

Katedra organické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého  
v Olomouci



Diplomová práce

**Příprava bisheterocyklických derivátů 2-substituovaných-3-  
hydroxychinolin-4(1*H*)-on-7-karboxamidů**

Vypracovala:

Vedoucí diplomové práce:

Studijní obor:

Veronika Fülöpová

RNDr. Miroslav Sural, Ph.D.

Organická chemie

**Olomouc 2011**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Miroslava Sourala, Ph.D., za použití pramenů, které uvádím v seznamu literatury.

V Olomouci dne

Veronika Fülöpová

Na tomto místě bych ráda poděkovala RNDr. Miroslavu Suralovi, Ph.D. za jeho podporu, rady a cenné připomínky při řešení a zpracování dané problematiky. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Petru Funkovi za jeho trpělivé odpovědi na mé všetečné dotazy, jakožto i všem pracovníkům Katedry organické chemie PŘF UP.

Tato práce by nevznikla bez pochopení mé rodiny a partnera, kterým rovněž patří můj dík.

# Obsah

<b>Obsah</b> .....	<b>4</b>
<b>Seznam zkratek</b> .....	<b>6</b>
<b>1. Úvod</b> .....	<b>7</b>
<b>2. Cíl práce</b> .....	<b>7</b>
<b>3. Obecné metody příprav derivátů 3-hydroxy-4(1H)-chinolonu</b> .....	<b>9</b>
3.1. <i>Souhrn substrátů pro syntézu derivátů 3-hydroxy-4(1H)-chinolonu</i> .....	9
3.2. <i>Další modifikace syntéz 3-hydroxy-4(1H)-chinolonu</i> .....	10
3.2.1. <i>Cyklizační metody</i> .....	10
3.3. <i>Příprava bisheterocyklických derivátů 3-hydroxy-4(1H)-chinolonu</i> .....	11
<b>4. Biologická aktivita vybraných derivátů 3-hydroxy-4(1H)-chinolonů</b> .....	<b>18</b>
4.1. <i>Antiprotozoální a fungicidní aktivita hydroxychinolonů</i> .....	19
4.2. <i>Virostatická aktivita hydroxychinolonů</i> .....	20
4.3. <i>Imunosupresivní aktivita hydroxychinolonů</i> .....	21
4.4. <i>Cytotoxická aktivita hydroxychinolonů</i> .....	22
4.5. <i>Další využití hydroxychinolonů</i> .....	23
<b>5. Fluorescenční vlastnosti 2-substituovaných-3-hydroxy-4(1H)-chinolonů</b> .....	<b>24</b>
<b>6. O-fenylendiaminy jako důležité prekurzory heterocyklických sloučenin</b> .....	<b>26</b>
6.1. <i>Benzimidazoly</i> .....	26
6.2. <i>Chinoxalin a jeho deriváty</i> .....	27
6.2.1. <i>Chinoxalin-2(1H)-ony</i> .....	28
6.2.2. <i>Dihydrochinoxaliny</i> .....	30
6.2.3. <i>Tetrahydrochinoxaliny</i> .....	31
6.3. <i>Benzodiazepin a jeho deriváty</i> .....	31

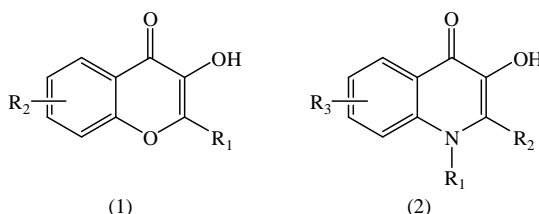
6.3.1. Benzodiazepin-2-ony.....	32
6.4. Benzotriazoly.....	32
<b>7. Výsledky a diskuse.....</b>	<b>32</b>
7.1. První strategie syntézy cílového benzimidazol-hydroxychinolonu.....	32
7.1.1. Syntéza prekursoru (VIII) .....	33
7.1.1.1. Imobilizace 3-aminopropanolu.....	34
7.1.1.2. Modifikace hydroxy skupiny.....	35
7.1.2. Výstavba bisheterocyklu benzimidazol-hydroxychinolon .....	37
7.1.2.1. První pokus o experimentální syntézu bisheterocyklu .....	<b>38</b>
7.2. Druhá strategie syntézy cílového benzimidazol-hydroxychinolonu .....	40
7.2.1. Syntéza výchozího prekursoru (XXIII).....	41
7.2.2. Druhý pokus o experimentální syntézu bisheterocyklu.....	42
<b>8. Experimentální část.....</b>	<b>45</b>
8.1. Obecný postup štěpení reakčních produktů z polymerního nosiče (standardní štěpení).....	45
8.2. Experimentální syntéza na pevné fázi.....	46
8.2.1. První strategie syntézy.....	46
8.2.2. Druhá strategie syntézy .....	52
<b>9. Závěr.....</b>	<b>57</b>
<b>Literatura .....</b>	<b>59</b>
<b>Přílohy (první strategie syntézy) .....</b>	<b>62</b>
<b>Přílohy (druhá strategie syntézy) .....</b>	<b>73</b>

