 (4H, m, H2', H3', H5', H6'), 3.04-2.88 (1H, m, CH), 1.25 (6H, d, $J=6.9$ Hz, CH₃)

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 160.3, 153.3, 149.2, 147.6, 140.5, 132.8, 129.3, 128.5, 127.1, 125.8, 116.8, 114.2, 33.4, 24.0

Elementární analýza (vypočtené/ naměřené hodnoty): C 64,67/64,62 %
H 4,47/4,43 %
N 4,44/4,20 %

5.7.5. 6-Chlor-3-(4-isopropylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (T5743)



$M_r=315,76$

Sumární vzorec: C₁₇H₁₄ClNO₃, teplota tání: 258-260°C

Použité chemikálie: *N*-(4-isopropylfenyl)-5-chlorsalicylamid
metylester kyseliny chlormravenčí
bezvodý pyridin
etanol 96%ní

Hodnoty vlnočtu $\nu(\text{C}=\text{O})$ absorpčních maxim v infračervených spektrech:
1777,1698 cm⁻¹

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7.99-7.85 (2H, m, H5, H7), 7.56 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H8), 7.42-7.34 (2H, m, AA' BB', H2', H6'), 7.34-7.28 (2H, m, AA'BB', H3', H5'), 3.08-2.86 (1H, m, CH), 1.25 (6H, d, $J=7.03$ Hz, CH₃)

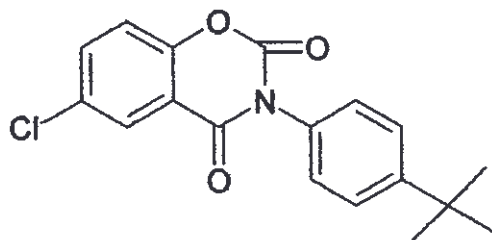
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 160.1, 151.5, 149.2, 147.6, 136.4, 132.8, 129.4, 128.4, 127.2, 126.5, 118.9, 116.7, 33.4, 24.0

Elementární analýza (vypočtené/ naměřené hodnoty): C 64,67/64,63 %

H 4,47/4,44 %

N 4,44/4,24 %

5.7.6. 6-Chlor-3-(4-*tert*-butylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dion (T5573)



$M_r=329,79$

Sumární vzorec: C₁₈H₁₆ClNO₃, teplota tání : 213-215°C

Použité chemikálie: *N*-(4-*tert*-butylfenyl)-5-chlorsalicylamid

metylester kyseliny chlormravenčí

bezvodý pyridin

etanol 96%ní

Hodnoty vlnočtu $\nu(\text{C}=\text{O})$ absorpčních maxim v infračervených spektrech:

1770,1709 cm⁻¹

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7.94-7.88 (2H, m, H5, H7), 7.56 (1H, dd overlaped, $J=8.8$ Hz, $J=0.6$ Hz, H8), 7.55-7.49 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.35-7.28 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 1.33 (9H, s, CH₃).

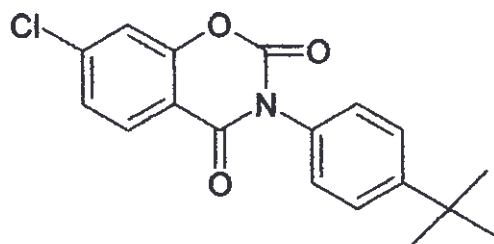
^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 160.1, 151.5, 151.4, 147.6, 136.1, 132.6, 129.4, 128.1, 126.5, 126.1, 118.9, 116.7, 34.7, 31.3.

Elementární analýza (vypočtené/ naměřené hodnoty): C 65,42/65,56 %

H 4,70/4,89 %

N 4,12/4,25 %

5.7.7. 7-Chlor-3-(4-*terc*-butylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dion (T5561)



$M_r=329,79$

Sumární vzorec: C₁₈H₁₆ClNO₃, teplota tání: 214-215°C

Použité chemikálie: *N*-(4-*terc*-butylfenyl)-4-chlorsalicylamid

metylester kyseliny chlormravenčí

bezvodý pyridin

etanol 96%ní

Hodnoty vlnočtu $\nu(\text{C}=\text{O})$ absorpčních maxim v infračervených spektrech: 1767, 1716 cm⁻¹

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7.98 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H5), 7.74 (1H, d, $J=1.9$ Hz, H8), 7.55-7.48 (3H, m, H6, H2', H6'), 7.35-7.27 (2H, m, AA', BB' H3', H5'), 1.39 (9H, s, CH₃)

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 160.4, 153.3, 151.5, 147.7, 140.6, 132.6, 129.3, 128.2, 126.2, 125.9, 125.7, 120.9, 116.9, 114.2, 34.7, 31.4

Elementární analýza (vypočtené/ naměřené hodnoty): C 65,29/65,56 %

H 4,74/4,89 %

N 3,97/4,25 %

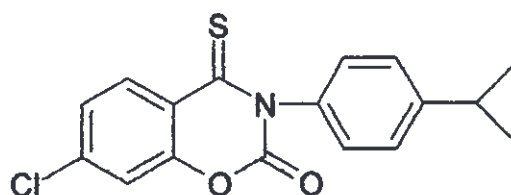
5.8. SYNTÉZA ROZVĚTVENÝCH DERIVÁTŮ

HALOGEN-3-(4-ALKYLFENYL)-4-THIOXO-2H-1,3-BENZOXAZIN-2 (3H)-ONŮ A HALOGEN-3-(4-ALKYLFENYL)-1,3-BENZOXAZIN-2,4(3H)-DITHIONŮ

Byly syntetizovány čtyři deriváty

halogen-3-(4-alkylfenyl)-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazin-2 (3H)-onů

5.8.1. 7-Chlor-3-(4-isopropylfenyl)-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazin-2 (3H)-on (T6007)



$M_r=331,82$

Sumární vzorec: $C_{17}H_{14}ClNO_2S$, teplota tání: 198-199 °C

Použité chemikálie: 7-chlor-3-(4-isopropylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion

P_2S_5

etanol 96%ní

Hodnota absorpčního maxima vlnočtu $\nu(C=O)$ v infračerveném spektru: 1761 cm^{-1}

1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.28 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H5), 7.73 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H8), 7.50 (1H, dd, $J=8.8$ Hz, $J=2.1$ Hz, H6), 7.46-7.34 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.30-7.24 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 3.03-2.87 (1H, m, CH), 1.24 (6H, t, $J=6.5$ Hz, CH₃)

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 192.3, 150.7, 149.5, 145.0, 141.2, 138.1, 133.5, 128.6, 127.9, 126.6, 120.6, 117.3, 33.9, 24.5

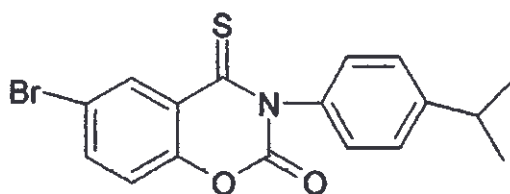
Elementární analýza (vypočtené/ naměřené hodnoty): C 61,54/61,55 %

H 4,25/4,07 %

N 4,22/3,99 %

S 9,66/9,91 %

5.8.2. 6-Brom-3-(4-isopropylfenyl)-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazin-2 (3H)-on (T6009)



$M_r=376,27$

Sumární vzorec: $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{BrNO}_2\text{S}$, teplota tání: 199-201 °C

Použité chemikálie: 6-brom-3-(4-isopropylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion

P_2S_5

etanol 96%ní

Hodnota absorpčního maxima vlnočtu $\nu(\text{C}=\text{O})$ v infračerveném spektru:
1759 cm^{-1}

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.35 (1H, d, $J=2.5$ Hz, H5), 8.01 (1H, dd, $J=8.8$ Hz, $J=2.5$ Hz, H7), 7.47 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H8), 7.42-7.34 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.32-7.24 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 3.04-2.87 (1H, m, CH), 1.24 (6H, d, $J=6.9$ Hz, CH_3)

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 191.3, 149.1, 149.0, 144.5, 138.6, 137.7, 133.0, 128.0, 127.4, 122.5, 119.4, 117.4, 33.4, 24.0

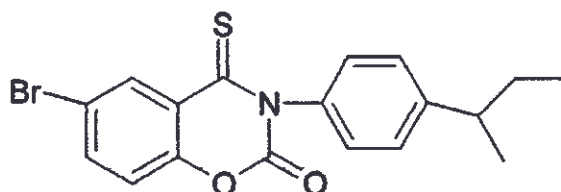
Elementární analýza (vypočtené/ naměřené hodnoty): C 54,27/54,04 %

H 3,75/3,62 %

N 3,72/3,62 %

S 8,52/8,51 %

5.8.3. 6-Brom-3-(4-*sek*-butylfenyl)-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazin-2 (3*H*)-on (T6011)



$M_r=390,30$

Sumární vzorec: $C_{18}H_{16}BrNO_2S$, teplota tání: 189-190 °C

Použité chemikálie: 6-brom-3-(4-*sek*-butylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dion

P_2S_5

etanol 96%ní

Hodnota absorpčního maxima vlnočtu $\nu(C=O)$ v infračerveném spektru: 1756 cm^{-1}

1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.35 (1H, d, $J=2.5$ Hz, H5), 8.02 (1H, dd, $J=8.8$ Hz, $J=2.5$ Hz, H7), 7.47 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H8), 7.37-7.30 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.30-7.24 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 2.73-2.59 (1H, m, CH), 1.65-1.51 (2H, m, CH₂), 1.23 (3H, d, $J=7.2$ Hz, CH₂), 0.80 (3H, t, $J=7.2$ Hz, CH₃)

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 191.4, 149.1, 147.9, 144.5, 138.6, 137.7, 133.0, 128.0, 122.5, 119.4, 117.4, 40.8, 30.7, 21.7, 12.3

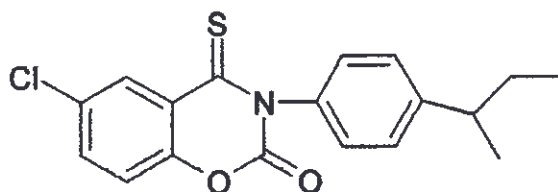
Elementární analýza (vypočtené/ naměřené hodnoty): C 55,39/55,08 %

H 4,13/4,15 %

N 3,59/3,44 %

S 8,22/8,43 %

5.8.4. 6-Chlor-3-(4-*sek*-butylfenyl)-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazin-2 (3*H*)-on (T6015)



$M_r=345,85$

Sumární vzorec: $C_{18}H_{16}ClNO_2S$, teplota tání: 154-155 °C

Použité chemikálie: 6-chlor-3-(4-*sek*-butylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dion

P_2S_5

etanol 96%ní

Hodnota absorpčního maxima vlnočtu $\nu(C=O)$ v infračerveném spektru: 1759 cm^{-1}

1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.22 (1H, d, $J=2.5$ Hz, H5), 7.91 (1H, dd, $J=8.8$ Hz, $J=2.5$ Hz, H7), 7.54 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H8), 7.37-7.30 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.30-7.25 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 2.74-2.59 (1H, m, CH), 1.66-1.51 (2H, m, CH_2), 1.23 (3H, d, $J=7.2$ Hz, CH_3), 0.80 (3H, t, $J=7.2$ Hz, CH_3)

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 191.5, 148.7, 147.9, 144.6, 137.7, 135.8, 130.0, 129.7, 128.0, 122.2, 119.2, 40.8, 30.8, 21.7, 12.3

Elementární analýza (vypočtené/ naměřené hodnoty): C 62,51/62,29 %

H 4,66/4,64 %

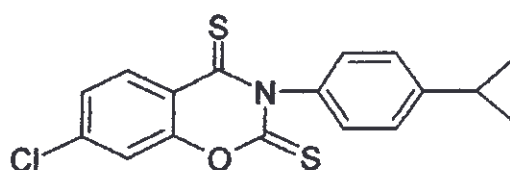
N 4,05/3,92 %

S 9,27/9,47 %

Byly syntetizovány čtyři deriváty

**HALOGEN-3-(4-ALKYLFENYL)-1,3-BENZOXAZIN-2,4(3H)-
DITHIONŮ**

**5.8.5. 7-Chlor-3-(4-isopropylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4 (3H)-dithion
(T6008)**



$M_r=347,89$

Sumární vzorec: $C_{17}H_{14}ClNOS_2$, teplota tání: 200-202 °C

Použité chemikálie: 7-chlor-3-(4-isopropylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion

P_2S_5

etanol 96%ní

V oblasti vibrací $\nu(C=O)$ v infračervených spektrech není žádné absorpční maximum.

