

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra organické a bioorganické chemie



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Syntéza analog chelátoru SIH se zvýšenou stabilitou vůči
hydrolýze**

Vedoucí diplomové práce: Ing. Galina Karabanovich, Ph.D.

Hradec Králové 2021

Pavel Kruchkou

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

V Hradci Králové 10. 9. 2021

Kruchkou Pavel

Poděkování

Rád bych touto cestou vyjádřil poděkování Ing. Galině Karabanovich, Ph.D. za odborné vedení plné podpory, trpělivost, za praktické poznámky k experimentální části, dále doc. PharmDr. Jaroslavu Rohovi, Ph.D. za velmi podnětné konzultace a rady při zpracování mé práce, Ing. Iuliii Melnikove, Ph.D. za pomoc při zpracování mé práce. Také bych chtěl poděkovat Mgr. Janu Kubešovi za studie cytoprotektivní aktivity syntetizovaných látek.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická Fakulta v Hradci Králové

Katedra organické a bioorganické chemie

Školitel: Ing. Galina Karabanovich, Ph.D.

Student: Pavel Kruchkou

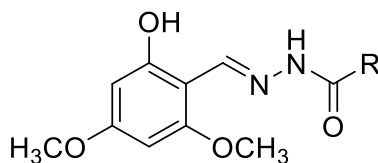
Název diplomové práce: Syntéza analog chelátoru SIH se zvýšenou stabilitou vůči hydrolyze

Nadměrné množství volných iontů železa v organismu může katalyzovat tvorbu hydroxylových radikálů, které se podílí na rozvoji různých onemocnění. Jednou z možností ochrany organismu je chelatace volných iontů železa pomocí chelátorů, a tím zabránit rozvoji železem katalyzovanému oxidačnímu stresu.

Účinnými chelátory jsou látky ze skupiny analogů salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazonu. Salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazon (SIH) je chelátor, který vytváří komplexy s ionty Fe^{3+} . Díky jeho vysoké lipofilitě může být podáván perorálně. Jeho hlavní nevýhodou je nízká stabilita ve vodném prostředí způsobená rychlou hydrolyzou hydrazonové vazby.

Cílem této práce bylo syntetizovat série nových aroylhydrazonů odvozených od chelátoru SIH, které by měly mít zlepšenou schopnost chelatace iontů železa a s ní spojenou schopnost ochrany buněk před oxidačním stresem, a potenciálně také zvýšenou stabilitu vůči hydrolyze.

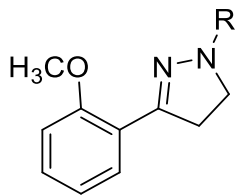
U první sérii analogů SIH – *N'*-(2-hydroxy-4,6-dimethoxybenzyliden)-hydrazidových derivátů – byly na benzenové jádro zavedeny dvě methoxyskupiny, které jednak zvyšují elektronovou hustotu na benzenovém jádře a navíc methoxyskupina v poloze 6 stericky chrání sousední hydrazonovou vazbu. Bylo připraveno jedenáct analogů chelátoru SIH. Tyto látky byly následně dále studovány na Katedře biochemických věd Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové, kde byla hodnocena jejich cytoprotektivní aktivita. Ze studovaných látek prokázaly nejlepší výsledky deriváty 4-chlorbenzohydrazidu a cyklohexankarbohydrazidu.



Obrázek 1. *N'*-(2-hydroxy-4,6-dimethoxybenzyliden)-hydrazidové deriváty

Druhá série cyklických analogů SIH – 3-(2-hydroxyfenyl)-4,5-dihydro-1*H*-pyrazolové deriváty – byla navržena za účelem zvýšení stability hydrazinové vazby vůči hydrolyze, a tím

prodloužení plazmatického poločasu. Bohužel, finální látky se nepodařilo syntetizovat. Byly připraveny pouze deriváty 1-acyl-3-(2-methoxyfenyl)-4,5-dihydro-1*H*-pyrazolu.



Obrázek 2. 1-acyl-3-(2-methoxyfenyl)-4,5-dihydro-1*H*-pyrazolové deriváty

ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Organic and Bioorganic Chemistry

Supervisor: Ing. Galina Karabanovich, Ph.D.

Student: Pavel Kruchkou

Title of Thesis: Synthesis of analogues of chelator SIH with increased stability towards hydrolysis

Excessive amounts of free iron ions in the body can catalyze the formation of hydroxyl radicals, which are involved in the development of various diseases. One of the ways how to protect the body is to chelate free iron ions with chelators, in order to prevent the development of iron-catalyzed oxidative stress.

Effective chelators are substances from the group of salicylaldehyde analogues of isonicotinoyl hydrazone. Salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH) is a chelator that forms complexes with Fe^{3+} ions. Due to its high lipophilicity can be administered orally. Its main disadvantage is the low stability in the aqueous environment caused by the rapid hydrolysis of the hydrazone bond.

The aim of this work was to synthesize a series of new aroylhydrazones derived from the SIH chelator, which supposed to have an improved ability to chelate iron ions and the associated ability to protect cells from oxidative stress and potentially increased stability to hydrolysis.

In the first series of SIH analogs - *N'*-(2-hydroxy-4,6-dimethoxybenzylidene)-hydrazide derivatives - two methoxy groups were introduced on the benzene nucleus, which on the one hand increase the electron density on the benzene nucleus and in addition the methoxy group in position 6 sterically protects the adjacent hydrazone bound. Eleven analogs of the SIH chelator were prepared. These substances were subsequently further studied at the Department of Biochemical Sciences, Faculty of Pharmacy, Charles University in Hradec Králové, where their cytoprotective activity was evaluated. From the studied substances, 4-chlorobenzohydrazide and cyclohexanecarbohydrazide derivatives showed the best results.

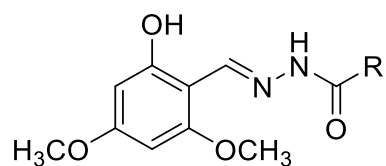


Figure 1. *N'*-(2-hydroxy-4,6-dimethoxybenzylidene)-hydrazide derivatives

A second series of cyclic SIH analogs - 3-(2-hydroxyphenyl)-4,5-dihydro-1H-pyrazole derivatives - have been designed to increase the stability of the hydrazine bond to hydrolysis, thereby extending the plasmatic half-life. Unfortunately, the final substances were not successfully synthesized. Only 1-acyl-3-(2-methoxyphenyl)-4,5-dihydro-1H-pyrazole derivatives were prepared.

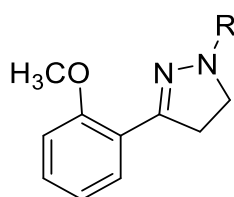


Figure 2. 1-acyl-3-(2-methoxyphenyl)-4,5-dihydro-1H-pyrazole derivatives

OBSAH

1	ÚVOD.....	9
2	TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1	Železo.....	10
2.2	Přetížení železem.....	10
2.3	Vztah iontů železa a rakovinných buněk.....	11
2.4	Vztah iontů železa a kardiotoxicity anthracyklinových antibiotik	11
2.5	Chelátory železa.....	11
3	CÍL PRÁCE.....	17
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	18
4.1	Chemikálie a přístroje.....	18
4.2	Syntéza 2-hydroxy-4,6-dimethoxybenzaldehydu (1)	18
4.3	Syntéza N'-(2-hydroxy-4,6-dimethoxybenzyliden)-hydrazidů (2-12).....	19
4.4	Syntéza 1-(2-hydroxyfenyl)prop-2-en-1-onu (13)	26
4.5	Syntéza 3-(2-hydroxyfenyl)-4,5-dihydro-1H-pyrazolu	27
4.6	Syntéza 1-acetyl-3-(2-hydroxyfenyl)-4,5-dihydro-1H-pyrazolu	28
4.7	Syntéza 3-(2-hydroxyfenyl)-4,5-dihydro-1H-pyrazolu	28
4.8	Syntéza 1-acyl-3-(2-methoxyfenyl)-4,5-dihydro-1H-pyrazolu	29
4.9	Syntéza 1-acetyl-3-(4-methoxyfenyl)-4,5-dihydro-1H-pyrazolu	33
5	DISKUSE	35
6	ZÁVĚR	41
7	SEZNAM ZKRATEK.....	42
8	POUŽITÁ LITERATURA.....	43

1 ÚVOD

Železo hraje významnou roli v různých životně důležitých metabolických procesech. Nadměrné množství volných iontů železa v organismu může katalyzovat tvorbu reaktivních forem kyslíku, které mohou vést k oxidačnímu stresu.¹ Předcházet se tomu dá použitím chelátorů. Salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazon (SIH) je účinný chelátor, který vytváří komplexy s ionty železa. Jeho nevýhodou je krátký plazmatický poločas kvůli nízké stabilitě v plazmě.²

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Železo

Železo je přechodný kov a představuje nezbytnou složku pro správné fungování všech živých buněk.³ Pokud je v buňce přítomno v nadbytku, může působit toxicky.⁴ Podílí se na řadě základních biologických procesů, jako jsou transport kyslíku, buněčné dýchání a syntéza DNA.⁵

Železo má neúplně zaplněné d-orbitaly, díky tomu může snadno darovat a přijímat elektrony a tím se účastnit řady oxidačně-redukčních reakcí.⁶ Ve vodném prostředí jsou obvyklými oxidačními stavy Fe^{2+} a Fe^{3+} , mezi kterými dochází k přesunu nepárového elektronu.

Většina iontů železa v organismu je uložena ve formě feritinu a zabudována do hemu. Transport iontů železa v organismu je zprostředkován pomocí transferinu. V organismu se vyskytuje také velmi malé množství volných iontů železa, tvoří méně než 5 % celkového buněčného železa. Toto malé množství volných iontů železa je však nezbytné pro buňky a vytváří tzv. labilní zásoby železa (LIP).^{7,8} Nadměrné množství LIP může katalyzovat tvorbu reaktivních forem kyslíku (ROS), prostřednictvím Fentonovy a Haber-Weissovy reakce. Nerovnováha v buněčném redoxním stavu, kdy produkce ROS převyšuje antioxidační kapacitu, však vede k oxidačnímu stresu.¹ Nejvíce reaktivní jsou hydroxylové radikály, které mohou poškodit buněčné biomolekuly, a tím může docházet k rozvoji různých onemocnění.⁸

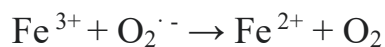


Schéma 1. Fentonova reakce⁸



Schéma 2. Haber-Weissova reakce⁸

2.2 Přetížení železem

Přetížení železem je stav, kdy dojde k nadbytečnému hromadění iontů železa v organismu. Do metabolismu železa je zapojena velká síť proteinů, přesto neexistuje žádný účinný mechanismus vylučování iontů železa, a proto mohou nastat problémy, když se během této

metabolické cesty vyskytnou chyby.² Primární přetížení železem nastává při hemochromatóze, která je geneticky podmíněna, nejčastěji se jedná o mutaci C282Y a H63D genu HFE. Hemochromatóza má za následek zvýšenou střevní absorpci a ukládání nadměrného množství železa především v hepatocytech.^{9,10}

Sekundární přetížení železem je vyvoláno například transfuzí (u talasémie major a srpkovité anémie)¹¹, hemolýzou nebo nadměrnou parenterální a/nebo dietní konzumací železa.¹² K zatížení dochází hlavně u vysoce vaskulárních tkání, mezi které patří například játra, endokrinní tkáň a srdeční sval.⁹

2.3 Vztah iontů železa a rakovinných buněk

Kvůli rychlé proliferaci mají rakovinné buňky vyšší spotřebu železa než normální buňky. Projevuje se to tím, že nádorové buňky mají na svém buněčném povrchu vyšší počet Tf receptorů (transferinový receptor), díky tomu je umožněna zvýšená absorpce železa. Dále to potvrzuje zvýšený obsah proteinu pro skladování železa – feritinu – uvnitř nádorové buňky. Pomocí chelatace železa se dají nádorové buňky relativně selektivně zasáhnout.²

2.4 Vztah iontů železa a kardiotoxicity anthracyklinových antibiotik

Anthracyklinová cytostatika (doxorubicin, daunorubicin) se užívají k léčbě široké škály hematologických malignit a solidních nádorů.¹⁴ Hlavním omezením jejich užívání je jeden z jejich nežádoucích účinků – kardiotoxicita. Kardiotoxicita může vést k srdečnímu selhání, až k úmrtí. Přesný mechanismus kardiotoxicity anthracyklinů zůstává nejasný, pravděpodobně je multifaktoriální. První a nejrozšířenější hypotéza byla, že komplexy anthracyklinů s ionty železa katalyzují produkci reaktivních druhů kyslíku (ROS), které byly popsány výše.¹⁵ Nyní se však předpokládá, že hlavním mechanismem anthracyklinové kardiotoxicity je inhibice topoizomerázy II v kardiomyocytech, v důsledku které dochází k přímému poškození DNA.¹⁶

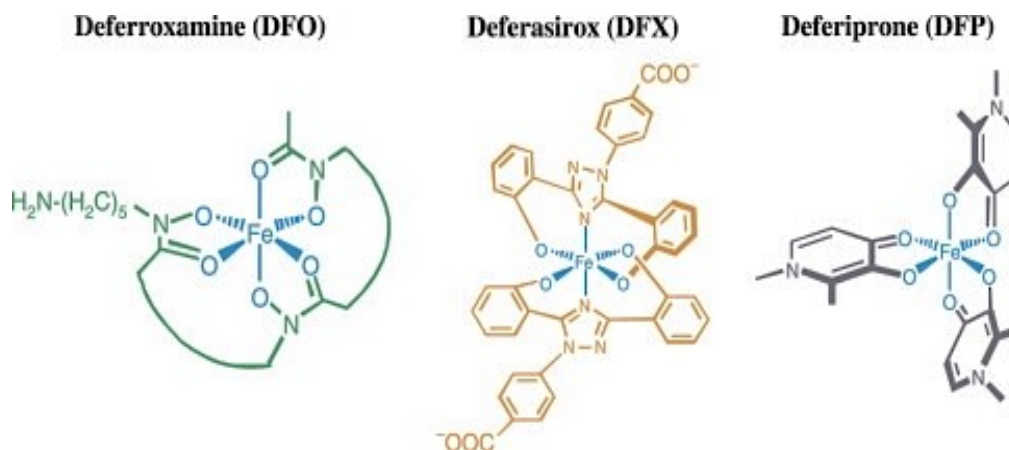
2.5 Chelátory železa

Pro ochranu organismu lze použít chelátory, které vytvářejí komplexy s železem bez redoxní aktivity, a tak inhibují tvorbu hydroxylových radikálů.