## Seznam zkratek

BAL linker	4-(4-formyl-3-methoxy-fenoxy)butanová kyselina
Bn	benzyl
BtOH	1-hydroxybenzotriazol hydrát
DBU	diazobicyklo[5.4.0]undec-7-en
DCM	dichlormethan
DIC	diisopropylkarbodiimid
DIEA	diisopropylethylamin
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
Et	ethyl
Fmoc-OSu	<i>N</i> -(9-fluorenylmethoxykarbonyloxy)sukcinimid
HAc	kyselina octová
IBX	kyselina <i>o</i> -iodoxybenzoová
IMPDH	inosinmonofosfátdehydrogenáza
Me	methyl
MsCl	mesylchlorid
NEt <sub>3</sub>	triethylamin
NMP	<i>N</i> -methylpyrrolidon
PIP	piperidin
PPA	kyselina polyfosforečná
PPTS	pyridinium- <i>p</i> -toluensulfonát
Pr	propyl
Py	pyridin
TFA	kyselina trifluoroctová
THF	tetrahydrofuran
TMSOK	trimethylsilanolát draselný

# 1. Úvod

Flavonoidy, skupina přírodních látek s hydroxykumarinovým skeletem (1), předurčují strukturně analogické 3-hydroxy-4-(1*H*)-chinolony (2) (dále jen „hydroxychinolony“) k intenzivnímu studiu jejich potenciální biologické aktivity a fluorescenčních vlastností.



Dosavadní výzkum v oblasti chemie hydroxychinolonů je zaměřen na přípravu zcela nových derivátů s významnými farmakologickými účinky za současného vývoje efektivních metod syntézy. V rámci této problematiky byla na katedře organické chemie PřF UP vyvinuta syntéza na pevné fázi derivátů hydroxychinolonu<sup>1,2</sup>, která má stěžejní uplatnění ve spojení s kombinatoriální chemií. S využitím této metody byly připraveny sloučeniny s významnou protinádorovou aktivitou, z nichž nejúčinnější deriváty jsou předmětem pokročilých biologických testů<sup>3</sup>. Předložená diplomová práce je zaměřena na další modifikaci hydroxychinolonů, která se týká syntézy bisheterocyklických derivátů obsahujících hydroxychinolonový skelet ve spojení s jedním nebo více heterocykly. Je známo, že většina účinných přírodních látek či léčiv obsahuje alespoň jeden heterocyklický systém a že řada biologicky aktivních substancí zahrnuje ve své struktuře kombinaci dvou heterocyklických prvků. Proto je možné předpokládat, že přítomnost dalšího heterocyklu ve struktuře hydroxychinolonů povede ke zvýšení biologické aktivity cílových sloučenin.

## 2. Cíl práce

Záměrem diplomové práce bylo připravit nové bisheterocyklické deriváty 2-substituovaných-3-hydroxychinolin-4(1*H*)-on-7-karboxamidů s využitím syntézy na pevné fázi, přičemž pozornost byla věnována implementaci dalšího heterocyklu. Pro tento účel byl vybrán jako výchozí substrát *o*-fenylendiamin, který je považován za velmi výhodný intermediát k přípravě pěti, šesti i vícečlenných dusíkatých heterocyklů. Schéma 1 znázorňuje vybrané příklady konkrétního využití *o*-fenylendiaminů předpokládaným způsobem<sup>4</sup>.