NMR prokázalo směs výchozí látky a produktu 3:1, z důvodu dočasného vyřazení provozu NMR, bude spektrum této látky doděláno dodatečně.

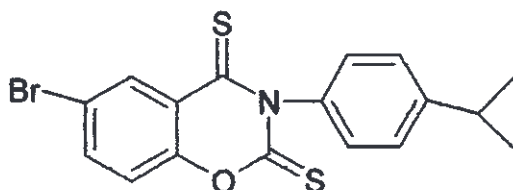
Elementární analýza (vypočtené/ naměřené hodnoty): C 57,69/57,45 %

H 4,06/3,89 %

N 4,03/3,86 %

S 18,43/18,56 %

**5.8.6. 6-Brom-3-(4-isopropylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4 (3*H*)-dithion
(T6010)**



$M_r=392,34$

Sumární vzorec: $C_{17}H_{14}BrNOS_2$, teplota tání: 181-182 °C

Použité chemikálie: 6-brom-3-(4-isopropylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dion

P_2S_5

etanol 96%ní

V oblasti vibrací $\nu(C=O)$ v infračervených spektrech není žádné absorpční maximum.

1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.26 (1H, d, $J=2.5$ Hz, H5), 8.04 (1H, dd, $J=8.8$ Hz, $J=2.5$ Hz, H7), 7.55 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H8), 7.41-7.33 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.26-7.18 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 3.03-2.86 (1H, m, CH), 1.24 (6H, d, $J=6.9$ Hz, CH₃)

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 186.8, 177.8, 149.1, 148.9, 141.5, 138.9, 133.0, 127.8, 127.7, 123.9, 119.0, 118.5, 33.3, 24.0

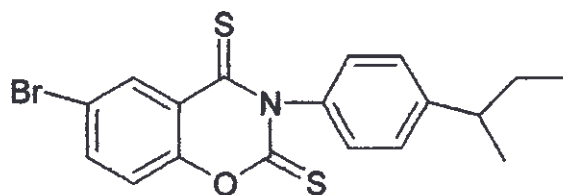
Elementární analýza (vypočtené/ naměřené hodnoty): C 52,04/51,78 %

H 3,60/3,48 %

N 3,57/3,47 %

S 16,35/16,20 %

**5.8.7. 6-Brom-3-(4-*sek*-butylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4 (3*H*)-dithion
(T6012)**



$M_r=406,37$

Sumární vzorec: $C_{18}H_{16}BrNOS_2$, teplota tání: 161-162 °C

Použité chemikálie: 6-brom-3-(4-*sek*-butylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dion

P_2S_5

etanol 96%ní

V oblasti vibrací $\nu(C=O)$ v infračervených spektrech není žádné absorpční maximum.

1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.26 (1H, d, $J=2.5$ Hz, H5), 8.04 (1H, dd, $J=8.8$ Hz, $J=2.5$ Hz, H7), 7.55 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H8), 7.36-7.28 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.26-7.18 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 2.73-2.58 (1H, m, CH), 1.67-1.47 (2H, m, CH₂), 1.23 (3H, d, $J=7.2$ Hz, CH₂), 0.78 (3H, t, $J=7.2$ Hz, CH₃)

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 186.8, 177.7, 149.1, 147.7, 141.6, 138.9, 133.0, 128.3, 127.7, 123.9, 119.0, 118.5, 40.7, 30.8, 21.6, 12.2

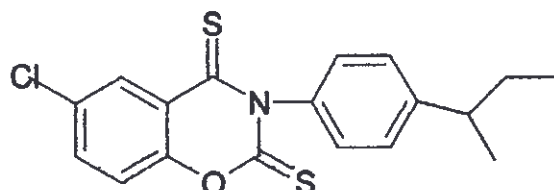
Elementární analýza (vypočtené/ naměřené hodnoty): C 53,20/52,90 %

H 3,97/3,95 %

N 3,45/3,31 %

S 15,78/15,80 %

**5.8.8. 6-Chlor-3-(4-*sek*-butylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4 (3*H*)-dithion
(T6016)**



$M_r=361,92$

Sumární vzorec: $C_{18}H_{16}ClNOS_2$, teplota tání: 154-153°C

Použité chemikálie: 6-chlor-3-(4-*sek*-butylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dion

P_2S_5

etanol 96%ní

V oblasti vibrací $\nu(C=O)$ v infračervených spektrech není žádné absorpční maximum.

1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.22 (1H, d, $J=2.5$ Hz, H5), 7.91 (1H, dd, $J=8.8$ Hz, $J=2.5$ Hz, H7), 7.54 (1H, d, $J=8.8$ Hz, H8), 7.37-7.30 (2H, m, AA', BB', H2', H6'), 7.30-7.24 (2H, m, AA', BB', H3', H5'), 2.73-2.57 (1H, m, CH), 1.66-1.50 (2H, m, CH₂), 1.23 (3H, d, $J=7.2$ Hz, CH₂), 0.80 (3H, t, $J=7.2$ Hz, CH₃)

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 186.9, 177.8, 148.7, 147.7, 141.6, 136.2, 130.7, 130.0, 128.3, 127.8, 123.6, 118.9, 40.7, 30.8, 21.6, 12.2

Elementární analýza (vypočtené/ naměřené hodnoty): C 59,74/59,48 %

H 4,46/4,36 %

N 3,87/3,80 %

S 17,72/17,95 %

6. VÝSLEDKY

V následujících tabulkách jsou uvedeny výsledky testů antimykobakteriální aktivity připravených produktů. Hodnoty představují minimální inhibiční koncentrace v $\mu\text{mol/l}$ po 14 dnech inkubace a po 21 dnech inkubace.

Jako referenční látka byl použit isoniazid (INH).

Kód látky	<i>M.tuberculosis</i> My 331/88	<i>M.kansasii</i> My 235/80	<i>M.kansasii</i> 6 509/96	<i>M.avium</i> My 330/88
T5721	8/8	8/16	16/16	8/16
T5722	8/8	16/16	16/16	16/32
T5723	8/8	16/16	16/16	16/32
T5728	8/8	16/16	16/16	8/8
T5729	8/8	16/16	16/16	16/16
T5730	4/8	16/16	16/16	16/16
T5508	16/16	32/62,5	32/62,5	-
T5512	8/16	16/16	16/16	16/32
isoniazid	1/2	250/250	8/8	250/250

Kód látky	<i>M.tuberculosis</i> My 331/88	<i>M.kansasii</i> My 235/80	<i>M.kansasii</i> 6 509/96	<i>M.avium</i> My 330/88
T5739	4/8	16/16	16/16	32/32
T5740	4/4	8/8	8/8	8/8
T5741	4/8	8/8	8/16	16/32
T5742	4/4	8/8	8/16	8/16
T5743	4/8	8/16	8/16	32/32
T5573	8/16	8/16	8/8	16/32
T5561	4/4	8/16	8/8	4/8
isoniazid	1/2	250/250	8/8	250/250

Kód látky	<i>M.tuberculosis</i> My 331/88	<i>M.kansasii</i> My 235/80	<i>M.kansasii</i> 6 509/96	<i>M.avium</i> My 330/88
T6007	0,5/1	4/8	2/4	8/8
T6008	0,5/1	4/4	2/4	8/8
T6009	0,25/0,5	4/8	4/8	32/62,5
T6010	0,5/1	8/16	4/8	32/62,5
T6011	0,25/0,5	4/8	2/4	16/32
T6012	1/2	4/8	2/4	32/32
T6015	0,5/1	8/8	4/8	32/32
T6016	1/2	8/16	4/8	16/32
isoniazid	0,5/1	250/250	4/4	250/250

7. DISKUZE

Bylo připraveno celkem 23 látek, z čehož bylo 8 látek

N-(4-alkylfenyl)halogensalicylamidů, 7 látek bylo 3-(4-alkylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4-(3*H*)-dionů, 4 látky ze skupiny halogen-3-alkylfenyl-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazin-2 (3*H*)-onů a 4 látky ze skupiny halogen-3-alkylfenyl-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithionů.

Připravené látky tály, až na dvě výjimky v rozmezí 1-3°C. Čistota látek byla ještě kontrolována chromatografií na tenkých vrstvách silufolu (Kavalier Vofice). Látka T5739 tála v rozmezí 7 °C a látka T5728 v rozmezí 5 °C.

Tenkovrstvá chromatografie, NMR spektrum a elementární analýza neprokázaly přítomnost nečistot.

Infračervená spektra připravených látek vykazovala absorpční maxima vlnočtu $\nu(\text{C}=\text{O})$ odpovídající strukturním typům.

U *N*-(4-alkylfenyl)halogensalicylamidů to byla valenční vibrace $\nu(\text{C}=\text{O})$ v intervalu od 1616 cm^{-1} do 1627 cm^{-1} , což je charakteristické pro aromatické amidy. U 3-(4-alkylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4-(3*H*)-dionů to byly dvě valenční vibrace v intervalech od 1767 cm^{-1} do 1776 cm^{-1} a od 1696 cm^{-1} do 1716 cm^{-1} , což je charakteristické pro 1,3-benzoxazin-2,4-(3*H*)-diony. Pro 3-alkylfenyl-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazin-2 (3*H*)-ony byla charakteristická vibrace $\nu(\text{C}=\text{O})$, která se nacházela v intervalu $1756\text{-}1767 \text{ cm}^{-1}$. Po záměně i druhé oxoskupiny za thiooxoskupinu nebylo nalezeno žádné absorpční maximum v oblasti valenčních vibrací $\nu(\text{C}=\text{O})$ karbonylu. Jednalo se tedy o látky ze skupiny halogen-3-alkylfenyl-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithionů.

Totožnost jednotlivých látek byla potvrzena NMR spektry. U látky T 6008 byla zjištěna směs výchozí látky a produktu 3:1, bohužel v době dokončení rigorózní práce bylo zařízení mimo provoz, proto bude NMR spektrum čisté látky doděláno dodatečně.

Elementární analýza prokázala shodu nalezených a vypočtených hodnot procentuálního zastoupení vodíku, uhlíku a dusíku. Naměřené hodnoty byly v rozmezí $\pm 0,5 \%$ vypočtených teoretických hodnot.

Hodnocení antimykobakteriální účinnosti prokázalo, že připravené preparáty *N*-(4-alkylfenyl)halogensalicylamidů, 3-(4-alkylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4-(3*H*)-dionů jsou na *M.tuberculosis* méně účinné než isoniazid. U *M. kansasii* My 235/80 a u *M. avium* My 330/88 byla prokázána vyšší aktivita námi připravených produktů než isoniazidu. U *M. kansasii* 6 509/96 byla prokázána nižší aktivita připravených látek než isoniazidu. Dále bylo prokázáno, že cyklizací se zvýšila antimykobakteriální aktivita, ale ještě k mohutnějšímu zvýšení došlo převedením oxo- skupiny na thioxo- skupiny. Látky z této skupiny se výrazně blíží antimykobakteriální aktivitě isoniazidu. Látky T6009 a T6011 dokonce překonávají aktivitu isoniazidu vůči všem sledovaným mykobakteriálním kmenům včetně *M. tuberculosis*.

