

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra anorganické a organické chemie

Barbora Růžková

Syntéza

**3-fenyl-5-hydroxy-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionů
a jejich sirných analogů**

Diplomová práce

Vedoucí práce: Doc. PharmDr. Miloš Macháček, CSc.

Na tomto místě bych ráda poděkovala PharmDr. Lence Kubicové, CSc., pod jejímž vedením jsem začínala s prvními syntézami, a Doc. PharmDr. Miloši Macháčkovi, CSc, za cenné rady a pomoc při vypracování diplomové práce.

Paní Kateřině Kolovratníkové děkuji za stanovení teplot tání, paní Ivě Vencovské za měření infračervených spekter, Doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc., za měření NMR spekter a Ing. Pavlu Skálovi za jejich interpretaci.

Za výsledky testování antimykobakteriální aktivity vděčím MUDr. Jarmile Kaustové ze Zdravotního ústavu v Ostravě a testování antifungální aktivity provedla paní Ida Dufková a Mgr. Marcela Vejsová z Katedry biologických a lékařských věd, jimž také děkuji.

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

V Hradci Králové 15. května 2008

.....

ABSTRAKT

Syntéza 3-fenyl-5-hydroxy-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionů a jejich sirných analogů

Barbora Růžková

V této diplomové práci jsem se zabývala přípravou 3-fenyl-5-hydroxy-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionů, 3-fenyl-5-hydroxy-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazin-2-onů a 3-fenyl-5-hydroxy-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithionů jako cyklických analogů 2,6-dihydroxybenzanilidů.

Výchozí 2,6-dihydroxybenzanilidy jsem syntetizovala reakcí 2,6-dihydroxybenzoové kyseliny a anilinu (nesubstituovaného, nebo substituovaného v poloze 4 chlorem, methylem, butylem a methoxyskupinou) v přítomnosti chloridu fosforitého prováděnou v mikrovlnném rektoru. Působením methyl-chlorformiátu jsem je převedla na 3-fenyl-5-hydroxy-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-diony ve výtěžku 77 – 94 %. 3-Fenyl-5-hydroxy-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazin-2-ony a 3-fenyl-5-hydroxy-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithiony jsem získala thionací Lawessonovým činidlem ve výtěžku 31 – 42 % v případě monosirných a 24 – 33 % v případě disirných analogů. Struktura připravených látek byla potvrzena IČ a NMR spektry.

Žádná z látek nevykazovala antimykotickou aktivitu (při testování proti *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *Trichosporon asahii*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Aspergillus fumigates* a *Absidia corymbifera*) ani antimykobakteriální aktivitu (proti *M. tuberculosis*, *M. kansasii* a *M. avium*).

ABSTRACT

Synthesis of 5-hydroxy-3-phenyl-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-diones and their sulfur analogues

Barbora Růžková

The thesis is concerned with the preparation of 5-hydroxy-3-phenyl-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-diones, 5-hydroxy-3-phenyl-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazin-2-ones and 5-hydroxy-3-phenyl-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-dithiones, i.e. cyclic analogues of 2,6-dihydroxybenzanilides.

The starting 2,6-dihydroxybenzanilides were synthesized by the microwave-assisted reaction of 2,6-dihydroxybenzoic acid with aniline (unsubstituted or *para*-substituted by chlorine, methyl, butyl or methoxy groups) in the presence of phosphorus trichloride. Their treatment with ethyl-chloroformate afforded 5-hydroxy-3-phenyl-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-diones in 77 - 94 % yields. 5-Hydroxy-3-phenyl-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazin-2-ones and 5-hydroxy-3-phenyl-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-dithiones were obtained by thionation using Lawesson's reagent in 31 – 42 and 24 – 33 % yields, respectively. All the compounds were characterized by infrared and NMR spectroscopy and by elemental analysis.

No substance exerted either antimycotic activity (against *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *Trichosporon asahii*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Aspergillus fumigates*, and *Absidia corymbifera*) or antimycobacterial activity (against *M. tuberculosis*, *M. kansasii*, and *M. avium*).

OBSAH

1. ÚVOD	7
2. OBECNÁ ČÁST	8
3.1 POLYENOVÁ ANTIMYKOTIKA	11
3.2 AZOLY	13
3.3 ALLYAMINY	16
3.4 THIOKARBAMÁTY	17
3.5 OSTATNÍ ANTIMYKOTIKA	17
3.6 ECHINOKANDINY	18
3.7 ANTIMYKOTICKÉ VLASTNOSTI 3-FENYL-2 <i>H</i> -1,3-BENZOXAZIN-2,4(3 <i>H</i>)-DIONŮ	21
3. CÍL PRÁCE	23
4. METODICKÁ ČÁST	24
4.1 SYNTÉZA SALICYLANIDIDŮ	24
4.2 SYNTÉZA 3-FENY-2 <i>H</i> -1,3-BENZOXAZIN-2,4(3 <i>H</i>)-DIONŮ	25
4.3 SYNTÉZA 3-FENYL-4-THIOXO-3,4-DIHYDRO-2 <i>H</i> -1,3-BENZOXAZIN-2-ONŮ A 3-FENY-2 <i>H</i> -1,3-BENZOXAZIN-2,4(3 <i>H</i>)-DITHIONŮ	25
5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	27
5.1 SYNTÉZA N-FENYL-2,6-DIHYDROXYBENZAMIDŮ	27
5.2 SYNTÉZA 3-FENYL-5-HYDROXY-2 <i>H</i> -1,3-BENZOXAZIN-2,4(3 <i>H</i>)-DIONŮ	31
5.3 SYNTÉZA 3-FENYL-5-HYDROXY-4-THIOXO-3,4-DIHYDRO-2 <i>H</i> -1,3-BENZOXAZIN-2-ONŮ A 3-FENYL-5-HYDROXY-2 <i>H</i> -1,3-BENZOXAZIN-2,4(3 <i>H</i>)-DITHIONŮ	36
5.4 METODY POUŽITÉ V EXPERIMENTÁLNÍ ČÁSTI	43
6. VÝSLEDKY A DISKUSE	44
7. ZÁVĚR	46
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	47
9. PŘÍLOHY	51

1. ÚVOD

Na Katedře anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty UK se již řadu let několik pracovních týmů zabývá problematikou salicylanilidů a jejich strukturních analogů a to zejména se zřetelem na jejich antimykotické a antimykobakteriální účinky. V této diplomové práci jsem se věnovala syntéze 3-fenyl-5-hydroxy-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionů a jejich sirných analogů. Tyto látky jsou cyklickými analogy salicylanilidů, které v acylové části molekuly obsahují o jednu hydroxyskupinu více (v poloze 6). Zajímá nás, jak se tato strukturní modifikace projeví na biologické aktivitě těchto látek.

Mykózy jsou velmi rozšířená onemocnění, která postihují pacienty všech věkových kategorií bez ohledu na to, ze které sociální vrstvy pocházejí. Houby, plísně a kvasinky mohou napadat nehty, kůži, vlasy i intimní partie a být tak příčinou dyskomfortu a ztráty sebevědomí pacienta. Mnohem závažnější jsou však orgánové mykózy např. pacientů s oslabenou imunitou. Onemocnění jsou obvykle léčena dlouhodobě. Úspěšná léčba vyžaduje důsledné dodržování hygienických návyků a spolupráci pacienta při dodržování rad lékaře a lékárníka.

Vývoj nových antimykotik a registrace nových preparátů jde stále kupředu. Mykózy jsou stále předmětem zkoumání, proto je velmi důležitá orientace v soudobé farmakoterapii, jak je nastíněno v obecné části této práce. Novinkou mezi antimykotiky jsou i echinokandinové preparáty, které začínají být dostupné i v České republice. Za zmínku jistě stojí i klasický přehled léčiv, která se používají již desetiletí.

3-Fenyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-diony nejsou úplně novou skupinou látek, avšak jejich biologické účinky ještě nejsou dostatečně poznány. Podle dosavadních vědeckých studií se zdá, že by mezi nimi mohly být nalezeny látky s výhodnými biologickými účinky. Hledání nových účinných látek, nejen s antimykotickou a antimykobakteriální aktivitou, je dlouhodobým procesem. Preparáty je třeba obměňovat, také proto, že na ně vzniká rezistence. Tato diplomová práce je konkrétně zaměřena na syntézu 3-fenyl-5-hydroxy-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionů a jejich sirných analogů substituovaných na fenylu v poloze 4 jako potenciálních antimykotik a antituberkulotik.

Práce je součástí výzkumu prováděného na Katedře anorganické a organické chemie v rámci výzkumného záměru MSM 0021620822.

2. OBECNÁ ČÁST

Mykózy jsou onemocnění způsobená houbami (plísněmi, kvasinkami). Méně závažné jsou místní, zejm. kožní (dermatomykóza), popř. slizniční mykózy, které patří k velmi častým onemocněním. Častěji je nacházíme u diabetiků. Naopak, velmi závažná onemocnění představují celkové (systémové) mykózy s postižením vnitřních orgánů (plic, jícnu, mozku), které se vyskytuje především u osob s narušenou imunitou. Většina původců těchto chorob je všudypřítomná, ale za normálních okolností nevyvolává již onemocnění.

Dnes rozeznáváme asi 300 000 hub, z nichž se asi 240 vyskytuje v lékařské praxi. Rozlišují se 4 druhy poškození zdraví způsobených houbami:

1. mycetismus - alimentární otrava,
2. mykotoxikóza - otrava toxinem nebo toxickým produktem sekundárního metabolismu při kontaminaci potravy, vzduchu,
3. mykoalergie - hypersenzitivní reakce imunitního organismu a
4. mykózy - infekční onemocnění vyvolaná houbami.

Mykózy můžeme rozdělovat podle různých hledisek¹:

a) podle rozsahu postižení:

- A. lokalizované-postihují orgán nebo jinou lokalitu
- B. systémové (diseminované) - postižení dvou a více orgánů

b) podle lokalizace:

- A. povrchové (superficiální)
- B. kožní (kutánní)
- C. podkožní (subkutánní)
- D. hluboké (orgánové).

Výskyt systémových infekcí stále roste. Často se jedná o nozokomiální nákazy, způsobené zejména *Candida albicans*, či *Aspergillus sp.*, např. u pacientů s hematologickými malignitami²⁻⁹.

Mezi rizikové faktory patří: intravaskulární katetrizace, močová katetrizace, parenterální výživa, nádorová onemocnění, bakteriální sepse, diabetes, steroidní léčba,

chemoterapie, popáleniny, léčba širokospektrými antibiotiky, imunosuprimovaní pacienti, používání dlouhodobých trvalých protéz, infuzní kanyly a další faktory umožňující průnik mikroorganismům do krevního řečiště a překonání tělesných bariér.^{10,11}

Predisponující faktory při vzniku mykóz uvádí následující tabulka:¹²:

Imunologické faktory	Příčina
Defekty neutrofilů	Maligní krevní onemocnění Solidní tumory Akutní leukémie Rifampicin Gentamicin
Defekty T a B lymfocytů	Maligní krevní onemocnění Solidní tumory Virus HIV Chemoterapeutika Adrenokortikosteroidy Cyklosporin Antimikrobní látky
Neimunologické faktory	Dlouhodobá hospitalizace Infuze Katetrizace Rozsáhlé chirurgické zákroky Malnutrice Převoz pacienta mezi nemocnicemi

c) podle mechanismu účinku¹³:

- A) specifická - zasahují na specifickém místě metabolismu mikromycet
- B) nespecifická - působí obecným fungistatickým účinkem

Specifická antimykotika lze podle chemické struktury rozdělit do tří základních skupin:

- A.** polyenová antimykotika
- B.** azolová antimykotika
- C.** allylaminová antimykotika

Látky s jinou chemickou strukturou pak řadíme mezi **D.** ostatní antimykotika.

Nespecifická antimykotika jsou zastoupena kyselinami (boritá, benzoová), aldehydy (formaldehyd), organickými barvivy (Solutio Castelani), deriváty fenolů (resorcinol) i anorganickými látkami (sloučeniny rtuti a jodu).

Léčba povrchových mykóz je zvládnuta antimykotiky různé struktury. Jedná se o skupinu antibiotik (griseofulvin, polyeny), azolových derivátů (imidazoly, triazoly), allylaminů, thiokarbamátů a sloučenin typu fluorpyrimidinů, *N*-hydroxypyridonů, fenypropylmorfolinů. Jednotlivá léčiva je potřeba obměňovat, protože se po určité době stávají neúčinnými. Aplikují se ve formě tinktur, na hlubší projevy ve formě mastí.

Hyperkeratonické nebo hluboké formy se léčí mastmi po koupeli v horkém hypermanganu. Masti se aplikují v tzv. náplasti (mast natřená na gázu v tenké vrstvě způsobuje zapaření ložiska).

Při postižení vousů a vlasů se terapie též urychlí koupeli v horkém hypermanganu a manuální epilací volných vlasů pinzetou.

Při postižení nehtů byla chirurgická ablace nahrazena nekrvavou onycholýzou, kde se aplikují masti obsahující 20-40% ury, která postupně rozruší nehet a usnadní působení antimykotika. Existují i léčiva, která prostupují skrz nehet do nehtové ploténky (amorolfín, naftifin, ciclopirox)¹³.

V terapii systémových mykóz je účinný pouze omezený počet látek, především ze skupiny polyenů, azolů, fluorpyrimidinů, thiokarbamátů, allylaminů. Ve většině případů jsou aplikovány pouze 3 látky: amfotericin B, flukonazol a itrakonazol. Nevýhodné vlastnosti (toxicita, vznik rezistence, nežádoucí účinky) se částečně podařilo eliminovat zavedením kombinované terapie. Tento přístup přináší rychlejší terapeutický efekt, fungicidní aktivitu a širší antifugální spektrum¹⁴.

Celkově působící antimykotika se také používají k léčbě povrchových mykóz, které neodpovídají na lokální terapii¹⁵.

Systémová léčba je indikována u závažných nebo recidivujících infekcí kůže nebo u vaginálních infekcí. Používá se v kombinaci s lokální terapií k léčbě onychomykózy. Výběr antimykotika se řídí etiologickým agens, lokalizací a závažností infekce.

Vývoj antimykotik

Až do 40. let minulého století nebyla k dispozici žádná antimykotika k léčbě systémových mykóz. Teprve v 50. letech přibyla antimykotika vhodná pro klinické použití.

Pro počátky chemoterapie dermatomykóz bylo charakteristické používat preparáty, které zabíjejí původce a způsobují olupování svrchní části pokožky. Používaly se preparáty s převážně dezinfekčním účinkem či účinkem antiseptickým (peroxid vodíku, manganistan draselný, lihový roztok jodu), na lokální mykózy se do dnes používají nescificky působící antimykotika, tj. látky ze skupiny fenolů, organických kyselin, kvarterních amoniových solí, trifenylmethanových barviv. Způsobují také odlupování vrchní části pokožky, proto nepůsobí u hloubkových mykóz, infekcí vlasů a nehtů, navíc dráždí, jsou toxická a zapáchají.