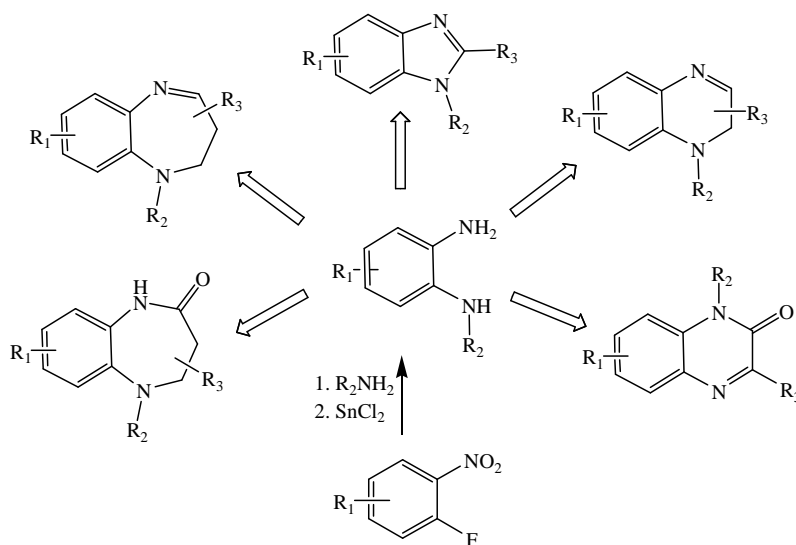


Schéma 1

Pro přípravu bisheterocyklických sloučenin (kde oba heterocykly jsou spojeny raménkem o různé délce a struktuře) pomocí syntézy na pevné fázi je možné v zásadě aplikovat dvojí strategii syntézy (Schéma 2)<sup>4</sup>. Metoda A je založena na imobilizaci prvního heterocyklu, přičemž jeden ze synthonů použitých k jeho přípravě slouží jako raménko pro spojení s druhým heterocyklem, který je posléze na konci tohoto raménka syntetizován. Metoda B pak spočívá nejprve v imobilizaci raménka a následné výstavbě (paralelní nebo postupné) obou heterocyklů na jeho koncích.

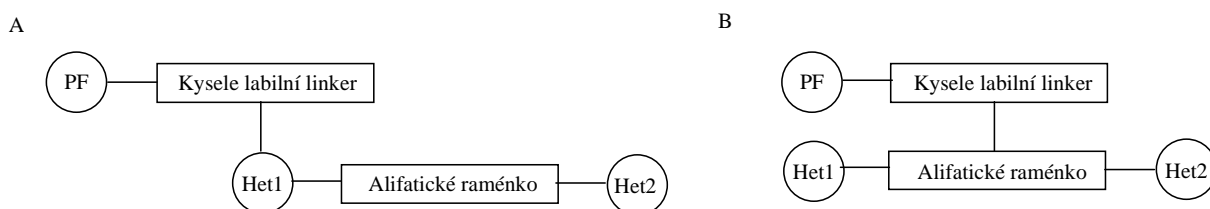
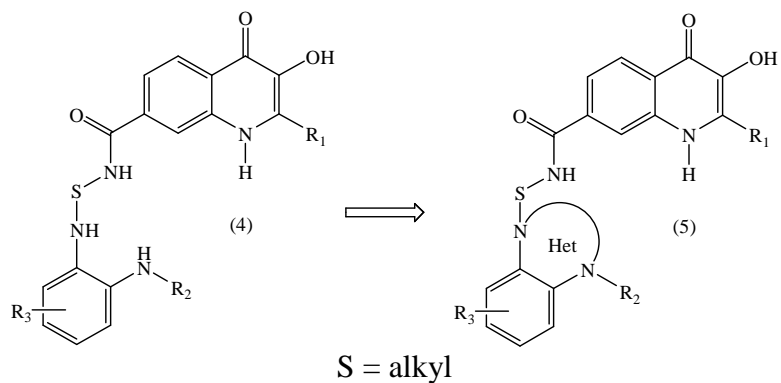


Schéma 2

V rámci diplomové práce byl k syntéze cílových sloučenin zvolen scénář B. Prvotní studie byla věnována transformaci derivátu *o*-fenylendiaminu na derivát benzimidazolu, přičemž tento heterocyklus měl být spojen s hydroxychinolovým skeletem v poloze 7 přes alkylový řetězec S (5). Volbou struktury a délky alifatického raménka by pak bylo možné dosáhnout proměnlivé konformační variability systému.