8. ZÁVĚR

Byly syntetizovány tyto látky:

N-(4-isopropylfenyl)-4-chlorsalicylamid. (T5721)

N-(4-isopropylfenyl)-5-chlorsalicylamid (T5722)

N-(4-isopropylfenyl)-5-bromsalicylamid (T5723)

N-(4-*sek*-butylfenyl)-4-chlorsalicylamid (T5728)

N-(4-*sek*-butylfenyl)-5-chlorsalicylamid (T5729)

N-(4-*sek*-butylfenyl)-5-bromsalicylamid (T5730)

N-(4-*terc*-butylfenyl)-4-chlorsalicylamid (T5508)

N-(4-*terc*-butylfenyl)-5-chlorsalicylamid (T5512)

6-Chlor-3-(4-*sek*-butylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (T5739)

7-Chlor-3-(4-*sek*-butylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (T5740)

6-Brom-3-(4-*sek*-butylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (T5741)

7-Chlor-3-(4-isopropylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (T5742)

6-Chlor-3-(4-isopropylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (T5743)

6-Chlor-3-(4-*terc*-butylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (T5573)

7-Chlor-3-(4-*terc*-butylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (T5561)

7-Chlor-3-(4-isopropylfenyl)-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazin-2 (3H)-on
(T6007)

6-Brom-3-(4-isopropylfenyl)-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazin-2 (3H)-on
(T6009)

6-Brom-3-(4-*sek*-butylfenyl)-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazin-2 (3H)-on
(T6011)

6-Chlor-3-(4-*sek*-butylfenyl)-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazin-2 (3H)-on
(T6015)

7-Chlor-3-(4-isopropylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4 (3H)-dithion
(T6008)

6-Brom-3-(4-*sek*-butylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4 (3H)-dithion
(T6012)

6-Brom-3-(4-isopropylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4 (3H)-dithion
(T6010)

6-Chlor-3-(4-*sek*-butylfenyl)-1,3-benzoxazin-2,4 (3H)-dithion
(T6016)

Celkem tedy bylo syntetizováno 23 látek. U všech látek byly zjištěny fyzikálně-chemické vlastnosti a dále byly hodnocena jejich antimykobakteriální účinnost.

9. POUŽITÁ LITERATURA

-
- ¹ Netrval M., Homolka J., Křepelka K., Feyereisl J. a kolektiv: Mimoplicní tuberkulóza, str.13-17, str.43-45, Praha, Grada Puplishing, 2004
- ² Bednář M., a kol.: Lékařská mikrobiologie, str. 215-233, Praha, Marvil, 1996
- ³ Waisser K., Gregor J., Kubicová L., Klimešová V., Kuneš J., Macháček M., Kaustová J.: New groups of antimycobacterial agents: 6-chloro-3-phenyl-4-thioxo-2H-1,3-benzoxazine-2(3H)-ones and 6-chloro-3-phenyl-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-dithiones. Eur. J. Med. Chem., 35, 733-741 (2000)
- ⁴ Waisser K., Gregor J., Dostál H., Kuneš J., Kubicová L., Klimešová V., Kaustová J.: Influence of the replacement of oxo function with the thioxo group an the antimycobacterial activity of 3-aryl-6,8-dichloro-2H-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-diones and 3-arylquinazoline-2,4(1H, 3H)-diones. Farmaco,56, 803-807 (2001)
- ⁵ Waisser K., Matyk J., Divišová H., Husáková P., Kuneš J., Klimešová V., Kaustová J., Möllmann U., Dahse HM., Miko M.: The Oriented Development of Antituberculotics: Salicylanilides. Arch. Pharm. Chem. Life. Sci., 330, 616-620, (2006)
- ⁶ Lincová D., Fagheli H.: Základní a aplikovaná farmakologie, str.461-463, Praha, Galén, 2002
- ⁷ Waisser K. :Biologicky aktivní organické látky, Hradec Králové, Gaudeamus, 2006
- ⁸ Waisser K., Dražková K., Čižmárik K., Kaustová J.: Antimycobacterial activity of basic etyl esters of alkoxy-substituted phenylcarbamic acids. Folia Microbiol, 48, 45-50 (2003)
- ⁹ Waisser K., Bureš O., Holý P., Kuneš J., Oswald R., Jirásková L., Pour M., Klimešová V., Kubicová L., Kaustová J.: Relationships between structure and

-
- antimycobacterial activity of substituted salicylanides. *Arch. Pharm.*, 1, 53-71 (2003)
- ¹⁰ Waisser K., Peřina M., Klimeřov V., Kaustov J.: On The relationship between the structure and antimycobacterial activity substituted N-benzylsalicylamides. *Collect. Czech, Cem. Commun*, 68, 1275-1294 (2003)
- ¹¹ Macielag M.J., Demers J. P., Fraga-Spano S. A., Halasta D.J., Johnson S. G., Kanojia R. M., Russel R.K., Sui Z., Weidner-Wells M. A., Werblood H., Foleno B. D., Goldschmidt R.M., Loeloff M.J., Webb G.C., Barrett J.: Substituted salicylanilides as inhibitors of two-component regulatory systems in bacteria. *J.Med.Chem.*, 41, 2939-2945 (1998)
- ¹² Lamaire H., Schramm C.H., Cahn A.: Synthesis and germicidal activity of halogenated salicylanilides and related compounds. *J.Pharm.Sci.* 51, 831-837 (1961)
- ¹³ Waisser K., Kubicov L.: Biologick uinky ltek podobnch salicylanilidm 3-aryl-2h,4H-benz(e)(1,3)oxazin-2,4-diony a thiosalicylanilidy. *esk.Slov.Farm.* 42, 218-222 (1993)
- ¹⁴ Maug H., Bruice T.C.: The Role of intramolecular Bifunctional catalysis of ester hydrolysis in Water. *J.Amer.Chem.Soc.* 93, 3237-3248 (1971)
- ¹⁵ Daidone G., Maggio B., Schillaci D.: Salicylanilide and its heterocyclic analogues. A comparative study of their antimicrobial activity. *Pharmacie*, 45, 441-442 (1990)
- ¹⁶ Borovansk A., Medveck R.: *Technolgia syntetickch lieiv*, 1. vydn, str.200-201, Bratislava, Univerzita Komenskho, 1987
- ¹⁷ Haaspacher K: N-substituted 2H-1,3-benzoxazine-2,4-(3H) diones. U. S. pat 3 353454 (1967), citovno podle *Chem.Abstr.*, 69, 19169h, (1968)

-
- ¹⁸ Wagner G., Singer D., Weuffen W.: Untersuchungen über 2-hydroxythiobenzamide und 2-hydroxythiobenzanilide. *Pharmazie*, 21, 161-166, (1966)
- ¹⁹ Peridou-Fischer J., Papadopoulos E.P.: Reactions of 2-hydroxybenzotrile with isocyanates. *J.Heterocycl.Chem.*, 20, 1159, (1983)
- ²⁰ Klingsberg E., Papa D.: Thion with phosphorus pentasulfide in pyridine solution. *J. Am. Chem. Soc.*, 74, 4988-4989 (1951)
- ²¹ Scheibye S., Pedersen B. S., Lawesson S. O.: Studies on organophosphorous compounds, XXIII. Synthesis of salicylthioamides and 4H-1,3-benzoxazaphosphorine derivatives from the dimer of p-methoxyphenylthionophosphine sulfide and salicylamides. *Bull. Soc. Chim. Belg.*, 87, 299-305 (1978)

10. PŘÍLOHY

Publikace Hany Divišové:

Původní práce

1. WAISSER, K., MATYK, J., DIVIŠOVÁ, H., HUSÁKOVÁ, P., KUNEŠ, J., KLIMEŠOVÁ, V., MÖLLMANN, U., DAHSE, H. M., KIKO, M.: The oriented development of antituberculosics: In acyl moiety halogenated *N*-(4-alkylphenyl)salicylamides. Arch. Pharm. Přijato do tisku.

Předběžná sdělení uveřejněná v časopisech

1. MATYK, J., ADAMEC, J., DIVIŠOVÁ, H., HUSÁKOVÁ, P., WAISSER, K.: Příprava antimykobakteriálních salicylanilidů s předpokládaným výrazným účinkem. (Synthesis of salicylanilides with expected high activity) 32. konference Syntéza a analýza léčiv. Nitra 9. – 11. 9. 2004. Farm. Obzor 73, 2004, 248.
2. MATYK, J., DIVIŠOVÁ, H., HUSÁKOVÁ, P., WAISSER, K.: Vysoce účinné antimykobakteriální salicylanilidy. (High active antimycobacterial salicylanilides). Konference Pokroky v organické, bioorganické a farmaceutické chemii. Nymburk 26.-28. 11. 2004. Chem. Listy 98, 2004, 1041.
3. WAISSER, K., MATYK, J., DIVIŠOVÁ, H., HUSÁKOVÁ, P., KUNEŠ, J., KLIMEŠOVÁ, V., KAUSTOVÁ, J.: The Oriented Development of Antituberculosics: (part 2.) Halogenated 3-(4-Alkylphenyl)benzoxazine-2,4(3*H*)-diones. Arch. Pharm. Life Sci., 340, 2007, 264-267.

Abstrakty ve sbornících symposií

1. MATYK, J., DIVIŠOVÁ, H., HUSÁKOVÁ, P., WAISSER, K., KAUSTOVÁ, J.: Perspektiva dalšího vývoje antituberkulotik, inhibitorů dvoukomplementového systému bakterií. (Perspective of development antituberculosics, inhibitors of two-complenets system of bacterium.) 34. konference „Syntéza a analýza léčiv“, Brno 12.-14. 9. 2005. Sborník abstrakt, str. 92. [ISBN 80-7305-533-3].

Full Paper

The Oriented Development of Antituberculotics: Salicylanilides*

Karel Waisser¹, Josef Matyk¹, Hana Divišová¹, Petra Husáková¹, Jirí Kuneš¹, Vera Klimešová¹, Jarmila Kaustová², Ute Möllmann³, Hans-Martin Dahse³, and Milan Miko⁴¹ Department of Inorganic and Organic Chemistry, Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy, Hradec Králové, Czech Republic² Regional Institute of Public Health, Ostrava, Czech Republic³ Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology, Hans Knoell Institute, Jena, Germany⁴ Slovak Technical University, Bratislava, Slovak Republic

On the basis of our previous results 22 salicylanilides were synthesized. The compounds were tested for *in vitro* antimycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium kansasii*, and *Mycobacterium avium*. The Free-Wilson method was used to evaluate structure-antimycobacterial activity relationships. 4-Chloro-*N*-(4-propylphenyl)salicylamide and 5-chloro-*N*-(4-propylphenyl)salicylamide were selected for preclinical studies.

Keywords: Antimycobacterial activity / Antituberculosis activity / QSAR / Salicylanilides

Received: June 12, 2006; accepted: July 12, 2006

DOI 10.1002/ardp.200600093

Introduction

The return of tuberculosis to Europe and North America is one feature of the period dating from 1985. And new mycobacterial diseases have occurred which have been recently considered intransferable to humans (mycobacterioses produced by potentially pathogenic strains). The development of new antituberculous agents is the principal goal of our group. We have recently studied a number of structurally different compounds, such as the derivatives of pyridine [1, 2], alkoxyphenylcarbamic acids [3], tetrazoles [4, 5], dihydroindolethiones [6] and other heterocycles [7, 8].