Chelatační činidla mohou být bidentátní, tridentátní a hexadentátní ligandy schopné interagovat s železem dvěma, třemi či šesti vazbami a ve výsledku tak tvořit oktaedrické komplexy s ionty železa. Atomy kyslíku a dusíku v ligandu jsou schopny pevně vázat železo,

což můžeme dokumentovat na porfyrinovém kruhu hemu, kde vazby Fe-N ukotvují centrálně iont železa.²

Ionty železa tvoří obvykle šest koordináčních vazeb. Chelátory, které se vážou na všech šest míst zcela deaktivují „volné“ železo.

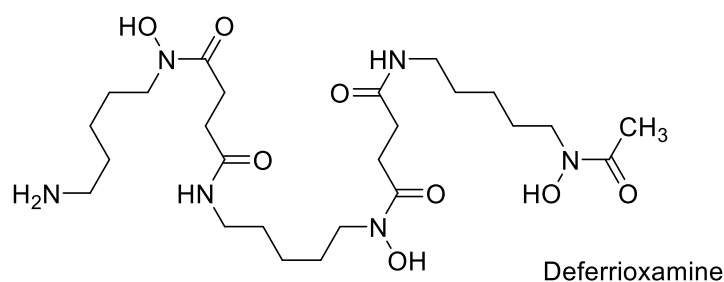


Obrázek 3. komplex chelátor - Fe(III)¹⁷

Ideální chelatační látky by měly mít vysokou afinitu a selektivitu k železu. Měly by být schopné procházet buněčnými membránou, také být netoxické, levné a účinné spíše perorálně než parenterálně.¹⁸

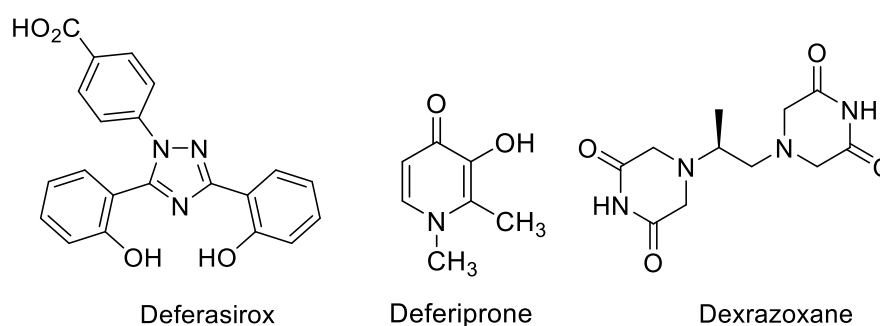
2.5.1 Chelátory užívané v praxi

Chelátory přírodního původu jsou siderofory, které umožňují zachytit železo z okolního prostředí a usnadňují jeho vstřebání. Produkovány jsou různými organismy, jako jsou například bakterie a houby.^{19,20} Hlavním zástupcem je deferoxamin (desferrioxamin). Deferoxamin je hexadentátní chelátor získávaný ze *Streptomyces pilosus*.²¹ Váže železo v poměru 1:1 a vytváří s ním velmi stabilní komplex.²² Klinicky se používá k léčbě onemocnění z přetížení železa, jako talasémie major. Kromě toho DFO také ukázalo antiproliferativní vlastnosti využitelné při léčbě nádorů.² Nevýhodou je jeho vysoká hydrofilita, kvůli které se DFO nevstřebává ze střeva, proto je nutná intravenózní nebo subkutánní aplikace.²³ Kvůli svému krátkému poločasu (5-10 minut)⁴ se podává v 8-12 hodinové infuzi nejméně 5 krát týdně.²²



Obrázek 4. Chemická struktura deferoxaminu²⁴

Mezi syntetické chelátory řadíme deferasirox, deferipron a dexrazoxan.



Obrázek 5. Chemická struktura deferasiroxu a deferipronu²⁴, dexrazoxanu²⁵

Deferasirox (DFX) je tridentátní perorální chelátor, který váže železo v poměru 2:1. Má vysokou afinitu k železitým iontům. Užívá se perorálně díky své vysoké lipofilitě. DFX má delší plazmatický poločas a jeho obvyklé dávkování je jednou denně.²³

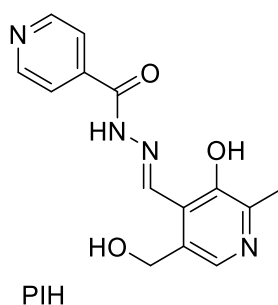
Deferipron (DFP) je bidentátní perorální chelátor a váže železo v poměru 3:1, což má za následek méně stabilní komplex se železem a nižší účinnost vazby železa při nízkých koncentracích chelátoru. DFP má bez navázaného železa krátký poločas v plazmě, což vyžaduje podávání třikrát denně.²² Jedním z hlavních důvodů omezené účinnosti je, že podléhá rozsáhlému metabolismu v játrech. Více jak 85 % podané dávky se zachytí v moči jako nechelující glukuronidový konjugát.⁴

Dexrazoxan, cyklický derivát kyseliny edetové (EDTA), je jediným schváleným lékem používaným na ochranu srdce před kardiotoxicitou u pacientů léčených chemoterapií na bázi anthracyklinů.¹ I přes dlouhodobé používání DEX v klinické praxi zůstává mechanismus jeho kardioprotektivních účinků nejasný.²⁵ Podle studií se předpokládá, že metabolit dexrazoxanu ADR-925²⁵ chelatuje jak volné, tak vázané intracelulární železo, včetně železa, které je vázáno

v anthracyklinových komplexech, čímž brání tvorbě toxických reaktivních forem kyslíku.²⁶ Druhá teorie mechanismu kardioprotektivních účinků DEX hovoří o katalytické inhibici topoizomerázy II, která ale neindukuje zlomy v řetězcích DNA jako např. u doxorubicinu.²⁷ Všechny čtyři výše zmíněné chelátory představují registrovaná léčiva v České republice.²⁸

2.5.2 Aroylhydrazony

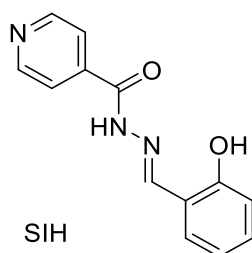
Pyridoxal isonikotinoyl hydrazon (PIH) je snadno připravitelný chelátor. Jeho výroba vychází z Schiffovy kondenzace dvou široce používaných levných léků, a to vitaminu B-6 (pyridoxal) a antituberkulotika isoniazidu.²⁹



Obrázek 6. Chemická struktura pyridoxal isonikotinoyl hydrazonu³⁰

PIH je jedním z nejúčinnějších perorálních chelátorů železa, účinně vylučuje železo u lidí a potkanů. Jeho struktura slouží jako vzor k syntéze dalších strukturně podobných chelátorů železa. Ty, které používají pyridoxal jako aldehyd, jsou známy jako série 100.^{2,31} Tridentální chelátor PIH má vysokou účinnost chelatace železa in vitro a in vivo s vysokou selektivitou a afinitou k železu.³² S ionty Fe^{3+} tvoří komplexy v poměru 2:1, s Fe^{2+} ionty vytváří komplexy taky, ale v menší míře.³³ PIH váže železo oktaedrálně přes karbonylový kyslík, iminový dusík a fenolický kyslík.² Při fyziologickém pH jsou molekuly chelátoru převážně (v průměru 80 %) v neionizované formě, což umožňuje průchod buněčnými membránami a přístup k intracelulárním zásobám železa.³⁴ Chelátory PIH jsou účinné jako antiproliferační činidla, snižují postischemické oxidační poškození tkání, také snižují peroxidaci lipidů a poškození DNA v modelech přetížení železem.³⁵

Jako významný analog PIH se prosadil salicylaldehyd isonicotinoyl hydrazon (SIH), který vznikl náhradou pyridoxinu hydrofobnějším salicylaldehydem a vytvořil sérii 200.²

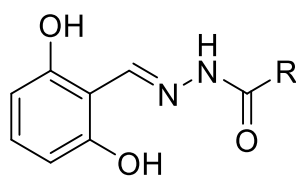


Obrázek 7. Chemická struktura salicylaldehyd isonicotinoyl hydrazonu³⁰

SIH je tridentátní chelátor, který tvoří komplexy 2:1 s Fe^{3+} . Díky jeho vysoké lipofilitě velmi účinně vstupuje do buněk a tkání, proto ho lze podávat perorálně.¹

Dle studií se ukázal jako nejpříznivější ze skupiny různých chelátorů železa, včetně klinicky používaných činidel desferrioxamin, deferiprone a deferasirox. Má nejpříznivější poměr vlastní toxicity a cytoprotektivní účinnosti proti buněčnému oxidačnímu poškození.³⁶ Některé analogy SIH navíc vykazují značnou antiproliferativní aktivitu proti buněčným liniím MCF-7 prsního adenokarcinomu a HL-60 promyelocytické leukémie.³⁷ Kromě toho bylo prokázáno, že SIH účinně chrání *in vitro* před kardiotoxicitou antracyklinového daunorubicinu.³⁸ Má však špatnou stabilitu ve vodném prostředí, kvůli rychlé hydrolyze hydrazonové vazby a z toho vyplývající krátký plazmatický poločas.³⁹

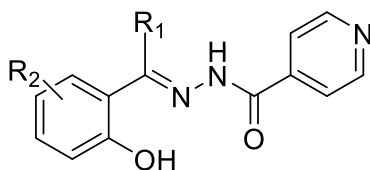
Volná rotace vazby mezi hydrazidovou a fenolovou částí může mírně snížit chelatační schopnost SIH. Ve snaze zvýšit jeho cytoprotektivní vlastnosti byly namísto salicylaldehydu připraveny analogy odvozené od 2,6-dihydroxybenzaldehydu, která minimalizuje vliv rotace vazby na chelatační účinnost. Analogy typu 2,6-dihydroxybenzaldehydu vykazovaly srovnatelné nebo lepší ochranné vlastnosti než SIH, nejlepší vykazovala sloučenina 2,6-dihydroxybenzaldehyd 4-chlorbenzohydrazon. Navíc lipofilnější deriváty vykazovaly vyšší stabilitu vůči hydrolyze než SIH.⁴⁰



Obrázek 8. Chemická struktura 2,6-dihydroxybenzaldehyd analogů SIH⁴⁰

Další skupina analogů SIH byly namísto salicylaldehydu připraveny analogy z methyl- a ethylketonů. Sloučeniny (*E*)-*N*'-[1-(2-Hydroxyfenyl)ethyliden]isonicotinoylhydrazid (HAPI) a (*E*)-*N*'-[1-(2-Hydroxyfenyl)propyliden]isonicotinoylhydrazid (HPPI) vykazovaly zlepšenou stabilitu vůči hydrolyze ve srovnání se SIH. Nejstabilnější byla sloučenina (*E*)-*N*'-[1-(2-

Hydroxy-5-nitrofenyl) ethyliden] isonikotinoylhydrazid (NHAPI), což naznačuje pozitivní vliv nitro-substituce na fenylovém kruhu.³⁸



HAPI: $R_1 = \text{CH}_3$, $R_2 = \text{H}$
HPPI: $R_1 = \text{C}_2\text{H}_5$, $R_2 = \text{H}$
NHAPI: $R_1 = \text{CH}_3$, $R_2 = 5\text{-NO}_2$

Obrázek 9. Chemická struktura methyl- a ethylketon analogů SIH³⁸

Při zkoumání vztahů mezi strukturou a aktivitou u analogů s modifikovanou hydrazidovou částí bylo zjištěno, že změna polohy atomu dusíku v hydrazidovém heterocyklu může vést k několikanásobnému zvýšení cytotoxicity a snížení antiproliferativní aktivity.⁴¹

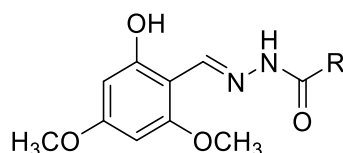
Zlepšení stability SIH v plazmě modifikací jeho chemické struktury se může zvýšit terapeutická účinnost této skupiny chelatačních činidel.