Od 30. let dvacátého století se hledaly účinnější látky, získávaly se izolací z přírodních zdrojů (antibiotika) nebo modifikací dezinfekčních látek.

V 50. letech byla objevena polyenová antibiotika (nystatin, natamycin, amfotericin B). Syntetická antimykotika typu azolů se objevila v 60. letech (klotrimazol, mikonazol).

70. léta byla významná rozdělením azolů na triazoly (terapie systémových mykóz) a imidazoly(terapie topická).

Mechanismus účinku antimykotik

Antimykotika specificky interferují s cílovými strukturami houbové buňky (působí fungistaticky či fungicidně). Fungicidní jsou pouze polyenová antibiotika. Podle mechanismu účinku rozlišujeme:

- a) inhibitory syntézy buněčné stěny – kaspofugin,
- b) inhibitory syntézy ergosterolu - polyeny, morfoliny,
- c) inhibitory jádra - flucytosin, griseofulvin
- d) a ostatní.

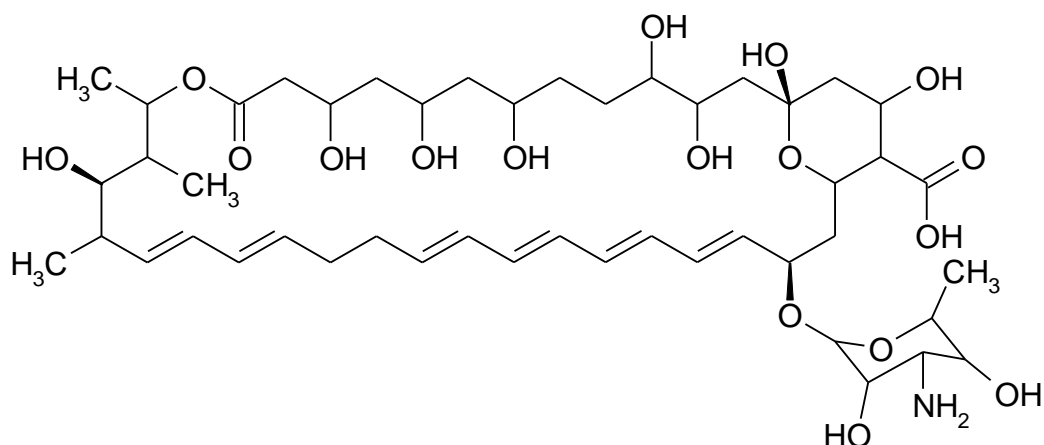
V praxi se využívají látky působící na ergosterol, který je součástí plazmalemy, která prostřednictvím fluidity ovlivňuje funkčnost. Dvě skupiny látek působí na ergosterol:

- Polyeny se váží na ergosterol z vnějšku, vytvářejí póry, kterými unikají elektrolyty.
- Allylaminy a morfoliny interferují uvnitř s enzymy ergosterolové dráhy, ergosterol je nahrazen jiným steroidem¹⁶.

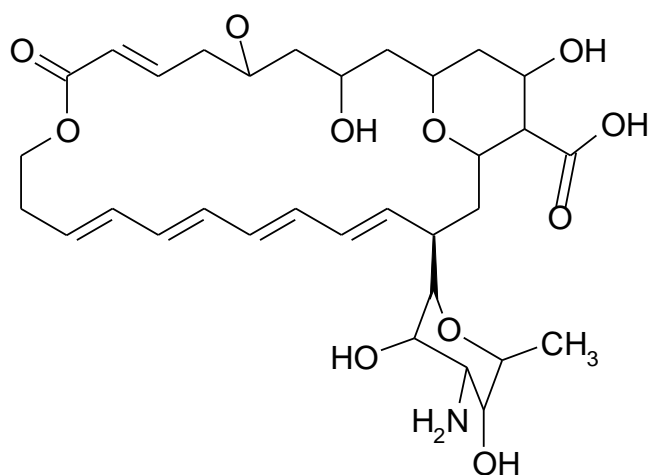
3.1 Polyenová antibiotika

Chemicky to jsou látky s 26-40členným laktonovým cyklem (makrolidy), polyhydroxylovým hydrofilním řetězcem a uhlíkovým lipofilním fragmentem.

Nystatin a natamycin jsou kvůli toxicitě vyhrazeny pouze pro lokální použití. Nystatin se používá také v liposomální lékové formě (NYOTRAN).



Nystatin



Natamycin

Griseofulvin

Mechanismus účinku spočívá v inhibici biosyntézy chitinu a inhibici syntézy RNA a bílkovin. Působí na dermatofyty, akumuluje se v keratinizované tkáni. Je těžko rozpustný ve vodě, proto se p.o. připravuje v mikronizované formě. V současnosti se v ČR nepoužívá.

3.2 Azoly

Podle centrálního heterocyklu: rozlišujeme imidazoly (atom dusíku v poloze 3) a triazoly (atom dusíku v poloze 4). Atom dusíku se váže na železo (součást enzymu). Dobrý průnik do membrány umožňuje substituce chlorem nebo fluorem, heteroaromatickým zbytkem.

Imidazoly působí na dermatofyty a kvasinky, působí fungistaticky, inhibují syntézu ergosterolu ve fázi demethylace, která je způsobena vazbou atomu dusíku v poloze 3 na atom železa hemu zmíněných enzymů. Nedochází k jejich metabolizaci, proto se v organismu vyskytují ve vysoké koncentraci, málo pronikají do nervové soustavy.

Specifický mechanismus účinku spočívá v blokaci syntézy ergosterolu prostřednictvím inhibice enzymu 14- α -demethylázy závislé na cytochromu P-450, který katalyzuje konverzi lanosterolu na ergosterol.¹⁷ Enzym je lokalizován v endoplazmatickém retikulu hub. Nevýhodou je vznik rezistence - houba může začít produkovat větší množství blokováného enzymu.

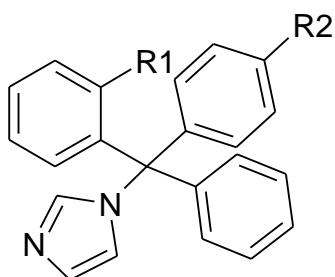
Dále blokují endogenní buněčné respirace, ovlivňují membránovou chitinesterázu a toxicky interagují s membránovými fosfolipidy.

Ketokonazol (NIZORAL tbl. sus. por. crm.)

Fungicidně působí na dermatofyty, kandidy, eumycety, fykomycety, dimorfní houby¹⁸. Nevýhodou je blokace cytochromu P-450. Byl vyvinut jako první orální antimykotikum.

Mikonazol (DAKTARIN inj. Zrušena registrace)

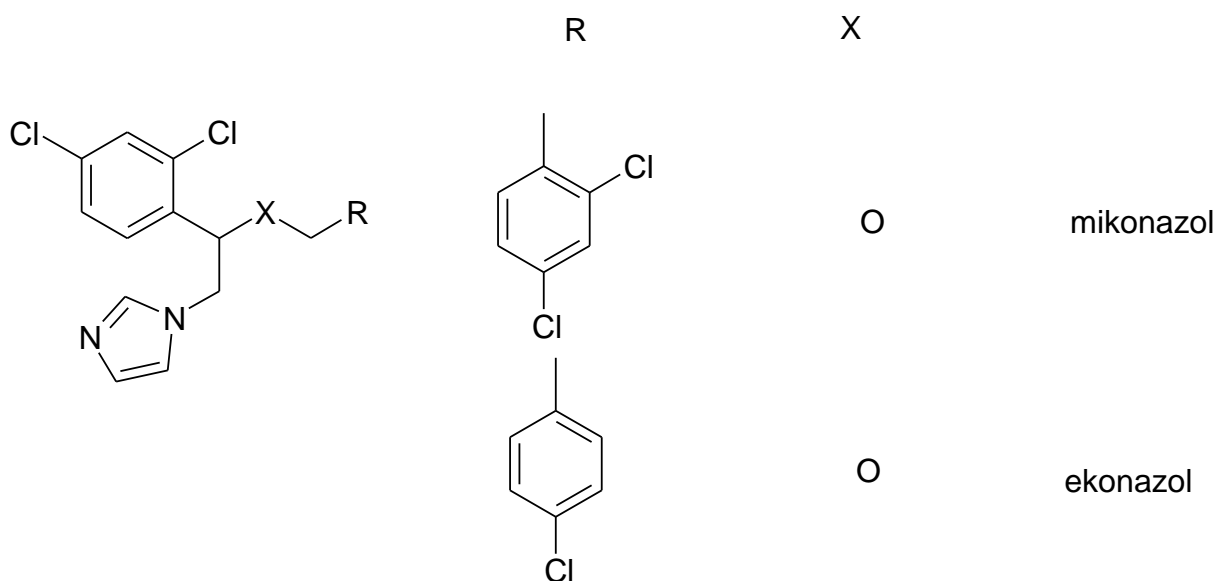
Trifenylmethanový derivát, lze v injekční formě použít na léčbu systémových infekcí. Lze ho podávat jak lokálně, tak systémově při léčbě celkových mykóz (nutné parenterální podání)¹⁹.



R1	R2	
Cl	H	klotrimazol
F	F	flutrimazol

Další deriváty

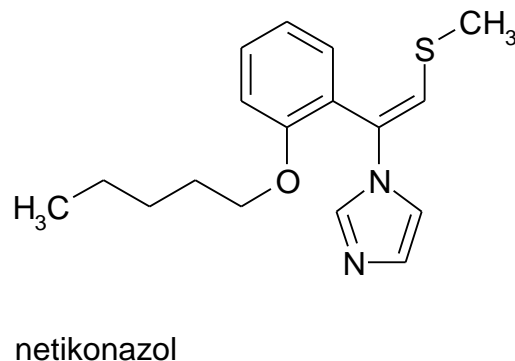
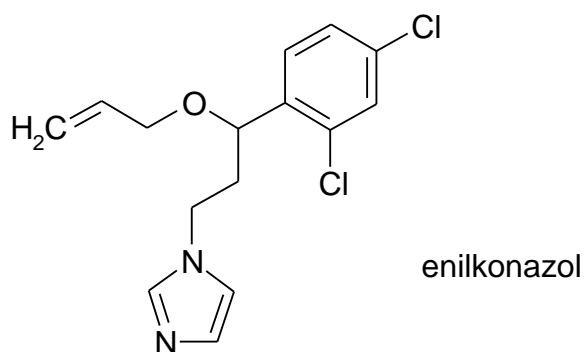
Ekonazol (PEVARYL crm. past. spr. lot.), isokonazol (TRAVOGEN crm.), tiokonazol, sulkonazol, fentikonazol, sertakonazol, bifonazol, oxikonazol, omokonazol, butokonazol, erbekonazol, krokonazol, netikonazol, lanokonazol,



enilkonazol (IMAVEOL, sol. ad usum veterinarium)

klotrimazol (CANESTEN, crm. liq. AKNECOLOR, CANDIBENE crm. spr.)

flutrimazol



Skupina *triazolů* vznikla v 80. letech výměnou imidazolového kruhu za triazolový. Jsou nejdůležitější skupinou používanou k léčbě systémových mykóz. Podávají se perorálně i parenterálně. Dosahují vysokých koncentrací v tkáních (i v CNS), proto se používají k léčbě systémových mykóz. Proti imidazolům mají širší spektrum účinku. Používají se při kryptokokózách, systémových kandidózách, kryptokokových meningitidách, k prevenci a léčbě systémových mykóz u imunodeficientních pacientů^{15,18}.

Flukonazol (DIFLUCAN cps. plv. sus. inf.)

Nízká lipofilita, ale vysoká penetrace do CNS. Brání tvorbě výběžků vláknitých hub, čímž omezuje jejich schopnost adheze na povrchy membrán, endotel cév a umělé povrchy, je vhodný k použití u dětí s nízkou porodní váhou¹⁸.

Itrakonazol (SPORANOX cps. sol. por.)

Chirální látka, která se používá se ve formě racemátu, lze podávat perorálně. Působí fungistaticky až fungicidně, ve srovnání s ostatními antimykotiky je širokospektrý. Používá se k léčbě kryptokokóz, systémových kandidóz, aspergilóz, dermatomykóz, onychomykóz a endemických mykóz.¹⁸

Triazolové deriváty zaznamenaly značný úspěch v léčbě systémových infekcí. Hodně látek se ještě nachází v preklinickém či klinickém zkoušení. Novinkou je vorikonazol odvozený od flukonazolu, působí na rod *Aspergillus spp.* A je lékem první volby léčby aspergilóz. Ravukonazol – odvozený od klotrimazolu.

Společným rysem této skupiny je přítomnost jednoho či dvou triazolových kruhů. Sloučeniny obsahují v molekule fluor, oproti imidazolům, které jsou chlorované. Látky jsou chirální a používají se ve formě čistých enantiomerů.

3.3 Allylaminy

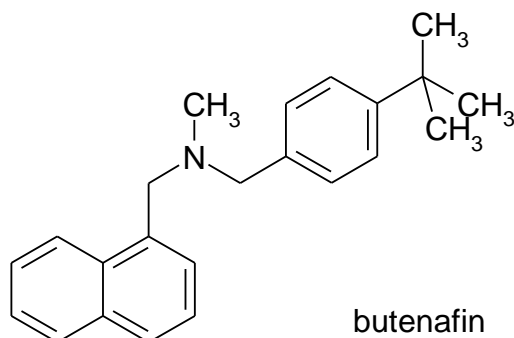
Jsou to syntetické látky získané v 70. letech.

Naftifin (EXODERIL)

Je účinný na dermatofyty.

Terbinafin (LAMISIL tbl. crm.)

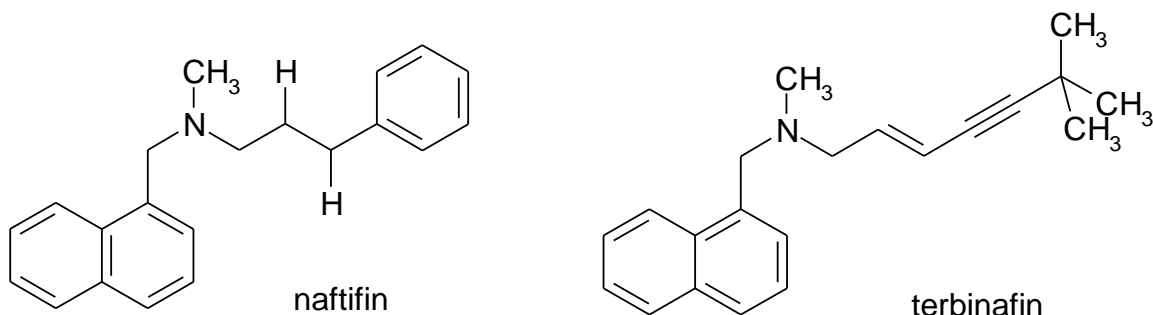
Systémově působící, farmakokinetické vlastnosti limitují použití pouze na infekce kůže a nehtů, ačkoliv má látka *in vitro* široké spektrum účinku. Inhibuje syntézu ergosterolu blokací skvalenepoxidázy.



butenafin

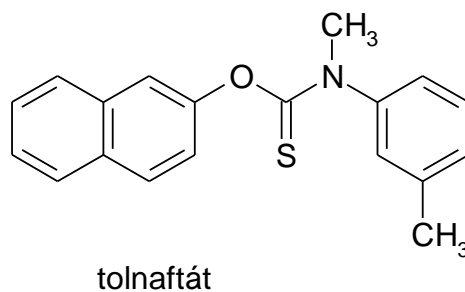
Butenafin

Topické antimykotikum (tinea pedis), strukturou a účinkem je příbuzné s alkylaminy, proto tato skupina ztrácí svoje opodstatnění, protože společným rysem pro tyto látky je (naftylmethyl)aminové uspořádání.