### 3. Obecné metody příprav derivátů 3-hydroxy-4(1H)-chinolonu

V této kapitole je uveden obecný přehled známých příprav hydroxychinolonů, který je rozšířen o poznatky v oblasti syntézy bisheterocyklických derivátů hydroxychinolonu.

#### 3.1. Souhrn substrátů pro syntézu derivátů 3-hydroxy-4(1H)-chinolonu

Pro přehlednost je v této podkapitole uvedeno celkové schéma všech substrátů (Schéma 3), které byly dosud využity pro přípravu derivátů 3-hydroxy-4(1H)-chinolonu. Většina z uvedených reakcí byla popsána v rámci rešerše dříve vypracované bakalářské práce<sup>5</sup> a proto nejsou tyto metody přípravy zde podrobněji komentovány.

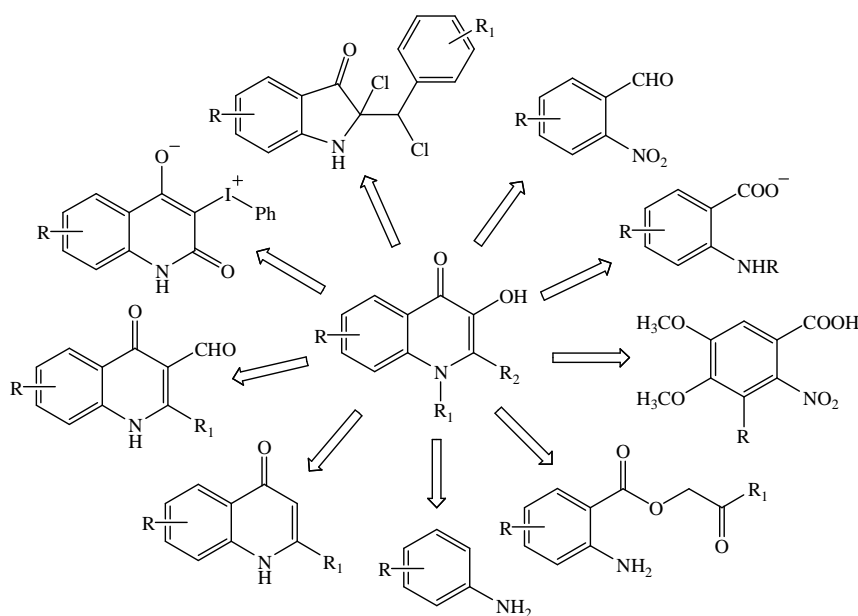


Schéma 3

### 3.2. Další modifikace syntéz 3-hydroxy-4(1H)-chinolonu

Tato podkapitola je věnována přípravám hydroxychinolonů, které nebyly ve zmíněné bakalářské práci<sup>5</sup> uvedeny.

#### 3.2.1. Cyklizační metody

Nejběžněji používaná metoda pro syntézu 3-hydroxychinolonů vychází z derivátů kyseliny anthranilové a fenacylhalogenidů<sup>6</sup>. Literatura<sup>7</sup> však popisuje alternativu, která využívá jako druhou reakční komponentu 2-brom-1,1-dimethoxyethan (7) (Schéma 4). V první fázi je zahřívána pouze směs kyseliny anthranilové (6) s uhlíčanem draselným a teprve po ochlazení na laboratorní teplotu je přidán bromdimethoxyethan (7). Následná cyklizace dimethoxyethylesteru (8) je provedena v kyselině polyfosforečné při 110°C za vzniku produktu (9).