3 CÍL PRÁCE

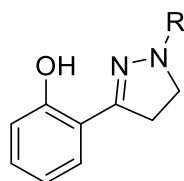
Cílem této diplomové práce bylo syntetizovat série nových aroylhydrazonů odvozených od chelátoru SIH, které by měly mít zlepšenou schopnost chelatace iontů železa a s ní spojenou schopnost ochrany buněk před oxidačním stresem, a potenciálně také zvýšenou stabilitu vůči hydrolýze.

Úkolem bylo syntetizovat řadu analogů SIH s ohledem na předchozí výsledky v této oblasti. Byly navrženy 2 strukturní typy sloučenin:

A. *N'*-(2-hydroxy-4,6-dimethoxybenzyliden)-hydrazidové deriváty



B. 3-(2-hydroxyfenyl)-4,5-dihydro-1*H*-pyrazolové deriváty



Sloučeniny typu A byly navrženy jako potenciálně stabilnější analoga SIH s lepšími chelatačními a cytoprotektivními schopnostmi. Byly připraveny substitucí salicylaldehydu (nebo 2-hydroxyfenylové skupiny) na základě předchozích prací ve skupině školitelky.

Sloučeniny typu B byly navrženy jako cyklický analog SIH s cílem dosažení zvýšené stability vůči hydrolýze.

Sloučeniny typu A byly dále studovány na Katedře biochemických věd a byla hodnocena jejich schopnost chránit kardiomyoblastové buňky H9c2 před modelovým oxidačním poškozením vyvolaným peroxidem vodíku.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Chemikálie a přístroje

Všechny chemikálie byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich nebo Fluorochem a byly použity bez dalšího čištění. Výchozí hydrazidy byly na pracovišti připraveny v minulých letech. Tenkovrstvá chromatografie byla prováděna na hliníkových deskách (silica gel 60F₂₅₄) od firmy Merck. Pro sloupcovou chromatografii byl použit Merck Kieselgel 60.

Struktury připravených sloučenin byly identifikovány pomocí ¹H a ¹³C NMR spektroskopie na přístrojích Varian S500, anebo Joel JNM-ECZ 600R. Chemické posuny δ jsou vyjádřeny jako pars per million (ppm) a jsou nepřímo vztaženy k tetramethylsilanu pomocí signálu rozpouštědla.

Teploty tání byly měřeny na Koflerově bloku. Čistota všech uváděných sloučenin byla stanovena elementární analýzou CHNS na přístroji automatic microanalyzer EA1110EC.

4.2 Syntéza 2-hydroxy-4,6-dimethoxybenzaldehydu (1)

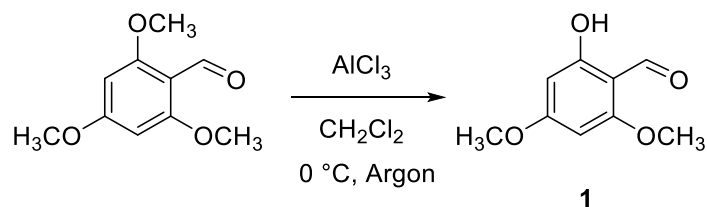


Schéma 3: Syntéza 2-hydroxy-4,6-dimethoxybenzaldehydu

Způsob přípravy byl převzat z článku autora Dr. Henry Dube a kolektivu.⁴²

K suspenzi chloridu hlinitého (4,1 g, 30,75 mmol) v dichlormethanu (50 ml), míchané za chladu a pod inertní atmosférou, se pomalu a za stálého míchaní přidával roztok 2,4,6-trimethoxybenzaldehydu (2,0 g, 10,2 mmol) v dichlormethanu (30 ml). Po 24 hodinách míchaní směsi při pokojové teplotě se pomalu přidala 1 M kyselina chlorovodíková (35 ml) a směs se míchala dalších 15 minut. Organická vrstva byla oddělena, promyta vodou (2 × 40 ml) a nasyceným roztokem chloridu sodného (1 × 40 ml) a vysušena bezvodým síranem sodným. Organické rozpouštědlo bylo odpařeno za sníženého tlaku a produkt se přečistil pomocí sloupcové chromatografii (mobilní fáze: hexan/EtOAc, 5 : 1). Výtěžek 2-hydroxy-4,6-dimethoxybenzaldehydu byl 1,29 g (70 %) jako světlo-žluta krystalická látka.

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 12.33 (s, 1H), 9.97 (s, 1H), 6.10 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 6.05 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 3.82 (s, 3H), 3.80 (s, 3H). ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ 192.00, 168.69, 165.73, 164.03, 105.90, 93.77, 91.34, 56.73, 56.53.

Teplota tání: 66 - 68 °C

Teplota tání a NMR spektra odpovídala literatuře.⁴³

CHNS-analýza: C₉H₁₀O₄

Vypočteno: C, 59,34; H, 5,53

Nalezeno: C, 59,24; H, 5,43

4.3 Syntéza *N'*-(2-hydroxy-4,6-dimethoxybenzyliden)-hydrazidů (2-12)

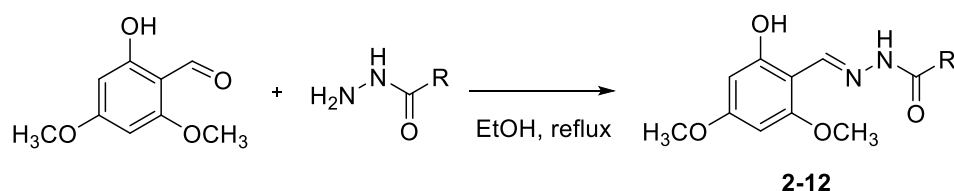


Schéma 4: Syntéza *N'*-(2-hydroxy-4,6-dimethoxybenzyliden)-hydrazidů

Produkty byly připraveny Schiffovou kondenzací.⁴⁴

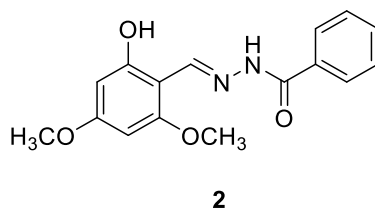
Směs 2-hydroxy-4,6-dimethoxybenzaldehydu (0,2 g, 1,1 mmol) a odpovídajícího hydrazidu (1,3 mmol) v ethanolu (20 ml) byla zahřívána k varu po dobu 6-24 hodin za stálého míchání.

Produkty byly získány pomocí 2 metod:

Metoda A: Filtrace za sníženého tlaku po ochlazení reakční směsi.

Metoda B: Rozpouštědlo bylo odpařeno, surový produkt byl rozpuštěn v ethyl-acetátu (50 ml) a promyt 1 M kyselinou chlorovodíkovou (20 ml) a následně vodou (50 ml). Organická vrstva byla vysušena bezvodým síranem sodným a rozpouštědlo bylo odpařeno.

4.3.1 *N'*-(2-Hydroxy-4,6-dimethoxybenzyliden)benzohydrazid (2)



Obrázek 10. *N'*-(2-Hydroxy-4,6-dimethoxybenzyliden)benzohydrazid

Metoda B. Výtěžek: 90 % jako béžová krystalická látka.

^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 12.41 (s, 1H), 11.98 (s, 1H), 8.81 (s, 1H), 7.92 – 7.87 (m, 2H), 7.59 – 7.53 (m, 1H), 7.50 (dd, $J = 8.3, 6.8$ Hz, 2H), 6.11 (s, 2H), 3.80 (s, 3H), 3.75 (s, 3H). ^{13}C NMR (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 163.72, 162.79, 161.44, 160.06, 146.37, 133.22, 132.45, 129.09, 128.07, 101.11, 94.42, 91.02, 56.49, 55.99.

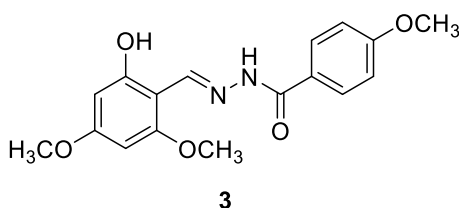
Teplota tání: 170 - 171 °C

CHNS-analýza: $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4$

Vypočteno: C, 63.99; H, 5.37; N, 9.33

Nalezeno: C, 63.90; H, 5.29; N, 9.06

4.3.2 *N'*-(2-Hydroxy-4,6-dimethoxybenzyliden)-4-methoxybenzohydrazid (3)



Obrázek 11. *N'*-(2-Hydroxy-4,6-dimethoxybenzyliden)-4-methoxybenzohydrazidu

Metoda B. Výtěžek: 82 % jako bílá krystalická látka.

^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 12.45 (s, 1H), 11.85 (s, 1H), 8.79 (s, 1H), 7.88 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.03 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 6.11 (s, 2H), 3.80 (s, 6H), 3.74 (s, 3H). ^{13}C NMR (151 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 163.57, 162.69, 162.24, 161.37, 159.96, 145.72, 129.98, 125.24, 114.36, 101.17, 94.41, 90.98, 56.46, 55.98, 55.96.

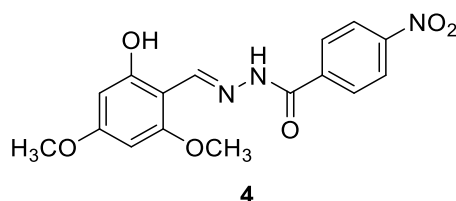
Teplota tání: 176 - 178 °C

CHNS-analýza: $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_5$

Vypočteno: C, 61.81; H, 5.49; N, 8.48

Nalezeno: C, 61.76; H, 5.45; N, 8.39

4.3.3 *N'*-(2-Hydroxy-4,6-dimethoxybenzyliden)-4-nitrobenzohydrazid (4)



Obrázek 12. *N'*-(2-Hydroxy-4,6-dimethoxybenzyliden)-4-nitrobenzohydrazidu

Metoda A. Výtěžek: 86 % jako žlutá krystalická látka.

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 12.27 (s, 1H), 12.25 (s, 1H), 8.82 (s, 1H), 8.33 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 8.13 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 6.11 (s, 2H), 3.80 (s, 3H), 3.75 (s, 3H). ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ 164.01, 161.55, 161.06, 160.20, 149.89, 147.43, 138.84, 129.59, 124.25, 100.96, 94.42, 91.10, 56.52, 56.02.

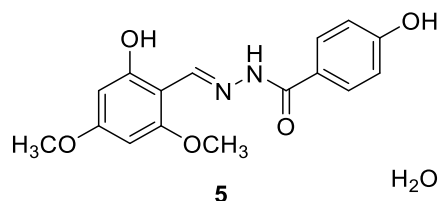
Teplota tání: 274 - 276 °C

CHNS-analýza: C₁₆H₁₅N₃O₆

Vypočteno: C, 55.65; H, 4.38; N, 12.17

Nalezeno: C, 55.20; H, 4.20; N, 12.13

4.3.4 4-Hydroxy-*N'*-(2-hydroxy-4,6-dimethoxybenzyliden)benzohydrazid monohdrát (5)



Obrázek 13. 4-Hydroxy-*N'*-(2-hydroxy-4,6-dimethoxybenzyliden)benzohydrazid monohdrátu

Metoda A. Výtěžek: 69 % jako světló-žlutá krystalická látka.

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 12.47 (s, 1H), 11.77 (s, 1H), 10.10 (s, 1H), 8.77 (s, 1H), 7.78 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 6.83 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 6.10 (s, 2H), 3.79 (s, 3H), 3.74 (s, 3H). ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ 163.49, 162.47, 161.37, 161.33, 159.91, 145.40, 130.11, 123.69, 115.65, 101.21, 94.40, 90.95, 56.45, 55.95.

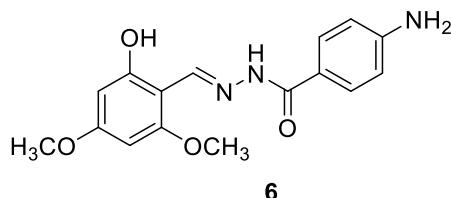
Teplota tání: 146 - 148 °C

CHNS-analýza: C₁₆H₁₆N₂O₅·H₂O

Vypočteno: C, 57.48; H, 5.43; N, 8.38

Nalezeno: C, 57.77; H, 5.88; N, 7.86

4.3.5 4-Amino-*N'*-(2-hydroxy-4,6-dimethoxybenzyliden)benzohydrazid (6)



Obrázek 14. 4-Amino-*N'*-(2-hydroxy-4,6-dimethoxybenzyliden)benzohydrazidu

Metoda A. Výtěžek: 79 % jako světló-žlutá krystalická látka.

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.54 (s, 1H), 11.58 (s, 1H), 8.75 (s, 1H), 7.63 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 6.56 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 6.09 (s, 2H), 5.76 (s, 2H), 3.79 (s, 3H), 3.74 (s, 3H). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 163.28, 162.73, 161.23, 159.79, 152.98, 144.52, 129.77, 119.30, 113.20, 101.34, 94.40, 90.89, 56.43, 55.92.

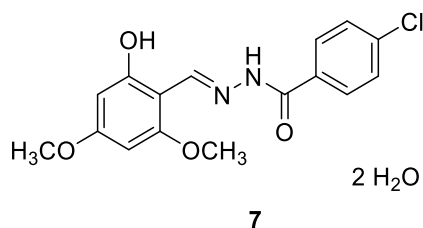
Teplota tání: 232 - 234 °C

CHNS-analýza: C₁₆H₁₇N₃O₄

Vypočteno: C, 60.94; H, 5.43; N, 13.33

Nalezeno: C, 60.10; H, 5.23; N, 13.01

4.3.6 4-Chlor-*N'*-(2-hydroxy-4,6-dimethoxybenzyliden)benzohydrazid dihydrát (7)



Obrázek 15. 4-Chlor-*N'*-(2-hydroxy-4,6-dimethoxybenzyliden)benzohydrazid dihydrátu

Metoda A. Výtěžek: 79 % jako bílá krystalická látka.