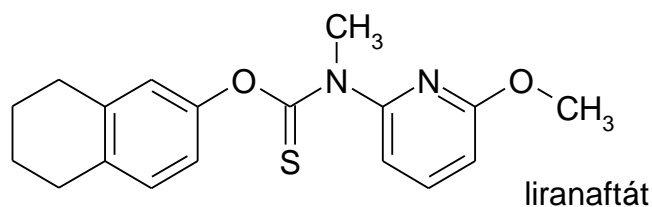


3.4 Thiokarbamáty

Tyto látky inhibují skvalenepoxidázu a tím blokují syntézu sterolů v houbové buňce. Tolnaftát byl indikován na mykózy nehtů vlasů, vousů, dnes se v ČR nepoužívá. Látky se používají lokálně.



Dalšími zástupci jsou tolciklát a liranaftát.



3.5 Ostatní antimykotika

Flucytosin (ANCOTIL Roche inj. tbl.)

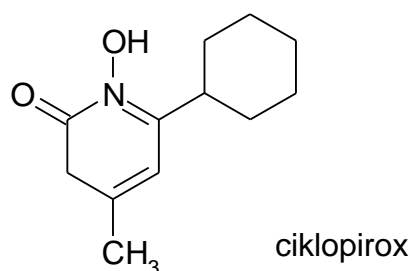
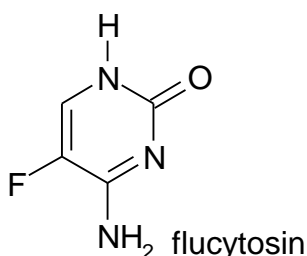
5-Fluorcytosin je pyrimidinový derivát s fungistatickým účinkem. Inhibuje citlivé kmeny *Aspergillus*, *Candida*, *Cladosporium*, *Cryptococcus*.

Používá se perorálně a parenterálně.

Mechanismu účinku spočívá v antimetabolitovém působení, tzn. že do mRNA a tRNA je vestavěn falešný stavební kámen (flucytosin se deaminuje na fluoruracyl, který je toxický), látka je však úzkospektrá a vzniká na ni rezistence, proto se kombinuje s amfotericinem B, který rozšiřuje spektrum účinku²⁰.

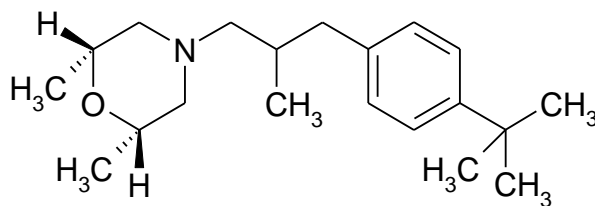
Ciklopirox (BATRAFEN crm. lot. lac.)

Širokospektré antimykotikum, proniká dobře do hlubších vrstev kůže a nehtů, ale neovlivňuje biosyntézu sterolů. Mění permeabilitu membrány, a tím narušuje transport bílkovin do nitra buňky.



Amorolfin (LOCERYL crm. lac.)

Derivát fenypropylmorfolinu, inhibuje syntézu sterolů u hub. Snižuje se obsah ergosterolu současně s akumulací monoplanárních sterolů. Působí na kvasinky, dermatofyty, dimorfní houby, ve formě laku se používá na onychomykózy.



amorolfin

3.6 Echinokandiny

Chemicky jde o lipopeptidy o velké molekulové hmotnosti kolem 1 200 kD se zcela odlišným mechanismem účinku od ostatních skupin antimykotik, cestou biotransformace mimo enzymatický systém cytochromu P-450, což jednak umožňuje jejich použití v

kombinaci prakticky se všemi ostatnímu antimykotiky a jednak s tím souvisí i minimum lékových interakcí.

LÉK	VÝROBCE	SOUČASNÝ STAV REGISTRACE VE SVĚTĚ
caspofugin	MDS	Registrován (i v ČR)
micalofugin	Fujisawa	Registrován
anidulafungin	Vicuron	Klinické studie fáze III
HMR 3270	Indevus	Studie fáze I
cilofungin	Lilly	Přerušeny výzkum

Mechanismus účinku

Cílovou strukturou antimykotického zásahu je enzymatický komplex β -1,3-D-glukan syntetáza nezbytný pro tvorbu buněčné stěny. Fungální stěna (na rozdíl od buněčné membrány) se skládá z polysacharidů β -(1,3)-D-glukanu, β -(1,4)-D-glukanu a β -(1,6)-D-glukanu, dále z chitinu, mannanu (kandidy) nebo galaktomannanu (aspergily), z α -glukanů a dalších glykoproteinů. Buněčná stěna je svým složením zcela odlišná od savčích buněk, proto je vhodným místem selektivního antifungálního zásahu. Echinokandiny zabrání specifickou a nekompetitivní inhibicí β -1,3-D-glukan syntetázy polymeraci glukanu, hlavní složky buněčné stěny většiny patogenních hub²¹⁻²³.

SPEKTRUM ANTIFUNGÁLNÍ ÚČINNOSTI ECHINOKANDINŮ			
Vysoce účinné	Velmi účinné	Nejistě účinné	neúčinné
<i>Candida albicans</i>	<i>Candida parapsylosis</i>	<i>Coccidioides immitis</i>	<i>Zygomycetes</i>
<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Blastomyces dermatitidis</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
<i>Candida tropicalis</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Scedosporium spp.</i>	<i>Fusarium spp.</i>
<i>Candida crusei</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Paecilomyces varlotii</i>	<i>Trichosporon spp</i>
<i>Candida kefyr</i>	<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Histoplasma capsulatum</i>	
	<i>Candida lusitanae</i>		
Pozn. Jsou pozorovány individuální rozdíly v citlivosti jednotlivých izolátů téhož species, mohou být i významné rozdíly mezi jednotlivými echinokandiny.			

Spektrum účinku

Echinokandiny mají široké spektrum účinku (viz. výše), mezi něž patří kandidy včetně rezistentních na triazoly, aspergily, cystická forma *Pneumocystis jiroveci* (dříve *P. carinii*)²⁴, nejsou však účinné proti *Cryptococcus neoformans*^{21,23,25}.

Caspofungin a micafungin vykazují u *Candida albicans* po jednohodinové expozici *in vitro* významně delší (5–6 hodin) postantifungální efekt (PAFE - doba nutná k reparaci poškozené buněčné stěny po expozici antimykotiku) ve srovnání s triazolou (0,5 hod). V případě *Aspergillus fumigatus* vykazoval dlouhý PAFE (7–8 hodin) pouze amphotericin B, zatímco triazolou a echinokandiny jen velmi krátký (0,5 hodiny)²⁶.

Farmakokinetika echinokandinů

Rozdíly mezi jednotlivými a velká molekulová hmotnost echinokandinů, je důvodem velmi nízké perorální resorpce (caspofungin 0,2 %), proto jsou podávány pouze v nitrožilní formě.²² Farmakokinetika je lineární s biologickým poločasem 8–13 hodin, což umožňuje dávkování jednou denně.

ZÁKLADNÍ FARMAKOKINETICKÉ PARAMETRY ECHINOKANDINŮ			
Parametr	caspofungin	micafungin	anidulafungin
c _{max} při dávce 70-75 mg/den (µg/ml)	12,1 (11,1-13,2)	10,9 (SD 1,5)	3,44 (iniciální dávka je 150 mg)
AUC ₀₋₂₄ (ustálený stav)(µg/hod/ml)	100,5 (87,9-114,8)	111,3 (SD 14,1)	44,4
T _½ (hod.)	10,6 (SD 1,1)	11-17	18,1
Clearance (ml/min)	10- 12,5	10,5	12,5- 19,2
Distribuční objem (l/kg)	NA	0,26	0,57
T _{½β} při jaterním poškození (hod.)	NA (prodloužený)	14,4 (SD 0,8)	34-42
T _½ při poškození ledvin (hod.)	NA	14,2 (SD 1,5)	33-42
Vazba na plazmatické bílkoviny (%)	96	99,8	84
Koncentrace v moči (%)	1,4	0,7	<0,1
Koncentrace v likvoru (%)	? – velmi nízká	? – velmi nízká	<0,1
c _{max} : maximální plazmatická koncentrace, AUC ₀₋₂₄ :plocha pod křivkou plazmatické koncentrace během 24 hodin, T _{½β} : biologický poločas v plazmě T _½ , % plazmatické koncentrace, NA- údaje nejsou známy			

Zástupci

Kaspofungin- (CANDIDAS inf. plv. sol.)

Micafungin

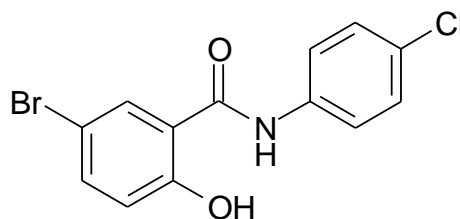
Anidulafungin

Papulakandiny a pneumokandiny:

Deriváty mastných kyselin a cyklických hexapeptidů (pneumokankandiny), nebo estery mastných kyselin s β -(1,4)-galaktosylglukosou. Působí na kandidózy, aspergilózy a rhinocerebrální mukomykózy.^{19,27,28}

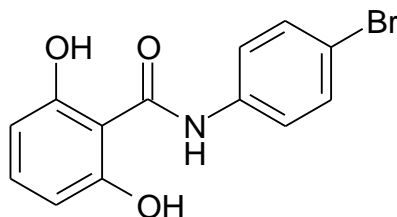
3.7 Antimykotické vlastnosti 3-fenyl-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dionů

K tradičním látkám s desinfekčními účinky patří fenoly. Zavedením dalších skupin se jejich aktivita a toxicita modifikuje. Z takto odvozených látek se významným antimykotickým účinkem vyznačují anilidy salicylových kyselin, zejména halogenovaných. Jako antimykotikum se používal u nás přípravek Salifungin Spofa, 2% roztok, který obsahoval 4-chloranilid kyseliny 5-bromsalicylové.¹⁶



5-brom-4'-chlorsalicylanilid

Látky tohoto typu mají i účinky anthelmintické, za všechny jmenujme např. niklosamid a resorantel²⁹, který je zajímavý tím, že obsahuje dvě fenolické skupiny, mimo jedné v poloze 2 ještě v poloze 6.

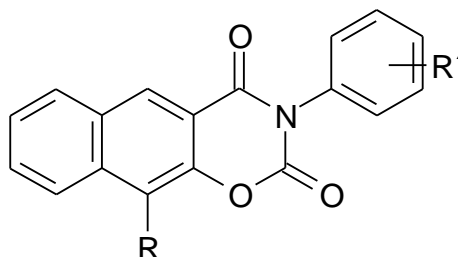


resorantel – anthelmintikum

V souvislosti s vývojem nových anthelmintik (účinných proti tasemnicím) byly patentovány 3-(subst.fenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-diony, halogenované (chlorované a bromované) v „acylové“ části molekuly, s významnou aktivitou vůči dermatofytu *Epidermophyton* (vedle dalších účinků).³⁰ Jako fungicidy účinné proti původci významné

houbové choroby rýže *Magnaporthe grisea* (*Pyricularia oryzae*) byly patentovány 5-hydroxyderiváty připravené cyklizací z 2,6-dihydroxybenzanilidů.³¹

Jistou fungicidní aktivitu vykazovaly i cyklické analogy 3-hydroxy-2-naftoylanilidů (R = H, Br), které byly původně syntetizované jako anthelmintika působící proti tasemnici *Hymenolepsis nana*.³²



Dílčí výsledky antimykotického testování 3-(subst.fenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dionů a 6-brom-3-(subst.fenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-diony byly uveřejněny v práci.³³ Později byla shromážděna další data pro deriváty s halogenem (F, Cl, Br), nitroskupinou, methylem a methoxyskupinou v poloze 6. Látky však vykazovaly aktivitu pouze vůči dermatofytům *Trichophyton mentagrophytes* a *Microsporum gypseum* a např. vůči kvasince *Candida albicans* byly neúčinné. Vztahy mezi chemickou strukturou a antimykotickou aktivitou byly analyzovány Freeovou-Wilsonovou metodou.³⁴ Analogickou citlivost obou dermatofytů a *C. albicans* vůči 6-chlor-3-(subst.fenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dionům popsali také vietnamští autoři³⁵, inspirovaní pracemi prof. Waissera o antituberkuloticích. Ačkoli série jejich látek nebyla rozsáhlá, ani jeden z obou dermatofytů nebyl citlivý na látky, které nesly substituent (chlor) v poloze 3' na fenylu. *T. mentagrophytes* se ukázal být citlivým species také vůči 3-(4-alkylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dionům.³⁶

O fungicidní aktivitě 3-(subst.fenyl)-2-thioxo-2H-3,4-dihydro-1,3-benzoxazin-4-onů halogenovaných v poloze 6 jsem našla zmínku pouze v již citované práci.³² Zřejmě dosud nebyla publikována žádná práce, která by se zabývala antimykotickou aktivitou 3-(subst.fenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dithionů. U obou skupin, mono- i dithionovaných analogů, však byla hodnocena antiproliferativní aktivita.³⁷

3. CÍL PRÁCE

Diplomová práce je příspěvkem k výzkumu strukturních analogů salicylanilidů jako látek s antimykotickou a antimykobakteriální aktivitou.