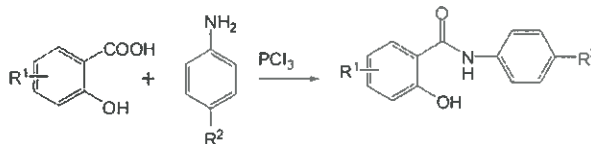
We published QSAR study of substituted salicylanilides [9] as potential antituberculous with the new mechanism of action in one of our previous paper. According to our study, we suppose that the substitution of *N*-phenyl-

salicylanilides in position 5 by chlorine or bromine and the substitution in position 4 in *N*-phenyl by alkyl increases the antimycobacterial activity. The goal of this paper is the synthesis and antimycobacterial evaluation of in acyl moiety halogenated *N*-(4-phenyl)salicylamides.

Results and discussion

Chemistry

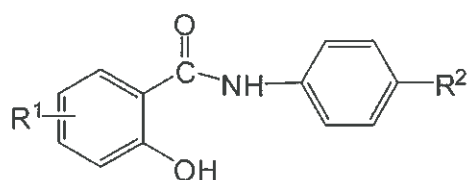
The synthesis of the title compounds is illustrated in Scheme 1 (see also Fig. 1). Various alkyl anilines were reacted in toluene with substituted salicylic acid in the presence of phosphorus trichloride. In the set of the starting compounds were 4-chloro-, 5-chloro-, 5-bromo-, and 3,5-dibromosalicylic acid. The anilides were substituted in position 4 by propyl, butyl, pentyl, hexyl, heptyl, octyl, or *tert*-butyl. Yields, melting points, and the frequency of



Scheme 1. Preparation of *N*-(4-alkylphenyl)salicylamides.

Correspondence: Karel Waisser, Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Heyrovského 1203, CZ 500 05 Hradec Králové, Czech Republic.
E-mail: waisser@faf.cuni.cz
Fax: +420 495 514-330

* Dedicated to Prof. Roland Mayer, Dresden, on the occasion of his 80th birthday.



	R ₁		R ₂		R ₂
1	4-Cl	a	propyl	e	hexyl
2	5-Cl	b	butyl	f	heptyl
3	5-Br	c	<i>tert</i> -butyl	g	octyl
4	3,5-Br ₂	d	pentyl		

Figure 1. Overviews of the structures of *N*-(4-alkylphenyl)salicylamides.

carbonyl of the compounds 1–4 are described in Table 1. Elemental analysis and NMR spectra are described in the Supplemental Material.

Biology

In vitro antimycobacterial activity of the compounds was evaluated against *Mycobacterium tuberculosis* CNCTC My 331/88, *Mycobacterium kansasii* CNCTC My 235/80, *Mycobacterium avium* CNCTC My 330/88, and *Mycobacterium kansasii* 6509/96 using the micromethod for the determination of minimum inhibitory concentration (MIC). All strains were obtained from the Czech National Collection of Type Cultures (CNCTC), National Institute of Public Health, Prague with the exception of *M. kansasii* 6509/96. The minimum inhibitory concentrations are illustrated in Table 2. For the sake of comparison, we

also included the values of MICs of the standard isoniazide (INH). The Free-Wilson method was applied for evaluating the structure-antimycobacterial activity relationship. Results of the analysis are summarized in Table 3, and 4-Chlor-*N*-(4-propylphenyl)salicylamide 1a and 5-chlor-*N*-(4-propylphenyl)salicylamide 2a were selected for preclinical study; other biological evaluation is described only with these compounds. Compounds 1a and 2a were assayed against cell lines K-562 and L-929 for their antiproliferative effects (GI_{50} : concentration which inhibited cell growth by 50%) and against HeLa for their cytotoxic effects (CC_{50} : cytotoxic concentration which causes a specific destructive action on certain cells by 50%; used particularly in referring to the lysis of cells). The cells were incubated with ten concentrations of the target compounds. Values of antiproliferative and cytotoxic activity are illustrated in Table 4. The actions of compounds 1a and 2a on endogenous respiration of Ehrlich ascites carcinoma (EAC) cells are summarized in Table 5.

Calculation

All calculations were carried out with the use of the Multireg H program (Klemera) for Microsoft Excel. The results of Free-Wilson method are summarized in Table 3.

Discussion

The structures of the compounds were confirmed by ¹H- and ¹³C-NMR, IR spectral data and their purity by elemental analysis. All salicylanilides showed a band at 1615–1650 cm⁻¹ in their IR spectra. The absorption maxima of C=O groups in this region are a characteristic feature for salicylanilides. The ¹H- and ¹³C-NMR spectra and also elemental analyses (for both Supplemental Material) of all compounds are in agreement with the proposed structures.

Table 1. Yield, melting point, and carbonyl frequency of halogenated *N*-(4-alkylphenyl)-salicylamides.

Compounds	Yield (%)	M. p. (°C)	$\nu_{C=O}$ (cm ⁻¹)	Compounds	Yield (%)	M. p. (°C)	$\nu_{C=O}$ (cm ⁻¹)
1a	71	187–189	1615	2g	77	170–172	1628
1b	77	167–168	1618	3a	72	196–197	1628
1c	76	232–233	1623	3b	66	189–190	1630
1f	65	166–167	1620	3d	67	186–187	1627
1g	68	163–164	1625	3e	69	183–184	1628
2a	71	186–187	1628	3f	65	184	1629
2b	79	162–163	1628	3g	63	179–180	1628
2c	73	221–222	1627	4b	59	119	1648
2d	79	185–186	1627	4d	52	121	1650
2e	71	172–173	1621	4e	64	120	1649
2f	64	170–172	1628	4f	61	115–116	1650

Table 2. Minimum inhibitory concentration (MIC) of halogenated *N*-(4-alkylphenyl)salicylamides.

	Compounds		MIC (mmol/L) Incubation time 14 d/21 d			
	R ¹	R ²	<i>M. tuberculosis</i> My 331/88	<i>M. kansasii</i> My 235/80	<i>M. avium</i> My 330/88	<i>M. kansasii</i> 6509/96
1a	4-Cl	Propyl	2/2	8/8	8/32	8/8
1b	4-Cl	Butyl	4/4	8/8	8/8	8/8
1c	4-Cl	tert-butyl	16/16	32/62.5	–	32/62.5
1f	4-Cl	Heptyl	4/8	8/16	4/8	8/16
1g	4-Cl	Octyl	16/16	16/16	8/16	16/16
2a	5-Cl	Propyl	2/2	16/16	8/8	16/16
2b	5-Cl	Butyl	4/4	8/8	8/8	4/8
2c	5-Cl	tert-butyl	8/16	16/16	16/32	16/16
2d	5-Cl	Pentyl	16/16	16/16	16/16	16/16
2e	5-Cl	Hexyl	16/16	16/16	8/16	16/16
2f	5-Cl	Heptyl	4/4	8/8	4/8	8/8
2g	5-Cl	Octyl	2/4	4/4	8/32	4/4
3a	5-Br	Propyl	2/2	4/8	16/16	4/8
3b	5-Br	Butyl	8/8	8/8	8/16	8/8
3d	5-Br	Pentyl	8/8	32/32	–	16/16
3e	5-Br	Hexyl	8/16	32/32	8/16	16/16
3f	5-Br	Heptyl	8/8	8/8	8/8	8/8
3g	5-Br	Octyl	2/4	4/4	8/8	4/4
4a	3,5-Br ₂	Butyl	16/32	32/32	62.5/62.5	32/32
4b	3,5-Br ₂	Pentyl	32/32	32/32	62.5/62.5	32/32
4c	3,5-Br ₂	Hexyl	16/32	32/32	32/62.5	32/32
4d	3,5-Br ₂	Heptyl	16/16	32/32	32/32	32/32
Isoniazid			2/1	>250/>250	>250/>250	4/8

Table 3. Activity contribution of Free-Wilson analyses of salicylamides and statistically significant correlations.

Parameter	$\Delta \log$ MIC (mmol/L) Incubation time 14 d/21 d			
	<i>M. tuberculosis</i> My 331/88	<i>M. kansasii</i> My 235/80	<i>M. avium</i> My 330/88	<i>M. kansasii</i> 6509/96
4-Cl	0.0405/-0.0131	0.0303/0.0928	-0.2556/-0.0819	0.0426/0.0912
5-Cl	-0.1193/-0.1357	-0.1121/-0.1584	-0.1936/-0.1439	-0.1161/-0.1294
5-Br	-0.1077/-0.096	-0.099/-0.0793	-0.037/-0.1505	-0.1154/-0.1478
3,5-Br ₂	0.3196/0.3966	0.3067/0.2802	0.6405/0.5219	0.3815/0.3343
4'-propyl	-0.4697/-0.546	-0.1579/-0.1108	0.127/0.0805	-0.1013/-0.0698
4'-butyl	-0.0401/-0.0655	-0.0997/-0.1429	-0.098/-0.0814	-0.1407/-0.1189
4'-tert-butyl	0.2577/0.3466	0.3478/0.3589	0.3586/0.8818	0.3032/0.3874
4'-pentyl	0.3373/0.2178	0.2499/0.2267	0.2415/0.066	0.1857/0.1492
4'-hexyl	0.2373/0.3178	0.2499/0.2267	-0.0716/0.0791	0.1857/0.1492
4'-heptyl	-0.0401/-0.0655	-0.0997/-0.0679	-0.1736/-0.231	-0.0657/-0.0439
4'-octyl	-0.1697/-0.046	-0.2579/-0.3107	0.027/0.0804	-0.2013/-0.2698
μ_0	0.832/0.927	1.118/1.159	1.035/1.245	1.0772/1.1318
r	0.864/0.925	0.842/0.860	0.965/0.887	0.868/0.888
s	0.254/0.197	0.230/0.219	0.134/0.207	0.2064/0.1865
F	3.91/7.89	3.26/3.81	15.10/4.13	4.14/4.95
n	22/22	22/22	20/20	22/22

The values of antimycobacterial activity of the halogenated *N*-(4-alkylphenyl)salicylamides are shown in Table 2. For the sake of comparison, we also included the values of MICs of the standard isoniazide (INH). The results revealed that the compounds exhibited *in vitro* activity against all mycobacterial strains tested. The MIC

values are generally within the range of 2 to 62.5 $\mu\text{mol/L}$, most often between 4 and 16 $\mu\text{mol/L}$. The compounds were less active than INH against *M. tuberculosis* 331/88, on the other hand the compounds possessed a better activity against *M. kansasii* 235/80 and *M. avium* 330/88 than INH. The activities of newly prepared compounds

Table 4. Antiproliferative (GI₅₀) and cytotoxic (CC₅₀) activity.

Compound	L-929GI ₅₀ ^a (mg/mL)	K-562 GI ₅₀ (mg/mL)	HeLa CC ₅₀ ^b /CC ₁₀
1a	2.5	1.0	4.2/0.4
2a	2.3	0.5	2.9/0.4
S.E.M.	0.7	10.3	

^a GI₅₀ (mg/mL): growth inhibition or antiproliferative activity.

^b CC₅₀(mg/mL): cytotoxic concentration.

against *M. kansasii* 6509/96 (clinical isolate) are comparable with that of INH. It is worthy to note that the monohalogenated compounds are more active than the dihalogenated.

According to Free-Wilson analysis the presence 4-propyl and 4-octyl group resulted in the increase in antimycobacterial activity, i.e. the alkyls have two optima of the antimycobacterial activity. With regard to the substituents in the acyl moiety, the substitution in position 5 by chlorine or by bromine leads to a rise of the activity. The highest activity exhibited compound 3g. Substitution with an octyl group strongly increases the lipophilicity (log P: 8.5) of the compounds and it is not favorable for use *in vivo* [10].