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.34 (s, 1H), 12.04 (s, 1H), 8.80 (s, 1H), 7.92 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.58 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.11 (s, 2H), 3.80 (s, 3H), 3.75 (s, 3H). ¹³C NMR (151 MHz,

DMSO-*d*₆) δ 163.81, 161.71, 161.46, 160.09, 146.67, 137.30, 131.95, 129.99, 129.21, 101.04, 94.41, 91.05, 56.49, 55.99.

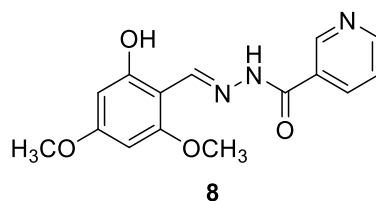
Teplota tání: 190 - 192 °C

CHNS-analýza: C₁₆H₁₅ClN₂O₄·2H₂O

Vypočteno: C, 51.83; H, 5.17; N, 7.56

Nalezeno: C, 52.22; H, 4.95; N, 7.52

4.3.7 *N'*-(2-Hydroxy-4,6-dimethoxybenzyliden)nikotinohydrazid (8)



Obrázek 16. *N'*-(2-Hydroxy-4,6-dimethoxybenzyliden)nikotinohydrazidu

Metoda A. Výtěžek: 49 % jako bílá krystalická látka.

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ 12.29 (s, 1H), 12.13 (s, 1H), 9.05 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 8.80 (s, 1H), 8.73 (dd, *J* = 4.8, 1.8 Hz, 1H), 8.23 (dt, *J* = 8.2, 2.0 Hz, 1H), 7.54 (dd, *J* = 7.9, 4.8 Hz, 1H), 6.12 (s, 2H), 3.80 (s, 3H), 3.75 (s, 3H).

¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*d*₆) δ 163.91, 161.49, 161.34, 160.15, 152.96, 149.10, 146.95, 135.85, 129.03, 124.19, 100.97, 94.43, 91.09, 56.51, 56.01.

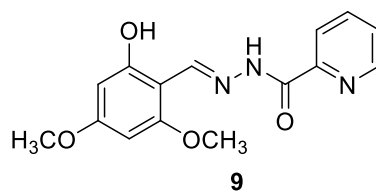
Teplota tání: 212 - 213 °C

CHNS-analýza: C₁₅H₁₅N₃O₄

Vypočteno: C, 59.8; H, 5.02; N, 13.95

Nalezeno: C, 59.51; H, 4.97; N, 13.93

4.3.8 *N'*-(2-Hydroxy-4,6-dimethoxybenzyliden)pikolinohydrazid (9)



Obrázek 17. *N'*-(2-hydroxy-4,6-dimethoxybenzyliden)pikolinohydrazidu

Metoda B. Výtěžek: 65 % jako světló-žlutá krystalická látka.

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 12.53 (s, 1H), 12.45 (s, 1H), 9.03 (s, 1H), 8.67 (ddd, $J = 1.1$, 7.8 Hz, 1H), 8.07 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 8.01 (td, $J = 7.6$, 1.7 Hz, 1H), 7.62 (ddd, $J = 1.3$, 4.7, 7.5 Hz, 1H), 6.10 (s, 2H), 3.79 (s, 3H), 3.75 (s, 3H).

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ 163.76, 161.59, 160.61, 160.24, 149.79, 149.12, 147.90, 138.51, 127.55, 123.24, 101.33, 94.39, 91.00, 56.51, 55.97.

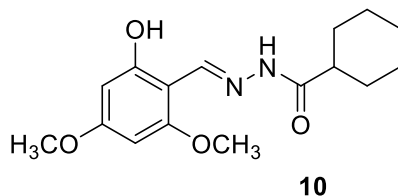
Teplota tání: 175 - 176 °C

CHNS-analýza: $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_4$

Vypočteno: C, 59.8; H, 5.02; N, 13.95

Nalezeno: C, 59.38; H, 5.03; N, 13.68

4.3.9 *N'*-(2-Hydroxy-4,6-dimethoxybenzyliden)cyklohexankarbohydrazid (10)



Obrázek 18. *N'*-(2-hydroxy-4,6-dimethoxybenzyliden)cyklohexankarbohydrazidu

Metoda A. Výtěžek: 67 % jako bílá krystalická látka.

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 12.23 (s, 1H), 11.38 (s, 1H), 8.51 (s, 1H), 6.08 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 6.07 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 3.77 (s, 3H), 3.73 (s, 3H), 2.12 (tt, $J = 11.7$, 3.4 Hz, 1H), 1.74 - 1.67 (m, 4H), 1.63 - 1.56 (m, 1H), 1.39-1.33 (m, 2H), 1.28 - 1.06 (m, 3H). ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ 171.37, 163.45, 161.20, 159.84, 144.61, 100.97, 94.34, 90.94, 56.46, 55.93, 43.15, 29.46, 25.88, 25.68.

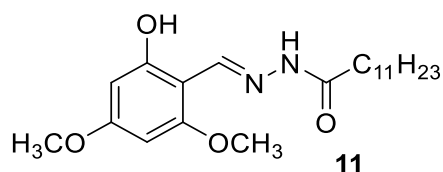
Teplota tání: 166 - 168 °C

CHNS-analýza: $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_4$

Vypočteno: C, 62.73; H, 7.24; N, 9.14

Nalezeno: C, 62.35; H, 7.33; N, 9.20

4.3.10 *N'*-(2-Hydroxy-4,6-dimethoxybenzyliden)dodekanhydrazid (11)



Obrázek 19. *N'*-(2-Hydroxy-4,6-dimethoxybenzyliden)dodekanhydrazidu

Metoda A. Výtěžek: 94 % jako bílá krystalická látka.

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 12.20 (s, 1H), 11.42 (s, 1H), 8.49 (s, 1H), 6.07 (s, 2H), 3.75 (d, $J = 22.8$ Hz, 6H), 2.12 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 1.52 (s, 2H), 1.21 (s, 16H), 0.81 (s, 3H). ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ 168.41, 163.49, 161.18, 159.87, 144.42, 100.92, 94.34, 90.96, 56.47, 55.95, 34.39, 31.83, 29.53, 29.43, 29.25, 29.13, 25.44, 22.63, 14.48.

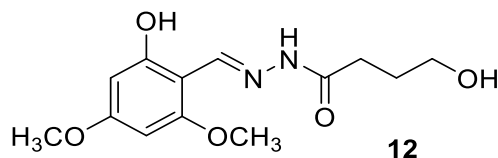
Teplota tání: 125 - 126 °C

CHNS-analýza: $\text{C}_{21}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_4$

Vypočteno: C, 66.64; H, 9.05; N, 7.40

Nalezeno: C, 66.59; H, 9.18; N, 7.35

4.3.11 4-Hydroxy-*N'*-(2-hydroxy-4,6-dimethoxybenzyliden)butanhydrazid (12)



Obrázek 20. 4-Hydroxy-*N'*-(2-hydroxy-4,6-dimethoxybenzyliden)butanhydrazidu

Metoda B. Výtěžek: 52 % jako bílá krystalická látka.

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 12.26 (s, 1H), 11.49 (s, 1H), 8.52 (s, 1H), 6.12 - 6.10 (m, 2H), 4.51 (t, $J = 5.2$ Hz, 1H), 3.80 (s, 3H), 3.76 (s, 3H), 3.46 - 3.37 (m, 2H), 2.22 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 1.73-1.67 (m, 2H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 168.12, 163.13, 160.83, 159.51, 144.04, 100.56, 93.98, 90.61, 60.28, 56.12, 55.60, 30.79, 28.42.

Teplota tání: 181 - 183 °C

CHNS-analýza: $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_5$

Vypočteno: C, 55.31; H, 6.43; N, 9.92

Nalezeno: C, 55.02; H, 6.36; N, 9.86

4.4 Syntéza 1-(2-hydroxyfenyl)prop-2-en-1-onu (13)

4.4.1 Syntéza 1-(2-hydroxyfenyl)prop-2-en-1-onu z 2-hydroxyacetofenonu

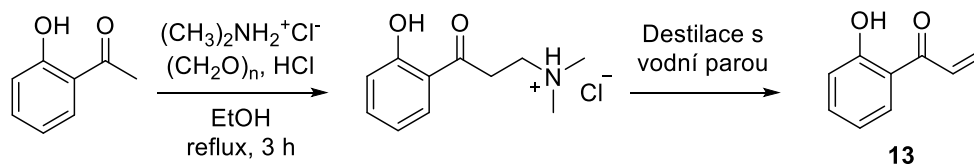


Schéma 5: Syntéza 1-(2-hydroxyfenyl)prop-2-en-1-onu z 2-hydroxyacetofenonu

Metoda byla převzata z článku autora Tamás Patonay a kolektivu.⁴⁵

Směs 2-hydroxyacetofenonu (6,0 ml, 49,8 mmol), dimethylamonium-chloridu (5,68 g, 69,7 mmol), paraformaldehydu (1,99 g, 24,4 mmol), koncentrované kyseliny chlorovodíkové (0,2 ml) ve 2-propanolu (10 ml) se zahřívala k varu pod zpětným chladičem po dobu 1 hodiny a poté nechala stát přes noc v lednici. Bílá sraženina byla odfiltrována za sníženého tlaku a promyta diethyletherem (4 × 30 ml). Následně byla rozpuštěna ve vodě (750 ml) a destilována s vodní parou. Destilát byl extrahován dichlormethanem (2 x 100 ml). Organická vrstva byla vysušena bezvodým síranem sodným a rozpouštědlo bylo odpařeno. Produkt byl vyčištěn pomocí sloupcové chromatografie (mobilní fáze: hexan/EtOAc, 20:1). Výtěžek 1-(2-hydroxyfenyl)-2-propen-1-onu byl 0,4 g (5 %) jako žlutý olej.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 12.53 (s, 1H), 7.82 (dd, *J* = 8.1, 1.6 Hz, 1H), 7.52-7.49 (m, 1H), 7.36–7.26 (m, 1H), 7.02 (dd, *J* = 8.4, 1.2 Hz, 1H), 6.94-6.91 (m, 1H), 6.58 (dd, *J* = 16.9, 1.7 Hz, 1H), 5.98 (dd, *J* = 10.5, 1.7 Hz, 1H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 194.35, 163.55, 136.63, 130.74, 130.57, 130.02, 119.34, 118.90, 118.54.

4.4.2 Syntéza 1-(2-hydroxyfenyl)prop-2-en-1-onu přes Weinrebův amid

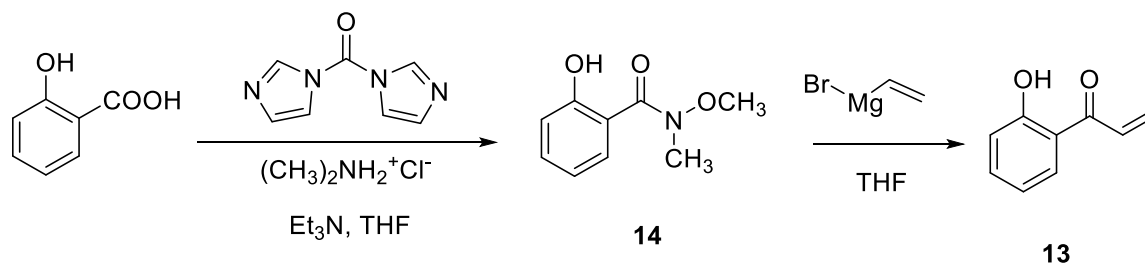


Schéma 6: Syntéza 1-(2-hydroxyfenyl)prop-2-en-1-onu přes Weinrebův amid

K roztoku kyseliny salicylové (1,69 g, 12,2 mmol) v suchém tetrahydrofuranu (25 ml) se za stálého míchání a chladu pod inertní atmosférou přidával po částech karbonyldiimidazol (2,38 g, 14,7 mmol) po dobu 2 hodin. Směs *N,O*-dimethylhydroxyl-amin hydrochloridu

(1,43 g, 14,7 mmol) s triethylaminem (2,21 ml, 15,9 mmol) se míchala po dobu 6 hodin při pokojové teplotě. Obě směsi se spojily a následně se vlily do roztoku $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (5% aq., 70 ml) obsahující HCl (1 M; 23 ml) a směs se míchala se po dobu 1 hodiny. Výsledné pH bylo 6. Následně byla provedena extrakce pomocí Et_2O (70 ml) a EtOAc (2 x 50 ml). Organická vrstva byla vysušena bezvodým síranem sodným a rozpouštědlo bylo odpařeno. Produkt byl vyčištěn pomocí sloupcové chromatografie (mobilní fáze: hexan/EtOAc, 6:1). Výtěžek *N*-methyl-*N*-methoxy-2-hydroxybenzamidů byl 0,77 g (70 %) jako oranžový olej.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 11.17 (s, 1H), 7.96 (dd, $J = 1.6, 8.1$ Hz, 1H), 7.39 - 7.36 (m, 1H), 6.99 (dd, $J = 1.2, 8.4$ Hz, 1H), 6.86 - 6.83 (m, 1H), 3.65 (s, 3H), 3.41 (s, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 169.82, 160.92, 133.74, 129.47, 118.53, 117.94, 114.33, 61.17, 34.01.