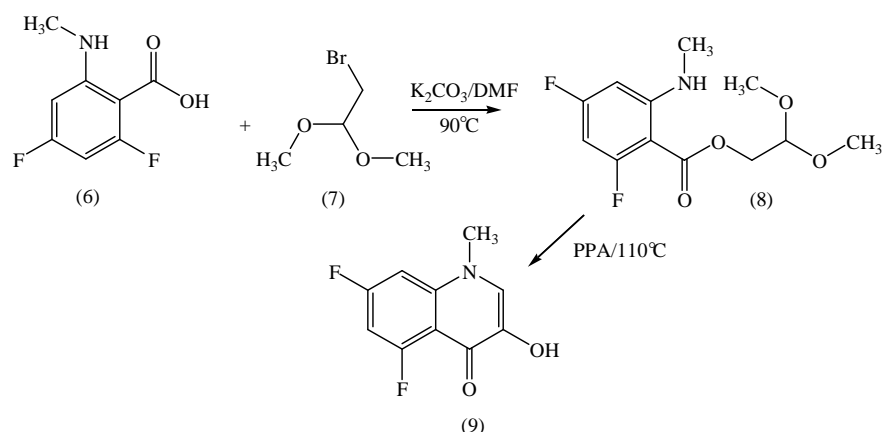


Schéma 4

Mezi velmi zajímavé deriváty z hlediska biologické aktivity náleží 2-heptyl-3-hydroxy-4(1H)-chinolon (PQS), který je produkován bakterií *Pseudomonas aeruginosa*. V roce 2011 byl publikován nový způsob syntézy využívající mikrovlnné záření<sup>8</sup> působící na směs anthranilové kyseliny (10) a 1-chlornonan-2-onu (11) (Schéma 5). V prvním kroku vzniká 2-heptyl-4-chinolon (12), jehož oxidací peroxidem vodíku dochází ke tvorbě příslušného 3-hydroxychinolonu (13)<sup>9</sup>.

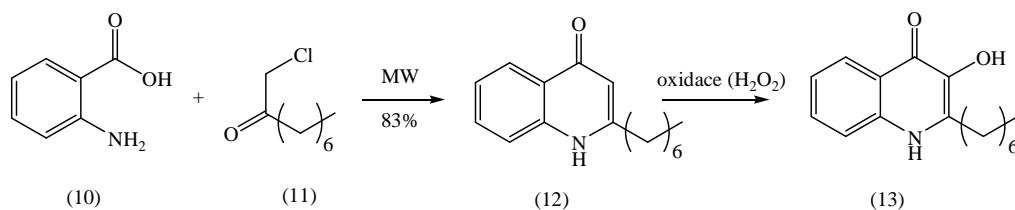


Schéma 5

Další možnost syntézy 3-hydroxychinolonu představuje Goldsworthova metoda<sup>10</sup>, která je založena na kondenzaci derivátu anilinu (14) s (ethyl)-2-kyano-3-ethoxyakrylátem (15). Meziprodukt (16) je dále termickou cyklizací převeden na intermediát (17), který po redukci nitrilové skupiny a následné oxidaci aldehydu přechází na výsledný hydroxychinolon (19).