4-Chloro-*N*-(4-propylphenyl)salicylamide 1a and 5-chloro-*N*-(4-propylphenyl)salicylamide 2a were chosen for preclinical testing. Both compounds displayed a promising activity *in vitro* against all mycobacterial strains tested, their activities reach that of INH against *M. tuberculosis* My 331/88 and *M. kansasii* 6509/96 and exceeded the potency of INH against *M. kansasii* My 235/80 and *M. avium* 330/88. These selected compounds were subjected to an antiproliferative effect assay and cytotoxic effect assay. According to the values of GI and CC, compounds can be considered as moderately cytotoxic. Both substances are able to release previously inhibited respiration by oligomycin similarly to carbonylcyanide-*p*-trifluoromethoxy phenylhydrazone (data not shown) in tests on effect on endogenous respiration and mode of action. We can conclude that both substances are similar to other uncouplers (such as dinitrophenole and carbonylcyanide-*p*-trifluoromethoxy phenylhydrazone). The compounds decrease the level of ATP that decreases or inhibits growth of bacteria. This effect can be connected to the mechanism of the antimycobacterial action.

Results shown in Table 5 are the arithmetic means of the three separate experiments (for each concentration). The precision of these measurements is ±%. Stimulation of endogenous respiration of Ehrlich ascites cells is significantly dependent on tested concentration, however, is similar as in the case of the most effective uncoupler of

Table 5. Effects of compounds 1a and 2a on endogenous respiration of Ehrlich ascites carcinoma cells.

Compound	Concentrations of compounds (mmol/L)	Consumption of oxygen (nmol O ₂ /min)	Percent of control (%)
1a	0	120.15	–
	22.73	184.68	+153.7
	45.45	160.2	+133.3
	68.18	151.3	+125.9
	90.91	135.73	+112.9
2a	113.64	115.7	+96.3
	0	115.7	–
	22.73	244.75	+211.5
	45.45	244.75	+211.5
	68.18	202.48	+175.0
	90.91	202.48	+175.0
	113.64	180.23	+155.8

Cell suspension (0.2 mL) containing 17 mg dry weight, was added to 2.0 mL of medium [11], pH 7.4. Oxygen uptake was measured at 30°C.

carbonylcyanide-*p*-trifluoromethoxy phenylhydrazone (FCCP).

This work is a part of the research project No. MSM0021620822 of the Ministry of Education of the Czech Republic.

Experimental

Melting points were determined on a Kofler block (C. Reichert, Vienna, Austria) and are uncorrected. The IR spectra were measured in KBr pellets or in CHCl₃ solutions on a Nicolet Impact 400 apparatus (Nicolet, Madison, WI, USA); the wave numbers are given in cm⁻¹. The NMR spectra were recorded on a Varian Mercury-Vx BB 300 spectrometer operating at 300 MHz for ¹H- and 75 MHz for ¹³C-NMR in d₆-DMSO (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA). Chemical shifts were recorded as δ values in ppm, and were indirectly referenced to tetramethylsilane via the solvent signal (7.26 for ¹H- and 77.0 for ¹³C-NMR). The coupling constants J are given in Hz. Elemental analyses were done on a CHNS-O CE elemental analyzer (FISONS EA1110, Milano). Analyses of the C, H, N, S content were within ±0.4% of the theoretical values. TLC was performed on silica gel plates precoated with a fluorescent indicator, Silufol UV 254 + 366 (Kavalier, Votice, The Czech Republic), in cyclohexane/acetone 3 : 1, to check the purity of the products.

General procedure for the preparation of *N*-(4-Alkylphenyl)salicylamides

A suspension of a substituted salicylic acid (0.02 mol) and a substituted aniline (0.02 mol) in toluene (100 mL) was heated under reflux in the presence of PCl₃ (0.01 mol) for three hours. The reaction mixture was filtered while hot, and the solvents evaporated. The product was crystallized from ethanol-water (yields in the range 52–79%).

Antimycobacterial susceptibility testing

The methods of experiments are described in our previous paper [3, 9]. The MICs were determined after incubation at 37°C for 14 and 21 days.

Antiproliferative and cytotoxic activity evaluation

The methods of experiments are described in our previous paper [11]. The 4-chloro-*N*-(4-propylphenyl)salicylamide **1a** and 5-chloro-*N*-(4-propylphenyl)salicylamide **2a** were chosen for the testing.

Endogenous respiration evaluation

The 4-chloro-*N*-(4-propylphenyl)salicylamide **1a** and 5-chloro-*N*-(4-propylphenyl)salicylamide **2a** were chosen for the testing. EAC cells were maintained and propagated in a strain of H Swiss albino mice from the Institute of Virology of Slovak Academy of Sciences, Bratislava, about 10 weeks old and 20–25 g body weight, as described previously [12].

The effect of compounds tested on the endogenous respiration of EAC cells was measured with a Clark-type oxygen electrode as described previously [13] in 154 mM NaCl, 6.2 mM KCl, 11 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4 [14]. Compounds dissolved in DMSO were mixed with 2.0 mL of this medium, and 200 µL of the cell suspension in the same buffer solution were added. Incubation temperature was 30 °C.

References

- [1] L. Zahajská, V. Klimešová, J. Kocí, K. Waisser, J. Kaustová, *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **2004**, 337, 549–555.
- [2] K. Waisser, K. Dražková, J. Kuneš, V. Klimešová, J. Kaustová, *Farmaco* **2004**, 59, 615–625.
- [3] K. Waisser, R. Doležal, J. Cižmárik, J. Kaustová, *Folia Microbiol.* **2006**, 51, 21–24.
- [4] K. Waisser, J. Adamec, R. Doležal, J. Kaustová, *Folia Microbiol.* **2005**, 50, 195–197.
- [5] J. Adamec, K. Waisser, J. Kuneš, J. Kaustová, *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2005**, 338, 385–389.
- [6] K. Waisser, L. Heinisch, M. Šlosárek, J. Janota, *Folia Microbiol.* **2006**, 51, 25–26.
- [7] J. Matyk, K. Waisser, K. Dražková, J. Kuneš, *et al.*, *Farmaco* **2005**, 60, 399–408.
- [8] K. Waisser, L. Heinisch, M. Šlosárek, J. Janota, *Folia Microbiol.* **2005**, 50, 479–482.
- [9] K. Waisser, O. Bureš, P. Holý, J. Kuneš, *et al.*, *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **2003**, 336, 53–71.
- [10] K. Waisser, Ž. Odlerová, *Folia Pharmaceutica Univ. Carol.* **1995**, 18, 35–39.
- [11] H. M. Dahse, U. Möllmann, K. Waisser, K. Palát, *et al.*, *Folia Pharm. Univ. Carol.* **2002**, 26–33.
- [12] M. Miko, M. Poturnajova, R. Soucek, *Neoplasma* **2002**, 49, 167–171.
- [13] M. Miko, B. Chance, *Biochim. Biophys. Acta* **1965**, 105, 410–423.
- [14] B. Chance, B. Hess, *J. Biol. Chem.* **1959**, 234, 2404–2412.

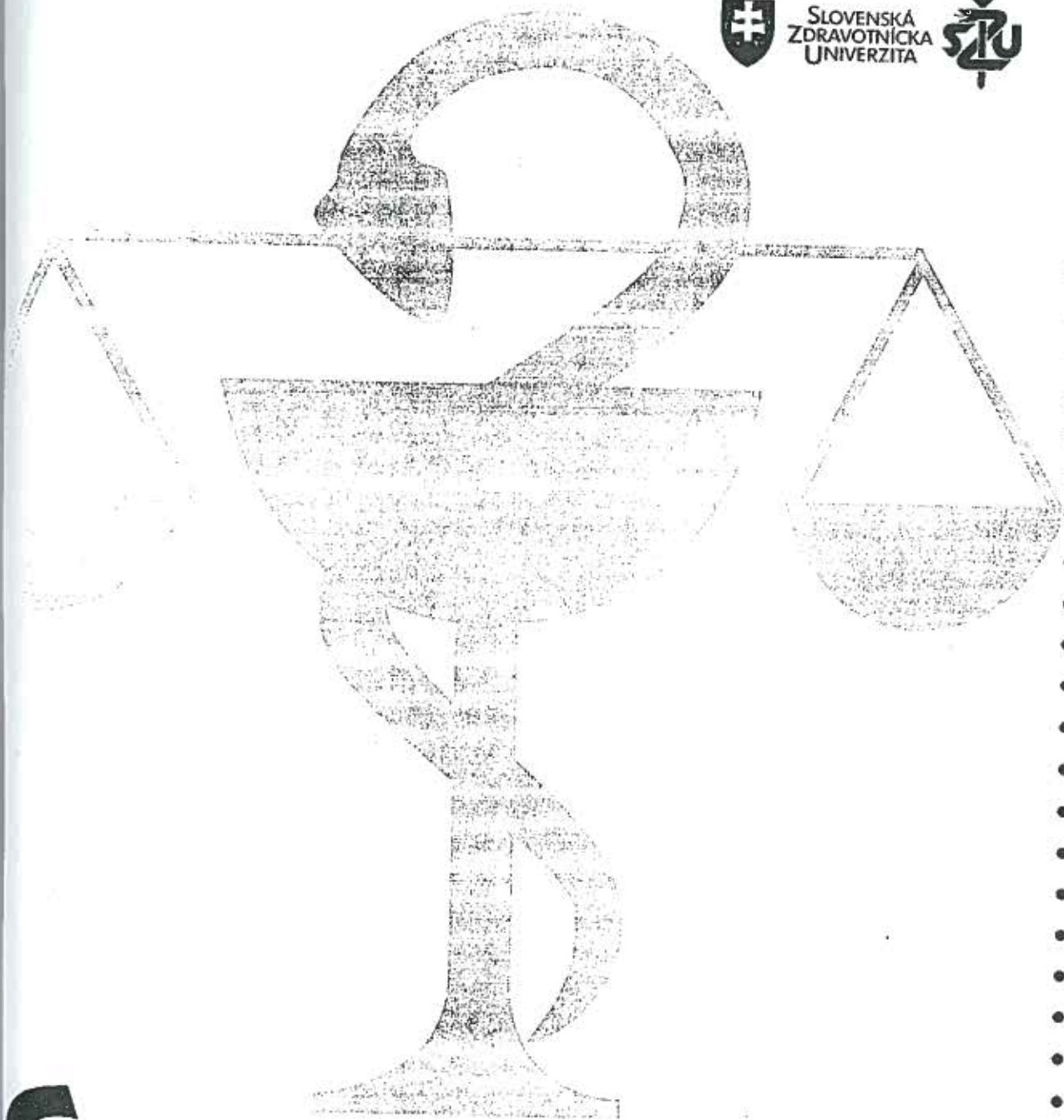
ROČNÍK LXXIII • ISSN 0014-8172 •

Odborný časopis Ministerstva zdravotníctva SR
a Slovenskej zdravotníckej univerzity v Bratislave

9-10/2004



SLOVENSKÁ
ZDRAVOTNÍCKA
UNIVERZITA



Indexed in Embase/Excerpta Medica database
Indexed in International Pharmaceutical Abstract
Indexed in Chemical Abstract

farmaceutický obzor

J. MATYK,
J. ADAMEC,
H. DIVIŠOVÁ,
P. HUSÁKOVÁ,
K. WAISSER

Katedra anorganické
a organické chemie,
Farmaceutické fakulty UK,
Hradec Králové

Příprava antimykobakteriálních salicylanilidů s předpokládaným výrazným účinkem

WME

V minulém roce jsme uveřejnili dvě studie o vztazích mezi strukturou a antimykobakteriální aktivitou salicylanilidů. I když studované skupiny byly početné, z alkylů mezi substitučními obměnami v poloze 4'-salicylanilidů obsahovaly pouze methyl. Později jsme zjistili, že vyšší alkylly zvyšují antimykobakteriální aktivitu. Cílem práce byla příprava 4'-alkyl-4-chlor-salicylanilidů, 4'-alkyl-5-chlor-salicylanilidů, 4'-alkyl-5-brom-salicylanilidů a 4'-alkyl-3,5-dibrom-salicylanilidů. Výchozí látkou pro syntézu byli příslušné halogenované salicylové kyseliny, tj. 4-chlor-salicylová kyselina, 5-chlor-salicylová kyselina, 3,5-dibrom-salicylová kyselina, a 5-brom-salicylová kyselina, a dále příslušné 4-alkylaniliny (4-pentylanilin, 4-hexylanilin, 4-heptylanilin, 4-oktylanilin a 4-*terc*-butylanilin). Nové připravené látky po ověření struktury byly odeslány na hodnocení antimykobakteriální aktivity.