Do roztoku *N*-methyl-*N*-methoxy-2-hydroxybenzamidů (0,31 g, 1,7 mmol) v suchém tetrahydrofuranu (THF; 17 ml) míchaném za chladu a pod inertní atmosférou se pomalu a za stálého míchaní přidával vinylmagnesium bromid (2,1 ml, 5,1 mmol) v suchém tetrahydrofuranu (5 ml) po dobu 2 hodin. Rozpouštědlo bylo odpařeno a surový produkt byl rozpuštěn v ethyl-acetátu (50 ml) a extrahován 1 M kyselinou chlorovodíkovou (25 ml) a následně s vodou (50 ml). Organické rozpouštědlo bylo odpařeno za sníženého tlaku a produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie (mobilní fáze: hexan/EtOAc, 15:1). Výtěžek 1-(2-hydroxyfenyl)-2-propen-1-onu byl 0,16 g (62 %) jako žlutý olej.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 12.53 (s, 1H), 7.82 (dd, $J = 8.1, 1.6$ Hz, 1H), 7.51 (ddd, $J = 8.6, 7.2, 1.7$ Hz, 1H), 7.37–7.25 (m, 1H), 7.03 (dd, $J = 8.4, 1.1$ Hz, 1H), 6.94-6.91 (m, 1H), 6.58 (dd, $J = 16.8, 1.7$ Hz, 1H), 5.98 (dd, $J = 10.6, 1.7$ Hz, 1H). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 194.37, 163.56, 136.64, 130.76, 130.59, 130.04, 119.36, 118.91, 118.56.

4.5 Syntéza 3-(2-hydroxyfenyl)-4,5-dihydro-1*H*-pyrazolu

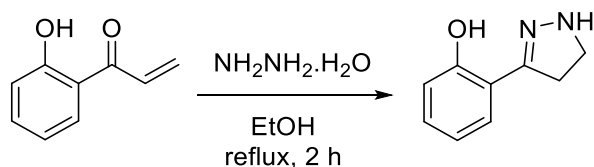


Schéma 7. Syntéza 3-(2-hydroxyfenyl)-4,5-dihydro-1*H*-pyrazolu z 1-(2-hydroxyfenyl)-2-propen-1-onu

Upravili jsme metodu z článku autorů M. Dora Carrión, Mariem Chayah, Antonio Entrena a kolektivu.⁴⁶

Směs 1-(2-hydroxyfenyl)-2-propen-1-onu (0,2 g, 0,67 mmol), hydrazinu (0,1011 g, 2,0 mmol) v ethanolu (10 ml) se zahřívala pod zpětným chladičem po dobu 2 hodin. Pomocí tenkovrstvé

chromatografie bylo zjištěno, že roztok obsahuje směs mnoha různých látek, které se po zpracování reakční směsi nepodařilo sloupcovou chromatografií rozdělit. Cílový produkt nebyl izolován.

4.6 Syntéza 1-acetyl-3-(2-hydroxyfenyl)-4,5-dihydro-1H-pyrazolu

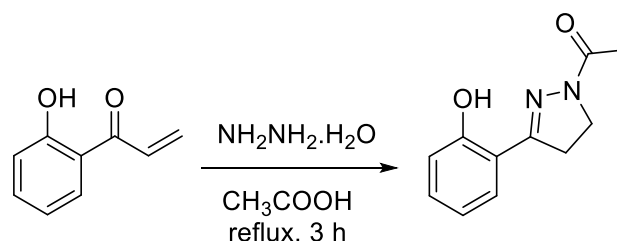


Schéma 8. Syntéza 1-acetyl-3-(2-hydroxyfenyl)-4,5-dihydro-1H-pyrazolu z 1-(2-hydroxyfenyl)-2-propen-1-onu
Směs 1-(2-hydroxyfenyl)-2-propen-1-onu (0,2 g, 1,4 mmol), hydrazinu (0,2 g, 4,1 mmol) v kyselině octové (10 ml) se zahřívala pod zpětným chladičem po dobu 3 hodiny. Rozpouštědlo bylo odpařeno a surový produkt byl rozpuštěn v ethyl-acetátu (50 ml) a extrahován vodou (50 ml). Organické rozpouštědlo bylo odpařeno za sníženého tlaku a produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie (mobilní fáze: hexan/EtOAc, 3:1 až 1:1). Ve výsledku byly izolovány dvě látky a-34 mg, b-25 mg, avšak dle NMR se nepodařilo identifikovat jejich struktury. Cílový produkt nebyl izolován.

4.7 Syntéza 3-(2-hydroxyfenyl)-4,5-dihydro-1H-pyrazolu

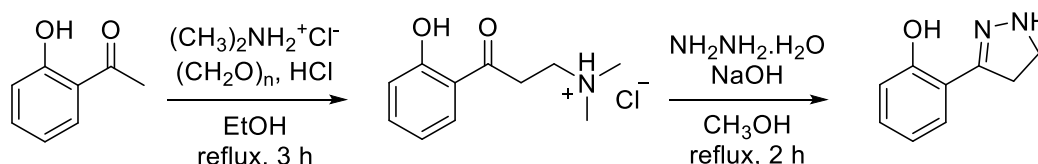


Schéma 9. Syntéza 3-(2-hydroxyfenyl)-4,5-dihydro-1H-pyrazolu z 2-hydroxyacetofenonu

Metoda byla vzata z článku autorů Franco Chimenti a Adriana Bolasco a kolektivu.⁴⁷
Směs 2-hydroxyacetofenonu (2,0 ml, 16,6 mmol), dimethylamonium-chloridu (1,86 g, 23,2 mmol), paraformaldehydu (0,66 g), koncentrované kyseliny chlorovodíkové (0,2 ml) ve 2-propanolu (10 ml) se zahřívala k varu pod zpětným chladičem po dobu 1 hodiny a pak se nechala stát přes noc v lednici. Surový produkt byl odfiltrován a promyt acetonem za sníženého tlaku. Následně byl produkt vysušen v exsikátoru. Výtěžek *N,N*-dimethyl-3-(2-hydroxyfenyl)-3-oxopropanammonium-chloridu byl 1,2 g (31 %) jako bílá krystalická látka.

Roztok produktu (0,2 g, 0,9 mmol) v methanolu (5 ml) se pomalu spojil se směsí hydrazinu (0,51 ml, 10,45 mmol) a hydroxidu sodného (50% aq., 0,32 ml, 12,2 mmol) v methanolu (5 ml) a zahřívával se k varu za stálého míchání po dobu 2 hodin. Rozpouštědlo bylo odpařeno a surový produkt byl rozpuštěn v dichlormethanu (40 ml), extrahován vodou (2 x 40ml), organická fáze byla vysušena síranem sodným a odpařena. Odparek byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie (mobilní fáze: hexan/EtOAc, 3:1), nicméně cílový produkt nebyl izolován..

4.8 Syntéza 1-acyl-3-(2-methoxyfenyl)-4,5-dihydro-1H-pyrazolu

4.8.1 Syntéza *N,N*-dimethyl-3-(2-methoxyfenyl)-3-oxopropanamonium-chloridu (15)

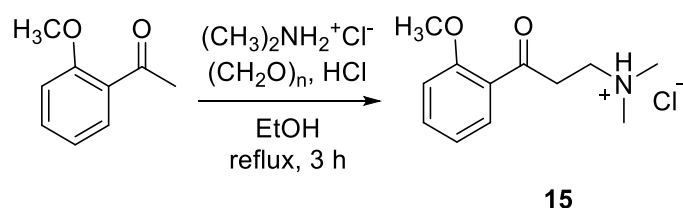


Schéma 10. Syntéza *N,N*-dimethyl-3-(2-methoxyfenyl)-3-oxopropanamonium-chloridu

Směs 2-methoxyacetofenonu (2,0 ml, 14,5 mmol), dimethylamonium-chloridu (1,66 g, 20,3 mmol), paraformaldehydu (0,58 g), koncentrované kyseliny chlorovodíkové (0,2 ml) ve 2-propanolu (10 ml) byla zahřívána pod zpětným chladičem po dobu 1 hodiny. Následně se ponechala stát přes noc v lednici, poté se zfiltrovala za sníženého tlaku a filtrát se odpařil. Do odparku se přidal aceton, sraženina se odfiltrovala za sníženého tlaku a následně vysušila v exsikátoru. Výtěžek *N,N*-dimethyl-3-(2-methoxyfenyl)-3-oxopropanamonium-chlorid byl 0,9 g (25 %) jako bílá krystalická látka.

4.8.2 Syntéza 1-acyl-3-(2-methoxyfenyl)-4,5-dihydro-1H-pyrazolu (16-18)

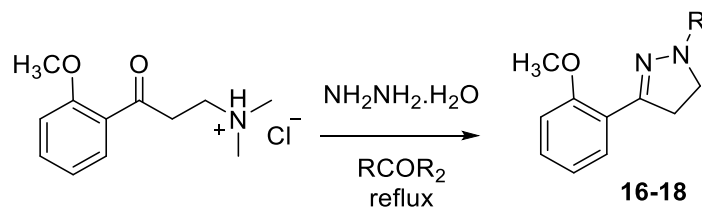
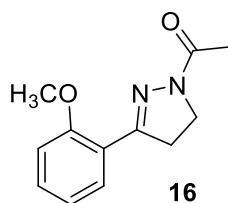


Schéma 11. Syntéza 1-acyl-3-(2-methoxyfenyl)-4,5-dihydro-1H-pyrazolu

4.8.2.1 Syntéza 1-acetyl-3-(2-methoxyfenyl)-4,5-dihydro-1*H*-pyrazolu (16)



Obrázek 21. 1-acetyl-3-(2-methoxyfenyl)-4,5-dihydro-1*H*-pyrazolu

N,N-dimethyl-3-(2-methoxyfenyl)-3-oxopropanamonium-chlorid (1,0 g, 4,1 mmol) a hydrazin (1,3 ml, 28,7 mmol) v kyselině octové (15 ml) se zahříval k varu pod zpětným chladičem po dobu 2 hodin. Rozpouštědlo bylo odpařeno, surový produkt se rozpustil v dichlormethanu (25 ml) a promyl se vodou (2 x 30 ml). Organické rozpouštědlo bylo odpařeno za sníženého tlaku a produkt se přečistil pomocí sloupcové chromatografie (mobilní fáze: chloroform/methanol, 50:1).

Výtěžek: 0,33 g (37 %) jako bílá krystalická látka.

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 7.69 (dd, $J = 7.8, 1.7$ Hz, 1H), 7.39 (ddd, $J = 8.9, 7.4, 2.0$ Hz, 1H), 7.09 (dd, $J = 8.3, 1.0$ Hz, 1H), 6.97 (td, $J = 7.5, 1.0$ Hz, 1H), 3.79 (m, 5H), 3.30 – 3.25 (m, 2H), 2.19 (s, 3H). ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ 168.10, 158.53, 156.12, 132.08, 129.17, 121.14, 120.87, 112.97, 56.26, 44.31, 35.31, 21.87.

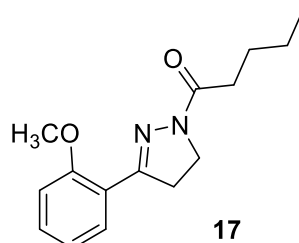
Teplota tání: 146 - 148 °C

CHNS-analýza: C₁₂H₁₄N₂O₂

Vypočteno: C, 66,04; H, 6,47; N, 12,84

Nalezeno: C, 65,83; H, 6,37; N, 12,89

4.8.2.2 Syntéza 3-(2-methoxyfenyl)-1-valeroyl-4,5-dihydro-1*H*-pyrazolu (17)



Obrázek 22. 3-(2-methoxyfenyl)-1-valeroyl-4,5-dihydro-1*H*-pyrazolu

N,N-dimethyl-3-(2-methoxyfenyl)-3-oxopropanamonium-chlorid (0,5 g, 2,05 mmol) a hydrazin (0,7 ml, 14,35 mmol) v kyselině valerové (10 ml) se zahříval k varu pod zpětným

chladičem po dobu 24 hodin. Výsledná směs byla ochlazena na laboratorní teplotu a poté byl přidán hexan (10 ml). Po 5 hodinách byl surový produkt odfiltrován za sníženého tlaku. Filtrát byl poté zahuštěn za sníženého tlaku a vzniklá sraženina byla odfiltrována. Obě části surového produktu byly rozpuštěny se v ethyl-acetátu (50 ml), organický roztok byl promyt roztokem hydrogenuhličitanu sodného (10 ml) a následně vodou (2 x 50 ml). Organická fáze byla odpařena za sníženého tlaku a produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie (mobilní fáze: hexan / EtOAc, 3:1).

Výtěžek: 0,24 g (45 %) jako bílá krystalická látka.

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 7.68 (dd, $J = 7.7, 1.8$ Hz, 1H), 7.39 (ddd, $J = 8.4, 7.3, 1.8$ Hz, 1H), 7.08 (dd, $J = 8.4, 1.1$ Hz, 1H), 6.97 (td, $J = 7.5, 1.0$ Hz, 1H), 3.85 - 3.71 (m, 5H), 3.27 - 3.24 (m, 2H), 2.59 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 1.57 - 1.49 (m, 2H), 1.29 (h, $J = 7.4$ Hz, 2H), 0.85 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ 170.85, 158.52, 155.94, 132.04, 129.15, 121.16, 120.94, 112.97, 56.25, 44.37, 35.06, 33.48, 27.30, 22.43, 14.31.

