

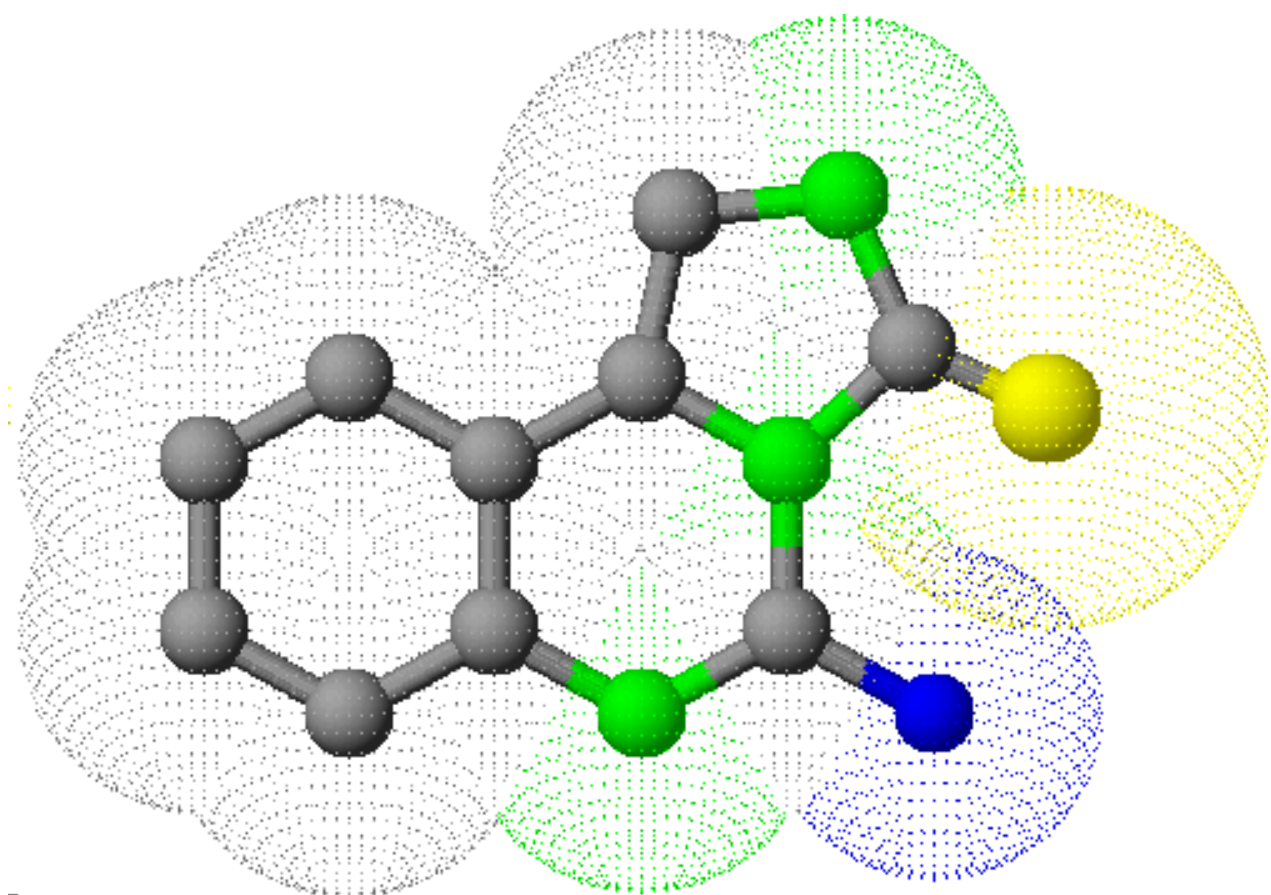
Reakce 3-aminochinolin-2,4-dionů s thiomocovinou a thiokyanatanem draselným

Ondřej Rudolf

Diplomová práce
2009



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav inženýrství ochrany živ. prostředí
akademický rok: 2008/2009

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: Bc. Ondřej RUDOLF
Studijní program: N 2808 Chemie a technologie materiálů
Studijní obor: Inženýrství ochrany životního prostředí

Téma práce: Reakce 3-aminochinolinu-2,4-dionu
s thiomocovinou a thiokyanatanem draselným.
Účinná syntéza
3-thioxo-2,6-dihydroimidazochinazolin-5-onů.

Zásady pro vypracování:

1. Zpracovat literární rešerši.
2. Provést reakce příslušných látek.
3. Vyhodnotit provedené experimenty.

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

1. Dostupná literatura v Univerzitní knihovně UTB a Krajské knihovně Zlín
2. Databáze Web of Science, SciFinder Scholár, CrossFire Beilstein

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Vladimír Mrkvička, Ph.D.
Ústav chemie

Datum zadání diplomové práce:

9. února 2009

Termín odevzdání diplomové práce:

15. května 2009

Ve Zlíně dne 10. února 2009

doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



doc. RNDr. Jan Růžička, Ph.D.
ředitel ústavu

„Ono nejde o to, dostat se tam, musíte se dokázat i vrátit.

Získat něco je k ničemu, když to nedokážete udržet.“

generál Jean B. Kléber

*„Generálský přepych nesmí jít tak daleko, aby byl urážkou
vojákovy bídy. Velitel se nesmí odlišovat od vojáků, musí si
počínat důstojně ne přepychářsky.“*

maršál Louis G. Suchet, vévoda z Albufera

ABSTRAKT

Substituované deriváty 3-aminoderivátů-*1H,3H*-chinolin-2,4-dionů reagují s thiomčovinou nebo thiokyanatanem draselným v kyselině octové a dávají nové odpovídající 3-thioxo-2,6-dihydro-*3H*-imidazo-[1,5c]chinazolin-5-ony.

Klíčová slova: 3-aminochinolin-2,4-diony, 3-thioxoimidazochinazolin-5-ony, thiomčovina, thiokyanatan draselný, mikrobiologická aktivita

ABSTRACT

Substituted 3-amino-*1H,3H*-quinoline-2,4-diones react with thiourea or potassium thiocyanate in acetic acid to give novel corresponding heterocyclic compounds 3-thioxo-2,6-dihydro-*3H*-imidazo[1,5-*c*]quinazolin-5-ones.

Keywords: 3-aminoquinoline-2,4-diones, 3-thioxoimidazoquinazolin-5-ones, thiourea, potassium thiocyanate, microbiology activity

Děkuji vedoucímu diplomové práce Ing. Vladimíru Mrkvičkovi, Ph.D. a konzultantovi prof. Ing. Antonínu Kláskovi, DrSc. za vedení, odborné připomínky a rady věnované mé diplomové práci. Děkuji celé mé nenahraditelné rodině a všem lidem co stáli za mnou. Velké dík též patří paní laborantce Haně Geržové za praktické rady nevyčísitelné ceny a osazenstvu laboratoře 102 na FT.

Prohlašuji, že jsem na bakalářské/diplomové práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků, je-li to uvedeno na základě licenční smlouvy, budu uveden jako spoluautor.

Ve Zlíně

.....

Podpis diplomanta

OBSAH

ÚVOD.....	9
I TEORETICKÁ ČÁST	10
1 BIOLOGICKY AKTIVNÍ CHINOLINY	11
1.1 CHINOLINY JAKO FARMAKA.....	14
1.1.1 Chinoliny a malárie	15
1.1.2 Chinoliny a onemocnění způsobující nemoci centrální nervové soustavy...	17
1.1.3 Chinoliny a tubkulóza	18
2 THIOKYANATAN DRASELNÝ A THIOKYANATANY	20
2.1 PŘÍPRAVA KYSELINY THIOKYANOVODÍKOVÉ A JEJICH DERIVÁTŮ.....	22
2.2 THIOKYANATANY A PŘÍPRAVA LÉČIV	24
2.3 ACYLISOTHIOKYANÁTY	24
3 THIOMOČOVINA	26
3.1 THIOMOČOVINA A PŘÍPRAVA LÉČIV	29
3.2 THIOMOČOVINA A PRŮMYSLOVÉ POUŽITÍ	30
II PRAKTICKÁ ČÁST	34
4 STANOVENÍ CÍLŮ DIPLOMOVÉ PRÁCE	35
5 VÝSLEDKY DIPL. PRÁCE S UVEDENÍM NOVÝCH POZNATKŮ.....	36
5.1 PREPARATIVNÍ CHEMICKÁ ČÁST	36
5.2 MIKROBIOLOGICKÉ TESTOVÁNÍ	42
5.2.1 Mikrobiologické testování na mikrotitračních destičkách	42
5.2.2 Testování enzymatické inhibice	45
6 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	46
6.1 PŘÍPRAVA 3-AMINO-3-ALKYL(ARYL)CHINOLIN-2,4-DIONŮ.....	46
6.2 PŘÍPRAVA 3-THIOXO-2,6-DIHYDRO-3 <i>H</i> -IMIDAZO[1,5 <i>C</i>] CHINAZOLIN-5-ONŮ	47
6.2.1 Metoda A.....	47
6.2.2 Metoda B	47
6.3 MIKROBIOLOGICKÉ TESTOVÁNÍ	51
6.3.1 Testování na mikrotitrační destičce.....	51
6.3.2 Testování enzymatické inhibice	53
ZÁVĚR	54
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	55
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	59
SEZNAM OBRÁZKŮ	60
SEZNAM TABULEK.....	61

ÚVOD

Chinoliny představují velkou skupinu zajímavých heterocyklických látek. Jsou zajímavé nejen čistě po chemické, ale také po mikrobiologické a farmaceutické stránce. Na Ústavu chemie Fakulty technologické a jeho předešlých ústavech, jsou deriváty chinolinů intenzivně studovány již od poloviny 90. let 20. století. I má bakalářská práce se zabývala reakcemi chinolinů a proto jsem svoji diplomovou práci zaměřil opět do této oblasti.

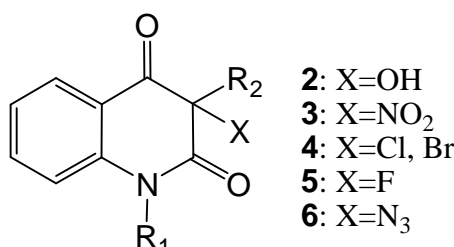
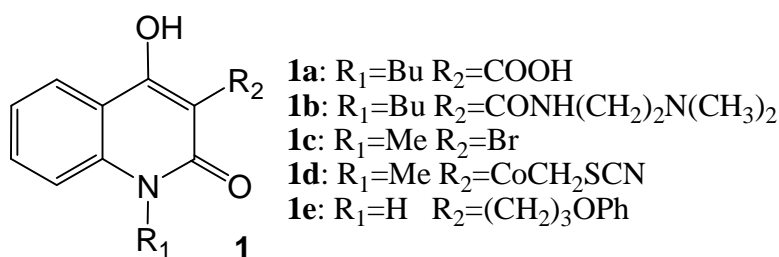
V teoretické části jsme se zabývali třemi základními oblastmi. Zaprvé biologickými účinky chinolinů, jejich výskytu v přírodním prostředí a jejich využití pro lékařskou praxi. Ve druhé a třetí části využitím a možnostmi thiokyanatanů, resp. thiomčoviny pro naši odbornou práci a způsoby, kterými byli využity jejich vlastnosti a chování v laboratorní a průmyslové praxi.

Cílem této diplomové práce bylo prostudování reaktivity 3-aminoderivátů-*1H,3H*-chinolin-2,4-dionů s thiomčovinou a thiokyanatanem draselným. Produkty těchto reakcí by měli být nové heterocyklické sloučeniny, odpovídající 3-thioxo-2,6dihydro-*3H*-imidazo[1,5c]chinazolin-5-ony.

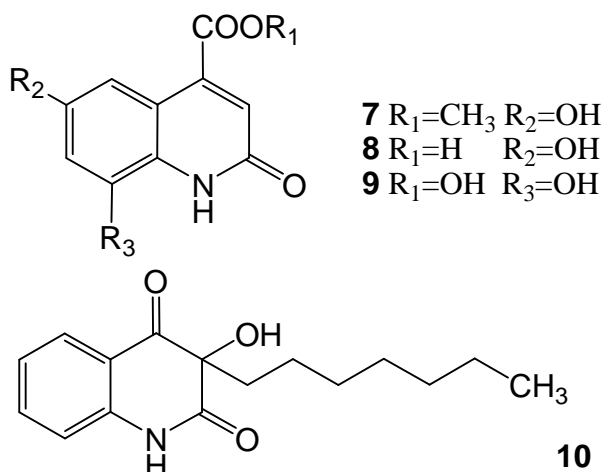
I. TEORETICKÁ ČÁST

1 BIOLOGICKY AKTIVNÍ CHINOLINY

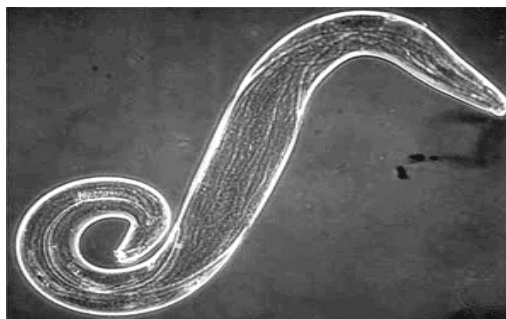
Mnohé z derivátů chinolinů vykazují biologickou aktivitu. Biologickou aktivitu ve smyslu např. potlačení růstu mikroorganismů. Významný potenciál mají 4-hydroxychinolin-2-ony a chinolin -2,4-diony. Např. z první skupiny látek má sloučenina **1a**^[1] má silnou analgetickou a protizánětlivou schopnost. Další deriváty **1b**^[2], **1c**^[3] a **1d**^[4] mají vysokou antimikrobiální a fungicidní aktivitu. U látky **1e**^[5] bylo objeveno, že působí jako inhibitor HIV-1 proteázové aktivity. Některé z chinolin-2,4-dionů **2** se vyskytují v přírodě jako metabolity některých druhů bakterií rodu *Pseudomonas* mající antibiotickou aktivitu.^[6, 7] Látky substituované v poloze 3 nitroskupinou **3** jsou účinné jako antialergika^[8, 9, 10], chlor a brom deriváty **4** mají herbicidní účinky^[11] fluorderiváty **5** působí proti intracelulárním patogenům a 3-azidoderiváty **6** zamezují shlukování krevních destiček.^[11]



Jedna z bakalářských prací^[12] na Ústavu chemie se zabývala shrnutím derivátů chinolinů jako látek vyskytujících se přirozeně v životním prostředí. Byly vyhledávány především látky s hydroxyskupinou v poloze 4 a ketoskupinou v poloze 2, případně tautomerní formy těchto látek. Podařilo se dohledat na 110 látek nalézajících se v biotickém prostředí. Některé z látek byly objeveny v rostlinách (rýže **7**, **8**, obilí **9**), v bakteriích *P. aeruginosa* **10**, plísních *Penicillium sp.*, případně jako metabolity trávení vyšších živočichů.