Práce je součástí výzkumného záměru MSM 111600001

L. MATYSOVÁ¹,
L. HAVLÍKOVÁ¹,
J. NOVÁČKOVÁ¹,
S. RECH²,
P. SOLICH^{1,3}

¹Katedra analytické chemie,
Farmaceutická fakulta UK,
Hradec Králové

²Rheinische-Friedrich-Wilhelms
-Universität Bonn,
Pharmazeutische Fakultät,
Poppelsdorf, Germany

³Výzkumné centrum LN00B125,
Farmaceutická fakulta UK,
Hradec Králové

Problematika HPLC analýzy parabenů v topických léčivých přípravcích

Parabeny se používají jako konzervační přísady ve velkém množství topických léčivých přípravků. Jsou málo toxické a jejich antimikrobiální účinnost není závislá na pH. V léčivých přípravcích se používají často ve směsi methylparaben a propylparaben.

Metodika HPLC je pro analýzu parabenů v topických léčivých přípravcích vhodná, neboť jako separační metoda umožňuje identifikaci složek a kvantitativní hodnocení směsí v jednom kroku, takže je možné stanovit oba parabeny během jedné analýzy. Metoda HPLC je vhodná i v těch případech, kdy se vlastní účinné látky v mastech, gelech a suspenzích stanovují jinými analytickými metodami a je třeba stanovit pouze obsah parabenů.

V rámci kontrolní laboratoře na Katedře analytické chemie FaF UK v Hradci Králové jsou zároveň prováděny kompletní validace vyvinutých HPLC metod, které respektují moderní lékopisy, doporučení SÚKL a ostatní platné normy.

Cílem práce bylo vytvořit stručný přehled nejnověji vyvinutých a validovaných metod pro stanovení parabenů pomocí HPLC, včetně uvedení chromatografických podmínek procesu izolace stanovovaných látek z léčivých přípravků a parametrů validace.

Problematika byla řešena za podpory grantu MSM 111600001 a Výzkumného centra LN00B125

P. MIKUŠ,
P. KUBAČÁK,
I. VALÁŠKOVÁ,
E. HAVRÁNEK

Katedra farmaceutické analýzy
a nukleární farmacie,
Farmaceutická fakulta UK,
Bratislava

Stanovenie loratadínu v tabletách kapilárnou zónovou elektroforézou

Loratadín patrí do farmakoterapeutickej skupiny H₁-antihistaminík 2. generácie, antialergik. s nízkou afinitou k H₁ receptorom v mozgu. Je indikovaný na liečbu alergickej nádchy - sezónnej i celoročnej, vrátane alergickej konjunktivitídy, urtikárie a ďalších alergických kožných ochorení. Spôsob podávania loratadínu je perorálne formou tabliet na priame použitie.

Práca je zameraná na stanovenie loratadínu v tabletách Claritine®. Použitie metódy kapilárnej zónovej elektroforézy (CZE) v hydrodynamicky uzatvorenom separačnom systéme, využívajúcom kapiláry s väčšími vnútornými priermi, bolo uprednostnené pre hydrodynamicky otvoreným CZE systémom, pretože umožňuje zlepšiť niektoré analytické parametre (citlivosť, kapacitu dávkovania, separačnú kapacitu, presnosť metódy). Použitie vodného prostredia (úprava vzorky, analýza) je výhodou CZE metódy v porovnaní s HPLC. Bol študovaný vplyv pH, nosného kationu a protiiónu na migračné parametre loratadínu. Po ich optimalizácii boli vybrané nasledujúce parametre: 24 mmol/l glycin ako nosný kation, 1.6 mmol/l kyselina citrónová a 84 mmol/l kyselina octová ako protiióny, 0.2% metylhydrol roxyetylcelulóza ako supresor elektroosmotického toku v kapiláre, pH 3.2, hnací prúd 10⁴ μA, vlnová dĺžka fotometrickej absorpčnej detekcie 240 nm.

Chemické listy

11



Organické fosforové báze

Stanovení pesticidů

Hydrogenační deoxygenace

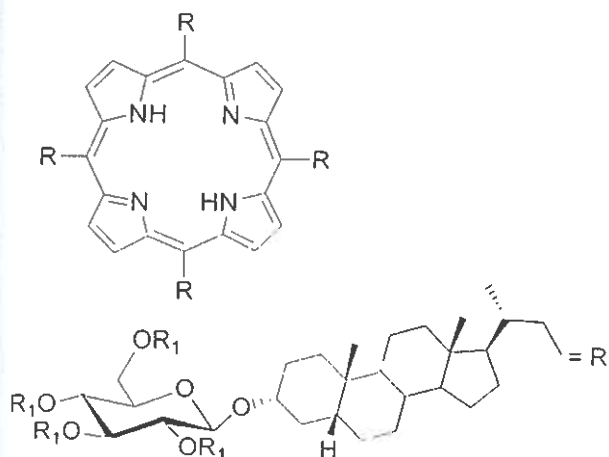
Výuka chemie

Liblice 2004

číslo 98

SAC 98 (11) 963 - 1070 (2004) ISSN 0009 - 2770 <http://chemicke-listy.vscht.cz>

supramolekuly a supramolekulární synthony jsou používány v elektrochemii³, pro membránové, samoskladné a biologické studie. Autoři chtěli demonstrovat možnosti kombinace již známých receptorů se sacharidy, které mohou sloužit jako "polární kotvy", chirální selektory nebo modifikátory polarit (rozpuštěnosti), závisející na stupni jejich chránění/odchránění. V poslední době byly připraveny *meso*-substituované porfyriny¹ se zajímavými vlastnostmi^{2,4}.



X

Práce byla podporována projekty MSM 113100001 223300006 a COST D-31 č. 1P0-10CD31 001

LITERATURA

1. Zelenka K., Trnka T., Tislerova I., Král V., Dukh M., Drašar P.: Collect. Czech. Chem. Commun. 69, 1149 (2004).
2. Dukh M., Černý I., Pouzar V., Král V., Berek J., Drašar P., in: *US-CZ Workshop on Electrochemical Sensors*, Abstract Book p. 5, Czech Chemical Society, Prague, 2001.
3. Dukh M., Černý I., Urbanský M., Pouzar V., Král V., Drašar P.: Czech Pat. 290491, Czech Pat. Appl. 3098 (1999).
4. Dukh M., Šaman D., Lang K., Pouzar V., Černý I., Drašar P., Král V.: Org. Biomol. Chem. 1, 3458 (2003).

VYSOCE ÚČINNÉ ANTIMYKOBAKTERIÁLNÍ SALICYLANILIDY

JOSEF MATYK, HANA DIVIŠOVÁ, PETRA HUSÁKOVÁ a KAREL WAISSER

Katedra anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy
matyk@faf.cuni.cz

V minulém roce jsme uveřejnili dvě studie o vztazích mezi strukturou a antimykobakteriální aktivitou salicylanilidů.¹ I když studované skupiny byly početné, z alkyly mezi

substitučními obměnami v poloze 4' salicylanilidů obsahovaly pouze methyl. Předpokládali jsme, že vyšší alkyly budou zvyšovat antimykobakteriální aktivitu. Cílem práce byla příprava v acylové části halogenem substituovaných 4-alkylsalicylanilidů. Substituci halogenem v acylové části jsme zvolili proto, že nejvýrazněji zvyšovala aktivitu u dříve připravených látek. Výchozí látkou pro syntézu byly příslušné halogenované salicylové kyseliny, tj. 4-chlorsalicylová kyselina, 5-chlorsalicylová kyselina, 3,5-dibromsalicylová kyselina, a 5-bromsalicylová kyselina, a dále příslušné 4-alkylaniliny (4-pentylanilin, 4-hexylanilin, 4-heptylanilin, 4-oktylanilin a 4-*tert*-butylanilin). Syntézy nových salicylanilidů byly prováděny podobným způsobem jako v uvedeném citovaném sdělení. Připravené látky byly po ověření struktury odeslány na hodnocení antimykobakteriální aktivity. Ukázalo se, že náš předpoklad byl správný a jedná se o vysoce účinné antimykobakteriální látky.²

Práce je součástí výzkumného záměru MSM 111600001.

LITERATURA

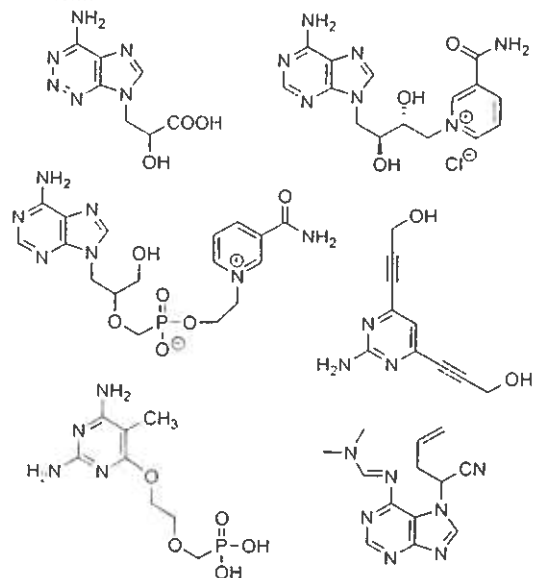
1. Waisser K., Bureš O., Holý P., Kuneš J., Oswald R., Jirásková L., Pour M., Klimešová V., Kubicová L., Kaustová J.: Arch. Pharm. 336, 53 (2003).

ACYKLIČKÉ ANALOGY NUKLEOSIDŮ A NUKLEOTIDŮ – VZTAHY MEZI CHEMICKOU STRUKTUROU A BIOLOGICKOU AKTIVITOU

DANA HOCKOVÁ

Ústav organické chemie a biochemie, Akademie věd České republiky, Flemingova nám. 2, 166 10 Praha 6
lusice@uochb.cas.cz

Analogy nukleosidů a nukleotidů jsou stále intenzivně studovány v souvislosti s terapií virových a nádorových onemocnění.