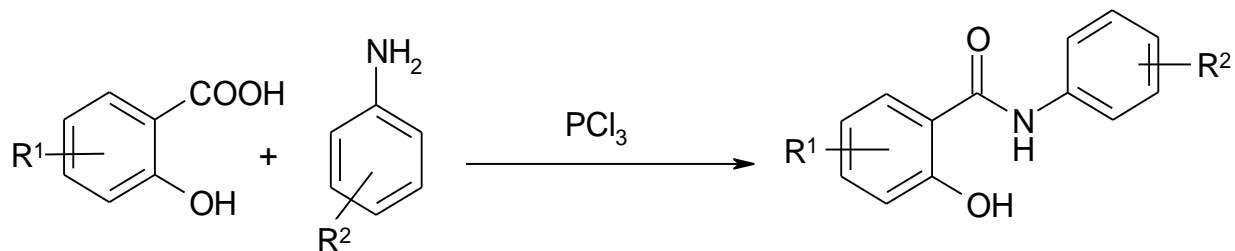
Konkrétním cílem práce bylo:

1. připravit výchozí 2,6-dihydroxybenzanilidy, tj. nesubstituovaný a v poloze 4' substituované methylem, chlorem a methoxyskupinou,
2. připravit odpovídající 3-fenyl-5-hydroxy-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-diony reakcí s methyl-chlorformiátem,
3. provést jejich thionaci a optimalizovat podmínky pro izolaci odpovídajících monosírných a disírných analogů,
4. připravené série látek předat k testování antimykotické a antimykobakteriální aktivity *in vitro* a případně vyhodnotit závislost biologických účinků na chemické struktuře.

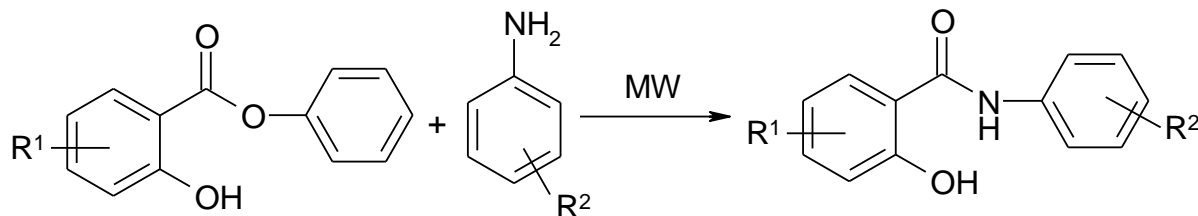
4. METODICKÁ ČÁST

4.1 Syntéza salicylanilidů

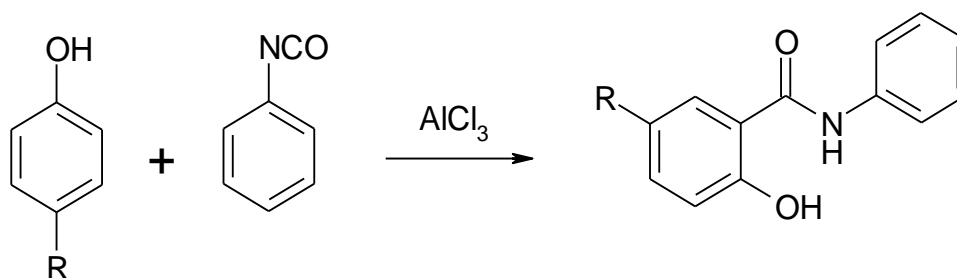
Přípravu salicylanilidů lze provést z příslušné kyseliny salicylové a anilinu. Reakce probíhá za přítomnosti chloridu fosforitého a jako rozpouštědla lze použít toluen, xylén, chlorbenzen, nebo pyridin.³⁸⁻⁴²



V posledních letech se objevuje snaha provádět chemické reakce v mikrovlnném reaktoru. Příkladem z oblasti syntézy salicylanilidů je práce skupiny autorů ze Slovenska, při níž byla použita „solvent-free“ metoda.⁴³

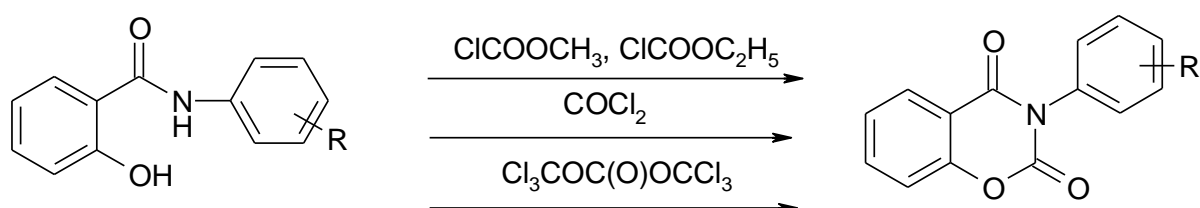


Jinou možností přípravy salicylanilidů je *ortho*-aminokarbonylace fenolů fenyloisokyanátem na principu Friedelovy-Craftsovy reakce.⁴⁴ Tato metoda není obecná, neboť derivát salicylanilidu vzniká pouze reakcí *para*-substituovaných fenolů, jinak vzniká směs izomerů.

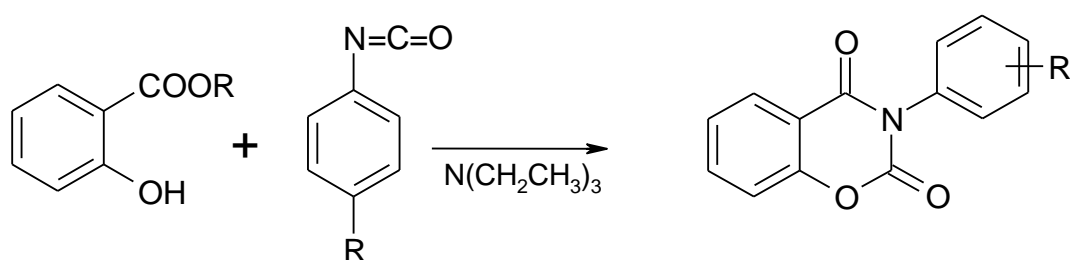


4.2. Syntéza derivátů 3-fenyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionů

Výchozími látkami při přípravě 3-fenyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionů mohou být salicylanilidy. Reakce je prováděna v prostředí pyridinu, toluenu nebo tetrahydrofuranu. Jako cyklizační činidlo lze použít methyl- nebo ethyl-chlorformiát, fosgen, trifosgen. V reakční směsi je nutná přítomnost pomocné báze (pyridin, triethylamin), která váže uvolňující se chlorovodík.^{45,46}



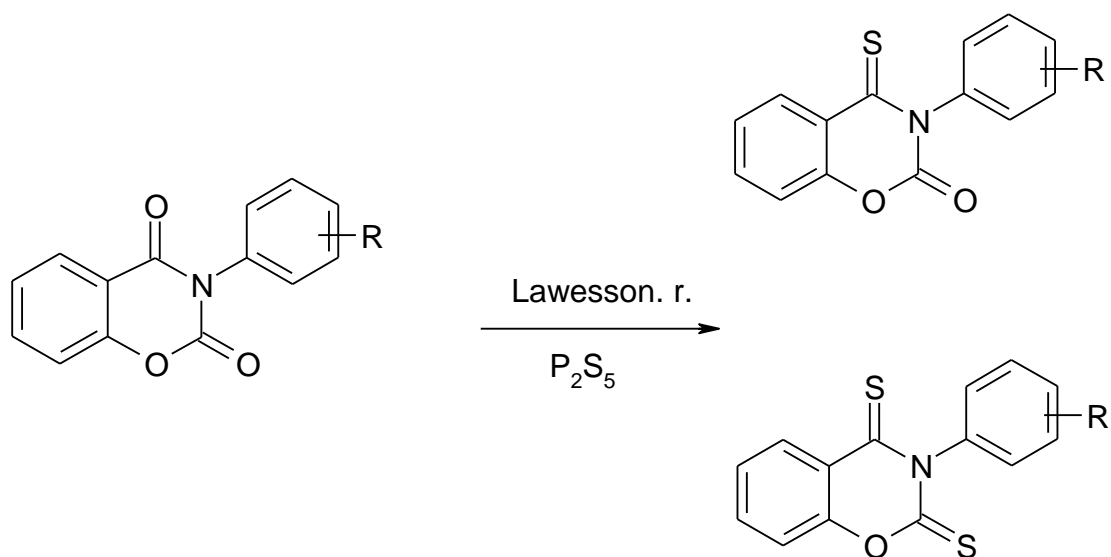
Dalším možným postupem při přípravě 3-fenyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionů je reakce methyl- nebo ethylesteru kyseliny salicylové s fenylisokyanátem. Reakce probíhá v prostředí triethylaminu⁴⁷.



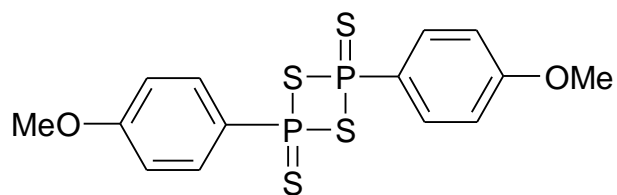
4.3. Syntéza derivátů 3-fenyl-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazin-2(3*H*)-onů a 3-fenyl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithionů

Záměna karbonylové skupiny za thiokarbonylovou je možná pomocí sulfidu fosforečného^{48,49}. Reakci lze provést za varu v rozpouštědle (toluen, benzen, pyridin)⁴⁵ nebo tavením, přičemž tavením lze výrazně zkrátit reakční čas. Při této reakci vzniká směs

monosirných a disirných produktů. Ke stejnému účelu lze též použít Lawessonovo reagens.^{50,51}



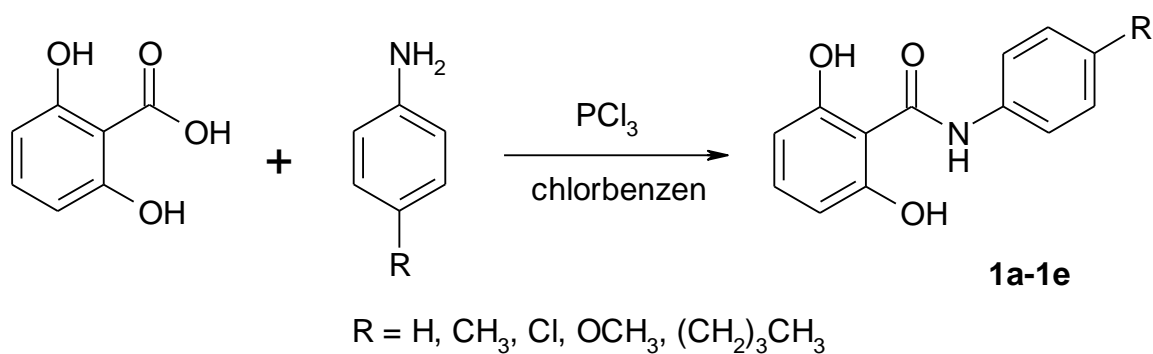
Lawessonovo činidlo:



5. Experimentální část

5.1 Syntéza *N*-fenyl-2,6-dihydroxybenzamidů

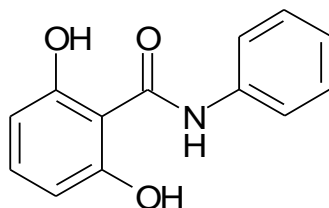
Schéma reakce:



Obecný postup:

Do 250ml destilační baňky byly předloženy 4 g (0,026 mol) 2,6-dihydroxybenzoové kyseliny, 0,039 mol příslušného substituovaného anilinu a 120 ml chlorbenzenu jako rozpouštědla. Po přidání 1,5 ml PCl_3 byla směs ihned vložena do mikrovlnného reaktoru. Reakce byla prováděna po dobu 20 minut při výkonu reaktoru 600 W. Po odpaření chlorbenzenu za sníženého tlaku byla směs čištěna sloupcovou chromatografií na silikagelu, jako mobilní fáze byla použita směs aceton - hexan 1:5. Po rekrystalizaci ze směsi ethanol - voda byly látky (**1a-1e**) sušeny v exsikátoru a charakterizovány teplotou tání, NMR a IČ spektry a elementární analýzou.

5.1.1 *N*-fenyl-2,6-dihydroxybenzamid (**1a**)



Sumární vzorec: $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{NO}_3$

Molekulová hmotnost: 229,24 g/mol

Produkt: bílá krystalická látka

Teoretický výtěžek: 5.95 g

Praktický výtěžek: 4.3 g (72 %)

Teplota tání: 195-197 °C. (**Literatura**^{52,53} 196 °C; 196-197 °C.)

¹H NMR (300 MHz, DMSO): δ = 6.41 (d, 2 H, J = 8.4 Hz, H -3, H -5), 7.10-7.15 (m, 1 H, H -4'), 7.19 (t, 1 H, J = 8.4 Hz, H -4), 7.32-7.38 (m, 2 H, H -3', H -5'), 7.61-7.65 (m, 2 H, H -2', H -6'), 10.73 (bs, 1 H, NH), 12.24 (bs, 2 H, OH).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO): δ = 104.3, 107.6, 121.2, 124.7, 129.2, 133.8, 137, 159.8, 168.3.

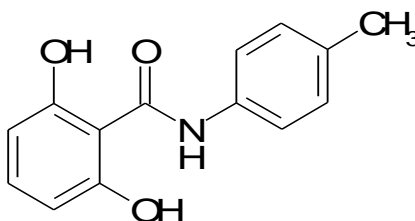
IR: $\nu(C=O)$ = 1654 cm^{-1}

Elementární analýza:

Vypočteno: 68.11% C; 4.84% H; 6.11% N.

Nalezeno: 68.22% C; 4.96% H; 6.16% N.

5.1.2 2,6-dihydroxy-*N*-(4-methylfenyl)benzamid (1b)



Sumární vzorec: C₁₄H₁₃NO₃

Molekulová hmotnost: 243,26 g/mol

Produkt: bílá krystalická látka

Teoretický výtěžek: 6,32 g

Praktický výtěžek: 4,8 g (76 %)

Teplota tání: 201-203 °C. (**Literatura**⁵³ 198-199 °C.)

¹H NMR (300 MHz, DMSO): δ = 2.28 (s, 3 H, CH_3), 6.43 (d, 2 H, J = 8.4 Hz, H -3, H -5), 7.16-7.22 (m, 3 H, H -4, H -3', H -5'), 7.50-7.56 (m, 2 H, H -2', H -6'), 10.69 (bs, 1 H, NH), 12.34 (bs, 2 H, OH).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO): $\delta = 20.7, 104.1, 107.6, 121.2, 129.5, 133.8, 133.9, 135.1, 159.9, 168.3.$

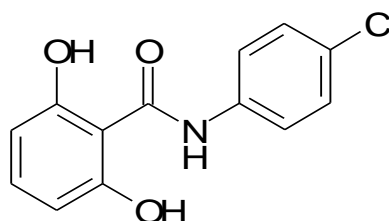
IR: $\nu(\text{C}=\text{O}) = 1651 \text{ cm}^{-1}$

Elementární analýza:

Vypočteno: 69.12 % C; 5.39 % H; 5.76 % N.

Nalezeno: 68.88 % C; 5.51 % H; 5.81 % N.

5.1.3 *N*-(4-chlorfenyl)-2,6-dihydroxybenzamid (1c)



Sumární vzorec: $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{ClNO}_3$

Molekulová hmotnost: 263,68 g/mol

Produkt: bílá krystalická látka

Teoretický výtěžek: 6,85 g

Praktický výtěžek: 4,3 g (63 %)

Teplota tání: 225-228 °C. (Literatura⁵⁴ 224 °C.)