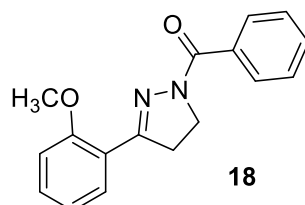
Teplota tání: 55 - 57 °C

CHNS analýza: $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2$

Vypočteno: C, 69,20; H, 7,74; N, 10,76

Nalezeno: C, 68,77; H, 7,60; N, 10,64

4.8.2.3 Syntéza 1-benzoyl-3-(2-methoxyfenyl)-4,5-dihydro-1H-pyrazolu (18)



Obrázek 23. 1-benzoyl-3-(2-methoxyfenyl)-4,5-dihydro-1H-pyrazolu

Do roztoku *N,N*-dimethyl-3-(2-methoxyfenyl)-3-oxopropanamonium-chloridu (1,0 g, 4,1 mmol) v methanolu se pomalu přidával hydrazin (2,3 ml, 28,7 mmol) a hydroxid sodný (50% aq., 1,4 ml) a výsledná směs se zahřívala k varu pod zpětným chladičem po dobu 3 hodin. Rozpouštědlo bylo poté odpařeno, surový produkt byl rozpuštěn v dichlormethanu (50 ml) a extrahován vodou (50 ml). Organické rozpouštědlo bylo odpařeno za sníženého tlaku a k odparku byl za stálého míchání přidán roztok benzoyl chloridu (0,45 ml, 4,1 mmol) v pyridinu (5,0 ml). Výsledná směs se míchala po dobu 24 hodin za laboratorní teploty. Rozpouštědlo bylo odpařeno, surový produkt byl rozpuštěn v ethyl-acetátu (50 ml) a extrahován 1 M kyselinou chlorovodíkovou (20 ml) a následně vodou (2 x 30 ml). Organická

fáze byla odpařena za sníženého tlaku a produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie (mobilní fáze: hexan / EtOAc, 4:1 až 2:1).

Výtěžek: 0,29 g (25 %) jako oranžova krystalická látka.

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 7.88 - 7.79 (m, 2H), 7.57 (dd, $J = 7.7, 1.9$ Hz, 1H), 7.52 - 7.32 (m, 4H), 7.09 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 6.95 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H), 4.03 (t, $J = 9.9$ Hz, 2H), 3.81 (s, 3H), 3.35 - 3.30 (m, 2H). ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ 165.92, 158.56, 157.23, 135.12, 132.19, 131.15, 130.03, 129.80, 129.37, 129.08, 128.21, 121.15, 120.72, 112.95, 56.30, 45.61, 34.48.

Teplota tání: 91 - 93 °C

CHNS analýza: $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$

Vypočteno: C, 72,84; H, 5,75; N, 9,99

Nalezeno: C, 71,88; H, 5,61; N, 9,42

Alternativní metody přípravy **1-benzoyl-3-(2-methoxyfenyl)-4,5-dihydro-1H-pyrazolu (18)**:

4.8.2.4

Směs *N,N*-dimethyl-3-(2-methoxyfenyl)-3-oxopropanamonium-chlorid (0,5 g, 2,05 mmol), hydrazinu (0,7 ml, 14,35 mmol), kyseliny benzoové (2,5 g, 20,5 mmol) v ethanolu (10 ml) byla zahřívána pod zpětným chladičem po dobu 24 hodin. Rozpouštědlo bylo odpařeno, surový produkt se rozpustil v ethyl-acetátu (25 ml) a promyl se vodou (2 x 30 ml). Organické rozpouštědlo bylo odpařeno za sníženého tlaku. Pomocí tenkovrstvé chromatografie bylo zjištěno, že roztok obsahuje jednu látku. Pomocí HPLC-MS analýzy odpovídající molární hmotnost nebyla nalezena. Cílový produkt nebyl izolován.

4.8.2.5

Bylo provedeno stejně jako v kapitole 4.8.2.3 za využitím jiného rozpouštědla – acetonitrilu (10 ml). Pomocí HPLC-MS analýzy odpovídající molární hmotnost nebyla nalezena. Cílový produkt nebyl izolován.

4.8.2.6

Bylo provedeno stejně jako v kapitole 4.8.2.3 za využitím jiného rozpouštědla – toluenu (10 ml). Pomocí tenkovrstvé chromatografie bylo zjištěno, že roztok obsahuje směs mnoha různých

látek, které se po zpracování reakční směsi nepodařilo sloupcovou chromatografií rozdělit. Cílový produkt nebyl izolován.

4.9 Syntéza 1-acetyl-3-(4-methoxyfenyl)-4,5-dihydro-1*H*-pyrazolu

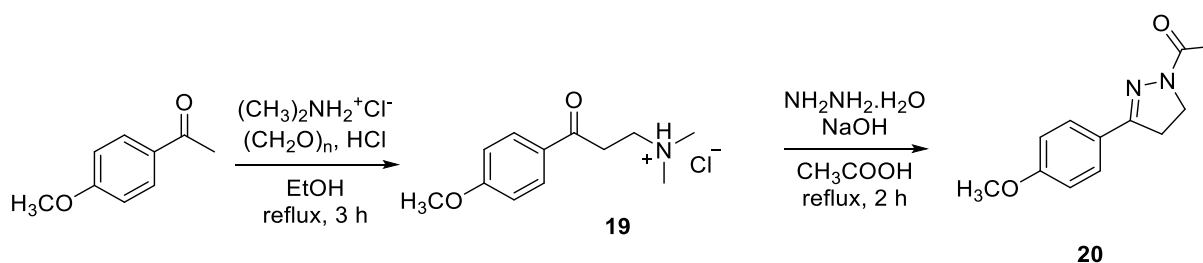


Schéma 12: Syntéza 1-acetyl-3-(4-methoxyfenyl)-4,5-dihydro-1*H*-pyrazolu

4.9.1 Syntéza *N,N*-dimethyl-3-(4-methoxyfenyl)-3-oxopropanamonium-chloridu (19)

Bylo provedeno stejně jako v kapitole 4.8.1 za využitím výchozí látky 4-methoxyacetofenonu. Výtěžek *N,N*-dimethyl-3-(2-methoxyfenyl)-3-oxopropanamonium-chloridu chlorid je 1,06 g (30 %) jako bílá krystalická látka.

4.9.2 Syntéza 1-acetyl-3-(4-methoxyfenyl)-4,5-dihydro-1*H*-pyrazolu (20)

N,N-dimethyl-3-(2-methoxyfenyl)-3-oxopropanamonium-chloridu chlorid (0,65 g, 2,7 mmol) a hydrazin (0,86 ml, 18,9 mmol) v kyselině octové (15 ml) se zahříval k varu pod zpětným chladičem po dobu 2 hodin. Rozpouštědlo bylo odpařeno, surový produkt byl rozpuštěn v dichlormethanu (25 ml) a promyt vodou (2 × 30 ml). Organické rozpouštědlo bylo odpařeno za sníženého tlaku a produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografii (mobilní fáze: chloroform/methanol, 60:1). Výtěžek 1-acetyl-3-(4-methoxyfenyl)-4,5-dihydro-1*H*-pyrazolu byl 0,254 g (44 %) jako oranžova krystalická látka.

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*D*₆) δ 7.65 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 6.97 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 3.87 – 3.79 (m, 2H), 3.77 (s, 3H), 3.19 (dd, *J* = 10.8, 9.3 Hz, 2H), 2.19 (s, 3H). ¹³C NMR (151 MHz, DMSO-*D*₆) δ 167.84, 161.35, 156.31, 130.84, 128.65, 124.43, 114.72, 114.37, 55.86, 44.24, 32.14, 21.83.

Teplota tání: 97 – 99 °C

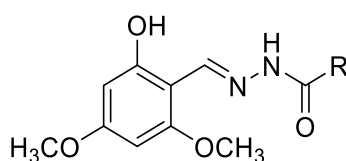
CHNS analýza: C₁₂H₁₄N₂O₂

Vypočteno: C, 66,04; H, 6,47; N, 12,84

Nalezeno: C, 65,63; H, 6,30; N, 12,28%

5 DISKUSE

Cílem této práce bylo syntetizovat nové chelátory železa odvozené od chelátoru SIH, které by měly mít schopnost chelatace iontů železa a potenciálně také zvýšenou stabilitu vůči hydrolyze. První série analogů SIH připravená a studovaná v této práci má *N'*-(2-hydroxy-4,6-dimethoxybenzyliden)-hydrazidový strukturní základ.



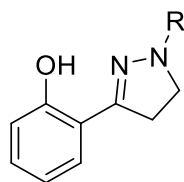
Obrázek 24. Struktura *N'*-(2-hydroxy-4,6-dimethoxybenzyliden)-hydrazidové deriváty

Tato základní struktura byla vybrána z několika důvodů. Především se jedná o pokračování v předchozí práci na syntéze potenciálně stabilnějších analogů SIH s lepšími chelatačními a cytoprotektivními schopnostmi ve skupině školitelky, kdy 2,4,6-trihydroxybenzylidenové a především 2,6-dihydroxybenzylidenové analogy SIHu ukázaly srovnatelnou aktivitu jako SIH. Zvolená substituce dvěma methoxyskupiny na benzenovém jádře zvyšuje elektronovou hustotu na benzenovém jádře a methoxyskupina v poloze 6 může stericky chránit citlivou hydrazonovou vazbu vůči hydrolyze. K tomu podle studie E. Mackové analogy SIH s methoxyskupinou v poloze 4 na aromatickém jádře mají dobré antiproliferační vlastnosti,³⁷ což by mohlo rozšířit spektrum účinků připravených látek.

Při syntéze první série látek bylo nejprve nutné připravit výchozí 2-hydroxy-4,6-dimethoxybenzaldehyd, způsob přípravy byl převzat z článku autora Dr. Henry Dube a kolektivu.⁴²

Tato látka byla snadno získaná monodemethylací v molekule komerčně dostupného 2,4,6-trimethoxybenzaldehydu pomocí chloridu hlinitého. Výsledné hydrazony byly získány Schiffovou kondenzací 2-hydroxy-4,6-dimethoxybenzaldehydu a odpovídajícího hydrazidu ve výtěžcích 49-94 %.

Druhá série analogů SIH jsou 3-(2-hydroxyfenyl)-4,5-dihydro-1*H*-pyrazolové deriváty. Cyklizace hydrazonové části molekuly by měla zabránit rychlé hydrolyze hydrazonové vazby a tím prodloužit plazmatický poločas.



Obrázek 25. Struktura 3-(2-hydroxyfenyl)-4,5-dihydro-1*H*-pyrazolové deriváty

Bylo navrženo několik způsobů přípravy. První plán počítal s přípravou 4-bromfenyl 3-chlorpropanoát, který by následně působením chloridu hlinitého poskytl 1-(5-brom-2-hydroxyfenyl)-3-chlorpropan-1-on mechanismm Friesova přesmyku.

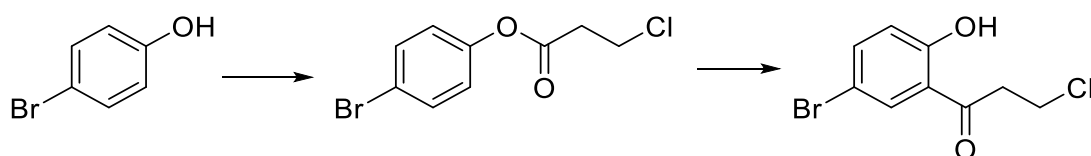


Schéma 13. Syntéza 1-(5-brom-2-hydroxyfenyl)-3-chlorpropan-1-onu

4-Bromfenol byl vybrán jako modelový substrát s obsazenou polohou 4, která by bránila vzniku dalšího produktu při Friesově přesmyku. Nicméně i takový produkt s halogenem (bromu) v poloze 4 by byl zajímavý pro svou zvýšenou lipofilitu, která může zvýšit propustnost přes cytoplazmatickou membránu buněk.

Ale už první krok neběžel podle plánu, bylo vyzkoušeno 5 různých způsobů, ale vždy docházelo k eliminaci choru a vznikal 4-bromfenyl-akrylát.

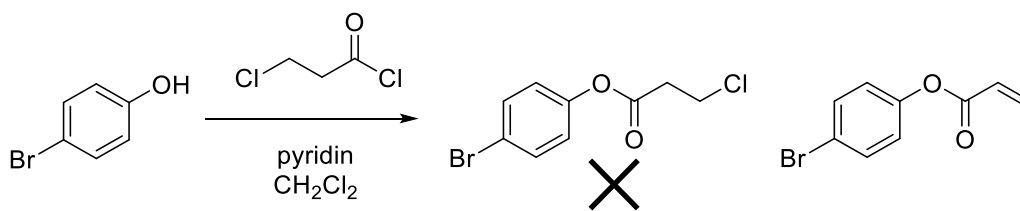


Schéma14. Syntéza 4-bromfenyl 3-chlorpropanoátu

Alternativní podmínky, které byly vyzkoušené: 4-bromfenol s 3-chlorpropionyl chloridem nebo 4-chlorbutyryl chloridem v různých rozpouštědlech (dichlormethan, acetonitril, THF) a za přidání různých bází (DIPEA, uhličitán draselný, hydroxid sodný (50% aq)).