Obr. 1. Příklad studovaných struktur

ČESKÁ FARMACEUTICKÁ SPOLEČNOST

ČESKÉ LÉKAŘSKÉ SPOLEČNOSTI J. E. PURKYNĚ

Sekce syntetických léčiv a sekce farmaceutické kontroly a bioanalytiky

SLOVENSKÁ FARMACEUTICKÁ SPOLEČNOST

Sekcia farmaceutickej chémie a sekcia farmaceutickej analýzy
ve spolupráci s

FARMACEUTICKOU FAKULTOU

VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÉ UNIVERZITY BRNO

pořádají

34. KONFERENCI

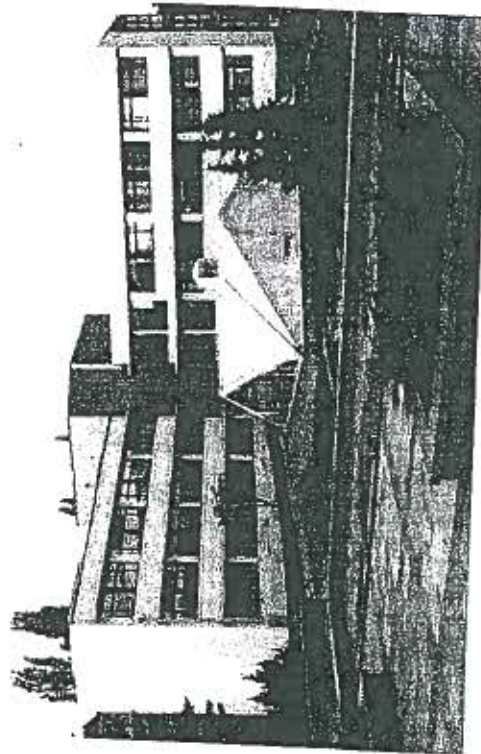
SYNTÉZA A ANALÝZA LÉČIV

Nové směry ve výzkumu léčiv

SBORNÍK

Vydala Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

ISBN 80-7305-533-3



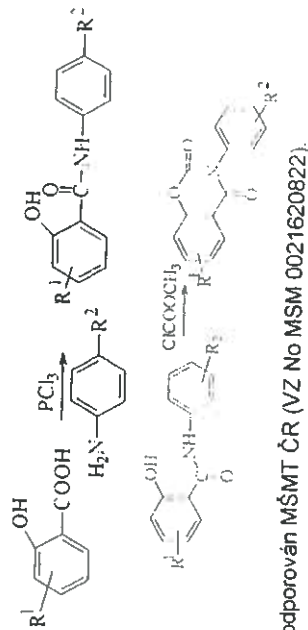
Brno, 12. - 14. září 2005

PERPEKTIVA DALŠÍHO VÝVOJE ANTITUBERKULOTIK, INHIBITORŮ DVOUKOMPLEMENTOVÉHO SYSTÉMU BAKTÉRIÍ

^aMATYK JOSEF, ^bDIVIŠOVÁ HANA, ^aHUSÁKOVÁ PETRA, ^aWAISSER KAREL, ^bKAUSTOVÁ JARMILA

^aUniverzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Heyrovského 1203, 50005 Hradec Králové, Česká republika, e-mail: Matyko@faf.cuni.cz, Waisser@faf.cuni.cz
^bZdravotní ústav se sídlem v Ostravě, Parýzánské nám. 7, 70200 Ostrava, e-mail: jarmila.kaustova@zuova.cz

Jednou z charakteristik období od roku 1985 je návrat tuberkulózy do Evropy a severní Ameriky. Pouze v letech 1900 - 1999 v Evropě a severní Americe zemřelo téměř 100 000 lidí (30 milionů v rozvojových zemích). V roce 1998 bylo zjištěno, že salicylanilidy jsou inhibitory bakteriálního dvou-komponentového systému¹, což je nový mechanismus antibakteriální aktivity. Salicylanilidy jsou účinné i proti mykobaktériím, a proto je lze považovat za potenciální antituberkulotika. Mechanismus účinku je rozdílný od mechanismu účinku používaných antituberkulotik v lékařské praxi. V nedávné době jsme zjistili, že účinek salicylanilidů zvyšuje alkylový řetězec² v poloze 4' a substituce halogenem v acylové části molekuly. Nejvyšší aktivitu vykazují salicylanilidy, které mají v poloze 4 a 5 na acylovém zbytku vázaný chlor. Jako nejúčinnější alkyly v poloze 4' se jeví butyl a heptyl. Obdobný mechanismus účinku mají i 3-fenyl-2H-benzoxazin-2,4(3H)-diony³. Cílem této práce byla syntéza a antimykobakteriální hodnocení 4'-alkylsalicylanilidů a 3-(4'-alkylfenyl)-2H-benzoxazin-2,4(3H)-dionů. Účinek derivátů benzoxazindionu je zpravidla vyšší než u odpovídajících salicylanilidů. Syntézy jsou popsány na příloženém schématu.



Projekt je podporován MŠMT ČR (VZ No MSM 0021620822).

- 1 Hlasta D. J., Demers J. P., Foletto B. D., et al.: Bioorg. Med. Chem. Letters 8, 1923 (1998)
- 2 Waisser K., Oswald R., Kuneš J., Kaustová J., Kaustová J.: Folia Pharm. Univ. Carol 31-32, 33 (2004)
- 3 Waisser K., Dražková K., Holý P., Palát K. Jr., Kaustová J.: Folia Pharm. Univ. Carol, 29-30, 17, (2003)

STANOVENÍ DIKLOFENAKU SODNÉHO A JEHO DEGRADAČNÍHO PRODUKTU METODOU RP-HPLC

MATYSOVÁ LUDMILA^a, HAVLÍKOVÁ LUCIE^b, HOMOLOVÁ ALŽBĚTA^a, SOLICH PETR^a, ŠÍCHA JAN^b

^aUniverzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, katedra analytické chemie, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, e-mail: ludmila.matysova@faf.cuni.cz
^bBochemia Group, Herbacos-biofarma s.r.o., Štrossova 239, 530 02, Pardubice

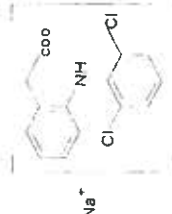
Cílem práce bylo vyvinout a validovat metodu pro stanovení obsahu diklofenaku sodného (obr. 1) a jeho degradačního produktu v topickém léčivém přípravku. Diklofenak sodný je antiflogistikum ze skupiny derivátů kyseliny fenylacetové, tzv. fenaků. Patří mezi nesteroidní protizánětlivá léčiva. Topicky aplikovaný diklofenak velmi dobře proniká přes kůži do hlubších vrstev epidermis a účinná koncentrace dosahuje v průběhu cca 20 minut¹⁾.

Sodná sůl diklofenaku se nejčastěji rozkládá za vzniku degradačního produktu s chemickým názvem 1-(2,6-dichlorfenyl)-1,3-dihydro-2H-indol-2-on (obr. 2).²⁾ Cílem práce bylo vyvinout jednoduchou a rychlou metodu stanovení diklofenaku sodného při zachování vysoké přesnosti a spolehlivosti metody. Zároveň bylo třeba metodu kompletně validovat podle platných norem, vzhledem k jejímu dalšímu předpokládanému použití v rutinní kontrole léčivého přípravku (gelu).

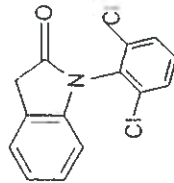
Byla vypracována metoda vnitřního standardu, kterým byl zvolen flurbiprofen. Pro analýzu byla využita kolona SUPELCO Discovery C18, 125x4 mm, velikost částic 5 µm. Optimální mobilní fázi byla směs methanolu a kyseliny fosforečné o pH 2,5 v poměru 65:35 (v/v) a průtok 1,0 ml/min., s UV detekcí při 254 nm. Dávkovány objem byl 10 µl, teplota při analýze byla 25°C.

Kompletní validace, vycházející z požadavků jak SUKL, tak Guidelines ICH (International Conference on Harmonisation Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) a Amerického lékopisu, 26. vydání. Všechny parametry plně vyhovovaly daným požadavkům, vyvinutá metoda je již používána v analýze uvedeného léčivého přípravku a to jak při sledování jeho stability, tak při výstupních kontrolách a kontrolách homogenity nově vyrobených šarží přípravku.

Obr. 1 Diklofenak sodný



Obr. 2 1-(2,6-dichlorfenyl)-1,3-dihydro-2H-indol-2-on



- 1) Mikro verze AISLP 2005 2 pro MS Windows
- 2) Český lékopis 2002 (Czech Pharmacopoeia), Grada Publishing Ltd, Praha 2003, s. 2259

Problematika byla řešena za podpory projektu MSM 0021620822.

Full Paper

**The Oriented Development of Antituberculotics (Part II):
Halogenated 3-(4-Alkylphenyl)-1,3-benzoxazine-2,4-(3H)-
diones***

Karel Waisser¹, Josef Matyk¹, Hana Divišová¹, Petra Husáková¹, Jirí Kuneš¹, Vera Klimešová¹, Karel Palát¹, and Jarmila Kaustová²

¹ Department of Inorganic and Organic Chemistry, Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Heyrovského, Czech Republic

² Regional Institute of Public Health, Department for Diagnostic of Mycobacteria, Ostrava, Czech Republic

Based on our previous studies, 21 new halogenated 3-(4-alkylphenyl)-1,3-benzoxazine-2,4-(3H)-diones were synthesized by the reaction of salicylanilides and methyl-chloroformate. All compounds were screened *in vitro* against three different strains of mycobacterium, and Free-Wilson method was used to establish structure-activity relationships. 6-Bromo-3-(4-butylphenyl)-1,3-benzoxazine-2,4-(3H)-dione **3b** proved to be the most active compound of the series.

Keywords: Antimycobacterial activity / Antituberculotic activity / Benzoxazine / Tuberculostatics

Received: October 18, 2006; accepted: January 18, 2007

DOI 10.1002/ardp.200600002

Introduction

The return of tuberculosis to Europe and North America is one truly unpleasant development of the period dating from 1985. New mycobacterial diseases, which recently have been considered to be transferable to humans, occurred during the last years (mycobacterioses produced by potentially pathogenic strains). The development of new antituberculotic agents is the principal goal of our group. Lately, we have studied a number of structurally different compounds, such as the derivatives of salicylamides [1], pyridine [2, 3], alkoxyphenylcarbamic acids [4], tetrazoles [5, 6], dihydroindolethiones [7], and other heterocycles [8, 9]. Our research was strongly oriented to collaborate with German institutes like Technical University Dresden, Friedrich Schiller University Jena, Hans Knöll Institute Jena, and Maxmilian University in Munich. Approximately ten years ago, we studied antimycobacterial derivatives with the new pharmacophore together with Hans-Dietrich Stachel [10, 11] and

for several years now, we are investigating the antimycobacterial arylbenzoxazine-2,4(3H)-diones [12].

The goal of this paper is the synthesis and antimycobacterial evaluation of 3-(4-alkylphenyl)-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-diones, substituted in the ring B by chlorine or bromine, and to complete with this study our previous work [1]. 3-Phenyl-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-diones are the cyclic carbamic derivatives of salicylanilides and the mechanism of the antimycobacterial activity of 3-phenyl-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-diones is similar to that of salicylanilides. [13].

Results and discussion**Chemistry**

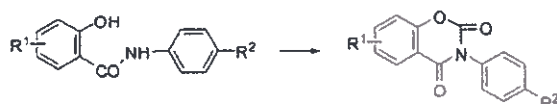
The synthesis of the title compounds is illustrated in Scheme 1. The synthesis of the starting material, halogenated *N*-(4-alkylphenyl)salicylamides, were described in the previous paper [1]. Various *N*-(4-alkylphenyl)salicylamides, being halogen substituted in ring A, were reacted with methyl-chloroformate in dry pyridine. The halogenated 3-(4-alkylphenyl)-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-

Correspondence: Karel Waisser, Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Heyrovského 1203, CZ 500 05 Hradec Králové, Czech Republic
E-mail: waisser@faf.cuni.cz
Fax: +420 495 514-330

* Dedicated to Prof. Hans-Dietrich Stachel (Munich) on the occasion of his 80th birthday.

Table 1. Yield, melting point, and carbonyl frequency of 3-(4-alkylphenyl)-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-diones.

Compound	Yield (%)	M. p. (°C)	$\nu_{\text{C=O}}$ (cm ⁻¹)	Compound	Yield (%)	M. p. (°C)	$\nu_{\text{C=O}}$ (cm ⁻¹)
1a	60	188–190	1773, 1703	2f	56	134–135	1777, 1708
1b	58	189–190	1771, 1705	2g	67	141–142	1777, 1708
1c	61	214–215	1770, 1709	3a	58	193–194	1774, 1700
1d	52	181–182	1773, 1701	3b	63	194–195	1770, 1702
1e	52	162–165	1776, 1699	3d	64	179–180	1777, 1709
1g	50	181–182	1773, 1702	3e	58	168–169	1774, 1701
2a	63	158–160	1777, 1696	3f	62	158–160	1774, 1701
2b	66	161–162	1776, 1708	4b	47	168–169	1774, 1701
2c	66	214–215	1767, 1716	4d	58	197–198	1780, 1701
2d	56	136–137	1777, 1708	4e	48	196–199	1781, 1703
2e	51	146–148	1776, 1708				



	R ¹		R ²
1	6-Cl	a	propyl
2	7-Cl	b	butyl
3	6-Br	c	tert-butyl
4	6,8-Br ₂	d	pentyl
		e	hexyl
		f	heptyl
		g	octyl

Scheme 1. Synthesis of 3-(4-alkylphenyl)-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-diones.

diones were purified by crystallization from ethanol. Yield, melting point, and carbonyl frequency of the products are summarized in Table 1. Data from elemental analysis and NMR spectra are described in the Supporting Information.