^1H NMR (300 MHz, DMSO): $\delta = 6.42$ (d, 2 H, $J = 8.1$ Hz, $H-3, H-5$), 7.19 (t, 1 H, $J = 8.1$ Hz, $H-4$), $7.39-7.45$ (m, 2 H, $H-3', H-5'$), $7.66-7.72$ (m, 2 H, $H-2', H-6'$), 10.74 (bs, 1 H, NH), 11.97 (bs, 2 H, OH).

^{13}C NMR (75 MHz, DMSO): $\delta = 105.1, 107.5, 122.6, 128.2, 129.0, 133.7, 136.8, 159.5, 168.1.$

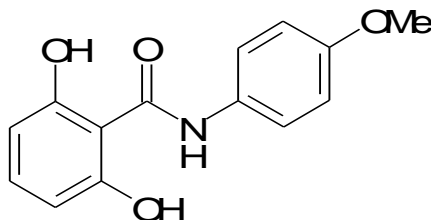
IR: $\nu(\text{C}=\text{O}) = 1648 \text{ cm}^{-1}$

Elementární analýza:

Vypočteno: 69.12 % C; 5.39 % H; 5.76 % N.

Nalezeno: 68.90 % C; 5.29 % H; 5.49 % N.

5.1.4 2,6-dihydroxy-*N*-(4-methoxyfenyl)benzamid (1d)



Sumární vzorec: C₁₄H₁₃NO₄

Molekulová hmotnost: 259,26 g/mol

Produkt: bílá krystalická látka

Teoretický výtěžek: 6,74 g

Praktický výtěžek: 3,7 g (55%)

Teplota tání: 213-215 °C. (**Literatura**²⁹ 213-214 °C.)

¹H NMR (300 MHz, DMSO): δ = 3.75 (s, 3 H, OCH₃), 6.42 (d, 2 H, *J* = 8.1 Hz, *H*-3, *H*-5), 6.90-6.97 (m, 2 H, *H*-3', *H*-5'), 7.20 (t, 1 H, *J* = 8.1 Hz, *H*-4), 7.52-7.58 (m, 2 H, *H*-2', *H*-6'), 10.63 (bs, 1 H, NH), 12.40 (bs, 2 H, OH).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO): δ = 55.4, 103.8, 107.6, 114.2, 122.9, 130.5, 133.8, 156.4, 160.0, 168.1.

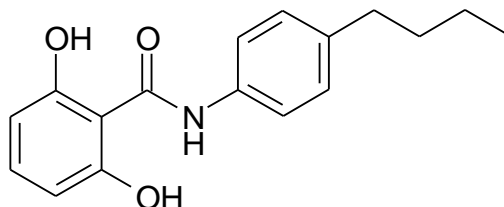
IR: ν(C=O) = 1689 cm⁻¹

Elementární analýza:

Vypočteno: 64.86 % C, 5.05 % H, 5.40 % N.

Nalezeno: 64.96 % C; 5.26 % H; 5.50 % N.

5.1.5 *N*-(4-butylfenyl)-2,6-dihydroxybenzamid (1e)



Sumární vzorec: C₁₇H₁₉NO₃

Molekulová hmotnost: 285,35 g/mol

Produkt: bílá krystalická látka

Teoretický výtěžek: 7,4 g

Praktický výtěžek: 5,3 g (72 %)

Teplota tání: 157 - 158.5 °C.

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 0.89 (t, 3 H, *J* = 7.5 Hz, CH₃), 1.30 (sext, 2 H, *J* = 7.5 Hz, CH₂CH₂CH₂CH₃), 1.54 (pent, 2 H, *J* = 7.5 Hz, CH₂CH₂CH₂CH₃), 2.55 (t, 2 H, *J* = 7.5 Hz, CH₂CH₂CH₂CH₃), 6.44 (d, 2 H, *J* = 8.1 Hz, *H*-3, *H*-5), 7.17-7.24 (m, 3 H, *H*-4, *H*-3', *H*-5'), 7.53-57 (m, 2 H, *H*-2', *H*-6'), 10.72 (bs, 1 H, *NH*), 12.40 (bs, 2 H, *OH*).

¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 14.0, 21.9, 33.4, 34.5, 104.0, 107.6, 121.2, 128.9, 133.8, 135.3, 138.8, 160.0, 168.3.

IR(KBr): ν(C=O) = 1647 cm⁻¹

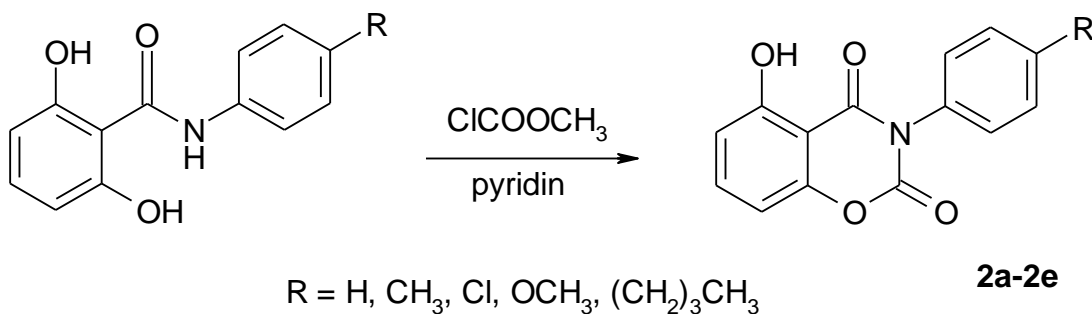
Elementární analýza:

Vypočteno: 71.56 % C; 6.71 % H; 4.91 % N.

Nalezeno: 71.68 % C; 6.89 % H; 4.92 % N.

5.2 Syntéza 3-fenyl-5-hydroxy-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionů

Schéma reakce:

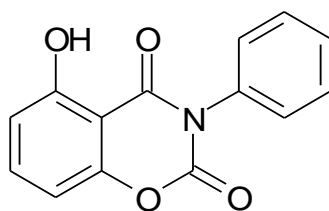


Obecný postup:

Do 250ml destilační baňky byla předložena 0,01 mol výchozího anilidu (**1a-1e**) a 50 ml pyridinu a roztok byl ochlazen ve směsi voda-led-NaCl na -5 - 0 °C. Poté bylo přikapáno 0,95 ml (0,012 mol) methyl-chlorformiátu tak, aby teplota směsi nepřekročila +5 °C. Reakční směs se ještě 10 minut míchala při laboratorní teplotě. Pak byla zahřívána pod zpětným chladičem na olejové lázni po dobu 2 hodin a potom míchána 12 hodin za

laboratorní teploty. Směs byla převedena do kádinky a okyselena přidáním 5% HCl do vzniku bílého zákalu (pH = 6). Krystaly, které se vytvořily po ochlazení v lednici, byly odfiltrovány na Büchnerově nálevce a několikrát promyty vodou. Produkt byl čištěn rekrytalizací z ethanolu. Látky (**2a-2e**) byly sušeny v exsikátoru a charakterizovány teplotou tání, NMR a IČ spektry a elementární analýzou.

5.2.1 3-fenyl-5-hydroxy-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dion (**2a**)



Sumární vzorec: C₁₄H₉NO₄

Molekulová hmotnost: 255,23 g/mol

Produkt: bílá krystalická látka

Navážka: 3,5 g (0,015 mol)

Teoretický výtěžek: 3,89 g

Praktický výtěžek: 3,4g (87 %)

Teplota tání: 172 -173 °C. (**Literatura**³¹ 169-170 °C.)

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 6.88 (d, 1 H, *J* = 8.3 Hz, *H*-6), 6.92 (d, 1 H, *J* = 8.3 Hz, *H*-8), 7.44-7.57 (m, 5 H, *H*-2', *H*-3', *H*-4', *H*-5', *H*-6'), 7.69 (t, 1 H, *J* = 8.3 Hz, *H*-7), 10.78 (bs, 1 H, *OH*).

¹³C-NMR (63 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 100.9, 105.9, 112.0, 128.2, 128.7, 128.8, 133.9, 136.9, 146.7, 152.3, 159.1, 164.3.

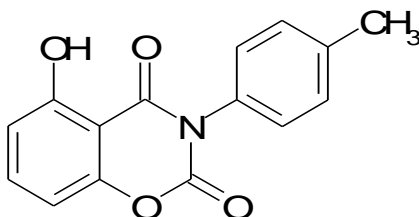
IR: ν(C=O) = 1761, 1662 cm⁻¹

Elementární analýza:

Vypočteno: 65.88 % C, 3.55 % H, 5.49 % N.

Nalezeno: 65.95 % C, 3.76 % H, 5.63 % N.

5.2.2 5-hydroxy-3-(4-methylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (2b)



Sumární vzorec: C₁₅H₁₁NO₄

Molekulová hmotnost: 269,26 g/mol

Produkt: bílá krystalická látka

Navážka: 4,0 g (0,016 mol)

Teoretický výtěžek: 4,43 g

Praktický výtěžek: 3,9 g (89 %)

Teplota tání: 179 -181 °C. (Literatura³⁹ 177-177,5 °C.)

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.38 (s, 3 H, CH₃), 6.88 (dd, 1 H, *J* = 0.9 Hz, *J* = 8.4 Hz, *H*-6), 6.93 (dd, 1 H, *J* = 0.9 Hz, *J* = 8.1 Hz, *H*-8), 7.29-7.35 (m, 4 H, *H*-2', *H*-3', *H*-5', *H*-6'), 7.69 (t, 1 H, *J* = 8.4 Hz, *H*-7), 10.79 (bs, 1 H, OH).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 21.0, 101.5, 106.4, 112.5, 128.5, 129.8, 131.8, 137.4, 138.7, 147.3, 152.8, 159.7, 165.0.

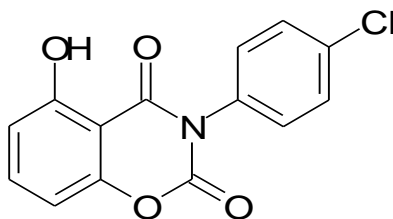
IR: ν(C=O) = 1752, 1667 cm⁻¹

Elementární analýza:

Vypočteno: 66.91 % C, 4.12 % H, 5.20 % N.

Nalezeno: 66.38 % C, 4.29 % H, 5.26 % N.

5.2.3 3-(4-chlorfenyl)-5-hydroxy-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (2c)



Sumární vzorec: C₁₄H₈ClNO₄

Molekulová hmotnost: 289,68 g/mol

Produkt: bílá krystalická látka

Navážka: 3,3 g (0,013 mol)

Teoretický výtěžek: 3,63 g

Praktický výtěžek: 3,4 g (93 %)

Teplota tání: 232-234 °C. (Literatura³⁹ 226 °C.)

¹H-NMR (250 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 6.84-6.95 (m, 2 H, *H*-6, *H*-8), 7.44-7.52 (m, 2 H, *H*-3', *H*-5'), 7.54-7.62 (m, 2 H, *H*-2', *H*-6'), 7.68 (t, 1 H, *J* = 8.3 Hz, *H*-7), 10.68 (bs, 1 H, *OH*).

¹³C-NMR (63 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 101.7, 106.7, 112.9, 129.6, 131.0, 133.5, 134.2, 137.7, 147.3, 153.0, 159.9, 164.9.

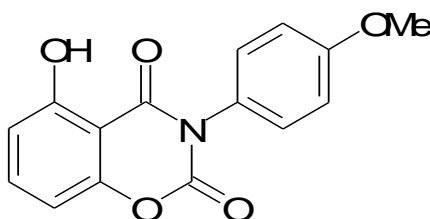
IR: $\nu(\text{C=O})$ = 1757, 1666 cm⁻¹

Elementární analýza:

Vypočteno: 58.05 % C, 2.78 % H, 4.84 % N.

Nalezeno: 57.89 % C, 3.09 % H, 4.86 % N.

5.2.4 5-hydroxy-3-(4-methoxyfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dion (2d)



Sumární vzorec: C₁₅H₁₁NO₅

Molekulová hmotnost: 285,26 g/mol

Produkt: bílá krystalická látka

Navážka: 3,0 g (0,012 mol)

Teoretický výtěžek: 3,30 g

Praktický výtěžek: 2,8 g (85 %)

Teplota tání: 212-214 °C

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 3.81 (s, 3 H, OCH₃), 6.87 (dd, 1 H, *J* = 0.9 Hz, *J* = 8.4 Hz, *H*-6), 6.92 (dd, 1 H, *J* = 0.9 Hz, *J* = 8.1 Hz, *H*-8), 7.02-7.08 (m, 2 H, *H*-3', *H*-5'), 7.33-7.39 (m, 2 H, *H*-2', *H*-6'), 7.69 (t, 1 H, *J* = 8.4 Hz, *H*-7), 10.81 (bs, 1 H, *OH*).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 55.6, 101.5, 106.4, 112.4, 114.5, 126.8, 129.8, 137.4, 147.4, 152.8, 159.6, 159.7, 165.2$.

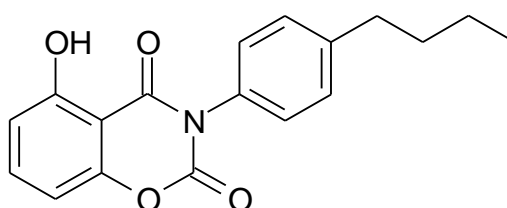
IR: $\nu(\text{C=O}) = 1765, 1679 \text{ cm}^{-1}$

Elementární analýza:

Vypočteno: 63.16 % C; 3.89 % H; 4.91 % N.

Nalezeno: 63.20 % C; 4.04 % H; 5.07 % N.

5.2.5 3-(4-butylyfenyl)-5-hydroxy-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dion (2e)



Sumární vzorec: $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{NO}_4$

Molekulová hmotnost: 311,34 g/mol

Produkt: bílá krystalická látka

Navážka: 2,0 g

Teoretický výtěžek: 2,18 g

Praktický výtěžek: 2,0 g (93 %)

Teplota tání: 158 – 159 °C.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 0.92$ (t, 3 H, $J = 7.2$ Hz, CH_3), 1.34 (sext, 2 H, $J = 7.5$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.60 (pent, 2 H, $J = 7.5$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2.64 (t, 2 H, $J = 7.5$ Hz, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 6.87 (d, 1 H, $J = 8.1$ Hz, $H-6$), 6.92 (d, 1 H, $J = 8.1$ Hz, $H-8$), 7.27-7.39 (m, 4 H, $H-2'$, $H-3$, $H-5'$, $H-6'$), 7.68 (t, 1 H, $J = 8.1$ Hz, $H-7$) 10.78 (bs, 1 H, OH).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 14.0, 22.0, 33.2, 34.7, 101.5, 106.4, 112.4, 128.5, 129.1, 132.0, 137.4, 143.4, 147.3, 152.8, 159.6, 165.0$.