Další postup počítal s přípravou 1-(2-hydroxyfenyl)prop-2-en-1-onu, ze kterého by bylo možno připravit 3-(2-hydroxyfenyl)-4,5-dihydro-1*H*-pyrazol, který by byl dále acylován. Metoda byla převzata z článku autora Tamás Patonay a kolektivu,⁴⁵ kdy se z 2-hydroxyacetofenonu připraví *N,N*-dimethyl-3-(2-hydroxyfenyl)-3-oxopropanamonium-

chlorid. Surový produkt se rozpustí ve velkém množství vody (750 ml) a destiluje se s vodní parou za vzniku požadovaného eliminovaného 1-(2-hydroxyfenyl)prop-2-en-1-onu. Ten byl získán v poměrně nízkých výtěžcích (5 %) a proces destilace byl zdlouhavý a neefektivní. Proto jsme vyzkoušeli jinou metodu syntézy 1-(2-hydroxyfenyl) prop-2-en-1-onu přes Weinrebův amid - 2-hydroxy-*N*-methoxy-*N*-methylbenzamid s lepším výtěžkem – 62 %.

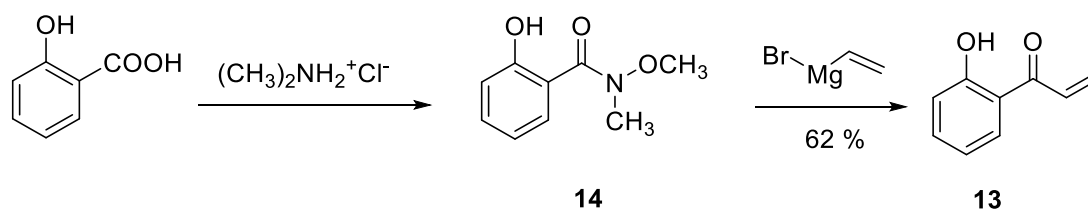


Schéma 15: Syntéza 1-(2-hydroxyfenyl)prop-2-en-1-onu přes Weinrebův amid

Metody syntézy 3-(2-hydroxyfenyl)-4,5-dihydro-1H-pyrazolových derivátů:

- I. Upravili jsme postup popsáný M. Dora Carrión, Mariem Chayah, Antonio Entrena a kolektivu⁴⁶, kdy se k 1-(2-hydroxyfenyl)prop-2-en-1-onu přidá hydrazin v ethanolu.

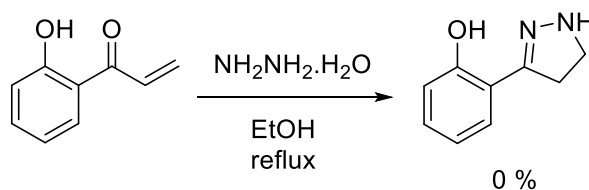


Schéma 16. Syntéza 3-(2-hydroxyfenyl)-4,5-dihydro-1H-pyrazolu

- II. k 1-(2-hydroxyfenyl)prop-2-en-1-onu se přidá hydrazin v kyselině octové.

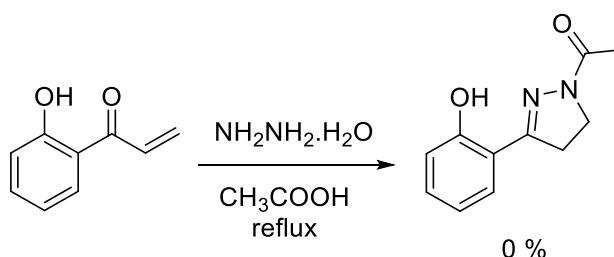


Schéma 17. Syntéza 1-acetyl-3-(2-hydroxyfenyl)-4,5-dihydro-1H-pyrazolu

- III. Alternativní metoda byla vzata z článku Franco Chimenti a Adriana Bolasco a kolektivu⁴⁷, kdy se přímo k *N,N*-dimethyl-3-(2-hydroxyfenyl)-3-oxopropanamoniumpchloridu přidá hydrazin v methanolu a směs se zahřívá k varu po dobu 2 hodin.

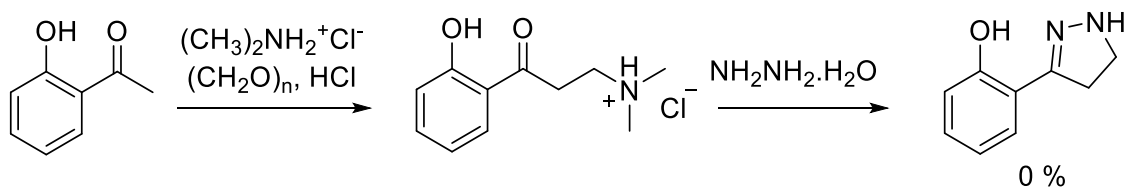
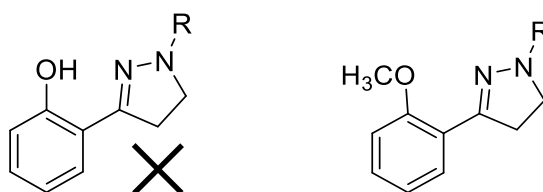


Schéma 18. Syntéza 3-(2-hydroxyfenyl)-4,5-dihydro-1*H*-pyrazolu

Bohužel, 3-(2-hydroxyfenyl)-4,5-dihydro-1*H*-pyrazolové deriváty se nepodařilo syntetizovat. V případě metody I a III vznikla směs produktů, kterou se následně nepodařilo rozdělit sloupcovou chromatografií, metodou II byly izolovány dvě látky, ale podle NMR se nepodařilo zjistit jejich strukturu. Proto bylo navrženo připravit deriváty 1-acetyl-3-(2-methoxyfenyl)-4,5-dihydro-1*H*-pyrazolu zavedením methoxyskupiny místo hydroxyskupiny, tím se zvýšila i lipofilita látek.



Obrázek 26. 3-(2-hydroxyfenyl)-4,5-dihydro-1*H*-pyrazolové a 3-(2-methoxyfenyl)-4,5-dihydro-1*H*-pyrazol deriváty

Na začátku se připravila sůl *N,N*-dimethyl-3-(2-methoxyfenyl)-3-oxopropanamonium-chlorid působením dimethylamonium-chloridu a paraformaldehydu na 2-methoxyacetophenon. Následně se připravily 3-(2-methofenyl)-4,5-dihydro-1*H*-pyrazol deriváty reakcí připraveného amonium-chloridu s hydrazinem a odpovídající karboxylovou kyselinou nebo benzoylchloridem ve výtěžcích 30-45 %. Taky by připraven 1 derivát 3-(4-methofenyl)-4,5-dihydro-1*H*-pyrazolu.

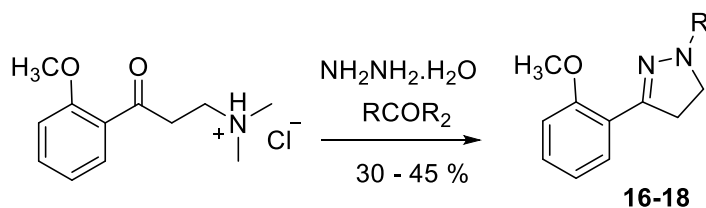
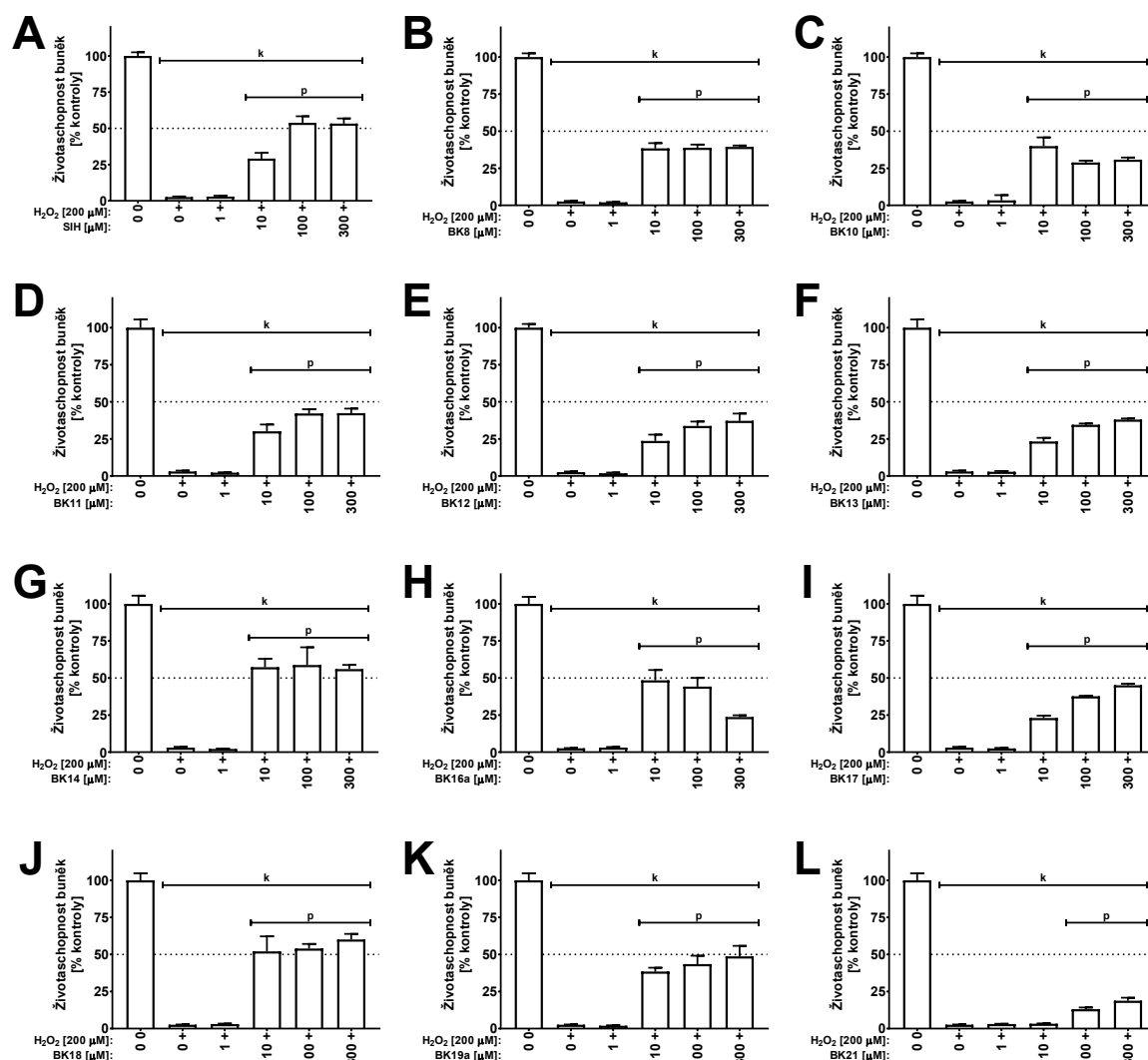


Schéma 19. Syntéza 1-acyl-3-(2-methoxyfenyl)-4,5-dihydro-1*H*-pyrazolu

Cytoprotektivní potenciál studovaných sloučenin proti oxidačnímu stresu

Aktivita *N*-(2-hydroxy-4,6-dimethoxybenzyliden)-hydrazidových derivátů byla stanovena ve spolupráci s Katedrou biochemických věd.

Schopnost chránit kardiomyoblastové buňky H9c2 před modelovým oxidačním poškozením vyvolaným peroxidem vodíku byla hodnocena pomocí testu vychytávání neutrální červeně po 24 hodinách. Životaschopnost buněk H9c2 ošetřených odstupňovanými koncentracemi studovaných sloučenin ve srovnání s kontrolou je uvedena na obrázku.



Obrázek 27. Cytoprotektivní vlastnosti SIH (A), 3 (B), 2 (C), 5 (D), 4 (E), 6 (F), 7 (G), 8 (H), 9 (I), 10 (J), 11 (K), 12 (L) na modelu buněčné linie H9c2 po 24 hodinách inkubace s H₂O₂ (200 μM). Výsledky jsou vyjádřeny jako procenta životaschopnosti buněk vůči kontrole. Uvedené hodnoty jsou zobrazeny jako aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou z 4 replikátů. Statistické hodnocení bylo provedeno one-way ANOVA s post hoc testem Holm-Šídák s hladinou významnosti: $p \leq 0,05$ v porovnání ke kontrole (k) nebo k buňkám vystaveným H₂O₂ (200 μM) bez chelátoru (p).

Sloučeniny **7** (G) a **10** (J) vykazovaly významně lepší ochranné vlastnosti než SIH, byly účinnější ve všech koncentracích. Sloučeniny **3** (B), **2** (C), **5** (D), **8** (H), **11** (K) vykazovaly lepší cytoprotektivní vlastnosti při koncentraci 10 μM, ale horší cytoprotektivní vlastnosti při

vyšších koncentracích 100 μM a 300 μM než SIH. Sloučeniny **4** (E), **6** (F), **9** (I), **12** (L) vykazovaly nižší ochranné účinky než SIH.