Některé z prezentovaných látek vykazovali různé typy interakcí s okolním biotickým prostředím. Často cytotoxické, protinádrové, výrazně toxické pro bezobratlé, ovlivňující srážlivost krevních destiček nebo hormonální estrogenový cyklus u samic hlodavců. Ve výše uvedené práci se vyskytovala u velké části látek metoxyskupina na různých lokantech. Což vede k závěru, že by tato skupina mohla výrazně ovlivňovat biologické chování chinolinů a jejich rozpustnost ve vodním prostředí. Tuto skutečnost podporují i tvůrci práce zabývající se chinolinovými alkaloidy získanými z rostlin a působících proti *Plasmodium falciparum* (Obr. 1), původci malárie. ^[13]



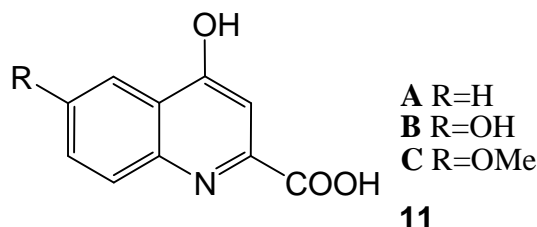
Obr. 1: *Plasmodium falciparum*

dostupný z <<http://www.celtnet.org.uk/medicine/malaria.php>>

Slovenský tým vedený J. Strigancovou zkoumal antimikrobiální aktivitu chinolin-4-karboxylových kyselin a jejich karboxamidů proti G(+) a G(-) bakteriím, kvasinkám a vláknitým plísním. U plísně *Borritis cinerea* (plíseň šedá) docházelo k vážným morfologickým změnám hyf plísně, hlavně větvení. Amidy pouze nepatrně zpomalovali bakteriální růst. ^[14]

Z rostliny routy halebské (Obr. 2) byly získány deriváty chinolinů substituovaná v poloze 3

nebo 4 aldehydickou skupinou. Při porovnávání protibakteriálních účinků s 3 nebo 4 karboxylovými kyselinami chinolinů byly tyto deriváty efektivnější a silnější. Výrazně působí proti bakteriím *C. perfringens*, *E. coli*, proti kterým uvedené kyseliny nepůsobí.^[15] Substituovanou 4-hydroxychinolin-2-karboxylovou kyselinu **11** v poloze 6 se podařilo získat z chvojníku *Ephedra pachyclada* (Obr. 3).^[16]



Obr. 2: routa halebská

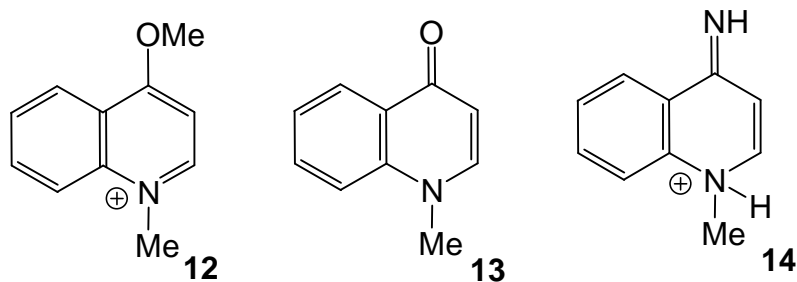
dostupný z: <<http://www.biolib.cz/cz/taxonimage/id60154/>>



Obr. 3: *Ephedra pachyclada*

dostupný z: <www.kew.org/msbp/where/Jordan.htm>

Jako vedlejší produkt izolace olejů z rostlin rodu *Echinops sp.*, např. bělotrn kulatohlavý (Obr. 4), byli vyizolovány alkaloidy s chinolinovým skeletem, echinorin **12** a jeho metabolity echnopsin **13** a echinopsidin **14**. Tyto alkaloidy jsou svými vlastnostmi podobné strychninu. Používají se při svalové atrofii a pomáhá stimulovat srdce. Byly také testovány jako „repellent“ proti ohryzu hlodavců a spárkaté zvěři na keře a mladé sazenice stromů v lesních školkách.^[17]

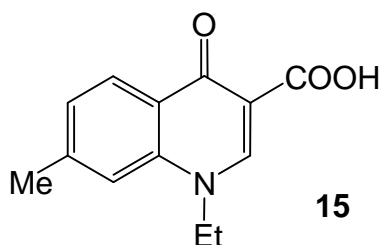


Obr. 4: bělotrň kulatohlavý

dostupný z: <<http://botanika.wendys.cz/kytky/foto.php?384:3>>

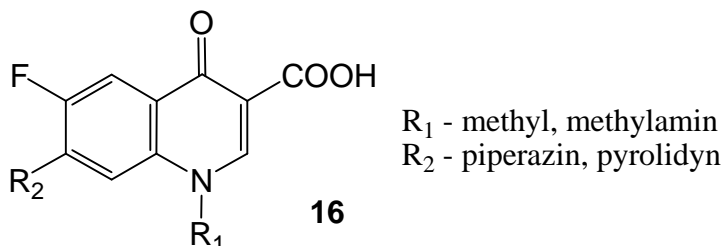
1.1 Chinoliny jako farmaka

S praktickým využitím chinolinů jako léčiv se setkáváme přibližně od 60. let (kyselina nalidixová **15**), s fluorovanými od 80. let minulého století. Chinoliny působí jak proti (G)-tak i proti (G)+ bakteriím případně vykazují i protinádorovou aktivitu. Slouží k léčbě infekcí urologických a respiračních cest.

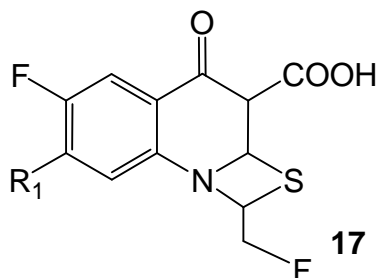


Léčebný účinek je založen na inhibici bakteriálních DNA gyráz, topoisomerázy (II). Tyto enzymy umožňují zformování molekuly DNA do chromozomů a usnadňují replikaci, transkripci a další operace probíhající s DNA bakteriálních buňkách. Při aplikaci chinolinových léčiv jsou tyto operace potlačeny nebo zpomaleny. ^[18, 19, 20, 21, 22] Účinnost léčiv na bázi chinolonů lze ovlivnit zavedením specifických funkčních skupin na vytypovaná místa

ve struktuře **16**. Mezi vyhovující skupiny patří karboxylová, ketoskupina a piperazinový kruh. Tyto skupiny je také nutné pro dostatečný antibakteriální účinek vhodně umístit. Významné jsou především polohy 6, 7 a 8 pro atomy uhlíku a obsazení dusíku v chinolinovém kruhu. Nejvýznamnější skupina a poloha se uvádí přítomnost atomu fluoru v poloze 6. Tato substituce zvyšuje efektivitu farmaka dvou až čtyř řádově.^[18, 19, 23]



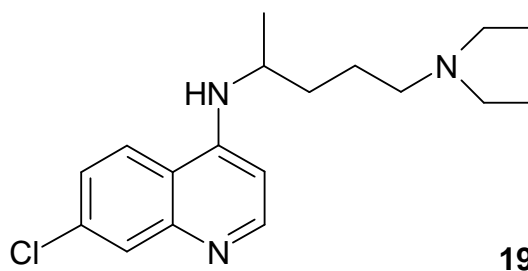
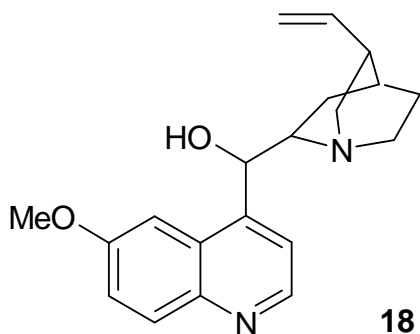
Velmi slibné výsledky proti grampozitivním i gramnegativním bakteriím prezentoval Matsuoka.^[23] Ten se svými kolegy syntetizoval nové deriváty thiazetochinolinů **17**. V poloze R₁ střídal substituované piperaziny, morfolin a další. Nejlepší výsledky měl derivát R₁ = 3 – hydroxyazetizinoskupinou na (G+) bakterii *Staphylococcus aureus*. Tato látka dosahovala inhibici v množství odpovídajícím 12% jiných testovaných (MIC = 0,0125 µg/ml proti 0,1 µg/ml).



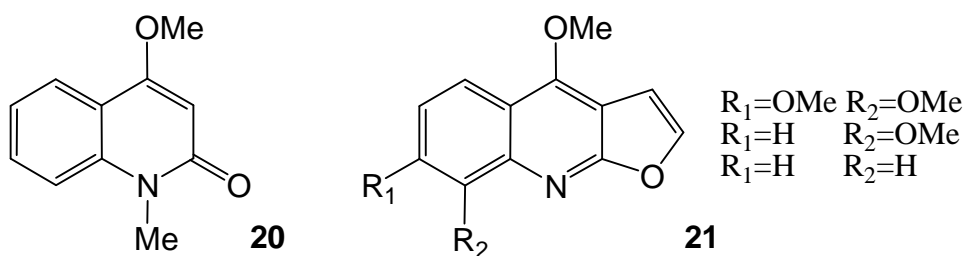
1.1.1 Chinoliny a malárie

Deriváty chinolinů vystupují jako významná léčiva působící proti původci malárie, parazitům rodu *Plasmodium*. Ať jde o přírodní chinin nebo uměle připravené látky jako chlorochin. Přestože uvedené látky patří do stejné skupiny léčiv, je jejich mechanismus účinku rozlišný. V případě chininu **18** a ostatních chinolinmethanolů dochází k zablokování transportních kanálů ve fosfolipidové vrstvě parazita. U chlorochinu **19** proniká do erytrocytů parazita, kde se akumuluje v jeho potravních vakuolách. V nich zvyšuje pH, protože pH v potravních vakuolách je kyselé. Tím blokuje trávení parazita.^[24, 25] V pozdějším článku^[26] se již mechanismus účinku popisuje přesněji. Chlorochin v komplexu s hemem působí v parazitovoy jako oxidační činidlo (Fe²⁺hem / Fe³⁺hem a chinolin). To vede k napadení lipidové membrá-

ny, destrukci DNA, oxidaci proteinů dále až k smrti parazita.



V rostlině *Zanthoxylum tsihanimposa* (Obr. 5) z rodu *Rutaceae*, endemicky rostoucí na Madagaskaru bylo vyizolovány čtyři alkaloidy chinolinové struktury **20**. Z tohoto rodu je využíváno místní léčitelé k léčbě malárie velké množství druhů rostlin, podle autorů 47 druhů z 33 rodů, ale nejčastěji výše zmíněná. Nejúčinnější se po testech projevil γ -fegarín **21** (R₁-H, R₂-OMe).^[13]

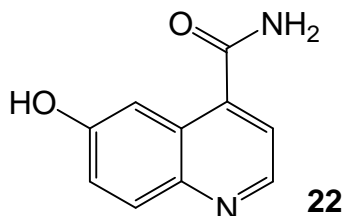


Citovaní tvůrci také zdůrazňují, že přítomnost metoxyskupin je velmi důležitá pro zvýšenou, případně vůbec nějakou aktivitu směřující k inhibici mikroorganismů. V konkrétním případě poloha C4 a C8.



Obr. 5: *Zanthoxylum tsihanimposa*^[13]

Francouzští vědci ^[27] vyizolovali z keře *Microdesmis keayana* (Obr. 6), rostoucího v oblasti Pobřeží slonoviny, chinolinový derivát 6-hydroxychinolin-4-karboxamid, xanthochininamid, **22**.



Výtažky z kořene tohoto keře využívají místní léčitelé jako antimalaretikum, parazitům a k léčbě sexuální disfunkce.

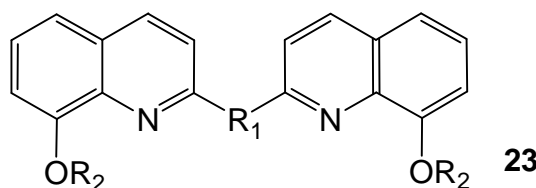


Obr. 6: *Microdesmis keayana*

Dostupný z <http://runetwork.demo.zadi.de/html/fr/index.html?category_id=8&country_id=22&offset=45>

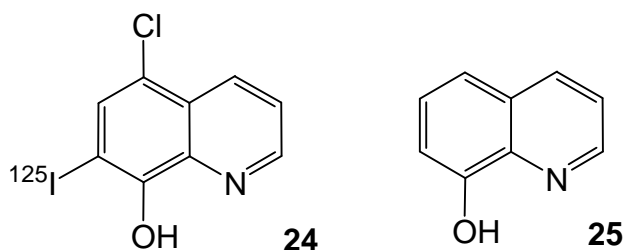
1.1.2 Chinoliny a onemocnění způsobující nemoci centrální nervové soustavy

Významnou skupinou látek k léčbě Alzheimerovy nemoci jsou „poly-8-hydroxychinoliny“ **23** a jejich komplexy s mědí, zinkem, nebo niklem. Chinolinové jednotky jsou navzájem spojeny různým typem přemostění v poloze 2, např. difluormethan, keto nebo amido skupinou. Nejlepších výsledků se dosáhlo s jednoatomovým přemostěním společně se dvěma jednotkami chinolinů. ^[28]

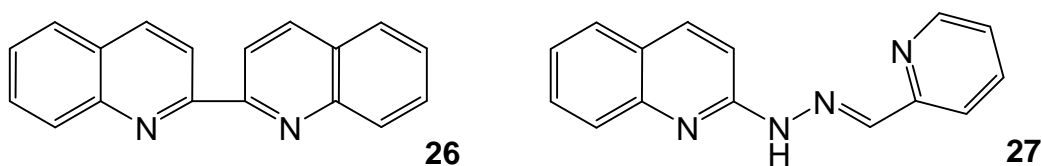


Tyto látky vytvářejí komplexy společně s měďnatými, zinečnatými ionty obsažených v agregátech amiloidózy. V ^[29] uvádějí termín extrakce iontů ze sedimentů amiloidózy. Po-

máhají tak rozpouštět plaky na mozku postižených pacientů. Blokují tímto vznik toxických forem peroxidu vodíku, které amiloid β -peptidy vytvářejí a tím poškozují mozkové buňky, neurony. ^[28, 29, 30] Schopnosti některých chinolinů **24**, **25** vázat se na kovy obsažených v placích se využívá k radioznačení těchto plaků, které pak lze lépe diagnostikovat skenováním pomocí CT a MRI vyšetřovacích metod. ^[29] Podle článku ^[30] je vázání na zinek a měď v placích velmi selektivní.



Japonští vědci vedení Murakami-Kubou prováděli testování dvou velkých skupin chinolinů. ^[30] Do první skupiny patřili poměrně složité látky substituované v poloze 4 rozličnými substituenty jejichž charakter se blížil analogům chininu **11**. V druhé skupině látek byli obsaženy především bichinoliny a jejich analogy, vázány navzájem v poloze C2 **26**, **27**. Vybrané látky testovali na schopnost atakovat a vázat se na a proteiny prionů, které mají na svědomí transmisní spongiformní encefalopati, Creutzfeldt-Jakobovu nemoc a Gerstmann-Sträussler-Scheinkrův syndrom. Tyto nemoci ve své podstatě způsobeny akumulací abnormálních forem proteinů prionů. Z jejich výsledků vyplývá, že bichinoliny jsou mnohem efektivnější při tvorbě komplexů s prionbílkovinami než-li substituce na C4. Některé v koncentracích až 2000 nižších než li jejich oponenti (**18** 6 μ M proti 0,003 μ M u látky **26**).

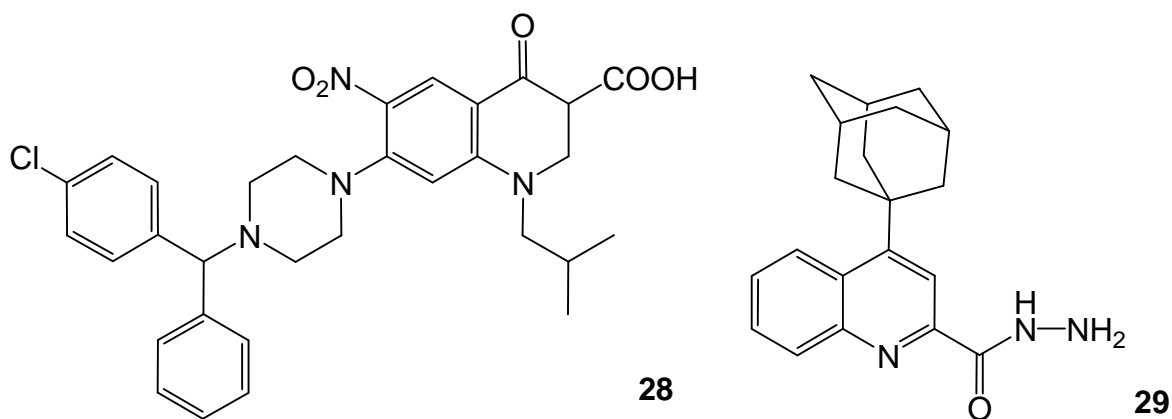


1.1.3 Chinoliny a tubkulóza

Indičtí vědci prezentovali ^[21] syntézu nových 6-nitrochinolin-3-karboxylových kyselin. Chtěli prověřit možnost nahrazení fluoru v poloze C6 za nitroskupinu. To proto, že některé z jejich literárních zdrojů odkazovali na dobré výsledky působení různých nitroderivátů při inhibici *Mycobacterium tuberculosis*. Připravili 48 různě substituovaných látek. V diskuzi vyzdvihovali především důležitost cyklopropylové skupiny na N, karboxylu na C3, substituované piperaziny, morfoliny, piperidiny na C7 podobně jako v souhrnné literatuře. ^[18, 19]

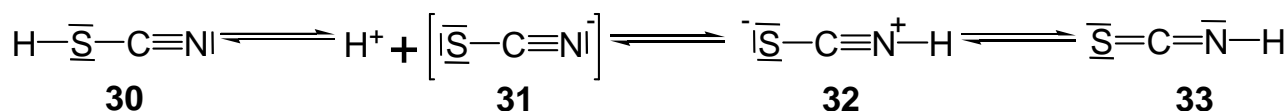
Své produkty testovali na antimikobakteriální aktivitu vůči a *M. smegmatis* a dále také na inhibici stáčecích možností DNA-gyráz. Přibližně 10 látek vykazovali upokojivé výsledky, kdy inhibovali funkci enzymů při koncentraci nižší než 30 μ g/ml. Látka **28** dokázala inhibovat již při koncentraci 5 μ g/ml.

Další indičtí vědci prezentovali v článku ^[31] přípravu látek kombinující strukturu chinolinu a adamantanu. Nasyntetizovali okolo 40 látek . Z nichž mnohé inhibovali růst *M. tuberculosis* při koncentraci jednotek μ M/ml. Konkrétně látka **29** při koncentraci 6,25 μ M/ml.