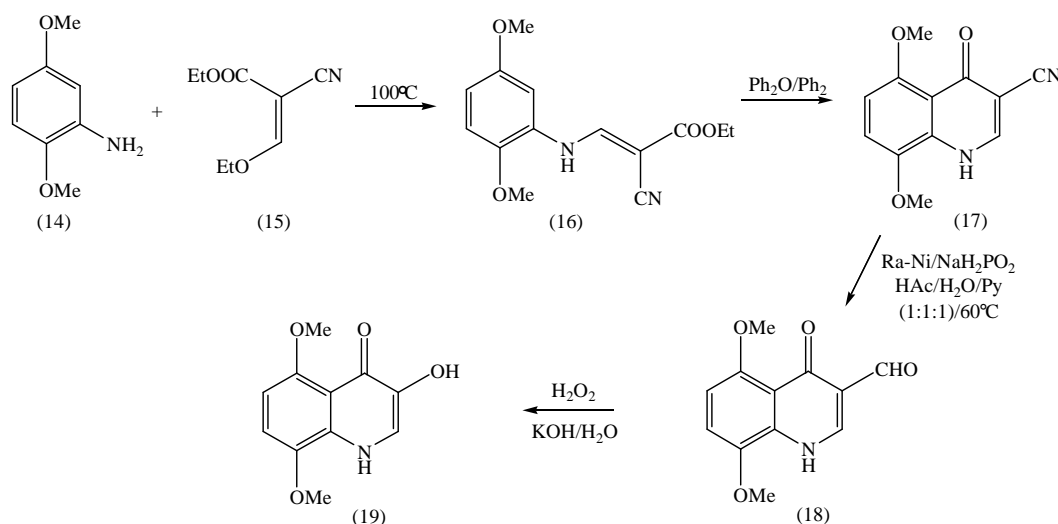
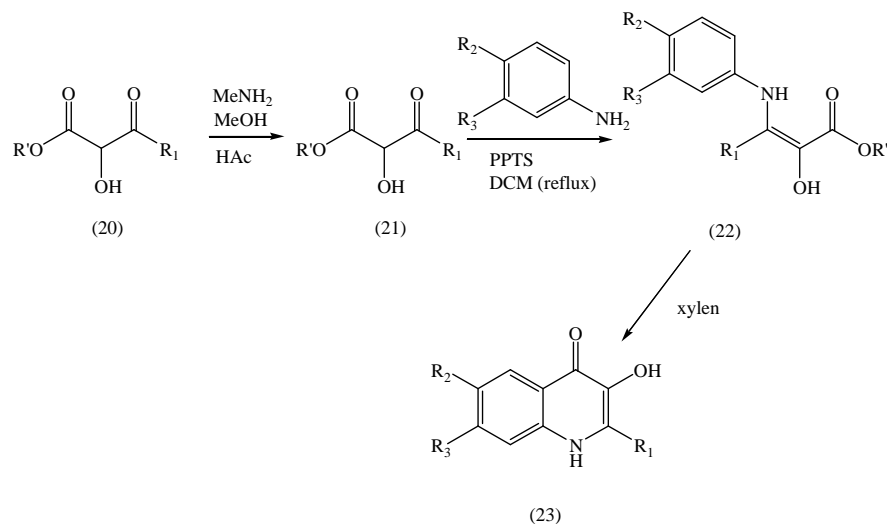


Schéma 6

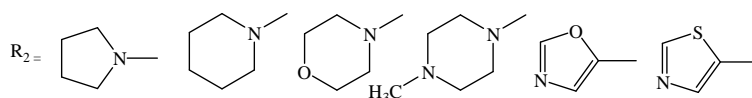
### 3.3. Příprava bisheterocyklických derivátů 3-hydroxy-4(1H)-chinolonu

V této podkapitole budou uvedeny syntézy všech dosud známých bisheterocyklických derivátů hydroxychinolonu.

Mezi první práce intenzivně se zabývající syntézou bisheterocyklických derivátů chinolonů patří literatura<sup>11</sup>. Záměrem bylo připravit sloučeniny typu (23), u nichž byly prokázány inhibiční účinky IMPDH (Schéma 7).



$R_1$  = heteroaryl, heterocykloalkyl



$R_3$  = -OMe

$R'$  = -Me, -Et, -Pr, -Bn

Schéma 7

Pro zajímavost je zde uveden způsob zavedení heterocyklu do výsledného systému, který byl uplatněn u příprav 3-hydroxychinolonů (23). Možnost inkorporace heterocyklického systému nabízí Suzukiho reakce mezi arylderivátem kyseliny borité (24) a halogenheteroaromátem. Deprotekcí chránicí skupiny vodíkem za katalýzy paládiem vzniká požadovaný intermediát (26) (Schéma 8).

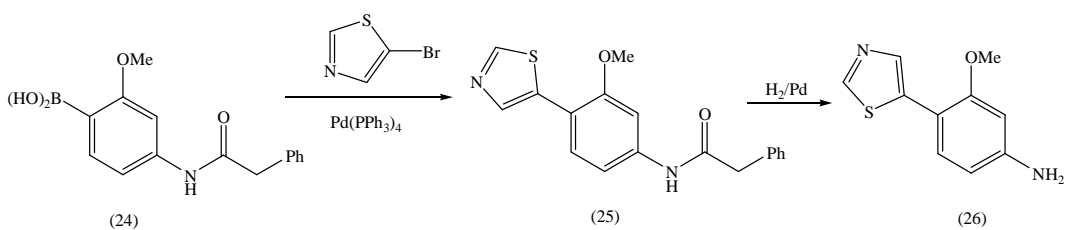


Schéma 8

V případě reakce popsané ve schématu 9 je oxazolový kruh tvořen přes 1,3-dipolární cykloadici účinkem (*p*-toluensulfonyl)methylisokyanátu (28) na aldehyd (27), přičemž k redukci nitro skupiny derivátu (29) se nejčastěji používá katalytická hydrogenace.