IR(KBr): $\nu(\text{C=O}) = 1771, 1668 \text{ cm}^{-1}$

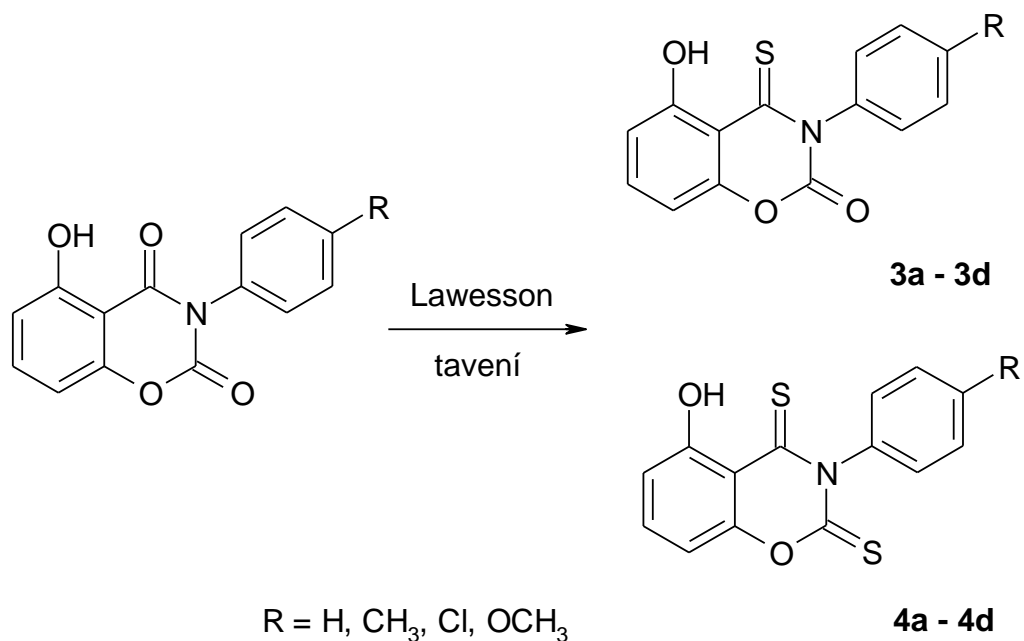
Elementární analýza:

Vypočteno: 69.44 % C; 5.50 % H; 4.50 % N.

Nalezeno: 69.29 % C; 5.64 % H; 4.53 % N.

5.3 Syntéza sirných analogů 3-fenyl-5-hydroxy-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionů

Schéma reakce:



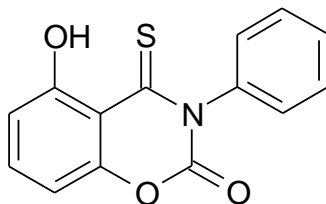
Obecný postup:

Do 10ml baňky bylo předloženo 0,05 mol výchozího 3-fenyl-5-hydroxy-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionu (**2a-2d**) a ekvimolární množství Lawessonova činidla. Baňka byla profouknuta argonem a uzavřena. Směs byla tavena 4 minuty na kovové lázni při teplotě 190-200 °C. Tavenina byla rozpuštěna v 150 ml chloroformu. Chloroformová fáze byla odpařena a surová směs byla čištěna sloupcovou chromatografií na silikagelu, jako mobilní fáze byla použita směs hexan a toluen (1:1). Byly izolovány 2 produkty, a to monosirný derivát (**3a-d**) s nižší hodnotou R_f a disirný derivát (**4a-b**) s vyšší hodnotou R_f . Látky byly dočištěny rekrystalizací z ethanolu a sušeny v exsikátoru. Získané produkty byly charakterizovány teplotou tání, IČ a NMR spektry a elementární analýzou.

5.3.1 Thionace 3-fenyl-5-hydroxy-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionu

Thionací 3-fenyl-5-hydroxy-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionu (**2a**) byly připraveny:

a) 3-fenyl-5-hydroxy-4-thioxo-3,4-dihydro-2H-1,3-benzoxazin-2-on (3a)



Sumární vzorec: C₁₄H₉NO₃S

Molekulová hmotnost: 271,3 g/mol

Produkt: žlutá krystalická látka

Praktický výtěžek: 0,53 g (42 %)

Teoretický výtěžek: 1,27g

Teplota tání: 178-179 °C

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 6.79 (dd, 1 H, *J* = 8.5 Hz, *J* = 1.0 Hz, *H*-6), 6.95 (dd, 1 H, *J* = 8.5 Hz, *J* = 1.0 Hz, *H*-8), 7.23-7.28 (m, 2 H, *H*-2', *H*-6'), 7.52-7.63 (m, 4 H, *H*-3', *H*-4', *H*-5', *H*-7), 12.86 (bs, 1 H, *OH*).

¹³C-NMR (63 MHz, CDCl₃): δ = 106.1, 107.8, 115.2, 128.1, 129.7, 130.1, 137.0, 137.4, 144.5, 149.6, 161.8, 192.5.

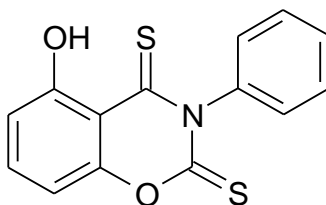
IR: ν(C=O) = 1759 cm⁻¹

Elementární analýza:

Vypočteno: 61.98 % C, 3.34 % H, 5.16 % N, 11.82 % S.

Nalezeno: 62.02 % C, 3.46 % H, 5.09 % N, 12.27 % S.

b) 3-fenyl-5-hydroxy-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dithion (4a)



Sumární vzorec: C₁₄H₉NO₂S₂

Molekulová hmotnost: 287,36 g/mol

Produkt: žlutá krystalická látka

Teoretický výtěžek: 1,35 g

Praktický výtěžek: 0,29 g (32 %)

Teplota tání: 192-193°C

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 6.85 (dd, 1 H, *J* = 1.2 Hz, *J* = 8.4 Hz, *H*-6), 6.94 (dd, 1 H, *J* = 1.2 Hz, *J* = 8.1 Hz, *H*-8), 7.19-7.23 (m, 2 H, *H*-2', *H*-6'), 7.49-7.62 (m, 4 H, *H*-7, *H*-3', *H*-4', *H*-5'), 12.74 (bs, 1 H, *OH*).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 105.7, 109.2, 115.4, 128.1, 129.4, 130.2, 137.5, 141.5, 149.9, 161.6, 177.0, 187.9.

Elementární analýza:

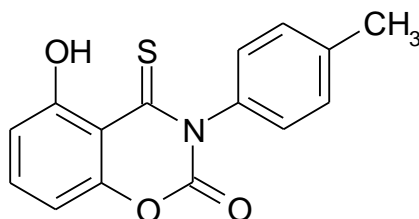
Vypočteno: 58.52 % C, 3.16 % H, 4.87 % N, 22.32 % S.

Nalezeno: 58.66 % C, 3.25 % H, 4.65 % N, 22.46 % S.

5.3.2 Thionace 5-hydroxy-3-(4-methylfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionu

Thionací 5-hydroxy-3-(4-methylfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionu (**2b**) byly připraveny:

a) 5-hydroxy-3-(4-methylfenyl)-4-thioxo-3,4-dihydro-2*H*-1,3-benzoxazin-2-on (**3b**)



Sumární vzorec: C₁₅H₁₁NO₃S

Molekulová hmotnost: 285,32 g/mol

Produkt: žlutá krystalická látka

Teoretický výtěžek: 1.59 g

Praktický výtěžek: 0.59 g (37%)

Teplota tání: 206-209 °C.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 2.46 (s, 3 H, *CH*₃), 6.78 (dd, 1 H, *J* = 8.3 Hz, *J* = 1.0 Hz, *H*-6), 6.94 (dd, 1 H, *J* = 8.5 Hz, *J* = 1.0 Hz, *H*-8), 7.08-7.17 (m, 2 H, *H*-3', *H*-5'), 7.34-7.42 (m, 2 H, *H*-2', *H*-6'), 7.55 (t, 1 H, *J* = 8.5 Hz, *H*-7), 12.89 (bs, 1 H, *OH*).

¹³C-NMR (63 MHz, CDCl₃): δ = 21.4, 106.1, 107.8, 115.2, 127.7, 130.8, 134.8, 136.9, 139.9, 144.5, 149.6, 161.8, 192.6.

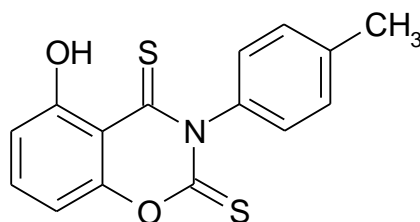
IR: ν(C=O) = 1751 cm⁻¹

Elementární analýza:

Vypočteno: 63.14% C, 3.89% H, 4.91% N, 11.24% S.

Nalezeno: 63.05% C, 4.09% H, 4.65% N, 11.71% S.

b) 5-hydroxy-3-(4-methylfenyl)-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dithion (4b)



Sumární vzorec: C₁₅H₁₁NO₂S₂

Molekulová hmotnost: 301,39 g/mol

Produkt: žlutá krystalická látka

Teoretický výtěžek: 1,68g

Praktický výtěžek: 0,41g (24 %)

Teplota tání: 179-180 °C.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 6.84 (dd, 1 H, J = 8.1 Hz, J = 0.9 Hz, H-8), 6.95 (dd, 1 H, J = 8.1 Hz, J = 0.9 Hz, H-6), 7.06-7.11 (m, 2 H, H-3', H-5'), 7.35-7.40 (m, 2 H, H-2', H-6'), 7.58 (t, 1 H, J = 8.1 Hz, H-7), 12.76 (s, 1 H, OH).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 21.4, 105.7, 109.2, 115.4, 127.7, 130.9, 137.4, 139.0, 139.7, 149.9, 161.6, 177.2, 188.0.

Elementární analýza:

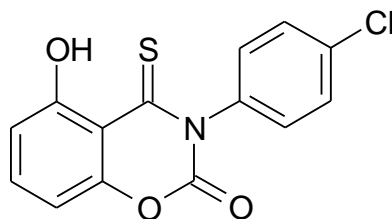
Vypočteno: 59.78 % C, 3.68 % H, 4.65 % N; 21.28 % S.

Nalezeno: 59.81 % C, 3.78 % H, 4.55 % N, 21.24 % S.

5.3.3 Thionace 3-(4-chlorfenyl)-5-hydroxy-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dionu

Thionací 3-(4-chlorfenyl)-5-hydroxy-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dioun (2c) byly připraveny:

a) 3-(4-chlorfenyl)-5-hydroxy-4-thioxo-3,4-dihydro-2H-1,3-benzoxazin-2-on (3c)



Sumární vzorec: C₁₄H₈ClNO₃S

Molekulová hmotnost: 305,74 g/mol

Produkt: žlutá krystalická látka

Teoretický výtěžek: 1,37 g

Praktický výtěžek: 0,54g (39 %)

Teplota tání: 218-220 °C.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 6.79 (dd, 1 H, *J* = 1.2 Hz, *J* = 8.4 Hz, *H*-6), 6.95 (dd, 1 H, *J* = 1.2 Hz, *J* = 8.7 Hz, *H*-8), 7.16-7.21 (m, 2 H, *H*-2', *H*-6'), 7.51-7.60 (m, 3 H, *H*-7, *H*-3', *H*-5'), 12.76 (bs, 1 H, *OH*).

¹³C-NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 106.1, 107.7, 115.3, 129.6, 130.4, 135.7, 135.8, 137.2, 144.3, 149.5, 161.8, 192.2.

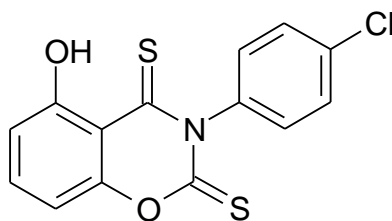
IR: ν(C=O) = 1752 cm⁻¹

Elementární analýza:

Vypočteno: 55.00 % C, 2.64 % H, 4.58% N, 10.49 % S.

Nalezeno: 54.89 %C, 2.74 % H, 4.52% N, 10.68 % S.

b) 3-(4-chlorfenyl)-5-hydroxy-2H-1,3-benzoxazin-2,4(3H)-dithion (4c)



Sumární vzorec: C₁₄H₈ClNO₂S₂

Molekulová hmotnost: 321,81 g/mol

Produkt: žlutá krystalická látka

Teoretický výtěžek: 1,44 g

Praktický výtěžek: 0,39 g (27 %)

Teplota tání: 166-167 °C.

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃): δ = 6.84 (dd, 1 H, *J* = 8.3 Hz, *J* = 1.0 Hz, *H*-8), 6.95 (dd, 1 H, *J* = 8.5 Hz, *J* = 1.0 Hz, *H*-6), 7.11-7.20 (m, 2 H, *H*-2', *H*-6'), 7.48-7.57 (m, 2 H, *H*-3', *H*-5'), 7.59 (t, 1 H, *J* = 8.3 Hz, *H*-7), 16.64 (bs, 1 H, *OH*).

¹³C-NMR (63 MHz, CDCl₃): δ = 105.8, 109.2, 115.6, 129.7, 130.6, 135.5, 137.6, 139.9, 149.9, 161.7, 176.8, 188.8.

Elementární analýza:

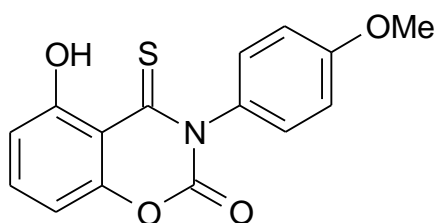
Vypočteno: 52.25 % C, 2,51 % H, 4.35 % N, 19.93 % S.

Nalezeno: 52.16 % C, 2,55 % H, 4.35 % N, 20.51 % S.

5.3.4 Thionace 5-hydroxy-3-(4-methoxyfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionu

Thionací 5-hydroxy-3-(4-methoxyfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithionu (**2d**) byly připraveny:

a) 5-hydroxy-3-(4-methoxyfenyl)-4-thioxo-3,4-dihydro-2*H*-1,3-benzoxazin-2-on (**3d**)



Sumární vzorec: C₁₅H₁₁NO₄S

Molekulová hmotnost: 301,32 g/mol

Produkt: žlutá krystalická látka

Teoretický výtěžek: 1,06 g

Praktický výtěžek: 0,33 g (31 %)

Teplota tání: 185-187°C

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 3.87 (s, 3 H, *OCH*₃), 6.78 (dd, 1 H, *J* = 1.2 Hz, *J* = 8.4 Hz, *H*-6), 6.94 (dd, 1 H, *J* = 1.2 Hz, *J* = 8.7 Hz, *H*-8), 7.02-7.09 (m, 2 H, *H*-3', *H*-5'), 7.12-7.19 (m, 2 H, *H*-2', *H*-6'), 7.55 (t, 1 H, *J* = 8.4 Hz, *H*-7), 12.90 (bs, 1 H, *OH*).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 55.5, 106.0, 107.8, 115.1, 115.3, 129.1, 129.8, 136.9, 144.7, 149.5, 160.2, 161.7, 192.8$.