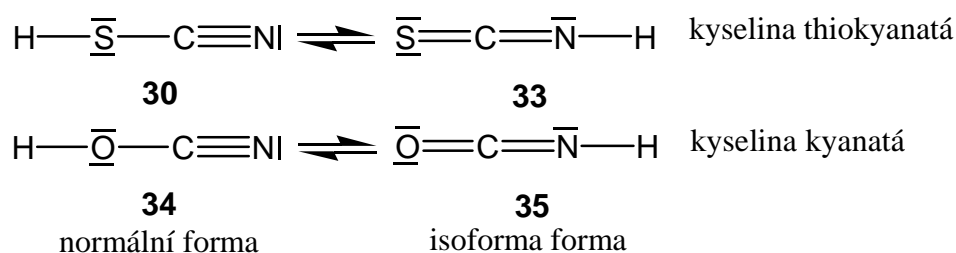


2 THIOKYANATAN DRASELNÝ A THIOKYANATANY

Thiokyanatany, soli kyselina thiokyanaté - jsou odvozovány jako sirné deriváty kyseliny kyanaté HOCN. ^[32, 33] Také se jako kyselina kyanatá vyskytuje v tautomerní formě. ^[32 – 34]



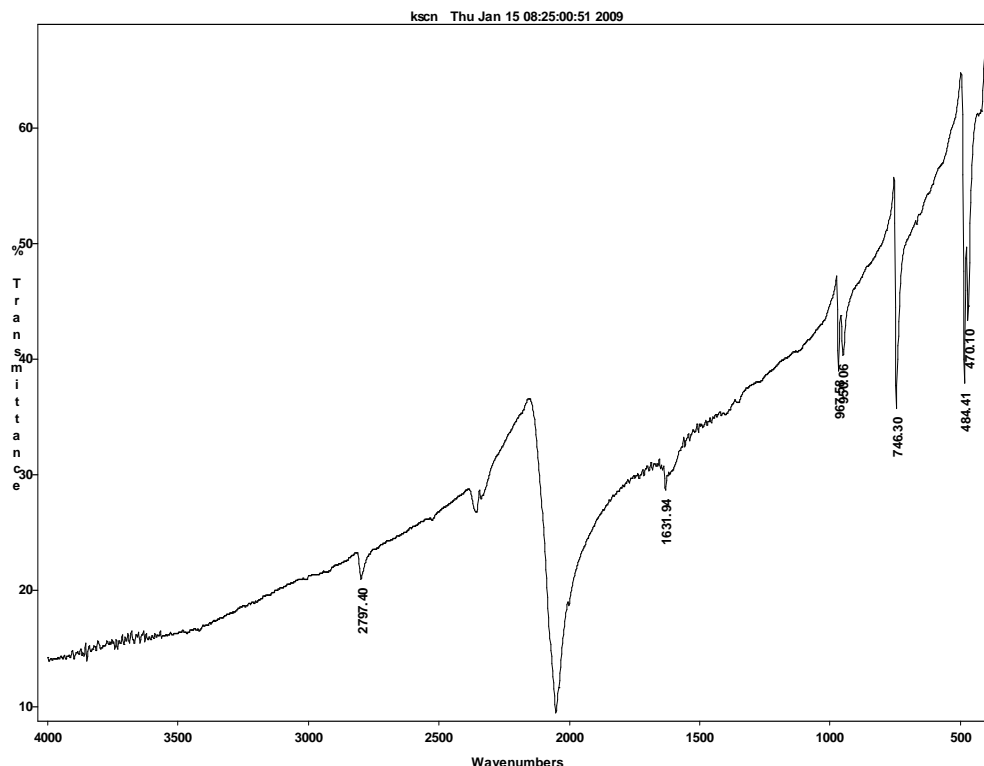
Autor literatury ^[34] uvádí celkem čtyři možnosti uspořádání atomů a vazeb v molekule kyseliny thiokyanaté, tak i v thiokyanatanech. Upřednostňuje strukturu **30** a pro soli **31**. Z důvodu malé ochoty atomu síry tvořit dvojnou vazbu u vzorce **33** nebo u vzorce **32** možnost dusíku s trojnou vazbou vázat vodík. Ale možnost **30** a **33**, je prezentována jak ve literatuře ^[32] tak i ve zdroji ^[33] kde se zdůrazňuje že tzv. normální forma převažuje nad tzv. izoformou. Na rozdíl od kyseliny kyanaté **34**, kde v roztocích převažuje isoforma **35** (až z 96%).



Kyselina thiokyanatá je vodním roztokem plynu thiokyanovodíku. Plyn pod svoji teplotu tání (-110 °C) vytváří bílou látku. Tvoří zapáchající olejovitou kapalinu již pod 0 °C, rozpustnou ve vodě, etheru a alkoholu. Vodný roztok kyseliny se řadí mezi silné kyseliny. Může dosahovat síly až halogenvodíkových kyselin. Což je způsobeno hodnotou disociační konstanty sulfhydriové skupiny. ^[33, 34, 35]

Tab. 1: Chemickofyzikální vlastnosti thiokyanatanu draselného ^[36 – 38]

Vlastnost	Hodnota	Vlastnost	Hodnota
Sumární vzorec	CKNS	Teplota tání	175°C ^[K] ; 177°C ^[L] ; 180°C ^[M]
Chemický vzorec	KSCN	Teplota rozkladu	500°C
Molární hmotnost	97,18 g/mol	Rozpustnost	voda, metanol, ethanol, pyridin
Hustota	1,882·10 ³ kg/m ³	Barva	bezbarvá
Toxikologie	LD ₅₀ orálně – potkan 854mg/kg LDLo orálně – člověk 80 mg/kg		
Nebezpečnost	zdraví škodlivý		



Obr. 7: infračervené spektrum thiokyanatanu draselného (Matson 3000)

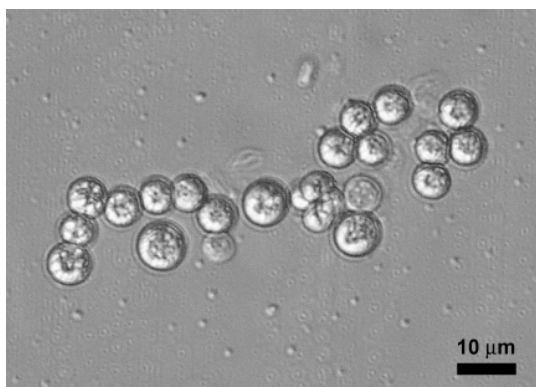
Thiokyanatany, alkalické, se vyskytují v malých množstvích v tělech organismů. Především ve slinách, dále v žaludeční šťávě, krvi, v moči a cibuli. Ionu SCN^- se připisuje podpora trávení a případná schopnost ničit choroboplodné zárodky. [33, 39] Mastrangelo [40] předpokládá schopnost ničit choroboplodné zárodky působením hypothiokyanátového iontu. Ten vzniká z SCN^- iontů reakcí s peroxidem vodíku za katalýzy enzymu laktoperoxi-dázy. Takto vzniklý OSCN^- aniont působí proti bakteriím, houbám i virům. Thiokyanátovému iontu se připisuje nepostradatelná úloha v enzymatických a hormonálních reakcích organismů. [41, 42] Podporuje prostup hormonů přes buněčné membrány a tlumí teratogenní a karcinogenní účinky jiných látek. Weingartner a kolegové ve svých člancích [42, 43] uvádí, že thiokyanátový iont má společně s vitamíny B6, B11 a B12 nezastupitelnou a důležitou funkci při vývoji embrya. Odstraňují malformace, metabolické problémy a podobně. Uvedené vitamíny společně s SCN^- podporují růst, zdraví i reprodukci. Dykhuizen a jeho kolegové [44] zkoumali vliv dusitanů na bakterie v žaludeční šťávě. Došli k závěrům, že za přítomnosti thiokyanatanů se antibakteriální potenciál dusitanů zvyšuje.

Někdy se také thiokyanatany označují jako sulfokyanidy. [32] Původní název této skupiny látek – RHODANIDY – byl odvozen z řeckého slova, které mělo znamenat růži

^[33] nebo označovat červenou případně růžovou barvu ^[39] Červená barva vzniká při reakci iontu SCN^- s železitým. Kdy vzniká komplex, který barví roztok velmi intenzivně do krvavě červené barvy. Toho se využívá v analytické chemii k důkazu thiokyanátů nebo železitých iontů.

Při spektrálním měření se zjistilo, že aniont SCN^- je uspořádán do přímky. Často vystupuje jako ligand v komplexních sloučeninách. V nichž vystupuje nejčastěji jako komplex obecného typu $[\text{Me}(\text{SCN})_4]^-$. Jsou si velmi podobné komplexům kyanidů. V komplexních útvarech se na centrální atom váže atom síry ($\text{Hg}(\text{SCN})_4^{2-}$) nebo atom dusíku (FeNCS^{2+}), případně vznikem můstkových vazeb Me-SCN-Me . ^[35, 45]

Thiokyanátové radikály se slučují po dvou do sloučeniny $(\text{SCN})_2$ - dirhodan. Ve volném stavu byla připraven v roce 1919. A to působením bromu rozpuštěného v indifferntním rozpouštědle, sirouhlíku, na thiokyanatan stříbrný. Svými vlastnostmi je dirhodan velmi podobný halogenům. Zejména jodu. Proto se řadí mezi pseudohalogenovodíky. V měďnatém komplexu s např. s thiomocovinou, deriváty alaninu a thiokyanátového iontu působí jako redukční činidlo chlorofylu u řas *Chlorella vulgaris* (Obr. 8) Má působit jako inhibitor fotosyntetického přenosu elektronů. ^[46]

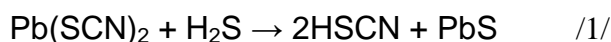


Obr. 8: řasa *Chlorella vulgaris*

dostupný z: <http://www.butbn.cas.cz/ccala/col_images/268.jpg>

2.1 Příprava kyseliny thiokyanovodíkové a jejich derivátů

Volnou kyselinu lze získat vytěsněním z jejich solí působením H_2SO_4 za chlazení zkapalněným vzduchem, ^[33] nebo mírným zahříváním suchého thiokyanatanu rtuťnatého nebo olovnatého v proudu H_2S : ^[39]



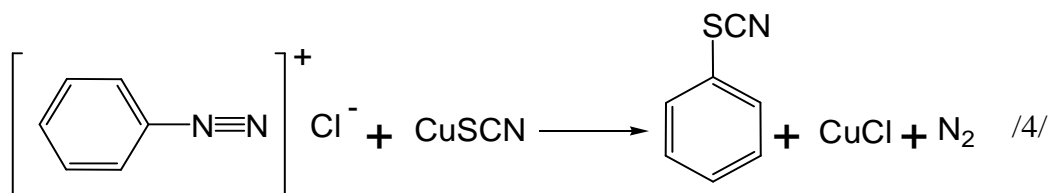
Thiokyanatany lze připravit tavením alkalického kyanidu, případně s ferrokyanidem se sírou: ^[32–34]



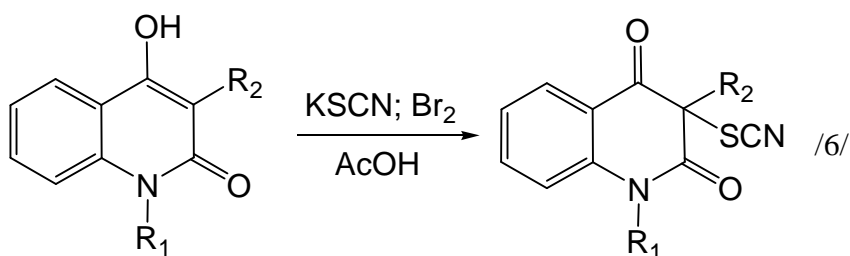
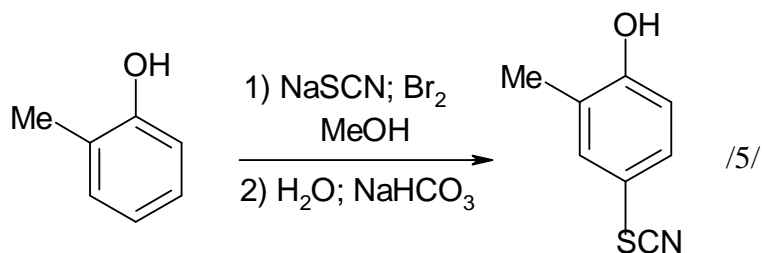
Thiokyanatan amonný lze získat reakcí amoniaku se sirouhlíkem v roztoku alkoholu, vzniklý meziprodukt, dithiokarbamid amonný se dále rozloží podle následující rovnice:



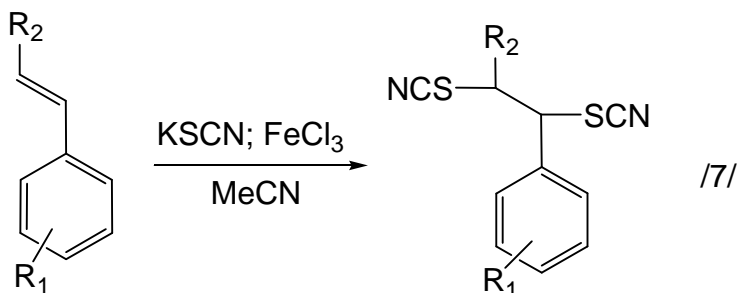
Z diazoniových solí lze připravit rozkladem thiokyanatany s aromatickým jádrem. ^[47]



Na aromatické cykly lze navázat thiokyanátovou skupinu reakcí bromu s thiokyanatanem sodným, draselným nebo amonným. ^[48, 49]

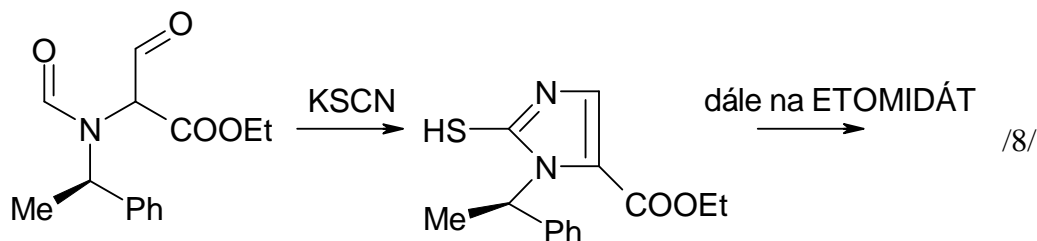


Adice na dvojnou vazbu thiokyanatanem draselným. ^[48]

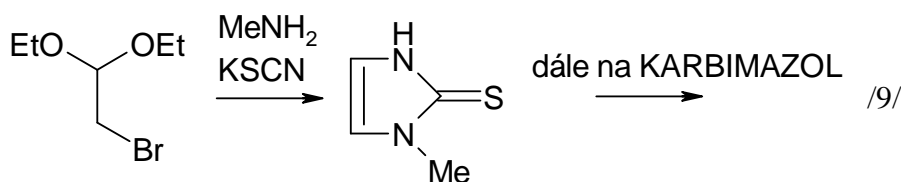


2.2 Thiokyanatany a příprava léčiv

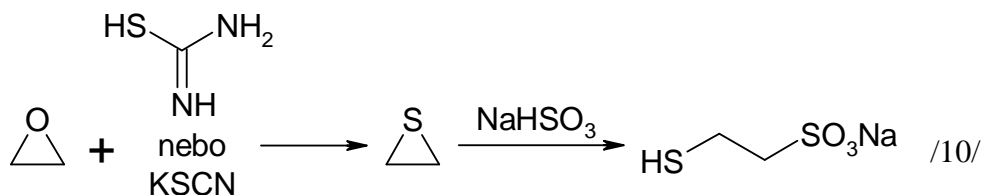
Thiokyanatanu draselného se používá k cyklizaci meziprojektu na imidazolový kruh, při syntéze intravenózního anestetika ETODÁTU: ^[18]



KSCN se využívá při syntéze léčiva KARBIMAZOLU, patřící do skupiny thyrostatik ovlivňující funkci štítné žlázy. A to z diethylacetalu cyklizací (methylamino) acetaldehydu (připraveného *in-situ* z diethylacetalubromacetaldehydu s methylaminu) s thiokyanatem za vzniku thiamazolu. Syntéza dále pokračuje reakcí s ethyl-chlorformiátem v prostředí pyridinu na KARBIMAZOL

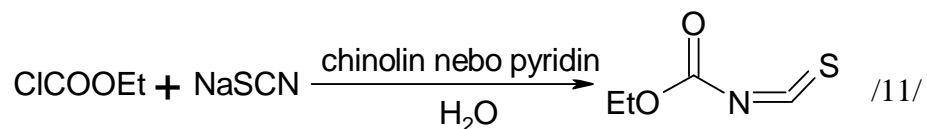


Reakcí KSCN nebo thiomočoviny lze mukolytikum MESNA (natrium-2-sulfanylethan-1-sulfonát). Mukolitika se používají k ovlivňování vlastností hlenu v dýchacích cestách. Thiokyanatan nebo thiomočovina reaguje s oxiranem za vzniku thiranu a ten s hydrogensířičitanem sodným. ^[18]

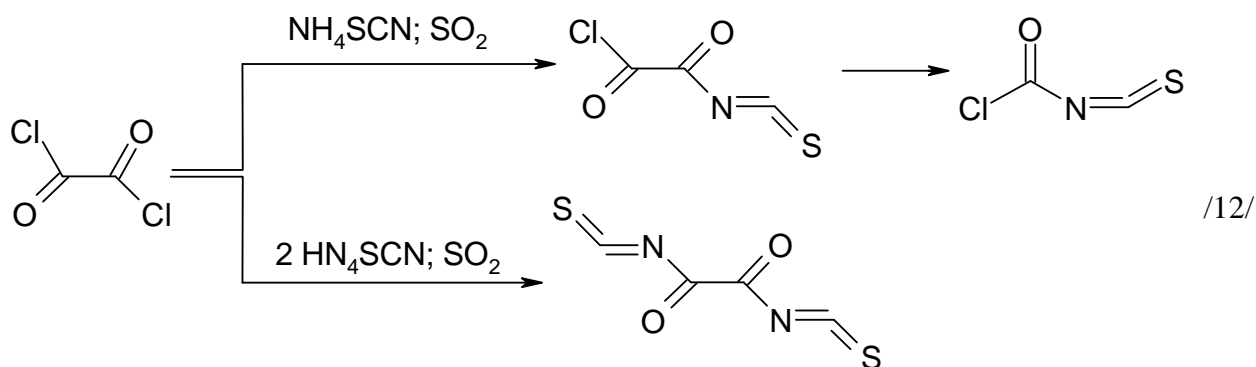


2.3 Acylisothiokyanáty

Thiokyanatan sodný nebo amonný se aplikuje při přípravách acylisothiokyanátů. Jako výchozí látky se používají chlorderiváty karboxylových kyselin. Reakce probíhají při nižších teplotách. První probíhá při 10 °C.