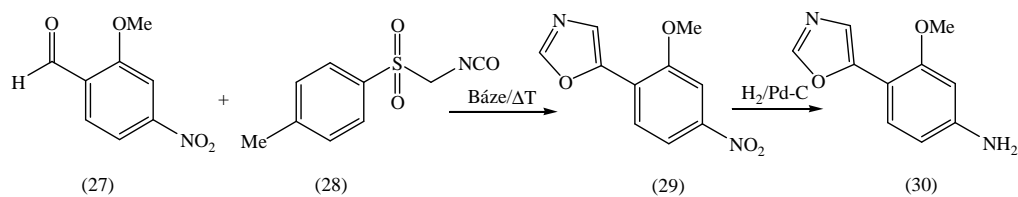


Schéma 9

K zavedení heterocyklu do struktury lze také využít reakci chlornitrobenzenu (31) s příslušným heteroaromátem (Schéma 10).

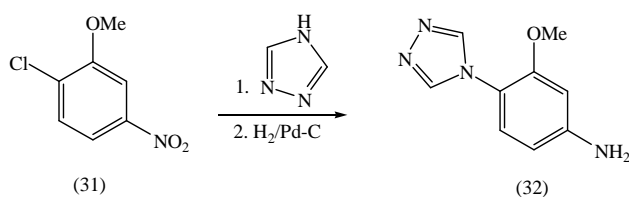


Schéma 10

Jiná metoda spočívá ve výstavbě heterocyklu na vhodně substituovaném benzenu, který je navázán v poloze 2 příslušného derivátu 3-hydroxychinolonu<sup>12,13</sup> (Schéma 11). Fenacylester (33) se nejdříve převede termickou cyklizací v kyselině polyfosforečné na hydroxychinolon (34)<sup>6</sup>. Po redukcí nitroskupiny dojde následně v kyselině octové k cyklizaci sloučeniny (34) na 3-hydroxychinolon-2-benzimidazol (35).

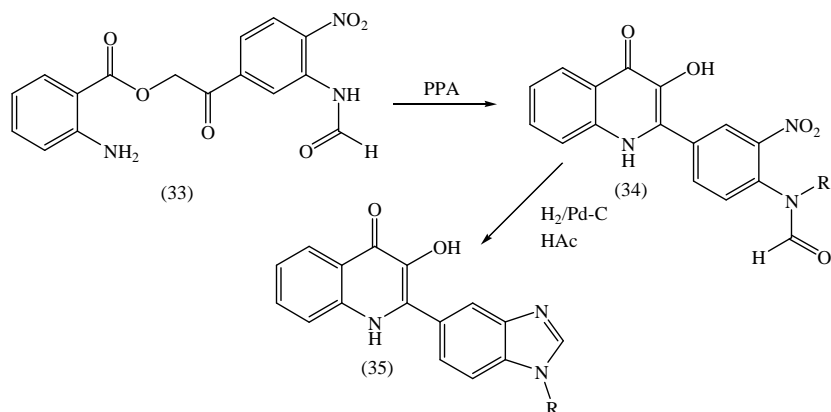


Schéma 11

Zajímavou alternativou je tzv. Algar-Flynn-Oymadaova reakce, která původně sloužila k syntéze 3-hydroxyflavonoidů. Ze schématu 12 je však patrné, že tuto metodu lze využít také k přípravě 3-hydroxychinolonů a jejich bisheterocyklických derivátů. V tomto případě je výchozím materiálem *N*-substituovaný acetofenon (36), který reakcí s

benzaldehydem poskytuje intermediát (37). Epoxidací připravený derivát (38) dále podléhá v ethanolickém prostředí cyklizaci. V posledním reakčním kroku je příslušný 3-hydroxychinolon (40) získán oxidací sloučeniny (39) peroxidem vodíku nebo kyslíkem<sup>13</sup>. Přestože literatura<sup>14, 15</sup> popisuje výtěžek od 49 do 71%, jiná studie<sup>16</sup> uvádí možnost výtěžku pouze okolo 1% v závislosti na substituci.