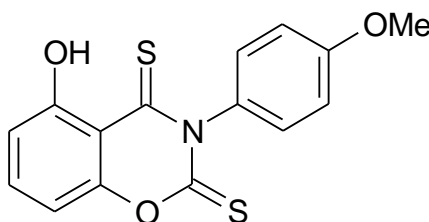
IR: $\nu(\text{C=O}) = 1766 \text{ cm}^{-1}$

Elementární analýza:

Vypočteno: 63.77 % C, 5.02 % H, 4.65 % N, 10.64 % S.

Nalezeno: 63.81 % C, 5.12 % H, 4.53 % N, 10.89 % S.

b) 5-hydroxy-3-(4-methoxyfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithion (4d)



Sumární vzorec: $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{NO}_3\text{S}_2$

Molekulová hmotnost: 317,39 g/mol

Produkt: žlutá krystalická látka

Teoretický výtěžek: 1,10 g

Praktický výtěžek: 0,36 g (33 %)

Teplota tání: 150-152 °C.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 3.88$ (s, 3 H, OCH_3), 6.83 (dd, 1 H, $J = 1.2 \text{ Hz}, J = 8.1 \text{ Hz}, H-6$), 6.94 (dd, 1 H, $J = 1.2 \text{ Hz}, J = 8.4 \text{ Hz}, H-8$), 7.03-7.14 (m, 4 H, $H-2', H-3', H-5', H-6'$), 7.58 (t, 1 H, $J = 8.1 \text{ Hz}, H-7$), 12.78 (bs, 1 H, OH).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 55.4, 105.7, 109.2, 115.3, 115.4, 129.1, 134.2, 137.4, 149.9, 160.0, 161.5, 177.4, 188.2$.

Elementární analýza:

Vypočteno: 56.77 % C, 3.49 % H, 4.41 % N, 20.20 % S.

Nalezeno: 56.88 % C, 3.57 % H, 4.42 % N, 20.51 % S.

5.4 Metody použité v Experimentální části

Průběh reakcí a čistotu produktů jsem sledovala pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC) na Silufolu UV 254/366. Jako mobilní fázi jsem používala toluen, chloroform, ethylacetát nebo směs aceton - hexan v různých poměrech. Produkty jsem čistila sloupcovou chromatografií za použití Silikagelu Merck 60 jako stacionární fáze a směsi aceton - hexan v různých poměrech jako mobilní fáze.

Vzorky k analýze a biologickému hodnocení jsem sušila 8 hodin nad oxidem fosforečným za sníženého tlaku při teplotě 60 °C. Teploty tání jsou stanoveny na automatickém přístroji Büchi Melting Point B-545. Elementární analýza byla provedena na analyzátoru Perkin-Elmer 2400.

Měření $^1\text{H-NMR}$ a $^{13}\text{C-NMR}$ spekter bylo prováděno v deuterovaném dimethylsulfoxidu na přístroji Varian Merkurs-Vx BB 300, pokud není uvedeno jinak. Chemický posun δ je udáván v jednotkách ppm vzhledem k tetramethylsilanu za použití signálu rozpouštědla jako sekundárního standardu (2,49 pro ^1H a 39,7 pro ^{13}C). Infračervená spektra byla měřena v tabletách bromidu draselného na přístroji NICOLET IMPACT 400.

6. VÝSLEDKY A DISKUSE

Tato práce je příspěvkem k výzkumu salicylanilidů a jejich derivátů jako biologicky aktivních látek, který probíhá na Katedře anorganické a organické chemie již řadu let. Jejím tématem je příprava 3-fenyl-5-hydroxy-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionů a jejich sirných analogů.

Jako výchozí látky pro přípravu žádaných produktů jsem zvolila odpovídající 2,6-dihydroxybenzanilidy, které jsem připravila reakcí 2,6-dihydroxybenzoové kyseliny a příslušného anilinu. Jako činidlo vytvářející chlorid kyseliny jsem použila chlorid fosforitý. Reakce byla prováděna v mikrovlnném reaktoru, čímž se zkrátil reakční čas. Oproti klasickému zahřívání, které trvá 2-3 hodiny,⁴⁶ se reakční čas při provedení reakce v mikrovlnném reaktoru zkrátil na 20 minut. Také se osvědčilo použít sloupcovou chromatografii před čištěním produktu krystalizací. Dosažené výtěžky tohoto stupně činily 55 – 72 %. Tímto způsobem bylo připraveno 5 derivátů 2,6-dihydroxybenzanilidu (**1a-1e**). Struktura nově připraveného *N*-(4-butylfenyl)-2,6-dihydroxybenzanilidu (**1e**) byla potvrzena NMR a IČ spektry.

Při syntéze 3-fenyl-5-hydroxy-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionů (**2a-2e**) jsem vycházela z připravených 2,6-dihydroxybenzanilidů. Jako cyklizační činidlo jsem použila methyl-chlorformiát. Trochu obtížná byla zpočátku izolace produktu z bílé heterogenní směsi, která vznikla po okyselení zředěnou kyselinou chlorovodíkovou. Následnou filtrací produktu usnadnilo ochlazení směsi v mrazicím boxu do vyloučení bílé krystalické látky. Tímto způsobem bylo připraveno 5 derivátů 3-fenyl-5-hydroxy-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionu ve výtěžku 85 – 93 %. Struktura nově připraveného 5-hydroxy-3-(4-methoxyfenyl)-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionu (**2d**) a 3-(4-butylfenyl)-5-hydroxy-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionu (**2e**) byla potvrzena NMR a IČ spektry.

K přípravě odpovídajících monosirných a disirných analogů jsem používala Lawessonova thionačního činidla místo sulfidu fosforečného. Reakce byla prováděna tavením směsi na kovové lázni při teplotě mezi 190 – 200 °C. Při použití Lawessonova činidla se při tavení směsi při 160 °C vytvořila homogenní směs, která byla dobře promíchávána, a před vlastním čištěním jsem nemusela používat vytřepávání s uhlíčitanem sodným k odstranění anorganických látek. V případě čištění produktů sloupcovou chromatografií nebyl oproti reakci se sulfidem fosforečným žádný rozdíl. Při použití

Lawessonova činidla jsem dosáhla srovnatelných výtěžků jako se sulfidem fosforečným. Tímto způsobem byly připraveny 4 deriváty 3-fenyl-5-hydroxy-4-thioxo-3,4-dihydro-2*H*-1,3-benzoxazin-2-onu (**3a-3d**) ve výtěžku 31 – 42 % a 4 deriváty 3-fenyl-5-hydroxy-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithionu (**4a-4d**) ve výtěžku 24 – 33 %. Jejich struktura byla rovněž potvrzena NMR a IČ spektry.

Látky byly testovány na antimykotickou a antimykobakteriální aktivitu. Antimykotická aktivita připravených látek byla hodnocena mikrodiluční bujonovou metodou^{34,46} vůči *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *Trichosporon asahii* (dříve označovanému jako *T. beigelii*, např. v ref.⁴⁶), *Trichophyton mentagrophytes*, *Aspergillus fumigatus* a *Absidia corymbifera* za použití ketokonazolu jako standardu. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 2 pro látky **1a-2e** a v Tab. 3 pro látky **3d-4d** v Příloze. Třebaže některé 3-fenyl-5-hydroxy-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-diony byly patentovány³¹ pro své účinky vůči *Magnaporthe grisea* (*Pyricularia oryzae*), původci závažné houbové choroby rýže, při testování *in vitro* vůči výše uvedeným patogenům nebyla u žádné z nich zjištěna vyšší aktivita, než jakou vykazoval použitý standard ketokonazol. Pouze minimální inhibiční koncentrace (MIC) *N*-(4-chlorfenyl)-2,6-dihydroxybenzamidu (**1c**) vůči *T. mentagrophytes* dosáhla stejné hodnoty, jakou měl standard (2 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$). Uzavření kruhu vedlo k poklesu antimykotické aktivity, který byl ještě prohlouben náhradou kyslíku za atom(y) síry. Jen u 3-(4-chlorfenyl)-5-hydroxy-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionu (**2c**) a jeho disírného analogu (**4c**) zůstala zachována mírná aktivita vůči *T. mentagrophytes* (7,8 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, resp. 31,2 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$).

Při hodnocení antimykobakteriální aktivity *in vitro* vůči *Mycobacterium tuberculosis*, *M. avium* a *M. kansasii* (včetně jednoho jeho klinického izolátu) žádná MIC (viz Tab. 4 v Příloze) nedosáhla takové hodnoty, jakou vykazoval isoniazid jako standard (pokud daný kmen není na něj rezistentní). Látkou s nejnižší hodnotou MIC vůči *M. tuberculosis* a *M. avium* byl 3-(4-chlorfenyl)-5-hydroxy-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionu (**2c**) (MIC = 32 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$), MIC odpovídajícího *N*-(4-chlorfenyl)-2,6-dihydroxybenzamidu (**1c**) byla dvojnásobná (65 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$).

7. ZÁVĚR

Působením methyl-chlorformiátu jsem z výchozích *N*-fenyl-2,6-dihydroxybenzamidů připravila jejich cyklické analogy, tj. 3-fenyl-5-hydroxy-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-diony. Jejich thionace Lawessonovým činidlem poskytla odpovídající monosírné a disírné deriváty, 3-fenyl-5-hydroxy-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazin-2-ony a 3-fenyl-5-hydroxy-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithiony. Volbu substituentů v poloze 4 fenylu jsem provedla podle Toplissova operačního schématu, vedle anilinu jsem použila jeho 4-methyl-, 4-chlor- a 4-methoxyderivát. Cyklizací *N*-(4-butylfenyl)-2,6-dihydroxybenzamidů jsem dále připravila 3-(4-butylfenyl)-5-hydroxy-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dion. Celkem jsem připravila 18 látek, z nichž 11 nebylo dosud popsáno.

Látky byly testovány na antimykotickou a antimykobakteriální aktivitu *in vitro*. Žádná z látek nevykazovala vyšší aktivitu než ketokonazol a isoniazid použité jako standardy. Jen aktivita *N*-(4-chlorfenyl)-2,6-dihydroxybenzamidů vůči *Trichophyton mentagrophytes* byla srovnatelná s aktivitou ketokonazolu.

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. BUCHTA V., JÍLEK P., HORÁČEK J., HORÁK V.: Základy mikrobiologie a parazitologie pro farmaceuty. Karolinum, Praha 1998.
2. TOMŠÍKOVÁ A.: Myotická onemocnění u rizikových pacientů. Karolinum, Praha 1998.
3. BÖHME A., KARTHAUS M.: Treatment of systemic fungal infections in patients with hematologic malignancies. *Antibiot. Chemother.* 50, 2000, 79-93.
4. BÖHME A., KARTHAUS M.: Therapie invasiver Organmykosen bei Patienten mit hämatologischen Systemerkrankungen. *Wien. Medizin. Wochenschr.* 151(3,4), 2001, 80-88.
5. GRAYBILL J. R.: Changing strategies for treatment of systemic mycoses. *Brazilian J. Infect. Dis.* 4 (2), 2000, 47-54.
6. HADDAD N. E., POWDERLY W. G.: The changing face of mycoses in patients with HIV/AIDS. *AIDS Read*, 11(7), 2001, 365-368, 375-378.
7. KAUFMANN C. A., HEDDERWICK S. A.: Treatment of systemic fungal infections in older patients. *Drugs Aging* 18 (5), 2001, 313- 323.
8. JUST-NÜBLING G., STILLE W.: Therapie von Systemmykosen bei Abwehrschwäche. *Immun. Infekt.* 19, 1991, 116-120.
9. DEL BRUTTO O. H.: Infecciones micóticas del sistema nervoso central. *Revista Neurol.* 30, 2000, 447-459.
10. HÁBER J., KOLEŠKOVÁ E., STRUB J., KLENER P.: Současný stav léčby oportunní myotické infekce systémovými antimykotiky. *Vnitřní lékařství* 40, 1994, 59- 64.

11. GRAYBILL J. R., TOLLERMAR J., TORRES-RODRÍGUEZ J. M., WALSH T. J., ROILIDES E., FARMAKI E.: Antifungal compounds: controversies, queries and conclusions. *Med. Mycol.* 38 Suppl. I, 2000, 323-333.
12. TOUŽIMSKÁ K.: Standardizace metodiky stanovení antifungální aktivity in vitro pro mikrodiluční a agarovou difuzní metodu. Diplomová práce. Farmaceutická fakulta UK, Hradec Králové 2000.
13. SUCHOPÁR J., BURŠÍK J., ŠÍMEK R.: *Remedia kompendium*. 3. vydání. Panax, Praha 1999, s. 624-625.
14. DOLEŽAL M.: Pokroky ve vývoji antifungálních léčiv. *Česk. Slov. Farm.* 51 (5), 2002, 226-235.
15. MOSSAVI M., BAGHERI B., SCHER R. K.: Systemic antifungal therapy. *Dermatol. Clin.* 19, 2001, 35-52.
16. HARTL J. ET AL.: *Farmaceutická chemie 4*. Karolinum, Praha 2006, s. 35-47.
17. HABER J. ET AL.: *Systémové mykózy a jejich léčba*. Galén, Praha 1995.
18. PLEMPPEL M.: Neue Antimykotika für System-Mykosen. *Z. Hautkr.* 56, 1981, 1109-1125.
19. HABER J.: Současný stav a perspektivy antimykotik se systémovým účinkem. *Čas. Lék. Čes.* 140, 2001, 596-604.
20. OTČENÁŠEK M., KEJDA J.: 5-Fluorcytosin - u nás opomíjené antimykotikum. *Čas. Lek. Čes.* 128, 1989, 1385-1389.
21. ARATHOON E. G.: Clinical efficacy of echinocandin antifungals. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 4, 2001, 685-691.

22. DENNING D. W.: Echinocandin antifungal drugs. *Lancet* 362, 2003, 1142–1151.

23. HOANG A.: Caspofungin acetate. An antifungal Agent. *Amer. J. Health-Syst. Pharm.* 2001, 58, 1206–1214.

24. BARLETT M. S., CURRENT V. L., GOHEEN M. P., ET AL.: Semisynthetic echinocandins affect cell wall disposition of *Pneumocystis carinii* in vitro and in vivo. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1996, 40, 1811–1816.

25. FELDMESSER M., KRESS Y., MEDNICK A., CASADEVALL A.: The effect of echinocandin analogue caspofungin on the cell wall glucan synthesis by *Cryptococcus neoformans*. *J. Inf. Dis.* 2000, 182, 1791–1795.

26. KRAUSE D. S., REINHARDT J, VAZQUEZ J.A., ET AL.: Phase 2, randomized, dose-ranging study evaluating the safety and efficacy of anidulafungin in invasive candidiasis and candidemia. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004, 48, 2021–2024.