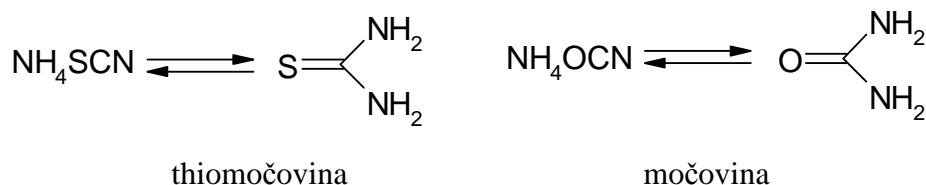


Druhá reakce při $-22\text{ }^\circ\text{C}$. Podle vloženého ekvimolárního množství thiokyanátu se vyprodukuje mono nebo diisothiokyanatan. Po zahřátí monoderivátu lze vyizolovat isothiokyanatanachlorderivátu karboxylové kyseliny. ^[48]

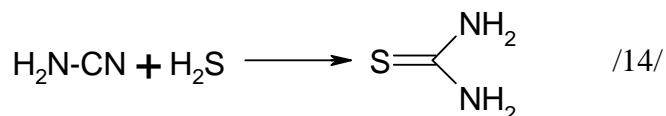
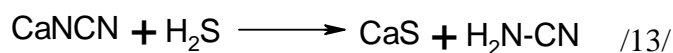


3 THIOMOČOVINA

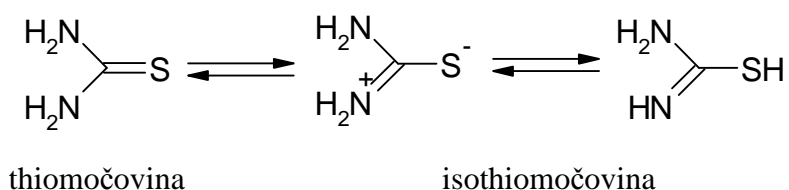
Thiomočovina se svými vlastnostmi velmi podobá své příbuzné močovíně. Již svojí přípravou, která je analogická s preparací provedenou Wöhlerem. Reakce je vratná. V ustáleném stavu obsahuje asi 25% thiomočoviny.: [33, 34, 47, 50]



Další z možností preparativních příprav je tepelný rozklad kyanamidu vápenatého v atmosféře sulfanu. Případně přímo z kyanamidu za opětovné přítomnosti sulfanu a navíc amoniaku: [33, 34, 47]



Jako jsme se setkali thiokyanatanů s více možnostmi uspořádání molekuly tak i v případě thiomočoviny lze vysledovat více intramolekulárních stavů. Opět se projevuje malá ochota síry vytvářet dvojné vazby s jinými prvky. Proto jsou i reakce thiomočoviny probíhá na SH skupině. [33, 34, 47]

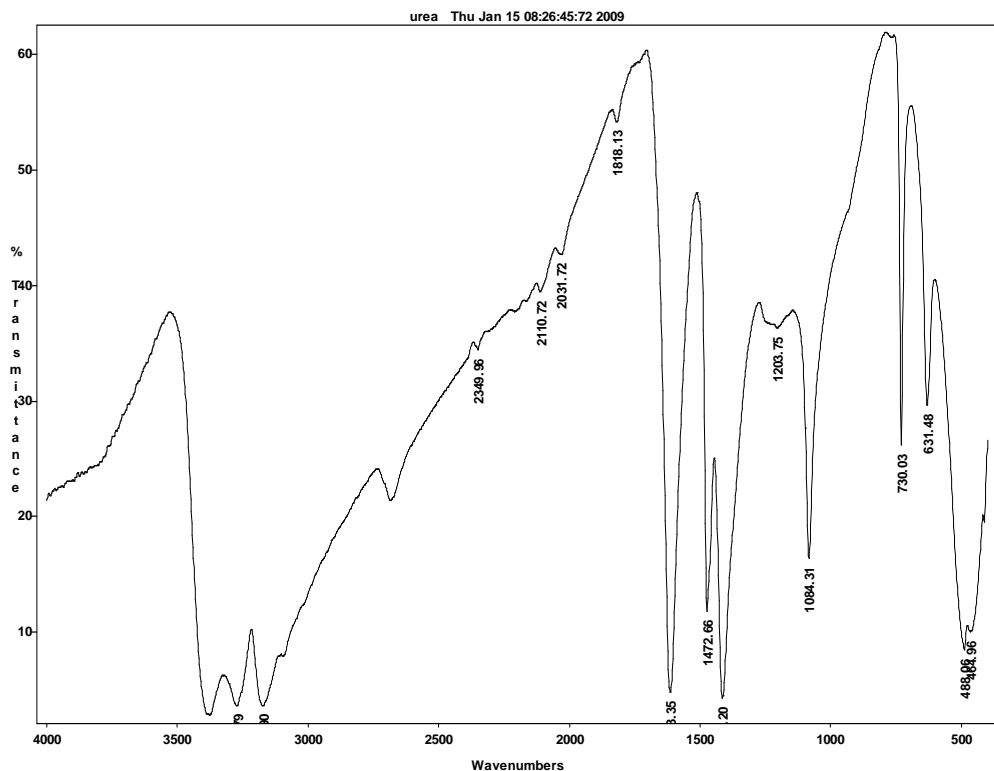


Thiomočovina má podobnou schopnost jako močovina vytvářet adiční sloučeniny, útvary, s různými organickými látkami. Pokud ovšem nemají tyto látky příliš rozvětvené řetězce. Jde hlavně o uhlovodíky a jejich alkoholy, mastné kyseliny, nitrily aj. Podle [51] je výhodné použít thiomočoviny k obohacování nebo izolaci izo a cykloalkanů ze směsi uhlovodíků. Pomocí aduktů thiomočoviny byl vyizolován z hodonínské ropy adamantan. Látky vstupují do krystalů močoviny, které jsou uspořádány do šestibokých dutých hranolů. Těmto útvarům se říká *KLATRÁTY*. Této schopnosti se využívá v petrochemickém průmyslu. Možnost

vytváření klatráty u thiomocoviny je o něco horší, nejspíše z důvodu výměny kyslíku za síru.
[33, 50, 51]

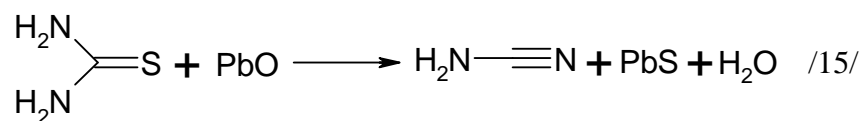
Tab. 2: Chemickofyzikální vlastnosti thiomocoviny^[36 – 38]

Vlastnost	Hodnota	Vlastnost	Hodnota
Sumární vzorec	CH ₄ N ₂ S	Teplota tání	174-178°C
Chemický vzorec	H ₂ NCSNH ₂	Rozpustnost	voda, etanol, ether
Molární hmotnost	76,12 g/mol	Barva	bezbarvá
Hustota	1,405·10 ³ kg/m ³		
Toxikologie	LD ₅₀ orálně – potkan 1750mg/kg LD ₅₀ dermálně – králík > 2800mg/kg		
Nebezpečnost	zdraví škodlivý, karcinogenní, toxické pro reprodukci, nebezpečný pro životní prostředí		

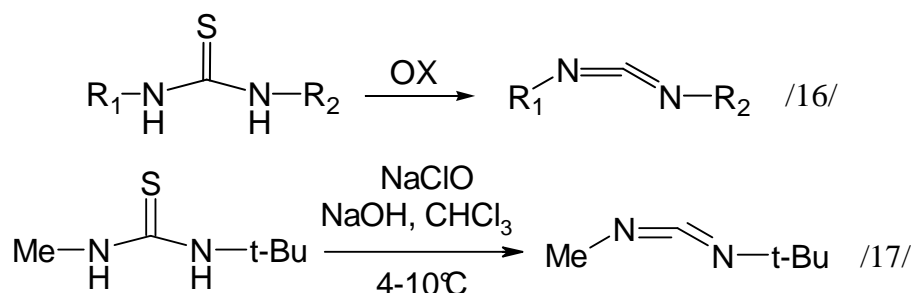


Obr. 9: infračervené spektrum thiomocoviny (Matson 3000)

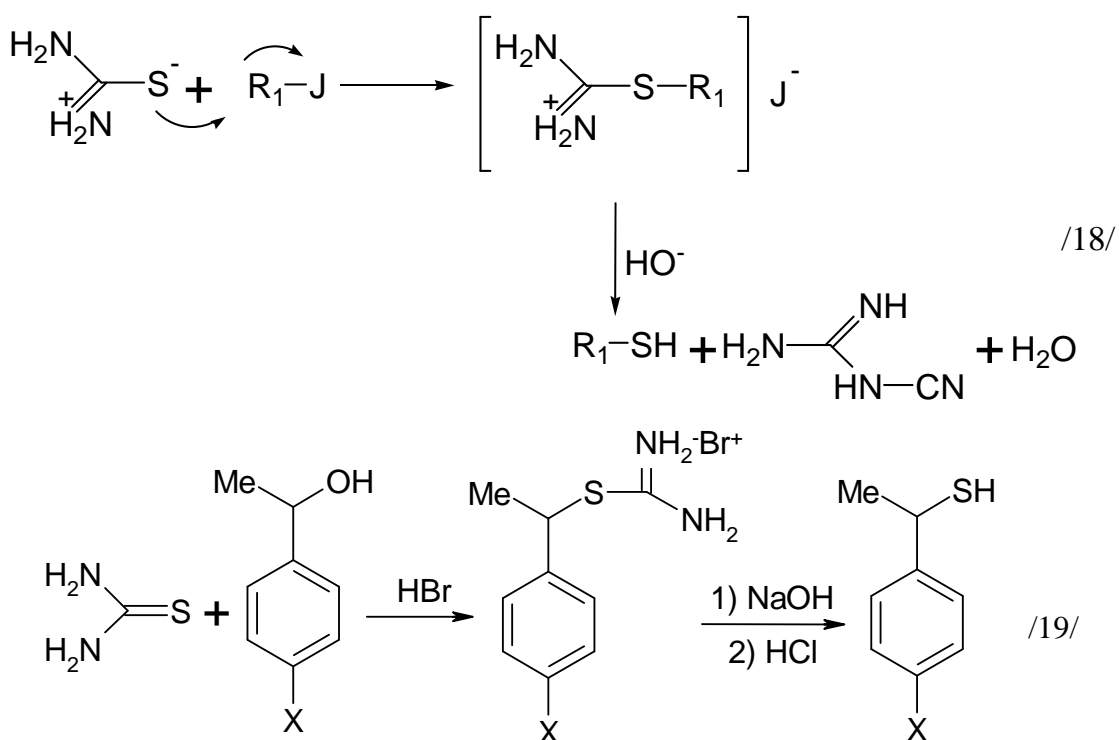
Působením oxidu olovnatého nebo rtuťnatého, podléhá thiomocovina rozkladu za vzniku kyanamidu a vedlejších produktů: ^[34]



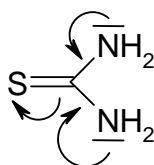
Modernější oxidaci se používají sloučeniny chloru, nejčastěji chlornany a reakce probíhá při teplotách okolo 0 °C. Podle výchozí látky vznikají stejně substituované karboimidy. ^[48]



Další z reakcí isoformy thioamoiny je reakce s alkylačními činidly. Při této reakci vzniká alkylisothiuroniové sole (S-ethery isothiuroniové), které alkalickou nebo kyselou hydrolyzou přecházejí na thioalkoholy. V některých případech mohou na thioalkoholy přecházet samovolně. ^[33, 34, 47, 48]

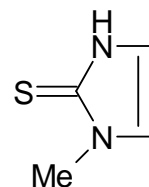
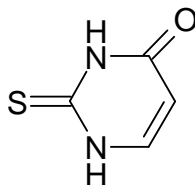
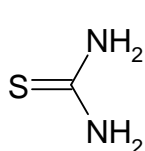


Schopnost vytvářet s alkylhalogenidy thiuroniové sole je způsobena vysokou nukleofilitou atomu síry. Elektronovou hustotu na síře umocňují bazické atomy dusíku. ^[52, 62]



3.1 Thiomočovina a příprava léčiv

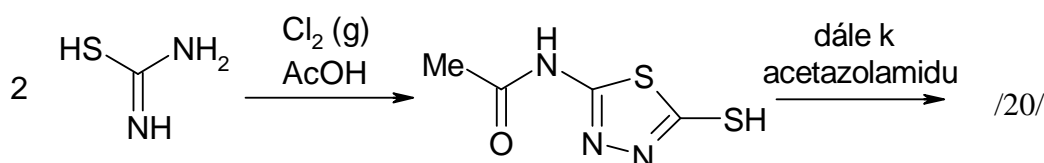
Z biochemického pohledu působí deriváty thiomočoviny jako tzv. antihyreoidální látky. Jsou schopny inhibovat biosyntézu hormonů štítné žlázy a to zabráněním oxidaci jodu a jeho včleněním do mono- nebo diiodtyrosinu. ^[53, 54]



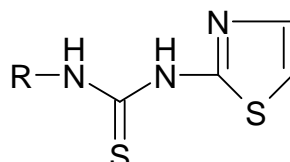
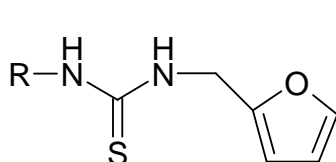
thiouracil

methimazol

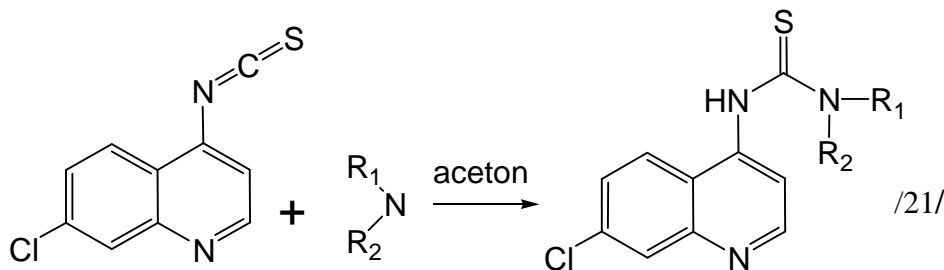
V prostředí kyseliny octové a za působení plynného chloru vytváří thiomočovina pětičlenný kruh se dvěma atomy dusíku a jedním atomem síry. Při následujících reakcích vzniká acetazolamid, přesněji N-(5-sulfanoyl-1,3,4-thiadiazol-2-yl) acetamid. Ten se používá v lékařství ke snížení alkality moči, tedy jako diuretika a inhibitory karbonatanhydrázy. ^[18]



Ve svém článku Yonová a Stolnikova ^[55] shrnují možnosti derivátů močoviny a thiomočoviny jako regulátory růstu sazenic obilnin. Některé z látek mají vysoké herbicidní účinky. Samy autorky odkazují na literaturu Inda Kumara z roku 1989, kde se udává fungicidní a tzv. nematocidní vlastnosti thiazolylderivátů thiomočoviny. Zkoumaly thiazoly a furfuryl deriváty thiomočoviny, kde jako substituent vystupoval např. fenyl, chlorfenyl, methyl a další.

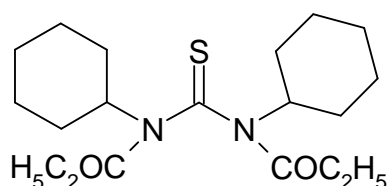


Nejlepší výsledky měly látky se substitucí 4-fluorfenylem a benzylem pro furfuryl deriváty a methyl nebo ethyl substituenty pro thiazolylthiomočoviny. Aman Mahajan a jeho tým ^[56] připravili syntézou thiomočoviny a 7-chlorchinolinisothio-kyanáty nové 7-chlorchinolinthiomočoviny. Připravené látky úspěšně testovali jako antimalaretika a protikarcinogenní látky. Nejlepší z látek působili inhibičně již při koncentraci 1,2 μmolu.