6 ZÁVĚR

Bylo připraveno 14 nových analogů SIH, které by měly mít zlepšenou schopnost chelatace iontů železa a s ní spojenou schopnost ochrany buněk před oxidačním stresem, a potenciálně také zvýšenou stabilitu vůči hydrolýze.

U 11 *N'*-(2-hydroxy-4,6-dimethoxybenzyliden)-hydrazidových derivátů byla hodnocena jejich schopnost chránit kardiomyoblastové buňky H9c2 před modelovým oxidačním poškozením vyvolaným peroxidem vodíku.

Sloučeniny *N'*-(2-Hydroxy-4,6-dimethoxybenzyliden)cyklohexankarbohydrazid a 4-Chlor-*N'*-(2-hydroxy-4,6-dimethoxybenzyliden)benzohydrazid dihydrát vykazovaly významně lepší ochranné vlastnosti než SIH. U těchto sloučenin bude studována jejich stabilita v plazmě (odolnost proti hydrolýze hydrazinové vazby), vlastní toxicita a antiproliferativní aktivita.

Výsledné 3-(2-methoxyfenyl)-4,5-dihydro-1*H*-pyrazolové deriváty budou podrobeny demethylačním reakcím s cílem získat požadované chelatačně účinné 3-(2-hydroxyfenyl)-4,5-dihydro-1*H*-pyrazolové deriváty.

7 SEZNAM ZKRATEK

SIH – Salicylaldehyd isonikotinoyl hydrazon

ROS – reaktivní formy kyslíku

DFO – Deferoxamin

DFX – Deferasirox

DFP – Deferipron

DEX – Dexrazoxan

PIH – Pyridoxal isonikotinoyl hydrazon

THF –tetrahydrofuran

DIPEA – *N,N*-diisopropylethylaminu

8 POUŽITÁ LITERATURA

1. Šimůnek Tomáš, et al. "SIH - a novel lipophilic iron chelator - protects H9c2 cardiomyoblasts from oxidative stress-induced mitochondrial injury and cell death." *Journal of molecular and cellular cardiology* 39.2 (2005): 345-354. doi:10.1016/j.yjmcc.2005.05.008
2. Kalinowski, Danuta S., and Des R. Richardson. "The evolution of iron chelators for the treatment of iron overload disease and cancer." *Pharmacological reviews* 57.4 (2005): 547-583. doi:10.1124/pr.57.4.2
3. Galaris Dimitrios, Alexandra Barbouti, and Kostas Pantopoulos. "Iron homeostasis and oxidative stress: An intimate relationship." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 1866.12 (2019): 118535. doi:10.1016/j.bbamcr.2019.118535
4. Zhou Tao, et al. "Design of iron chelators with therapeutic application." *Dalton transactions* 41.21 (2012): 6371-6389. doi:10.1039/C2DT12159J
5. Zhao Lu, Zhidan Xia, and Fudi Wang. "Zebrafish in the sea of mineral (iron, zinc, and copper) metabolism." *Frontiers in pharmacology* 5 (2014): 33. doi:10.3389/fphar.2014.00033
6. Dev Som, and Jodie L. Babitt. "Overview of iron metabolism in health and disease." *Hemodialysis International* 21 (2017): S6-S20. doi:10.1111/hdi.12542
7. Wang Jian, and Kostas Pantopoulos. "Regulation of cellular iron metabolism." *Biochemical Journal* 434.3 (2011): 365-381. doi:10.1042/BJ20101825
8. Nakamura Toshitaka, Isao Naguro, and Hidenori Ichijo. "Iron homeostasis and iron-regulated ROS in cell death, senescence and human diseases." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1863.9 (2019): 1398-1409. doi:10.1016/j.bbagen.2019.06.010
9. Powell Lawrie W., Rebecca C. Seckington, and Yves Deugnier. "Haemochromatosis." *The Lancet* 388.10045 (2016): 706-716. doi:10.1016/S0140-6736(15)01315-X
10. McDowell Lisa A., P. Kudaravalli, and K. L. Sticco. "Iron Overload. 2020." <https://ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK526131/>
11. Majhail N. S., H. M. Lazarus, and L. J. Burns. "Iron overload in hematopoietic cell transplantation." *Bone marrow transplantation* 41.12 (2008): 997-1003. doi:10.1038/bmt.2008.99

12. Pauline T. Lieu, Marja Heiskala, Per A. Peterson, Young Yang. "The roles of iron in health and disease." *Molecular Aspects of Medicine* 22 (2001): 1-87 doi:10.1016/S0098-2997(00)00006-6
13. Čermák J. "Přetížení železem—novinky v patogenezi a léčbě." *Vnitřní lékařství* 55.1 (2009): 59-63.
14. Hortobagyi G. N. "Anthracyclines in the treatment of cancer." *Drugs* 54.4 (1997): 1-7. doi:10.2165/00003495-199700544-00003
15. McGowan John V., et al. "Anthracycline chemotherapy and cardiotoxicity." *Cardiovascular drugs and therapy* 31.1 (2017): 63-75. doi:10.1007/s10557-016-6711-0
16. Henriksen Peter A. "Anthracycline cardiotoxicity: an update on mechanisms, monitoring and prevention." *Heart* 104.12 (2018): 971-977. doi:10.1136/heartjnl-2017-312103
17. Symeonidis A. S. "The role of iron and iron chelators in zygomycosis." *Clinical Microbiology and Infection* 15 (2009): 26-32. doi:10.1111/j.1469-0691.2009.02976.x
18. Baker Erica, et al. "Evaluation of the iron chelation potential of hydrazones of pyridoxal, salicylaldehyde and 2-hydroxy-1-naphthylaldehyde using the hepatocyte in culture." *Hepatology* 15.3 (1992): 492-501. doi:10.1002/hep.1840150323
19. Albelda-Berenguer Magdalena, Mathilde Monachon, and Edith Joseph. "Siderophores: From natural roles to potential applications." *Advances in applied microbiology* 106 (2019): 193-225. doi:10.1016/bs.aambs.2018.12.001
20. Sherrington Sarah L., et al. "Host sensing by pathogenic fungi." *Advances in applied microbiology* 102 (2018): 159-221. doi:10.1016/bs.aambs.2017.10.004
21. Keberle H. "The biochemistry of desferrioxamine and its relation to iron metabolism." *Annals of the New York Academy of Sciences* 119.2 (1964): 758-768. doi:10.1111/j.1749-6632.1965.tb54077.x
22. Porter John, Vip Viprakasit, and Antonis Kattamis. "Iron overload and chelation." *Guidelines for the Management of Transfusion Dependent Thalassaemia (TDT)* 3 (2014). <https://ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK269373/>
23. Mobarra Naser, et al. "A review on iron chelators in treatment of iron overload syndromes." *International journal of hematology-oncology and stem cell research* 10.4 (2016): 239. <https://ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5139945/>
24. Crichton Robert R., Roberta J. Ward, and Robert C. Hider. "The Efficacy of Iron Chelators for Removing Iron from Specific Brain Regions and the Pituitary—Ironing out the Brain." *Pharmaceuticals* 12.3 (2019): 138. doi:10.3390/ph12030138

25. Bures Jan, et al. "Investigation of novel dexrazoxane analogue JR-311 shows significant cardioprotective effects through topoisomerase IIbeta but not its iron chelating metabolite." *Toxicology* 392 (2017): 1-10. doi:10.1016/j.tox.2017.09.012
26. Lynda R. Wiseman, Caroline M. Spencer. "Dexrazoxane." *Drugs* 56 (1998): 385–403. doi:10.2165/00003495-199856030-00009
27. Brian B. Hasinoff, Eugene H. Herman. "Dexrazoxane: how it works in cardiac and tumor cells. Is it a prodrug or is it a drug?." *Cardiovasc Toxicol* 7 (2007): 140–144. doi:10.1007/s12012-007-0023-3
28. Státní ústav pro kontrolu léčiv
29. Case Western Reserve University. "Chelatační terapie přetížení železa pyridoxalisonicotinoylhydrazonem." *Klinická studie* (1989).
30. da Silva Gabriel Souto, et al. "Antioxidant activity and cellular uptake of the hydroxamate-based fungal iron chelators pyridoxatin, desferriastechrome and desferricoprogen." *Biometals* 32.4 (2019): 707-715. doi:10.1007/s10534-019-00202-7
31. Buss Joan L., et al. "Pyridoxal isonicotinoyl hydrazone analogs induce apoptosis in hematopoietic cells due to their iron-chelating properties." *Biochemical pharmacology* 65.2 (2003): 161-172. doi:10.1016/S0006-2952(02)01512-5
32. Hermes-Lima Marcelo, Prem Ponka, and Herbert M. Schulman. "The iron chelator pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH) and its analogues prevent damage to 2-deoxyribose mediated by ferric iron plus ascorbate." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1523.2-3 (2000): 154-160. doi:10.1016/S0304-4165(00)00115-X
33. Vitolo Lucia M. Wis, et al. "Iron chelators of the pyridoxal isonicotinoyl hydrazone class Part II. Formation constants with iron (III) and iron (II)." *Inorganica chimica acta* 170.2 (1990): 171-176. doi:10.1016/S0020-1693(00)80472-7
34. Richardson Des R., et al. "Iron chelators of the pyridoxal isonicotinoyl hydrazone class Part I. Ionisation characteristics of the ligands and their relevance to biological properties." *Inorganica chimica acta* 170.2 (1990): 165-170. doi:10.1016/S0020-1693(00)80471-5
35. Santos Natacha CF, et al. "The iron chelator pyridoxal isonicotinoyl hydrazone inhibits mitochondrial lipid peroxidation induced by Fe (II)–citrate." *European journal of pharmacology* 428.1 (2001): 37-44. doi:10.1016/S0014-2999(01)01291-2
36. Jansová Hana, et al. "Characterization of cytoprotective and toxic properties of iron chelator SIH, prochelator BSIH and their degradation products." *Toxicology* 350 (2016): 15-24. doi:10.1016/j.tox.2016.03.004

37. Macková Eliška, et al. "Methyl and ethyl ketone analogs of salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone: Novel iron chelators with selective antiproliferative action." *Chemico-Biological Interactions* 197 (2012): 69-79. doi:10.1016/j.cbi.2012.03.010
38. Hrušková Kateřina, et al. "Synthesis and initial in vitro evaluations of novel antioxidant aroylhydrazone iron chelators with increased stability against plasma hydrolysis." *Chemical research in toxicology* 24.3 (2011): 290-302. doi:10.1016/j.cbi.2012.03.010
39. Potůčková Eliška, et al. "Structure-activity relationships of novel salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone (SIH) analogs: iron chelation, anti-oxidant and cytotoxic properties." *PLoS One* 9.11 (2014): e112059. doi:10.1371/journal.pone.0112059
40. Jansová Hana, et al. "2, 6-dihydroxybenzaldehyde analogues of the iron chelator salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone: Increased hydrolytic stability and cytoprotective activity against oxidative stress." *Chemical research in toxicology* 31.11 (2018): 1151-1163. doi:10.1021/acs.chemrestox.8b00165
41. Hrušková Kateřina, et al. "Aroylhydrazone iron chelators: Tuning antioxidant and antiproliferative properties by hydrazide modifications." *European journal of pharmacology* 120 (2016): 97-110. doi:10.1016/j.ejmech.2016.05.015
42. Henry Dube, et al. "Probing Hydrogen Bonding to Bound Dioxygen in Synthetic Models for Heme Proteins: The Importance of Precise Geometry." *Chemistry - A European Journal* 15 (2009): 125-135. doi:10.1002/chem.200802077
43. Guan-Jhong Huang, M. Vijaya Bhaskar Reddy, et al. "A concise synthesis of viscolin, and its anti-inflammatory effects through the suppression of iNOS, COX-2, ERK phosphorylation and proinflammatory cytokines expressions." *European Journal of Medicinal Chemistry* 48 (2012): 371-378. doi:10.1016/j.ejmech.2011.12.008
44. John T. Edward, Mario Gauthier, Francis L. Chubb, and Premysl Ponka. "Synthesis of new acylhydrazones as iron-chelating compounds." *Journal of Chemical and Engineering Data* 33 (1988): 538-540 doi:10.1021/je00054a044
45. Tamás Patonay, Albert Lévai, Csaba Nemes, Tibor Timár, Gábor Tóth, and Waldemar Adam. "Synthesis and Cyclization of 1-(2-Hydroxyphenyl)-2-propen-1-one Epoxides: 3-Hydroxychromanones and -flavanones versus 2-(1-Hydroxyalkyl)-3-coumaranones." *The Journal of Organic Chemistry* 61 (1996): 5375-5383 doi:10.1021/jo960163z
46. M. Dora Carrión, Mariem Chayah, Antonio Entrena, et al. "Synthesis and biological evaluation of 4,5-dihydro-1H-pyrazole derivatives as potential nNOS/iNOS selective inhibitors. Part 2: Influence of diverse substituents in both the phenyl moiety and the acyl

group." *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 21 (2013): 4132–4142
doi:10.1016/j.bmc.2013.05.016

47. Franco Chimenti, Adriana Bolasco, Fedele Manna, Daniela Secci, Paola Chimenti, Arianna Granese. "Synthesis and Molecular Modelling of Novel Substituted-4,5-dihydro-(1H)-pyrazole Derivatives as Potent and Highly Selective Monoamine Oxidase-A Inhibitors." *Chemical Biology & Drug Design* 67 (2006): 206-214 doi:10.1111/j.1747-0285.2006.00367.x