27. ONISHI J., MEINZ M., THOMPSON J., CURROTTO J., DREIKORN S., CABELLO A., ROSENBAACH M., DOUGLAS C., ABRUZZO G., FLATTERY A., KONG L., VINCENTE F., PELAEZ F., DIEZ M. T., MARTIN L., BILLS G., GIACOBBE R., DOMBROWSKI A., SCHWARZ R., MORRIS S., HARRIS G., TSIPOURAS A., WILSON K., KURTZ M. B.: Discovery of novel antifungal (1,3)- β -glukan synthase inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 2000, 368-377.

28. JACOBS P., WOOD L., DU TOIT A., ESTERHUIZEN K.: Eradication of invasive mucormycosis - Effectiveness of the Echinocandin FK463. *Hematology* 8, 2003, 113-123.

29. RUSCHIG H., KÖNIG J., DÜVEL D., LOEWE H.: 2,6-Dihydroxybenzoesäurederivate als Anthelminthika. *Arzneim. Forsch.* 23, 1973, 1745-1758.

30. Boehringer Ingelheim G.m.b.H. N-Substituted 2H-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-diones. HASSPACHER K. (inventor). US 3355453, 1967-11-28, 6 s.; *Chem. Abstr.* 69: 19169.

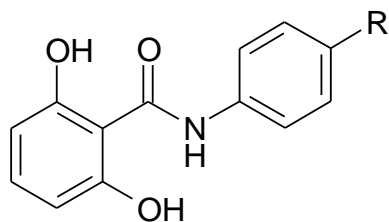
31. Nippon Soda Co (JP). 2,3-Dihydro-4H-1,3-benzoxazines. YASUDA Y., KOSAKA S., MYAZAKI Y., YAKUSHIJI M. (inventors). JP 51004183. 1976-01-14.; Chem. Abstr. 85:21389.
32. BINDRA R., SINGH H. SHARMA S., IYER R. N.: Synthesis and antimicrobial activity of 4-oxo-2,3-dihydro-1,3-benzoxazine- and naphthoxazine-2-thiones and related compounds. *Ind. J. Pharm.* 37, 1975, 133-136
33. WAISSER K., HLADŮVKOVÁ J., KUBICOVÁ L., KLIMEŠOVÁ V., BUCHTA V. ODLEROVÁ Ž.: Differences between the structure and activity of potentially antimycobacterial and antifungal compounds. 3-aryl-2H-1,3-benzoxazine-2,4(3H)diones. Comparison of the Topliss approach with regression analysis. *Sci. Pharm* 64, 1996, 701-707.
34. WAISSER K., KUBICOVÁ L., BUCHTA, V., KUBANOVÁ P., BAJEROVÁ K., JIRÁSKOVÁ L., BEDNAŘÍK O., BUREŠ O., HOLÝ P.: In vitro antifungal activity of 3-phenyl-2H-benzoxazine-2,4(3H)-diones. *Folia Microbiologica (Prague, Czech Republic)* 47, 2002, 488-492.
35. TRUONG, PHUONG; NGUYEN, BAO TRAN; LE, THI THANH THAO. Synthesis and antibacterial activity of some 1,3-benzoxazin-2,4-dione derivatives. *Tap Chi Duoc Hoc* 46(1), 2006, 14-17, 34.
36. WAISSER K., BUCHTA V., VALE-SILVA L. A., MATYK J.: A note on the antifungal activities of halogenated 4'-alkylphenylsalicylanilides and halogenated 3-(4-alkylphenyl)-2H-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-diones. *Folia Pharm. Univ. Carol.* 34, 2006, 17-19.
37. DAHSE H.-M., MÖLLMANN U., WAISSER K., PALÁT K., BUREŠ O., HOLÝ P.: Antiproliferative and cytotoxic activities of derivatives of 3-aryl-2H-1,3-benzoxazine-2,4(3H)-dione. *Folia Pharm. Univ. Carol.* 27-28, 2003, 29-33.
38. WANSTRAT R.: *Chem. Ber.* 6, 1873, 336; citováno podle Beilstein CrossFire, Beilsteins Informationssysteme GmbH, Frankfurt, Germany.

39. GRIMMEL H. W., GUENTHER A., MORGAN J. F.: Phosphazo compounds and their use in preparing amides. *J. Amer. Chem. Soc.* 68(4), 1946, 539-542.
40. LEMAIRE H., SCHRAMM C. H., CAHN A.: Synthesis and germicidal activity of halogenated salicylanilides and related compounds. *J. Pharm. Sci.* 50, 1961, 831-837.
41. AGRAWAL V. K., SHARMA S.: Salicylanilides in the treatment of helminth diseases. *Pharmazie* 39, 1984, 373-378.
42. KÓTAI A., SZÓKÁN G.: New salicylamide derivatives. II. Synthesis of the substituted hydrazides and further derivatives of 4-dimethylaminosalicylic acid. *Acta Pharm. Hung.* 40, 1970, 108-115.
43. VEVERKOVÁ E., MEČIAROVÁ M., TOMA Š., BALKO J.: Synthesis of substituted salicylanilides under microwave irradiation. *Monatsh. Chem.* 134(9), 2003, 1215-19.
44. DESAI R. D.: Some new observations on the Friedel-Crafts reaction. *J. Indian Chem. Soc.* 45(3), 1968, 193-199.
45. WAGNER D., SINGER D., WEUFFEN W.: Untersuchungen über 2-hydroxythiobenzamide und 2-hydroxythiobenzanilide. *Pharmazie* 21, 1966, 161-166.
46. BUREŠ O.: Vztahy mezi strukturou a antimykobakteriální aktivitou v poloze 4 substituovaných salicylanilidů a jim odpovídající 3-aryl-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*) dionů a jejich sirných derivátů. *Disertační Práce, Farmaceutická fakulta UK*, 2002.
47. BUTT A., KHAN A. M., PERVEEN R., KEMAL R.: Synthesis of heterobicyclic compounds. III. Formation of 2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-dione. *Pakistan J. Sci. Ind. Res.* 14(3), 1972, 192-193.; *Chem. Abstr.* 76: 46151.
48. WISLICENUS J.: *Z. Chem.* 9, 1869, 324.

49. KLINGSBERG E., PAPA D.: Thionation with phosphorus pentasulfide in pyridine solution. *J. Am. Chem. Soc.* 73, 1951, 4988-4989.
50. SCHEIBYE S., PEDERSEN B. S., LAWESSON S. O.: Studies on organophosphorous compounds, XXI. The dimer of *p*-methoxyfenylthiophosphine sulfide as thionation agent - new route to thiocarboxamides. *Bull. Soc. Chim. Belg.* 87(3), 1978, 229-238.
51. TURAN O., ERDAL E., OLCAY M.: Use of Lawesson's reagent in organic syntheses. *Chem. Rev.* 107, 2007, 5210-5278.
52. Farbwerke Hoechst A.-G. (DE). 2,6-Dihydroxybenzoesaeure-anilide und ihre Verwendung als Pflanzenschutzmittel. RUSCHIG H., KÖNIG J., HAERTEL K. (inventors). DE, Ger. Offen. 1945255 A. 1971-03-18.; *Chem. Abstr.* 74: 141320.
53. DESAI R. D., MARBALLI M. S.: Heterocyclic compounds. XXIV. Coumarins from arylamides of γ -resorcylic acid. *J. Sci. Ind. Res.* 11B, 1952, 292-4.

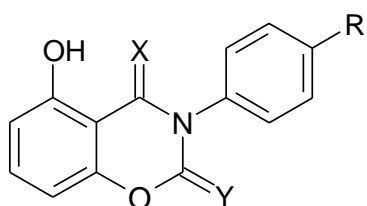
9. PŘÍLOHY

Přehled látek



1a-1e

a	b	c	d	e
H	CH ₃	Cl	OCH ₃	[CH ₂] ₃ CH ₃



2a-2e (X = Y = O)

3a-4d (X = S, Y = O)

4a-4d (X = Y = S)

a	b	c	d	e
H	CH ₃	Cl	OCH ₃	[CH ₂] ₃ CH ₃

Tab. 1.

Charakteristika připravených látek

Látka	Sumární vzorec <i>M_r</i> (g/mol)	Výtěžek (%)	T. t. (Lit.) (°C)	$\nu(\text{C=O})$ (cm ⁻¹)
1a	C ₁₃ H ₁₁ NO ₃ 229,24	72	225-228 (196-197)	1654
1b	C ₁₄ H ₁₃ NO ₃ 243,26	76	201-203 (198-199)	1651
1c	C ₁₃ H ₁₀ ClNO ₃ 263,68	63	195-197 (224)	1648
1d	C ₁₄ H ₁₃ NO ₄ 259,26	55	213-215 (213-214)	1689
1e	C ₁₇ H ₁₉ NO ₃ 285,35	72	157-158,5	1647

Tab. 1 - pokrač.

Charakteristika připravených látek

Látka	Sumární vzorec <i>M_r</i> (g/mol)	Výtěžek (%)	T. t. (Lit.) (°C)	v(C=O) (cm ⁻¹)
2a	C ₁₄ H ₉ NO ₄ 255,23	75	160-161 (169-170)	1761 1662
2b	C ₁₅ H ₁₁ NO ₄ 269,26	89	168-171 (177-177,5)	1752 1667
2c	C ₁₄ H ₈ ClNO ₂ 289,68	93	232-234 (226-228)	1757 1666
2d	C ₁₅ H ₁₁ NO ₅ 285,06	85	221-214 —	1765 1679
2e	C ₁₈ H ₁₇ NO ₄ 311,34	93	158-159	1771 1668
3a	C ₁₃ H ₉ NO ₃ S 271,3	42	178-179 —	1759
3b	C ₁₅ H ₁₁ NO ₃ S 285,32	37	163-165 —	1751
3c	C ₁₄ H ₈ ClNO ₃ S 305,74	39	223-225 —	1752
3d	C ₁₅ H ₁₁ NO ₄ S 267,28	31	185-187 —	1760
4a	C ₁₄ H ₉ NO ₂ S ₂ 287,36	32	192-193 —	—
4b	C ₁₅ H ₁₁ NO ₂ S ₂ 301,39	24	212-214 —	—
4c	C ₁₄ H ₈ ClNO ₂ S ₂ 321,81 g	27	165-167 —	—
4d	C ₁₅ H ₁₁ NO ₃ S ₂ 295,35	33	150-152 —	—

Tab. 2

Antifungální aktivita *N*-fenyl-2,6-dihydroxybenzamidů (**1**) a 3-fenyl-5-hydroxy-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionů (**2**) *in vitro*
 – MIC ($\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$)

Látka	CA		CT		CK		CG		TA		AF		AC		TM	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	72 h	120 h
1a	250	250	250	250	125	250	125	250	62,5	250	62,5	250	125	250	31,25	31,25
1b	15,63	31,25	62,5	62,5	31,25	31,25	62,5	62,5	31,25	62,5	31,25	62,5	62,5	62,5	7,81	15,63
1c	3,91	7,81	15,63	31,25	7,81	7,81	15,63	31,25	7,81	15,63	15,63	31,25	15,63	31,25	1,95	1,95
1d	>125	>125	>250	>500	>125	>250	>250	>250	>125	>250	>250	>250	>125	>125	>125	>125
1e	31,25	62,5	62,5	62,5	31,25	62,5	62,5	62,5	31,25	62,5	62,5	250	15,62	15,62	31,25	31,25
2a	125	250	250	500	250	250	500	500	125	125	125	250	250	250	31,25	31,25
2b	125	125	125	125	125	125	250	250	62,5	125	62,5	125	125	125	31,25	31,25
2c	125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	7,81	15,63	>125	>125	>125	>125	7,81	7,81
2d	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
2e	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
*	0,061	0,122	1,95	3,91	1,95	3,91	0,49	1,95	0,061	0,122	7,81	7,81	15,63	31,25	0,49	1,95

* ketokonazol

CA - *Candida albicans*

CT - *Candida tropicalis*

CK - *Candida krusei*

CG - *Candida glabrata*

TA - *Trichosporon asahii*

AF - *Aspergillus fumigatus*

AC - *Absidia corymbifera*

AF - *Aspergillus fumigatus*

TM - *Trichophyton mentagrophytes*

Tab. 3

Antifungální aktivita 3-fenyl-5-hydroxy-4-thioxo-3,4-dihydro-2*H*-1,3-benzoxazin-2-onů (**3**) a 3-fenyl-5-hydroxy-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithionů (**4**) *in vitro* – MIC ($\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$)

Látka	CA		CT		CK		CG		TA		AF		AC		TM	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	72 h	120 h
3a	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
3b	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	125	>125
3c	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125
3d	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
4a	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
4b	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
4c	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	>125	15,62	31,25
4d	250	250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250
*	0,061	0,122	1,95	3,91	1,95	3,91	0,49	1,95	0,061	0,122	7,81	7,81	15,63	31,25	0,49	1,95

* ketokonazol

Testované kmeny:

CA - *Candida albicans*

CG - *Candida glabrata*

AC - *Absidia corymbifera*

CT - *Candida tropicalis*

TA - *Trichosporon asahii*

AF - *Aspergillus fumigatus*

CK - *Candida krusei*

AF - *Aspergillus fumigatus*

TM - *Trichophyton mentagrophytes*

Tab. 4

Antimykobakteriální aktivita *N*-fenyl-2,6-dihydroxybenzamidů (**1**), 3-fenyl-5-hydroxy-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dionů (**2**), 3-fenyl-5-hydroxy-4-thioxo-3,4-dihydro-2*H*-1,3-benzoxazin-2-onů (**3**) a 3-fenyl-5-hydroxy-2*H*-1,3-benzoxazin-2,4(3*H*)-dithionů (**4**) *in vitro* – MIC ($\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$)

Látka	<i>M. tubercul.</i> My 331/88		<i>M. avium</i> My 330/88		<i>M. kansasii</i> My 235/80			<i>M. kansasii</i> 6509/96		
	14 d	21 d	14 d	21 d	7 d	14 d	21 d	7 d	14 d	21 d
1a	32	62,5	62,5	125	32	62,5	62,5	32	62,5	62,5
1b	32	62,5	32	62,5	32	62,5	62,5	32	62,5	62,5
1c	62,5	62,5	32	62,5	16	32	62,5	16	32	32
2a	32	62,5	32	62,5	32	62,5	125	32	62,5	125
2b	32	62,5	32	62,5	16	32	62,5	16	32	62,5
2c	16	32	16	32	16	32	62,5	16	32	62,5
3a	125	250	125	125	62,5	125	250	62,5	125	250
3b	62,5	125	62,5	125	62,5	125	250	62,5	125	250
3c	62,5	125	62,5	125	32	62,5	250	32	62,5	250
4a	32	62,5	32	62,5	32	62,5	125	32	62,5	125
4b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4c	32	62,5	32	62,5	32	62,5	125	32	62,5	125
INH	0,5	0,5	>250	>250	>250	>250	>250	2	4	4

INH – isoniazid