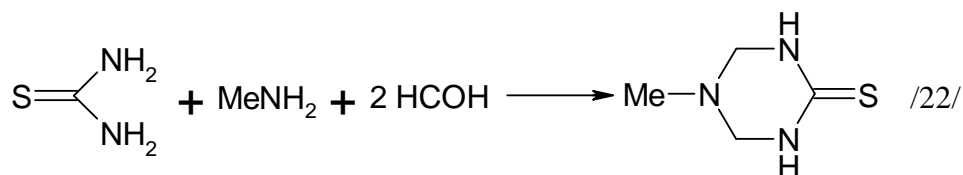
3.2 Thiomočovina a průmyslové použití

Thiomočovina se v průmyslovém měřítku využívá např. jako stabilizátor vinylidenchloridu při jeho skladování. ^[63] Jako antioxidanty do benzínů nebo nebarvící antiozonanty. Aplikují se N-substituované thiomočoviny, např. N-guanylthiomočovina. Častěji se používají deriváty s akylskupinami o jednom až devíti uhlíky. Případně jejich kovové soli nebo aduktů s halogenidy kovů, např. CdCl_2 . Prospěšné vlastnosti mají i deriváty tetrasubstituované. Např. N,N'-dicyklohexyl-N,N'-dipropionylthiomočovina: ^[57]



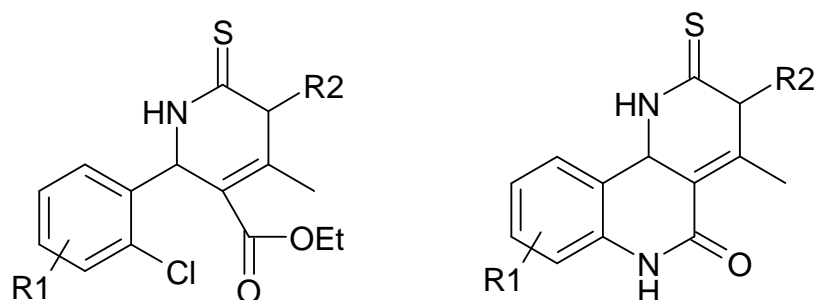
Antioxidačních vlastností thiomočoviny se využívá také u stabilizace kyseliny L-askorbové, již při koncentraci 0,85% v léčebném přípravku. ^[58]

Průmyslově používanou reakcí thiomočoviny s aminomethanem a formaldehydu se vyrábí další vulkanizační činidlo – Triazim TM. ^[59]

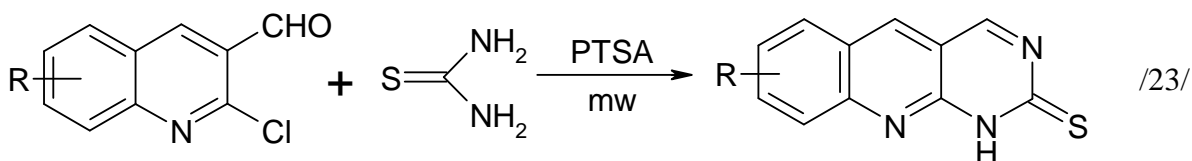


Skupina Ismaila Lahassana ^[60] připravovala pomocí monosubstituované thiomočoviny nebo močoviny, derivátů 2-chlorbenzaldehydů ethyl acetátoacetátu v kyselině borité a octové. Touto tzv. Biginelliho reakcí připravili 4-fenyl-6-methyl-2-thioxotetrahydro pyrimidino-5-karboxyláty pro thiomočovinu. Ty nechaly dále reagovat v atmosféře amoniaku. Kdy dojde k zacyklizování kruhu po odstoupení HCl a ethanolu. Z reakční směsi byly vyizolovány deriváty 2-thioxohexapyrimidochinolin-5-onů. Produkty byly podrobeny testování na anti-

oxidační aktivitu. Z výsledků bylo patrné, že látky připravené z thioočoviny vykazovali vyšší stupeň potlačení oxidace



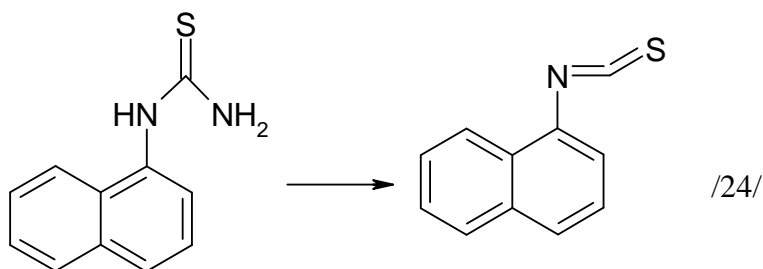
Mikrovlnným ohřevem tuhé směsi thioočoviny, chlorformylchinolinu a PTSA jako katalyzátoru připravili 2-thio[4,5-b]chinoliny. Aplikovaný chinoliny měly různé substituenty na svém benzenovém jádře, např. methyl, metoxy skupinu a halogeny v různých pozicích. Připravené látky pak testovali na možnou antibakteriální a antimikotickou aktivitu. Velmi dobré výsledky byly dosaženy při účinku na bakterie *E. coli*, *P. aeruginosa* a další. Dobré výsledky byly dosaženy i proti houbě *Aspergillus flavus*, (Obr. 10). ^[61]



Obr. 10: *Aspergillus flavus*

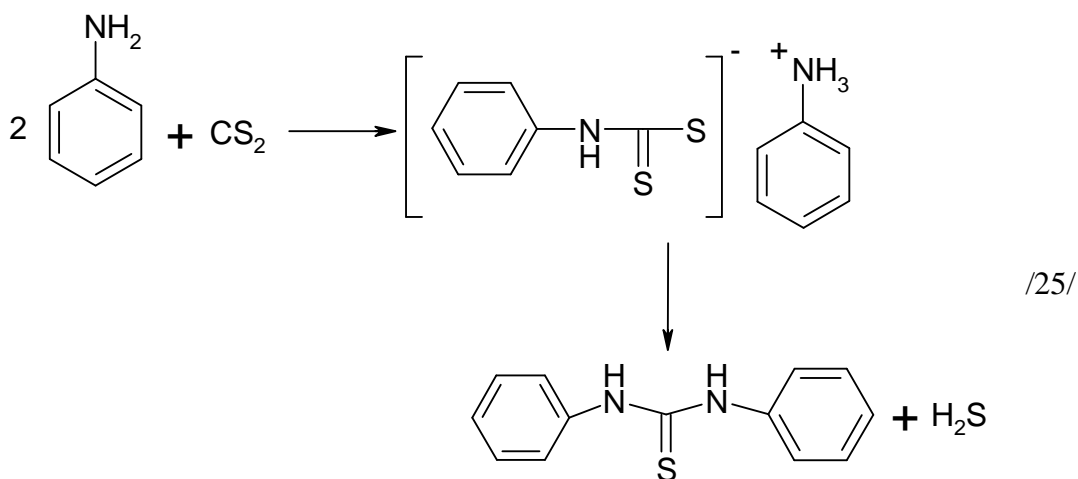
dostupný z <<http://vietsciences.free.fr/biographie/biologists/takamine-jokichi.htm>>

N-naftylthiomočovina je refluxována v prostředí chlorbenzenu ^[48]



Difenyльмоčovina

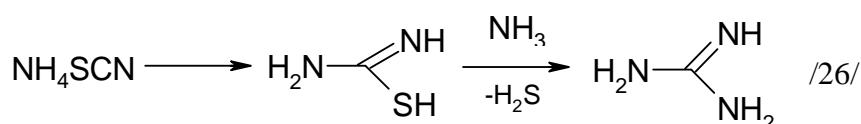
Průmyslově velmi ceněný derivát thiomočoviny. Používá se jako urychlovač vulkanizace. Přípravuje se zahříváním anilínu se sirouhlíkem. V prvním kroku vzniká fenyldithiokarbaman anilínu. Po delším zahřívání karbamanu dojde k rozkladu na N,N'-difenyłthiomočovinu a sirovodík. ^[47]



Následnou reakcí N,N'-difenyłthiomočoviny se sírou vzniká derivát benzenthiazolu 2-merkaptotiazol používaný jako urychlovač vulkanizace. ^[59]

Amidiny

Jsou to látky patřící mezi silné zásady. Vytváří i se slabými kyselinami stálé sloučeniny. Jako hlavní zástupce této skupiny látek je uváděn guanidin. Získává se zahříváním thio-kyanatanu amonného. Kdy dochází k disociaci za vzniku thiomočoviny a po účinku amoniaku přechází na guanidin. ^[50]



Rešerše byla provedena pomocí databáze Web of Sciens a ScienceDirect. Knižní zdroje byli dohledány v Ústřední knihovně UTB a Krajské knihovně Františka Bartoše ve Zlíně, a představuje pravděpodobně kompletní souhrnný materiál o postupu při vývoji, výzkumu a použití daných látek s literárními odkazy. Schematický přehled možnosti jejich využití v praxi s případnými dopady pro další naši práci.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

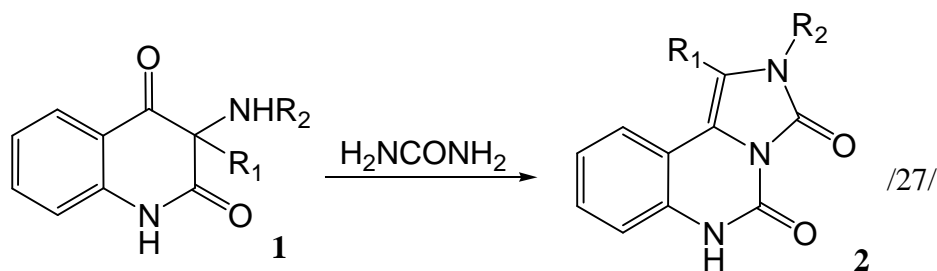
4 STANOVENÍ CÍLŮ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cíle diplomové práce byly definovány jejím zadáním. Hlavním úkolem bylo prostudování reaktivity 3-aminoderivátů-*1H,3H*-chinolin-2,4-dionů s thiomocovinou a thiokyanatanem draselným. Vedlejším úkolem bylo otestování připravených látek na možné protimikrobiální účinky.

5 VÝSLEDKY DIPL. PRÁCE S UVEDENÍM NOVÝCH POZNATKŮ

5.1 Preparativní chemická část

V jedné z prací prof. Klásek a jeho spolupracovníci popsali reakci 3-aminochinolin-2,4-dionů **1** s močovinou /27/.^[64] Látky **1** reagují tak, že vznikají odpovídající 2,6-dihydroimidazo[1,5-c]chinazolin-3,5-diony **2**.



Navržený mechanismus předpokládá adici aminoskupiny chinolonu **1** kyselinou isokyanatovou H–N=C=O (vzniká v reakční směsi termálním rozkladem močoviny kyselinou octovou) za vzniku látky **3**. Látka **3** vytváří intramolekulární reakcí imidazolový kruh za vzniku nestabilní látky **4**. Ta je v chinolonovém kruhu otevřena bazickou katalýzou (NH₃ z močoviny) za vzniku intermediátu **A**, který přechází na intermediát **B**. V intermediátu **B** dojde k intramolekulární adici imidového anionu isokyanátovou skupinou v intermediátu **B**. Tautomerní forma **C** přechází 1,3-vodíkovou výměnou na konečný produkt **5** (Schéma 1).

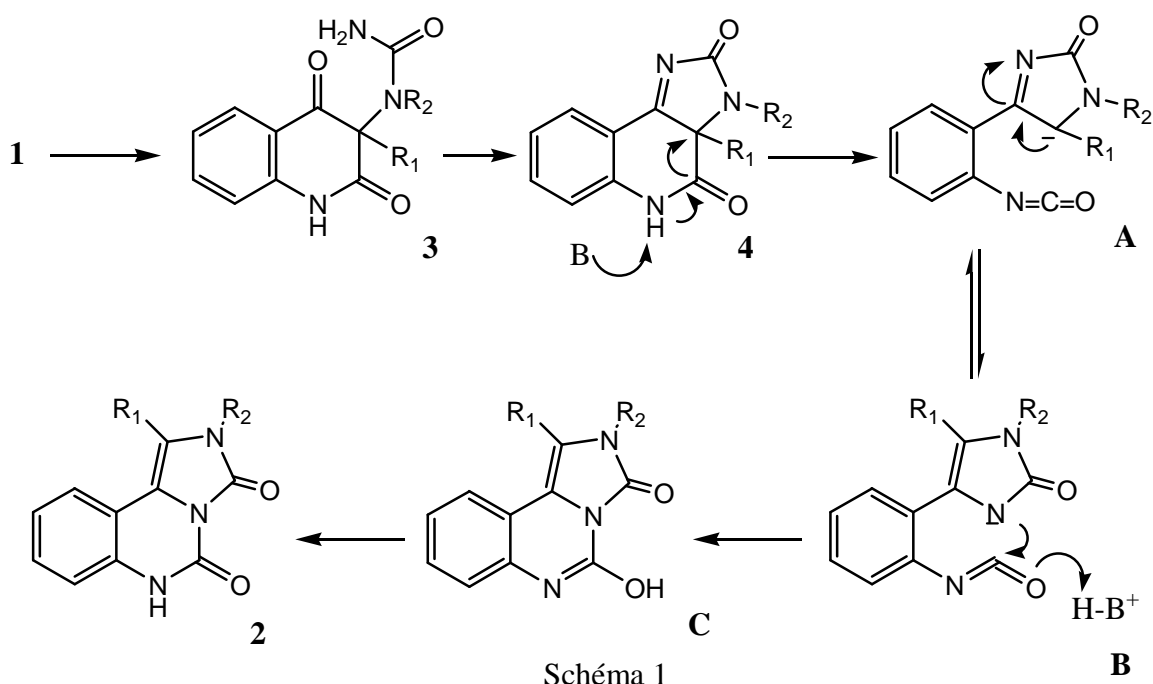
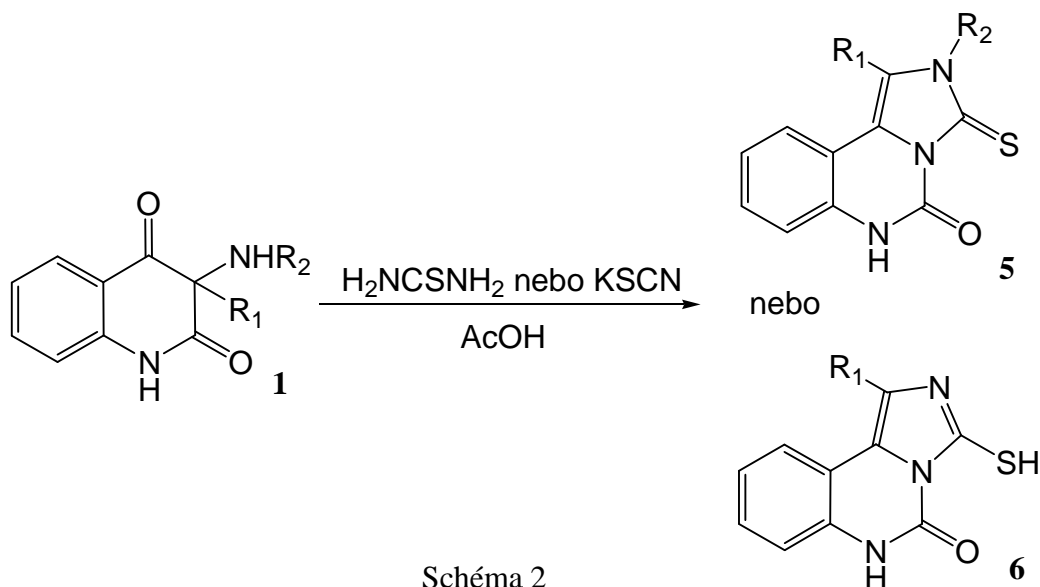


Schéma 1

Předpokládali jsme, že 3-aminochinolin-2,4-diony **1** budou reagovat s thiomocovinou podobně, ovšem za vzniku látek se sírou v poloze 3 za vzniku 3-thioximidochinazolín-5-onů **5**, **6**. Souběžně reakcemi s thiomocovinou jsme provedli reakce s thiokyanatanem draselným ve vroucí AcOH.



Tab. 3: Klíč substituentů látek **1a-i**

	Látka 1								
	a	b	c	d	e	f	g	h	i
R ₁	Bu	Bz	Ph	Ph	Bu	Bu	Bz	Bz	Ph
R ₂	H	H	H	Bu	Bu	Bz	Bu	Bz	Bz

Jako výchozí látky jsme zvolili řadu 3-aminochinolin-2,4-dionů **1a-i**. Očekávané produkty mají strukturu **5**. U výchozích látek **1a-c** mohou vznikat i tautomerní formy **6** (Schéma 2). Tautomerní forma se nám zdá být pravděpodobnější, protože jak bylo výše uvedeno v teoretické části ochota síry vytvářet dvojně vazby se sousedním atomem je nízká. A protože má v sousední poloze vodík na dusíku 2-N, který může být navázán na jednu z vazeb síry za současného vzniku dvojně vazby mezi dusíkem a uhlíkem. Tuto teorii však musíme podepřít výsledky z NMR spekter.

Během experimentální práce se ukázalo, že výtěžky vznikajících látek při reakci s thiomocovinou a KSCN jsou ve většině případů rozdílné.