Biology

In vitro antimycobacterial activity of the compounds was evaluated against *Mycobacterium tuberculosis* CNCTC My 331/88, *Mycobacterium kansasii* CNCTC My 235/80, *Mycobacterium avium* CNCTC My 330/88 and *Mycobacterium kansasii* 6 509/96 using the micromethod for the determination of minimum inhibitory concentration (MIC). All strains were obtained from the Czech National Collection of Type Cultures (CNCTC), National Institute of Public Health, Prague with the exception of *M. kansasii* 6 509/96. The minimum inhibitory concentrations are illustrated in Table 2. For the sake of comparison, we also include the MIC values of the standard isoniazide (INH).

Calculation

All calculations were carried out with the use of the Multireg H program (Klemera) for Microsoft Excel. The results of Free–Wilson method are summarized in Table 3.

Table 2. Minimum antimycobacterial inhibitory activity.

Compound		MIC (μmol/L) Incubation time 14 d/21 d			
R ¹	R ²	<i>M. tuberculosis</i> My 331/88	<i>M. kansasii</i> My 235/80	<i>M. avium</i> My 330/88	<i>M. kansasii</i> 6 509/96
1a	6-Cl propyl	16/16	8/8	16/16	8/16
1b	6-Cl butyl	8/8	8/8	8/8	8/16
1c	6-Cl tert-butyl	8/16	8/16	16/32	8/8
1d	6-Cl pentyl	8/4	8/16	8/16	8/16
1e	6-Cl hexyl	8/8	8/16	8/8	8/16
1g	6-Cl octyl	8/8	4/8	8/8	4/4
2a	7-Cl propyl	8/8	8/16	16/16	8/16
2b	7-Cl butyl	8/8	8/16	16/16	8/16
2c	7-Cl tert-butyl	4/4	8/16	4/8	8/8
2d	7-Cl pentyl	8/8	8/8	4/8	8/16
2e	7-Cl hexyl	4/8	8/8	4/8	8/8
2f	7-Cl heptyl	16/32	8/8	16/32	8/16
2g	7-Cl octyl	8/16	8/16	8/16	8/16
3a	6-Br propyl	16/16	8/16	16/16	8/16
3b	6-Br butyl	4/4	8/8	8/8	8/8
3d	6-Br pentyl	4/4	8/16	8/8	8/8
3e	6-Br hexyl	4/8	8/16	4/8	8/8
3f	6-Br heptyl	4/8	8/16	4/4	4/8
4b	6,8-Br ₂ butyl	32/32	62.5/62.5	62.5/62.5	62.5/62.5
4d	6,8-Br ₂ pentyl	16/32	16/16	62.5	32/32
4e	6,8-Br ₂ hexyl	62.5/62.5	32/32	62.5	62.5/62.5
INH		1/2	250/250	250/250	8/8

Discussion

The study was incited by the previous synthesis of antimycobacterial salicylanilides. For the synthesis of 3-(4-alkylphenyl)-1,3-benzoxazine-2,4(3H)diones salicylanilides are reacted with chloroformate. The 1,3-benzoxazine-2,4(3H)diones are cyclic carbamates of salicylanilides. The structures of products were confirmed by elemental analyses and by IR, ¹H- and ¹³C-NMR spectral methods. All halogenated 3-(4-alkylphenyl)-1,3-benzoxazine-2,4(3H)diones showed characteristic absorption maxima of two C=O groups at 1767–1777 cm⁻¹ and 1696–1716 cm⁻¹ with the exception of compound 3d. Two absorption maxima of the C=O groups in this region are a characteristic feature for 1,3-benzoxazine-2,4(3H)diones. The other confirmation of the structure was by NMR

Table 3. Activity contribution of Free-Wilson analyzes of benzoxazinediones and statistical significants of correlations.

Parameter	$\Delta \log \text{MIC}$ ($\mu\text{mol/L}$) For incubation time 14 d/21 d			
	<i>M. tuberculosis</i> My 331/88	<i>M. kansasii</i> My 235/80	<i>M. avium</i> My 330/88	<i>M. kansasii</i> 6509/96
R ¹ : 6-Cl	0.0209/0.207	-0.1121 ^{a)}	-0.0435/-0.0646	-0.1383/-0.062
7-Cl	-0.0935/-0.0842	-0.0638 ^{a)}	-0.1504/-0.0569	-0.0696/-0.006
6-Br	-0.2664/-0.2469	0.0023 ^{a)}	-0.2318/-0.2654	-0.1459/-0.235
6,8-Br ₂	0.6204/0.6494	0.5133 ^{a)}	0.8247/0.7043	0.7451/0.5321
R ² : propyl	0.2701/0.1744	0.0152 ^{a)}	0.2991/0.1718	0.0322/0.1585
butyl	-0.0444/-0.1423	0.0901 ^{a)}	0.0575/-0.0365	0.0572/0.679
tert-butyl	-0.1566/-0.0904	0.0165 ^{a)}	-0.0458/0.1037	0.0182/-0.208
pentyl	-0.1132/-0.1423	-0.0597 ^{a)}	-0.0926/-0.0365	-0.0178/0.0002
hexyl	-0.0382/0.0078	0.0153 ^{a)}	-0.0962/-0.115	0.0572/0.0002
heptyl	0.1371/0.3227	0.0025 ^{a)}	0.0483/0.054	-0.128/0.028
octyl	-0.0066/0.0596	-0.1335 ^{a)}	-0.0458/-0.0464	-0.1318/-0.207
μ_0	0.943/1.043	0.9714 ^{a)}	1.043/1.157	0.1015/0.1724
r	0.881/0.878	0.928 ^{a)}	0.915/0.860	0.971/0.901
s	0.2033/0.2087	0.1253 ^{a)}	0.211/0.238	0.1015/0.1724
F	4.24/4.12	7.57 ^{a)}	6.25/3.48	20.42/5.25
n	21/21	21/21	21/21	21/21

^{a)} Correlation is not statistically significant.

methods: The ¹H- and ¹³C-NMR spectra of all compounds (see Table 1) are in the good agreement with the proposed structures. In addition, elemental analyses of all compounds correspond to the calculated values.

The values of antimycobacterial activity of the halogenated 3-(4-alkylphenyl)-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-diones are shown in Table 2. For the sake of comparison, we also included the MIC values of the standard isoniazide (INH). The results revealed that the compounds exhibited *in vitro* activity against all tested mycobacterial strains. The values of MICs are generally within the range 4–62.5 $\mu\text{mol/L}$, most often between 4–8 $\mu\text{mol/L}$. The compounds were less active than INH against *M. tuberculosis* 331/88, on the other hand, the compounds possessed a better activity against *M. kansasii* 235/80 and *M. avium* 330/88 than INH. The activities of newly prepared compounds against *M. kansasii* 6509/96 (clinical isolate) are comparable with that of INH. The newly synthesized compounds form the new promising group of antimycobacterials with the broad spectrum of activity. It is worth to note, that the monohalogenated compounds are more active than the dihalogenated ones. The antimycobacterial activity increases if 1,3-benzoxazine-2,4(3H)diones are substituted in position 6 with bromine. Bromo derivatives were more active than chloro derivatives. Contrary to the starting salicylanilides, the antimycobacterial activity mostly increases when the phenyl ring is substituted by butyl. (In case of salicylanilides it was propyl). The most active in the group of halogenated 3-(4-alkylphenyl)-1,3-benzoxazine-2,4(3H)dione was 6-bromo-3-(4-

butylphenyl)-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-dione 3b. According to Free-Wilson calculations, we can assume that 6-bromo-3-(4-*tert*-butylphenyl)-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-dione will be more active than the compounds under study.

This work is a part of the research project No. MSM0021620822 of the Ministry of Education of the Czech Republic.

Experimental

Melting points were determined on a Kofler block (C. Reichert, Vienna, Austria) and are uncorrected. The IR spectra were measured in KBr pellets or in CHCl₃ solutions on a Nicolet Impact 400 apparatus (Nicolet, Madison, WI, USA); the wave numbers are given in cm⁻¹. The NMR spectra were recorded on a Varian Mercury-Vx BB 300 spectrometer operating at 300 MHz for ¹H and 75 MHz for ¹³C in d₆-DMSO (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA). Chemical shifts were recorded as δ values in ppm and were indirectly referenced to tetramethylsilane via the solvent signal (7.26 for ¹H and 77.0 for ¹³C). The coupling constants *J* are given in Hz. Elemental analyses were done on a CHNS-O CE elemental analyzer (FISONS EA1110, Milano, Italy). Analyses of the C, H, N, S content were within $\pm 0.4\%$ of the theoretical values. TLC was performed on silica gel plates precoated with a fluorescent indicator, Silufol UV 254 + 366 (Kavalier, Votice, The Czech Republic), in cyclohexane/acetone 3 : 1, to check the purity of the products.

General procedure for the preparation 3-(4-alkylphenyl)-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-diones

Methyl-chloroformate (5.2 g, 48 mmol) was added dropwise to a stirred solution of the corresponding salicylanilide (40 mmol) in

dry pyridine (20 mL) under ice cooling. The mixture was heated on a steam bath for 1 h and then poured into 5% hydrochloric acid (140 mL). After 24 h the product was filtered off, suspended in 5% potassium hydroxide solution, and the solid was filtered off. The crude products were purified by the crystallization from EtOH-water (yields 55–65%).

Antimycobacterial susceptibility testing

The methods of the experiments are described in our previous paper [12]. The minimum inhibitory concentrations (MIC) were determined after incubation at 37°C for 14 and 21 days.

References

- [1] K. Waisser, J. Matyk, H. Divišová, P. Husáková, et al., *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2006**, 339, 616–620.
- [2] L. Zahajská, V. Klimešová, J. Kocí, K. Waisser, J. Kaustová, *Archiv Pharm. Med. Chem.* **2004**, 337, 549–555.
- [3] K. Waisser, K. Dražková, J. Kuneš, V. Klimešová, J. Kaustová, *Farmaco* **2004**, 59, 615–625.
- [4] K. Waisser, R. Doležal, J. Čižmárik, J. Kaustová, *Folia Microbiol.* **2006**, 51, 21–24.
- [5] K. Waisser, J. Adamec, R. Doležal, J. Kaustová, *Folia Microbiol.* **2005**, 50, 195–197.
- [6] J. Adamec, K. Waisser, J. Kuneš, J. Kaustová, *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2005**, 338, 385–389.
- [7] K. Waisser, L. Heinisch, M. Šlosárek, J. Janota, *Folia Microbiol.* **2006**, 51, 25–26.
- [8] J. Matyk, K. Waisser, K. Dražková, J. Kuneš, et al., *Farmaco* **2005**, 60, 399–408.
- [9] K. Waisser, L. Heinisch, M. Šlosárek, J. Janota, *Folia Microbiol.* **2005**, 50, 479–481.
- [10] H.-D. Stachel, Ž. Odlerová, K. Waisser, *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1997**, 62, 510–515.
- [11] J. E. Schachtner, J. Hienaber, H. D. Stachel, K. Waisser, *Pharmazie* **1999**, 54, 335–339.
- [12] K. Waisser, O. Bureš, P. Holý, J. Kuneš, et al., *Pharmazie* **2003**, 58, 83–94.
- [13] K. Waisser, K. Dražková, P. Holý, K. Palát, J. Kaustová, *Folia Pharm. Univ. Carol.* **2003**, 29/30, 17–20.