Tab. 4: Výtěžky z reakcí látek **1a-i** s thiomočovinou a KSCN

Výchozí látka	Produkt	Výtěžek a reakční doba při reakci s					
		thiomočovinou	t [min]	KSCN	t [min]	močovinou ^[64]	t [min]
1a	6a	40%	30	97%	5	63%	90
1b	7b	nereaguje	30	77%	5	71%	20
1c	6c	33%	30	100%	4	90%	5
1d	5d	25%	30	86%	30	76%	30
1e	5e	37%	30	88%	30	95%	30
1f	5f	79%	30	92%	30	93%	30
1g	7g	9%	30	83%	5	87%	120
1h	7h	37%	30	81%	10	66%	120
1i	5i	33%	30	89%	30	—	—

Je patrné, že při porovnání výtěžnosti reakce s thiomočovinou a KSCN je s thiomočovinou dosahováno diametrálně nižších výtěžků než v případě KSCN. Většinou se výtěžky s thiomočovinou pohybovali v třetinových až polovičních hodnotách oproti s KSCN. při porovnání výsledků s reakcemi s močovinou z článku ^[64] je výtěžnost bližší k reakci s KSCN. Při porovnání s thiomočovinou jsou výsledky opět přibližně třetinové až poloviční. Domníváme se, že zásadní vliv má vznik kyseliny thiokyanaté, která příznivě ovlivňuje výtěžky. Vznik HSCN u reakce s thiomočovinou je nepravděpodobný.

Porovnání látek připravených reakcí thiomočovinou a KSCN s **1a-i** (Schéma 3)

Látka **6a**: tato látka byla připravena z **1a**. Teploty tání se shodují jak po reakci s KSCN a thiomočovinou. IR spektrum má maximum při 1720 cm^{-1} a jsou také shodná, tak i po EA a MS si odpovídají.

Látka **7b**: tato látka byla připravena z **1b**. Teploty tání jsou rozdílné po reakci s KSCN a thiomočovinou. IR spektrum má maximum látka připravená reakcí s KSCN při $1709, 1665$ a 1620 cm^{-1} . EA a MS si odpovídají látce navržené vypočteným a navrženým hodnotám. IR spektrum látky připravená reakcí s thiomočovinou bylo shodné s výchozí **1b**. Tak i teplota tání, EA i MS.

Látka **6c**: tato látka byla připravena z **1c**. Teploty tání se shodují jak po reakci s KSCN tak i s thiomočovinou. IR spektrum má maximum při 1730 cm^{-1} a jsou také shodná, tak i po EA a MS si odpovídají.

Látka **5d**: tato látka byla připravena z **1d**. Teploty tání se shodují jak po reakci s KSCN a thiomočovinou. IR spektrum má maximum při 1728 cm^{-1} a jsou také shodná. EA a MS byla provedena pouze pro látku připravenou s KSCN a odpovídá vypočteným a navrženým hodnotám.

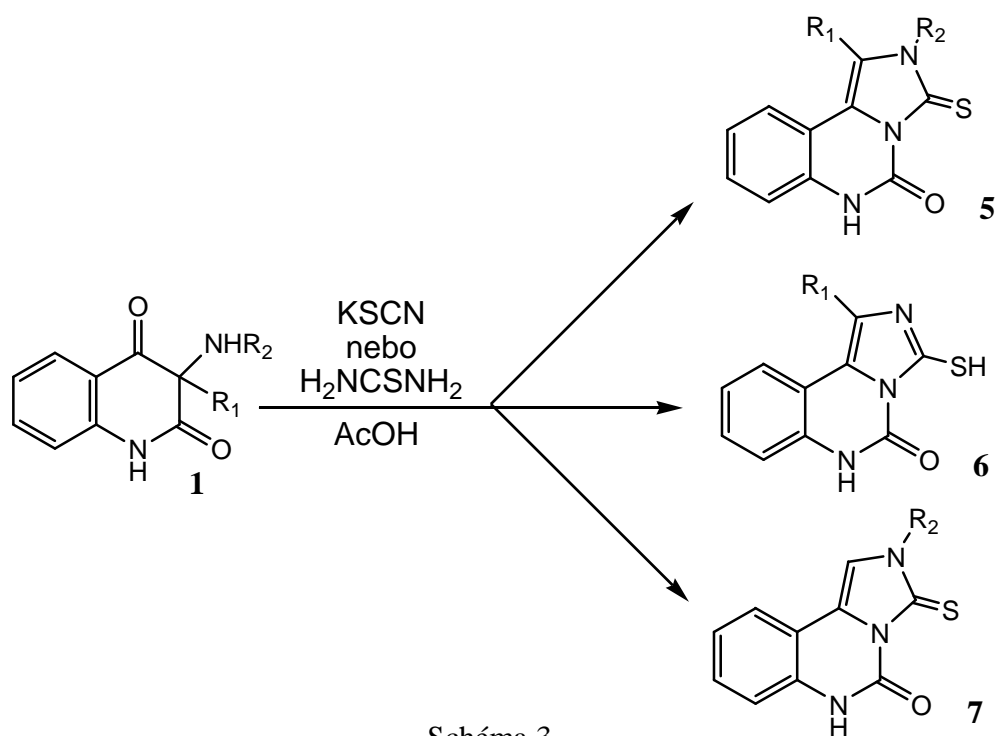
Látka **5e**: tato látka byla připravena z **1e**. Teploty tání se shodují jak po reakci s KSCN tak i s thiomočovinou. IR spektrum má maximum při 1728 cm^{-1} a jsou také shodná. EA a MS byla provedena pouze pro látku připravenou s KSCN a odpovídá vypočteným a navrženým hodnotám.

Látka **5f**: tato látka byla připravena z **1f**. Teploty tání se shodují jak po reakci s KSCN tak i s thiomočovinou. IR spektrum má maximum při 1730 cm^{-1} a jsou také shodná. EA a MS byla provedena pouze pro látku připravenou s KSCN a odpovídá vypočteným a navrženým hodnotám.

Látka **7g**: tato látka byla připravena z **1g**. Teploty tání se shodují jak po reakci s KSCN tak i s thiomočovinou. IR spektrum má maximum při $1660, 1615\text{ a }1570\text{ cm}^{-1}$ a jsou také shodná. EA a MS byla provedena pouze pro látku připravenou s KSCN a odpovídá vypočteným a navrženým hodnotám

Látka **7h**: tato látka byla připravena z **1h**. Teploty tání jsou rozdílné po reakci s KSCN a thiomočovinou. IR spektrum má maximum látka připravená reakcí s KSCN při $1660, 1615\text{ a }1570\text{ cm}^{-1}$, látka připravená reakcí s thiomočovinou má při $1700, 1690\text{ a }1665\text{ cm}^{-1}$. EA a MS pro látku připravenou s KSCN a odpovídá vypočteným a navrženým hodnotám látky **7h**. Pro látku připravenou reakcí s thiomočovinou byl nalezen pík 265 m/z po MS analýze. Tato hodnota by mohla odpovídat debenzylované výchozí látce **1h** v poloze R_1 (benzyl na R_2 zůstal zachován $m/z\ 106$) avšak EA analýza odpovídá jinému typu látky. Navržený sumární vzorec by mohl být $C_{11}H_{10}NO$. Ten však odporuje celkové molární hmotnosti stanovené pomocí MS, protože složení $C_{11}H_{10}NO$ odpovídá molární hmotnosti 172.

Látka **5i**: tato látka byla připravena z **1i**. Teploty tání se shodují jak po reakci s KSCN tak i s thiomočovinou. IR spektrum má maximum při 1727 cm^{-1} a jsou také shodná. EA a MS byla provedena pouze pro látku připravenou s KSCN a odpovídá vypočteným a navrženým hodnotám.



Podle navrženého mechanismu (Schéma 4) vzniku látek **5** nebo **6** předpokládá adici aminoskupiny chinolonu **1** kyselinou thiokyanatou H–S–CN (vzniká v reakční směsi reakcí KSCN s kyselinou octovou) za vzniku látky **A**. Látka **A** vytváří intramolekulární reakcí imidazolonový kruh za vzniku nestabilní látky **B**. Z látky **B** by mohli vznikat dvě látky a to **C** a **E**. To je způsobeno možností oddělení hydroxyskupiny pro látku **C** nebo dojde přednostně k otevření chinolonového kruhu u látky **B** za vzniku látky **E**. V prvním případě dochází k otevření chinolonového kruhu látky **C** až po odštěpení hydroxyskupiny za vzniku látky **D**. Ta však přechází po otevření kruhu na látku **E** u které se opět objevuje hydroxyskupina, která je definitivně eliminována v následujícím kroku u látky **F**. Z látky **F** vniká konečný produkt, látka **5** nebo **6** 3-thioimidazo[1,5-*c*]chinazolin-5-on.

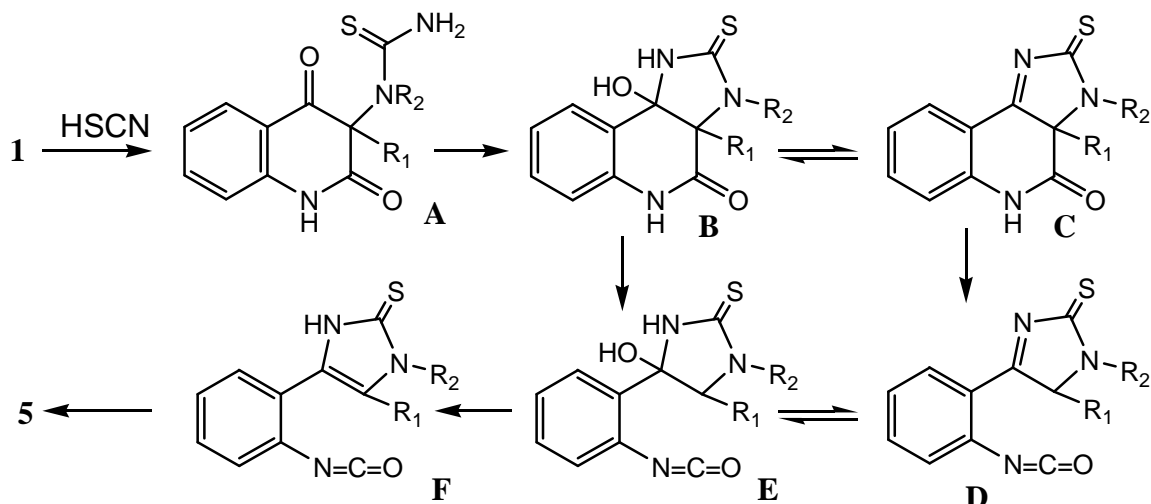


Schéma 4

Z uvedených maxim IR spekter je vidět, že látky by bylo možné pomyslně rozdělit do třech skupin:

- I. látky s jedním maximem v oblasti $1720\text{--}1730\text{ cm}^{-1}$; **6a**, **6c**, **5d**, **5e**, **5f**, a **5i**;
- II. látky se třemi maximy v oblasti 1660 , 1615 a 1570 cm^{-1} ; **7g** a **7h**;
- III. látka se třemi maximy v oblasti 1710 , 1665 a 1620 cm^{-1} ; **7b**.

V prvním případě lze toto zdůvodnit velmi podobnými substituenty jejich vzájemnými kombinacemi mezi sebou. Mírně z této skupiny svojí strukturou vybočují látky **6a** a **6c**, které v poloze N-2 nemají žádný substituent. Proto je IR spektrum v „alifatické“ oblasti $3400\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$ těchto látek jednodušší než li látek se substitucí i na N-2.

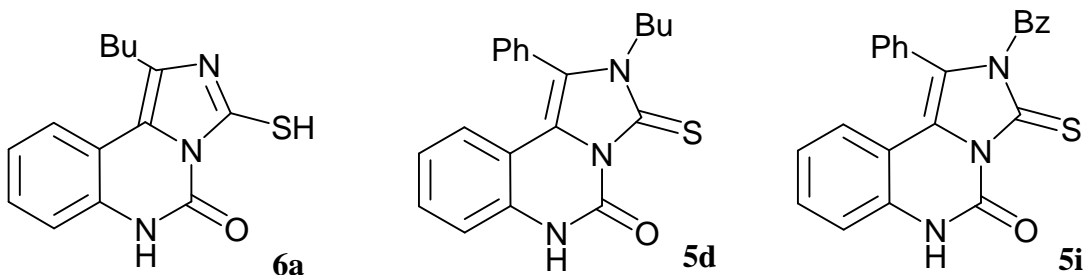
V druhém případě jde o látky, kdy v poloze R_1 byl za substituent umístěn benzyl. Tento benzyl u vyprodukovaných látek chyběl. Debenzylace vyplynula z EA a MS analýz. U látky **7g** nebyl benzylový fragment u MS nalezen (m/z 91) a u látky **7h** byl benzylový fragment nalezen. Avšak procentuální zastoupení prvků vyplývající z EA by odpovídalo taktéž debenzylované látce v poloze R_1 .

Třetí skupina obsahuje pouze látku **7b**. Své maximum v IR spektru má v uvedené oblasti. Jeho vzhled však připomíná vzhled spekter **7g** a **7h** u kterých došlo k debenzylaci polohy R_1 . Rozdíl je v „alifatické“ oblasti IR spektra kde u látky **7b** je jednodušší. Z toho důvodu, že poloha N-2 není ničím substituovaná. Je také zřejmé, že i u této látky došlo k debenzylaci polohy R_1 .

Proč dochází u látek **7b**, **7g** a **7h** k debenzylacím nejsme schopni zcela v tuto chvíli vysvětlit. S největší pravděpodobností k ní dochází vlivem vznikající HSCN v reakční směsi z KSCN a AcOH. Jak již bylo uvedeno v teoretické části patří HSCN k středně silným až silným kyselinám a proto by mohla být schopná oddělit benzyl při reakci z výchozích látek z polohy R₁. Naproti tomu není schopná oddělit benzyl z polohy N-2.

5.2 Mikrobiologické testování

Třetím úkolem této práce bylo prověření možných protimikrobních účinků námi připravených látek na některé typické mikrobiální zástupce a inhibici vybraných enzymů. Pro první skupinu testování byly vybrány následující látky **5i**, **5d** a **6a**. A to hlavně z důvodu dobré rozpustnosti těchto látek v DMSO.



V druhé sérii testování inhibici enzymů byli vybrány tyto látky, **5d**, **5e**, **5f**, **5i**, **6a** **7g** a **7h**. Kritériem výběru těchto látek byla jejich dokončená identifikace a purifikace v průběhu praktické části diplomové práce.

5.2.1 Mikrobiologické testování na mikrotitračních destičkách

Tato série testů byla provedena ve spolupráci s Ústavem inženýrství ochrany životního prostředí FT UTB ve Zlíně pod vedením doc. RNDr. Jana Růžičky, Ph.D.

Protimikrobiální testování bylo provedeno na mikrotitrační destičce. Na mikroorganismy se působilo pěti koncentracemi látek v DMSO. Získané data jsou uvedeny v následujících tabulkách.

Tab. 5: Koncentrace látek **6a**, **5i**, **5d** v jamkách mikrotitrační destičky

Látka	Molekulová hmotnost [g/mol]	Koncentrace základní roztok [g/l]	Koncentrace v jamce [mg/l]	Koncentrace v jamce [mM/l]
6a	273,35	1	25	0,091
		3	75	0,274
		5	125	0,457
		10	250	0,915
		20	500	1,829
5d	349,4	1	25	0,072
		3	75	0,215
		5	125	0,358
		10	250	0,716
		20	500	1,431
5i	383,11	1	25	0,065
		3	75	0,196
		5	125	0,326
		10	250	0,653
		20	500	1,305

Tab. 6: Vyhodnocení růstu mikroorganismů za přítomnosti látky **6a** za daných koncentrací

Mikroorganismus	Koncentrace [mg/l]				
	25	75	125	250	500
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	+
<i>Saccharomyces cerevesiae</i>	+	+	+	+	+

růst mikroorganismů: +

omezený růst mikroorganismů: ±

bez růstu mikroorganismů: –

Tab. 7: Vyhodnocení růstu mikroorganismů za přítomnosti látky **5d** za daných koncentrací

Mikroorganismus	Koncentrace [mg/l]				
	25	75	125	250	500
<i>Staphylococcus aureus</i>	±	±	±	–	–
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	+
<i>Saccharomyces cerevesiae</i>	+	+	+	+	+

růst mikroorganismů: +

omezený růst mikroorganismů: ±

bez růstu mikroorganismů: –

Tab. 8: Vyhodnocení růstu mikroorganismů za přítomnosti látky **5i** za daných koncentrací

Mikroorganismus	Koncentrace [mg/l]				
	25	75	125	250	500
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	+
<i>Saccharomyces cerevesiae</i>	+	+	+	+	+

růst mikroorganismů: +

omezený růst mikroorganismů: ±

bez růstu mikroorganismů: –

Z Tab. 6 až Tab. 8 lze vyčíst, že námi připravené látky nevykázali žádnou významnou protimikrobní aktivitu. Pouze v jednom případě, a to u látky **5d** při koncentracích 250 a 500 mg/l nebo li 0,716 a 1,431 mmol/l (Tab. 7). Kde došlo k výraznější inhibici růstu bakterie. Z těchto jamek byly vzaty vzorky na kultivaci na petriho miskách s univerzálním živným médiem. Abychom tak zjistili, nedošlo li vlivem látky **5d** k úhynu mikroorganismů anebo pouze k jejich růstové inhibici. Po 16 hodinové kultivaci petriho misek, byl zjištěn masivní nárůst biomasy *S. aurea* na naočkovaných plochách (viz Obr. 11 a Obr. 12). Z čehož vyvozujeme, že tato látka při daných koncentracích pouze zpomaluje růst bakterie *Staphylococcus aureus*. Což bylo zjištěno také vizuálně při porovnání ostatních naočkovaných jamek mikrotitračních destiček, ve kterých se objevil zákal živného média. U koncentrací nižších byl pozorován pouze méně intenzivní zákal oproti jiným jamkám.



Obr. 11: Nárůst biomasy *S. aurea* po naočkování na univerzální agar (**5d**, 250 mg/l)



Obr. 12: Nárůst biomasy *S. aurea* po naočkování na univerzální agar (**5d**, 500 mg/l)

5.2.2 Testování enzymatické inhibice

Tato série testů byla provedena ve spolupráci s Laboratoří růstových regulátorů Přírodovědecké fakulty UP v Olomouci pod vedením RNDr. Vladimíra Kryštofa, Ph.D.

V podstatě jde o otestování možnosti látek potlačit proteinkinázovou aktivitu enzymu CDK2/E, který je důležitý pro transkripci RNA. Enzym CDK má souvislost také s proteinem p53 který významně ovlivňuje transkripci avšak v lidských nádorových buňkách. ^[65]

Získané výsledky jsou uvedeny v následující tabulce Tab. 9.

Tab. 9: Výsledky měření biologické účinnosti látek **5d, 5e, 5f, 5i, 6a, 7g a 7h**

Látka	IC ₅₀		GI ₅₀		Max. aktivita
	CDK2/E	Abl	K-562	MCF7	Arn8/p53
6a	>20	>20	>100	>100	neaktivní
5d	>20	>20	X	X	X
5e	>20	>20	X	X	X
5f	>20	>20	X	X	X
5i	>20	>20	X	X	X
7g	>20	>20	X	X	X
7h	>20	>20	>100	>100	neaktivní

IC₅₀ – hodnota udává koncentraci (μM) inhibující 50% aktivity purifikovaného enzymu

GI₅₀ – hodnota udává koncentraci (μM) eliminující 50% buněk v třídním kultivačním testu

Aktivace p53 v buněčné linii je vyjádřena koncentrací (μM), při které dochází k maximální aktivaci.

Abl - tyrosinkináza

U záznamů z Tab. 9. označených jako X se nepodařilo látku na daný test použít z důvodu špatné rozpustnosti.

Z Tab. 9 můžeme vyvodit, že naše látky podrobené testování enzymatické inhibice nevykazovali, při dané koncentraci, žádné výrazné inhibiční vlastnosti ve vztahu k modelovým enzymům. Případná aktivita by měla ležet výrazně výše než li koncentrace 20 μM pro IC₅₀ nebo 100 μM pro GI₅₀. K aktivaci Arn8/p53 našimi látkami nedochází.

6 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Teploty tání byly měřeny na Köflerově bloku PolyTherm A nebo kapilárním bodotávku Büchi B-540. Infračervená spektra látek byla měřena přístroji Mattson 3000 nebo Nicolet technikou KBr tablet. MS/MS spektra látek byla naměřena na přístroji GC-MS QP2010 Shimadzu metodou přímého vstupu s rozsahem $m/z=50 - 600$. Ionizační podmínky 70eV, 200°C a metan jako reakční plyn. Elementární analýza látek byla provedena pomocí přístroje Thermo Elektron Corporation Flash EA 1112 Series v provedení CHNS. MS spektra a EA byly naměřeny v Laboratoři instrumentální analýzy ÚCH FT UTB ve Zlíně. NMR spektra látek byla naměřena přístrojem Bruke Avance (500,13 MHz pro ^1H a 125,76 MHz ^{13}C) v DMSO- d_6 . Chemické posuny ^1H a ^{13}C jsou uváděny ve stupnici δ [ppm] k vnitřnímu standardu TMS. NMR spektra byly naměřena na Výzkumném ústavu organické syntézy Rybitví, Pardubice. Průběh reakcí byl sledován pomocí metody chromatografie na tenké vrstvě (TLC). Jako mobilní fáze byly použity směsi benzen:ethyl-acetát (4:1) a chloroform:ethanol (9:1) na silufolu ALUGRAM[®] SIL G/UV₂₅₄.

6.1 Příprava 3-amino-3-alkyl(aryl)chinolin-2,4-dionů

Obecný postup přípravy N-substituovaného 3-aminochinolinu:

Odpovídající 3-alkyl/aryl-3-chlorchinolin-2,4-dion (**1d-i**) (1mmol) se rozpustí v DMF. K roztoku se pozvolna přikapává primární alkyl nebo arylamin (3mmol). Směs je míchána po dobu 1 – 3 dnů. Po uplynutí reakční doby se reakční směs vlije do 500ml ledové tříště. Vzniklá sraženina se důkladně zbaví přítomného DMF. Po vysušení se sraženina látky rozpustí v benzenu. Benzenový roztok se vytřepává 5%-ním roztokem HCl. Po vytřepání se vodná vrstva smíchá s aktivním uhlím, přefiltruje se. K filtrátu se přidá takové množství roztoku NH_4OH dokud roztok nepřejde do alkalické oblasti pH. Vypadlý aminochinolin se přefiltruje, promyje do neutrální reakce a po vysušení se rekrystalizuje v příslušném rozpouštědle. ^[67]

Obecný postup přípravy N-nesubstituovaného 3-aminochinolinu:

Odpovídající 3-alkyl/aryl-3-chlorchinolin-2,4-dion (**1a-c**) (1mmol) se rozpustí v DMF. Dále se připraví suspenze NH_4Cl (2mmol) v DMF. Tato suspenze se smísí s K_2CO_3 (4mmol). K suspenzi NH_4Cl a K_2CO_3 se pozvolna za intenzivního míchání přikapává roz-

tok chlorchinolinu. Reakční směs se míchána po dobu 1 – 3 dnů a dále zpracuje podle předešlého postupu.

6.2 Příprava 3-thioxo-2,6-dihydro-3*H*-imidazo[1,5*c*] chinazolin-5-onů

6.2.1 Metoda A

Obecný postup:

Odpovídající 3-amino-3-alkyl(aryl)chinolin-2,4-dion (**1a-i**) (1mmol) se společně s thiomochovinou (0,457g, 6 mmol) rozpustí v koncentrované kyselině octové (3ml). Reakční směs se vloží na olejovou lázeň (150 °C). Podle látky se refluxuje 5 až 30 minut. Po uběhnutí reakční doby se reakční směs vlije do 50 ml vody kde vypadne látka. Takto získané produkty se přefiltrují pře s fritu a promyjí vodou. Po vysušení se připravené látky rekrystalizují v odpovídajícím rozpouštědle (AcOH).

6.2.2 Metoda B

Obecný postup:

Odpovídající 3-amino-3-alkyl(aryl)chinolin-2,4-dion (**1a-i**) (1mmol) se společně s thiokyanatanem draselným (0,583g, 6 mmol) rozpustí v koncentrované kyselině octové (3ml). Reakční směs se vloží na olejovou lázeň (150 °C). Podle látky se refluxuje 30 minut. Po uběhnutí reakční doby se reakční směs vlije do 50 ml vody kde vypadne látka. Takto získané produkty se přefiltrují pře s fritu a promyjí vodou. Po vysušení se připravené látky rekrystalizují v odpovídajícím rozpouštědle (AcOH).

1-Butyl-3-thioxo-2,6-dihydro-3*H*-imidazo[1,5-*c*]chinazolin-5-on (6a)

Připraveno z **1a**

Výtěžek: metoda A – 40%; metoda B – 97% bezbarvých krystalů, t.t. 304 – 315 °C (AcOH) (dec)

EA pro C ₁₄ H ₁₅ N ₃ OS (273.35) vypočteno	61,51%C	5,53%H	15,37%N	11,73%S
stanoveno	61,55%C	5,50%H	15,31%N	11,71%S

IČ spektrum: 3080, 2947, 2925, 2865, 2748, 1721, 1636, 1615, 1589, 1498, 1448, 1386, 1360, 1285, 1253, 1226, 1127, 1075, 826, 779, 753, 741, 527 cm^{-1} ;

EIMS: m/z (%): 273 (M^+ , 59), 230 (100), 201(9), 187 (5), 172 (50), 144 (10), 130 (27), 116 (15), 102 (20), 90 (9), 77 (8), 63 (6), 52 (8);

3-Thioxo-2,6-dihydro-3H-imidazo[1,5-c]chinazolin-5-on (7b)

Připraveno z **1b**

Výtěžek: metoda B – 77% bezbarvých krystalů, t.t. >340 °C (AcOH) (dec)

EA pro $C_{16}H_{11}N_3OS$ (293.34) vypočteno	55,29%C	3,25%H	19,34%N	14,76%S
stanoveno	54,33%C	3,70%H	15,89%N	12,44%S

IČ spektrum: 3071, 3013, 2845, 2729, 2596, 1709, 1665, 1619 1574, 1500, 1450 1426, 1385, 1339, 1258, 1232, 1200, 1164, 1154, 1038, 1000, 964, 641, 885, 769, 687, 662, 624, 602, 515 cm^{-1} ;

EIMS: m/z (%): 217 (M^+ , 100), 207 (9), 185 (18), 157 (7), 118 (5), 103 (23), 91 (5), 76 (14), 65 (7), 51 (9);

1-fenyl-3-thioxo-2,6-dihydro-3H-imidazo[1,5-c]chinazolin-5-on (6c)

Připraveno z **1c**

Výtěžek: metoda A – 16%; metoda B – 76% žlutých krystalů, t.t. 356 – 362 °C (AcOH) (dec)

EA pro $C_{16}H_{11}N_3OS$ (293.34) vypočteno	65,51%C	3,78%H	14,32%N	10,93%S
stanoveno	65,30%C	3,76%H	14,54%N	11,00%S

IČ spektrum: 3077, 2986, 2919, 1731, 1633, 1615, 1591, 1506, 1488, 1445, 1388, 1345, 1256, 1224, 1159, 1131, 1101, 1067, 781, 754, 699, 669, 569 cm^{-1} ;

EIMS: m/z (%): 293 (M^+ , 100), 260 (10), 234 (17), 206 (8), 190 (8), 117 (9), 104 (16), 89 (6), 77 (9), 51 (5);

2-Butyl-1-fenyl-3-thioxo-2,6-dihydro-3H-imidazo[1,5-c]chinazolin-5-on (5d)Připraveno z **1d**

Výtěžek: metoda A – 25%; metoda B – 86% bezbarvých krystalů, t.t. 265 – 267 °C (AcOH)

EA pro C ₂₀ H ₁₉ N ₃ OS (349,45) vypočteno	68,74%C	5,48%H	12,02%N	9,18%S
stanoveno	68,55%C	5,46%H	11,98%N	8,97%S

IČ spektrum: 3226, 3163, 3098, 2955, 2932, 2871, 1727, 1654, 1615, 1592, 1484, 1394, 1375, 1330, 1292, 1266, 1229, 1183, 1134, 1076, 1061, 1025, 1000, 921, 864, 829, 790, 757, 742, 711, 696, 671, 588 cm⁻¹;EIMS: *m/z* (%): 349 (M⁺, 37), 316 (100), 293 (45), 260 (6), 233 (13), 206 (8), 190 (8), 149 (7), 135 (7), 111 (11), 104 (19), 97 (19), 85 (21), 71 (29), 57 (55);**1,2-Dibutyl-3-thioxo-2,6-dihydro-3H-imidazo[1,5-c]chinazolin-5-on (5e)**Připraveno z **1e**

Výtěžek: metoda A – 37%; metoda B – 88% bezbarvých krystalů, t.t. 273 – 274 °C (AcOH)

EA pro C ₁₈ H ₂₃ N ₃ OS (329,46) vypočteno	65,62%C	7,04%H	12,75%N	9,73%S
stanoveno	65,37%C	7,03%H	12,81%N	9,68%S

IČ spektrum: 3239, 3190, 3130, 2956, 2930, 2871, 1727, 1629, 1612, 1590, 1490, 1467, 1377, 1342, 1291, 1261, 1231, 1154, 1134, 1080, 1052, 1016, 937, 909, 822, 741, 696, 682, 660, 574, 556, 537 cm⁻¹;EIMS: *m/z* (%): 329 (M⁺, 44), 296 (100), 272 (12), 254 (7), 245 (8), 231 (31), 172 (15), 130 (10), 69 (6), 55 (16);**2-Benzyl-1-butyl-3-thioxo-2,6-dihydro-3H-imidazo[1,5-c]chinazolin-5-on (5f)**Připraveno z **1f**

Výtěžek: metoda A – 79%; metoda B – 95% bezbarvých krystalů, t.t. 253 – 254 °C (AcOH)

EA pro C ₂₁ H ₂₁ N ₃ OS (363,48) vypočteno	69,39%C	5,82%H	11,56%N	8,82%S
stanoveno	69,52%C	5,53%H	11,58%N	8,72%S

IČ spektrum: 3190, 2955, 2928, 2870, 1729, 1612, 1590, 1492, 1455, 1397, 1375, 1324, 1291, 1245, 1216, 1153, 1126, 1089, 1054, 1023, 967, 911, 841, 822, 754, 741, 710, 695, 585, 569, 550, 535 cm^{-1} ;

EIMS: m/z (%): 363 (M^+ , 65), 330 (77), 321 (15), 288 (6), 272 (19), 230 (28), 218 (9), 172 (10), 130 (7), 97 (7), 91 (100), 85 (10), 71 (12), 65 (16), 57 (20);

2-Butyl-3-thioxo-2,6-dihydro-3H-imidazo[1,5-c]chinazolin-5-on (7g)

Připraveno z **1g**

Výtěžek: metoda A – 9%; metoda B – 96% bezbarvých krystalů, t.t. >350 °C (dec) (AcOH)

EA pro $C_{14}H_{15}N_3OS$ (273.35) vypočteno	61,51%C	5,53%H	15,37%N	11,73%S
stanoveno	61,58%C	5,53%H	15,57%N	11,59%S

IČ spektrum: 3101, 2993, 2870, 1661, 1615, 1571, 1520, 1500, 1466, 1442, 1370, 1347, 1289, 1256, 1243, 1208, 1151, 1101, 1035, 939, 853, 799, 746, 699, 679, 603, 536 cm^{-1} ;

EIMS: m/z (%): 273 (M^+ , 47), 240 (62), 231 (8), 217 (100), 129 (12), 103 (11);

2-Benzyl-3-thioxo-2,6-dihydro-3H-imidazo[1,5-c]chinazolin-5-on (7h)

Připraveno z **1h**

Výtěžek: metoda A – 37%; metoda B – 81% bezbarvých krystalů, t.t. 370 – 388 °C (AcOH)

EA pro $C_{17}H_{13}N_3OS$ (307,37) vypočteno	66,43%C	4,26%H	13,67%N	10,43%S
stanoveno	66,37%C	4,27%H	13,46%N	10,15%S

IČ spektrum: 3420, 3103, 3046, 2991, 2890, 2836, 1659, 1614, 1571, 1518, 1496, 1477, 1456, 1434, 1377, 1346, 1322, 1254, 1201, 1145, 1102, 1077, 1033, 993, 935, 868, 794, 751, 705, 674, 604, 585, 528 cm^{-1} ;

EIMS: m/z (%): 307 (M^+ , 365), 274 (24), 137 (5), 129 (7), 97 (11), 92 (9), 91 (100), 83 (13), 71(13), 69 (15), 59 (22), 55 (33);

2-Benzyl-1-fenyl-3-thioxo-2,6-dihydro-3H-imidazo[1,5-c]chinazolin-5-on (5i)

Připraveno z **1i**

Výtěžek: metoda A – 36%; metoda B – 89% bezbarvých krystalů, t.t. 282 – 284 °C (AcOH)

EA pro C ₂₃ H ₁₇ N ₃ OS (383,47) vypočteno	72,04%C	4,47%H	10,96%N	8,36%S
stanoveno	72,11%C	4,51%H	10,94%N	8,16%S

IČ spektrum: 3230, 3166, 3102, 3064, 3003, 2946, 1727, 1645, 1590, 1484, 1443, 1425, 1382, 1324, 1253, 1233, 1077, 836, 789, 758, 743, 712, 700, 670, 568 cm⁻¹;

EIMS: *m/z* (%): 383 (M⁺, 64), 350 (99), 234 (91), 206 (15), 149 (6), 135 (12), 111 (11), 104 (13), 97 (16), 91 (100), 85 (19), 71 (26), 65 (20), 57 (50);

¹H NMR a ¹³C NMR spektra všech látek nebyla do sepsání této práce dodána.

6.3 Mikrobiologické testování

6.3.1 Testování na mikrotitrační destičce

K prověření možné protimikrobní aktivity vybraných látek (**6a**, **5d**, **5i**) byli vybráni typičtí zástupci mikroorganismů. Jak zástupce (G+) bakterií – *Staphylococcus aureus* CCM 3953, jako zástupce (G-) bakterií – *Escherichia coli* CCM 3954 a jako zástupce kvasinek - *Saccharomyces cerevesiae* CCM 8191. Na každý mikroorganismus bylo působeno všemi látkami v daných koncentracích.

Jako metoda, z časových důvodů, byla zvolena metoda kultivace na mikrotitrační destičce, přestože jsme si vědomi některých omezení, viz diplomová práce Ing. Romana Kimmla. [66]

Postup:

Příprava roztoků látek **6a**, **5d**, **5i**

Do vysterilizovaných odměrných baněk (5ml, t=170°C po dobu 2h) bylo sterilní špachtlí naváženo příslušné množství látky (5; 15; 25; 50; 100 mg) testovaných látek. Látky byly

rozpuštěny v DMSO, z důvodu velmi nízké rozpustnosti našich látek v jiných rozpouštědlech a také z důvodu použití v předešlé diplomové práci. ^[66] Po dokonalém rozpuštění byly roztoky doplněny po risku.

Takto byli připraveny roztoky o koncentracích 1; 3; 5; 10; a 20 g/l látek **6a**, **5d**, **5i** v DMSO.

Příprava živného média (tryptický sojový bujon TSB)

Používaný k testování bakterií a kvasinek

Složení: enzymatický kaseinový hydrolyzát (Imuna).....	2,2g
sojová pepton (Himedia).....	0,4g
D-glukóza (p.a., Lachema).....	1,2g
NaCl (p.a., Lachema).....	0,6g
K ₂ HPO ₄ (p.a., Lachema).....	0,3g
Destilovaná voda.....	100ml

Do infuzní láhve se naváží dané množství přísad. Nadávku je se destilovaná voda a po dokonalém rozpuštění se provede sterilizace. V našem případě jsme zvolili sterilizaci za studena přes komerční filtr Millipore, Millex[®] GS ($d_{\text{filtru}} = 33\text{mm}$, $d_{\text{pórů}} = 0,22\mu\text{m}$, sterilizace ethylenoxidem).

Očkování TSB a přidavek roztoků látek

Podle navrženého schématu se do sterilních jamek mikrotitrační destičky dávkovalo sterilní špičkou 145 μl TSB, dále 5 μl testované látky v DMSO a 50 μl suspenze mikroorganismů ve sterilním fyziologickém roztoku (2. stupeň podle McFarlanda). Dále byly nadávkovány pouze jamky TSB pro kontrolu sterility. Výsledné koncentrace látek v jamkách jsou následující 25, 75, 125, 250, 500 mg/l.

Inkubace

Inkubace bakterií byla provedena v inkubátoru při teplotě 37 °C po dobu 48 hodin. Inkubace kvasinky byla provedena volně za laboratorní teploty 25 °C po dobu 48 hodin.

Vyhodnocení

Vyhodnocení růstu bylo provedeno vizuálně podle množství vytvořeného zákalu v živném bujónu. Z vybraných jamek byly dále vyočkovány na petriho misku s univerzálním živným médiem.

6.3.2 Testování enzymatické inhibice

Metodika je popsána blíže a podrobně v literatuře ^[65].

ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zabývala v teoretické části aspekty výskytu, biologického působení a použití v lékařství chinolinů jako látek běžně se vyskytujících v životním prostředí. Ze získaných informací lze tvrdit, že chinoliny se výhradně vyskytují v rostlinné říši. Jsou schopny potlačovat různé patologické mikroorganismy, především bakterie a prvoky.

Synteticky připravené chinoliny našly rozsáhlé uplatnění v klinické praxi a jsou dále intenzivně studovány. Chinoliny pomáhají při léčbě různých nemocí jako je např. malárie, tuberkulóza, nemoci CNS a dalších.

Praktická část diplomové práce se zaměřila na dvě hlavní oblasti. A to na problematiku přípravy nových 3-thioxo-2,6-dihydro-3*H*-imidazo[1,5-*c*]chinazolin-5-onů a otestování těchto látek nevykazují li biologickou aktivitu ve smyslu potlačení mikroorganismů.

3-thioxoimidazochinazolin-5-ony jsme se pokusili připravit dvěma cestami. Reakcí 3-alkyl(aryl)-3-aminochinolin-2,4-dionů s thiomocovinu nebo s thiokyanatanem draselným. Z původně očekávaných látek **5d**, **5e**, **5f**, **5i** a **6a**, **6c** jsme získali navíc i látky **7b**, **7g**, a **7h**. Látky **7b**, **7g**, a **7h** se odlišovali od jiných přítomností benzylu v poloze 1. Tento substituent byl během reakce jak s KSCN tak i s thiomocovinou odtržen – došlo k debenzylaci. Předpokládáme, že hlavním důvodem debenzylace je přítomnost kyseliny thiokyanaté v reakční směsi, která by mohla mít schopnost debenzylaci podpořit.

V mikrobiologické části jsme testovali vybrané látky (**6a**, **5d**, **5i**) nepůsobí li inhibičně nebo likvidačně na vybrané zástupce mikroorganismů. Testy jsme provedli metodou mikrotitračních destiček. Z vybraných látek byla aktivní pouze látka **5d**. Ta dokázala inhibovat bakterii *Staphylococcus aureus* při koncentraci 250 a 500 mg/l.

Při testování na enzymatickou inhibici žádná námi připravená látka nevykazovala inhibiční charakter. To že naše látky nevykazovali žádnou významnou mikrobiologickou aktivitu připisuje velmi špatné rozpustnosti ve vodním prostředí a tím i dostupnost látek mikroorganismům.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Ukrainets I.V., et al.: Khim. Geterotsikl. Soed., 1994, č. 7, s. 958.
- [2] Ukrainets I.V., et al.: Khim. Geterotsikl. Soed., 1994, roč. 10, s. 1400.
- [3] Ukrainets I.V., et al.: Khim. Geterotsikl. Soed., 1995, roč. 2, s. 204.
- [4] Girges M. M., et al.: Collect. Czech Chem. Commun., 1998, roč. 53, s. 3179.
- [5] Lunney E.A., et al.: J. Med. Chem., 1994, roč. 37, č. 17, s. 2664.
- [6] Kitamura S., Hashizume K., Iida T., Miyashita E., Shirata K., Kase H.: J. Antibiot., 1986, roč. 39, s. 1160.
- [7] Laschober R., Stadlbauer W.: Liebigs Ann Chem., 1990, s. 1083.
- [8] Beecham Group Ltd. (Buckle D. E., Cantello B.C.C., Smith H., investors): ger. Offen, 197, roč. 42, č. 076, s. 424; Chem Abstr., 1975, roč. 82, s. 139976.
- [9] Buckle D. E., Cantello B.C.C., Spicer, B. A.: J. Med. Chem., 1975, roč. 18, s. 726.
- [10] Buckle D. E., Outred D. J., Ross J.W., Smith H., Smith R. J., Spicer B.A., Gasson B.: J. Med. Chem., 1979, roč. 22, s. 158.
- [11] Malle E., Stadelbauer W., Ostermann G., Hoffmann B., Leis H. J., Kostner G. M.: Eur. J. Med. Chem., 1990, roč. 25, s. 137.
- [12] Sikorová Pavlína; Přírodní chinolony a jejich biologické účinky, bakalářská práce, FT UTB ve Zlíně, 2006.
- [13] Randrianarivelojosia M. et al., Malaria journal, 2003, roč. 2.
- [14] Strigacova J. et al., Folia microbiologica, 2000, roč. 45, č. 4, s. 305-309, ISSN 0015 – 5632.
- [15] Cho K. H., Lee C. H., Lee H. S., Journal of microbiology and biotechnology, 2005, roč. 15, s. 646 – 651.
- [16] Starratt A. N., Caveney S., Phytochemistry, 1996, roč. 40, č. 5, s. 1477 – 1478.
- [17] Horn Gert et al., Eur. J. Lipid Sci. Medicin. 2008, roč. 110, s. 662 – 667
- [18] Hampl, František; Rádl, Stanislav; Paleček, Jaroslav; Farmakochemie; vydavatelství VŠCHT; Praha; 2.vydání; ISBN 978-80-7080-639-5; 2007.

- [19] Přiborský, Jan; Chinolony. Farmakologie a klinická farmakologie; MAXDORF, Praha, 2000; ISBN 80-85912-16-3.
- [20] Black, M .T. et al., Antimicrobial agents and chemotherapy, 2008, roč. 52, s. 3339 – 3349, ISSN 0066-4804.
- [21] Sentilkumar P. et al., European Journal of Medicinal Chemistry, 2002, roč. 44, s. 345 – 358.
- [22] El-Subbagh, H. I. et al., Arch. Pharm. Med. Chem., 1999, roč. 332, s. 19 – 24.
- [23] Matsuoka M. et al., Chem. Pharm. Bull., 1999, roč. 47, č. 12, s. 1765 – 1773.
- [24] Foley M., Tilley L., International journal for parasitology, 1997, roč. 27, č. 2, s. 231 – 240.
- [25] Dorn A. et al., Biochemical pharmacology, 1998, roč. 55, s. 727 – 736.
- [26] Kumar S. et al., Life Medicin, 2007, roč. 80, s. 813 – 828.
- [27] Zamble A. et al., Chem. Phar. bull., 2007, roč. 55, č. 4, s. 243 – 245.
- [28] Deraeve C. et al., Chemistry a european journal, 2008, roč. 14, s. 682 – 696.
- [29] Kulkarni P. V. et al., Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, 2005, roč. 241, s. 676 – 680.
- [30] Murkami-Kubo I. et al., Journal of virology, 2004, roč. 78, č. 3, s. 1281 – 1288.
- [31] Nayyar Amit et al., Bioorganic and Medicinal chemistry, 2007, roč. 15, č. 2, s. 626 – 640.
- [32] Wichterle, Oto; Petrů, František; Anorganická chemie; Nakladatelství ČSAV; Praha; 1.vydání; 1953.
- [33] Beyer, Hans; Organická chemie; SNTL; Praha; 1958.
- [34] Lukeš, Rudolf; Vaculík, P.; Trojánek, J.; Organická chemie I.; Nakladatelství ČSAV; Praha; 1954.
- [35] Gažo, Ján; a kol.; Všeobecná a anorganická chémia; Alfa, Bratislava, 1. vydání; 1974.
- [36] ChemDat, databáze společnosti Merck, CD-ROM, 2005.
- [37] Andrlík, K.; a kol.; Chemické tabulky; SNTL; Bratislava; 2. vydání; 1967.

- [38] Březina, František; a kol.; Chemické tabulky anorganických sloučenin; SNTL; Praha; 1. vydání; 1986.
- [39] Remy, Heinrich; Anorganická chemie, I. díl; SNTL; Praha; 1. vydání; 1961.
- [40] Mastrangelo G. et al., Medical hypohese, 2008, roč. 71, s. 551 – 563.
- [41] Weingartner J., et al., Deutsche lebensmittel-rundschau, 2003, roč. 99, s. 403 – 408, ISSN 0012-0413.
- [42] Weingartner J. et al., Deutsche lebensmittel-rundschau, 2003, roč. 99, č. 10, s. 403 – 408, ISSN 0012-0413.
- [43] Weingartner J. et al., Deutsche lebensmittel-rundschau, 2003, roč. 99, č. 8, s. 307 – 310, ISSN 0012-0413.
- [44] Dykhuizen R. S. et al., Royal society of chemistry Medicin publications, 1999, roč. 237, s. 295 – 316, ISSN 0260-6291.
- [45] Okáč Arnošt; Analytické reakce; Nakladatelství ČSAV; Praha, 4.vydání; 1961.
- [46] Kralova K., Kissova K., Svajlenova O., Vanco J.. Chemical papers – Chemicke zvesti, 2004, roč. 58, s. 357-361, ISSN 0366-6352.
- [47] Červinka, Otakar; Dědek, Václav; Ferles, Miloslav; Organická chemie; SNTL; Praha; 1. vydání, 1970.
- [48] Hradil, Pavel; Moderní metody organické syntézy v reakčních schématech; UP Olomouc; 1.vydání; ISBN 978-80-244-1657-1; 2007.
- [49] Klásek A., Polis J., Mrkvička V., Kosmrlj J.; Journal of heterocyclic chemistry, 2002, roč. 39, č. 6, s. 1315 – 1320, ISSN 0022-152X.
- [50] Červinka, Otakar; a kolektiv; Organická chemie; SNTL; Praha; 2. vydání; 1980.
- [51] Šešulka, Vilém; Analýza paliv; SNTL; 1. vydání; Praha; 1970.
- [52] Večeřa, Miroslav; Panchartek, Josef; Laboratorní příručka organické chemie; SNTL, Praha, 1.vydání; 1987.
- [53] Murray, R.K. a kol.; Harperova biochemie; nakladatelství H+H; 4.vydání; 2002.
- [54] Vokurka, M.; Hugo, J.; Velký lékařský slovník; Maxdorf; Praha, 5. vydání; 2005.

- [55] Yonova P. A., Stoikova G. M., *Journal of plant growth regulation*, 2005, roč. 23, s. 280 – 291.
- [56] Mahajan A. et al., *Bioorganic and medicinal chemistry letters*, 2007, roč. 17, s. 5683-5685, ISSN 0960-894X.
- [57] Pospíšil, Jan; *Antioxidanty*; Academia ČSAV; Praha; 1.vydání; 1968.
- [58] Melichar, Bohuslav a kol.; *Chemické léčiva*; Avicenum, Praha; 3.vydání; 1987.
- [59] Kováč, J., Krutošíková, A., Kada, R.; *Chémia heterocyklických zlúčenin*; VEDA – vydavateľství SAV; Bratislava; 1.vydání; 1982.
- [60] Lhassane Ismaili et al., *European journal of medicinal chemistry*, 2008, roč. 43, s. 1270 – 1275.
- [61] Selvi S. T. et al., *Bioorganic and medicinal chemistry*, 2006, roč. 14, s. 3896 – 3903.
- [62] *Organická syntéza*; Academia ČSAV; Praha; 1.vydání; 1971.
- [63] Vaculík, Pavel; *Chemie monomerů I*; ČSAV; 1.vydání; 1956.
- [64] Klásek A., Kořistek K., Lyčka A., Holčapek M.; *Tetrahedron*, 2003, roč. 59, s. 1283 – 1288.
- [65] Kryštof V. et al.; *Cellular and Molecular Life Science*, 2005, roč. 62, s. 1763 – 1771.
- [66] Kimmel Roman; *Příprava a reakce derivátů chinolin-2,4-dionů s atomem síry v poloze 3*; diplomová práce; FT UTB ve Zlíně; 2006.
- [67] Kafka S., Kořistek K., Polis J., Košmrlj J., *Heterocycles*, 2002, roč. 57, č. 9, s. 1659 – 1682, ISSN 0385-5414.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AcOH	kyselina octová
Bz	benzyl
d	průměr
CDK	cyclin-dependent kináza
dec	rozklad látky při stanovování teploty tání
DMF	N,N-dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
CNS	centrální nervová soustava
EA	elementární analýza
Et	ethyl
(G)+	gramnegativní bakterie
(G)-	grampozitivní bakterie
IR	infrared = infračervený
KSCN	thiokyanatan draselný
Me	methyl
MeO	methoxy
MS	hmotnostní spektrum, hmotnostní analýza
TMS	tetramethylsilan
TSB	tryptický sójový bujón
t.t.	teplota tání

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: <i>Plasmodium falciparum</i>	12
Obr. 2: routa halebská.....	13
Obr. 3: <i>Ephedra pachyclada</i>	13
Obr. 4: bělotrn kulatohlavý.....	14
Obr. 5: <i>Zanthoxylum tsihanimposa</i>	16
Obr. 6: <i>Microdesmis keayana</i>	17
Obr. 7: infračervené spektrum thiokyanatanu draselného (Matson 3000).....	21
Obr. 8: řasa <i>Chlorella vulgaris</i>	22
Obr. 9: infračervené spektrum thiomočoviny (Matson 3000).....	27
Obr. 10: <i>Aspergillus flavus</i>	31
Obr. 11: Nárůst biomasy <i>S. aurea</i> po naočkování na univerzální agar (2d , 250mg/l).....	44
Obr. 12: Nárůst biomasy <i>S. aurea</i> po naočkování na univerzální agar (2d , 500mg/l).....	44

SEZNAM TABULEK

Tab. 1: Chemickofyzikální vlastnosti thiokyanatanu draselného	20
Tab. 2: Chemickofyzikální vlastnosti thiomčoviny	27
Tab. 3: Klíč substituentů látek 1a-i	37
Tab. 4: Výtěžky z reakcí látek 1a-i	38
Tab. 5: Koncentrace látek 6a, 5i, 5d v jamkách mikrotitrační destičky	43
Tab. 6: Vyhodnocení růstu mikroorganismů za přítomnosti látky 6a za daných koncentrací	43
Tab. 7: Vyhodnocení růstu mikroorganismů za přítomnosti látky 5d za daných koncentrací	43
Tab. 8: Vyhodnocení růstu mikroorganismů za přítomnosti látky 5i za daných koncentrací	44
Tab. 9: Výsledky měření biologické účinnosti látek 5d, 5e, 5f, 5i, 6a, 7g a 7h	45