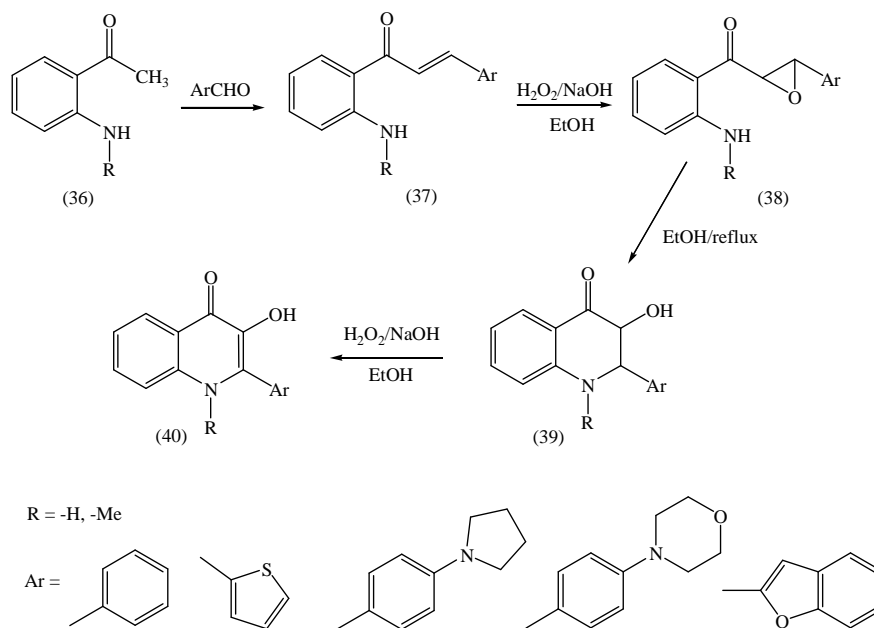


Schéma 12

Mezi zajímavé biologicky aktivní deriváty náleží 3-hydroxychinolony, které mají ve struktuře inkorporovaný oxadiazolový skelet. Literatura<sup>17</sup> popisuje přípravu produktu (43) na základě transformace alkylesteru 3-hydroxychinolon-2-karboxylové kyseliny (41) na hydrazid (42). Hydroxychinolon-oxadiazol (43) je pak získán následnou termickou cyklizací intermediátu (42).

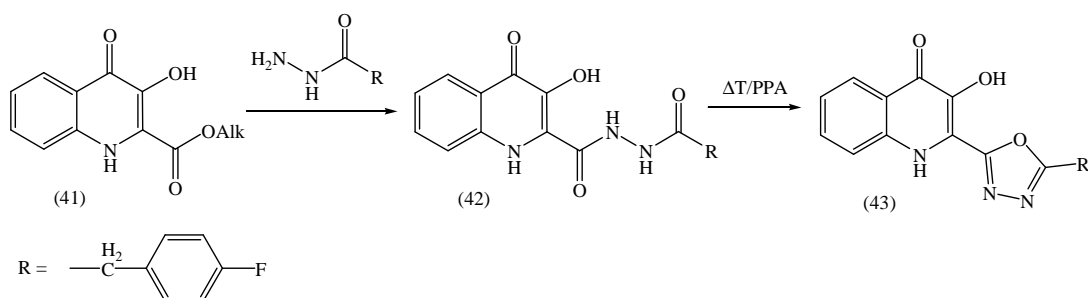


Schéma 13

V roce 2007 byla poprvé popsána příprava 2-fenylsubstituovaných-3-hydroxychinolin-4(1*H*)-on-7-karboxamidů pomocí syntézy na pevné fázi<sup>1</sup>. Tato technika využívá aminotereftalovou kyselinu imobilizovanou na polystyrenové pryskyřici přes amidickou skupinu. Reakce je zahájena reaktivní aminací (44), kdy za účelem inkorporace heterocyklické struktury do cílových sloučenin je s výhodou použit amin, na němž je navázán heterocyklus. Po acylaci sekundárního aminu (45) je ester (46) hydrolyzován za následné esterifikace kyseliny (47) pomocí příslušného bromacetofenonu. Intermediát (48) se dále převede do roztoku štěpící směsi (50% trifluoroctová kyselina v dichlormethanu) a jeho cyklizace na konečný 3-hydroxychinolon (50) probíhá v trifluoroctové kyselině (Schéma 14).

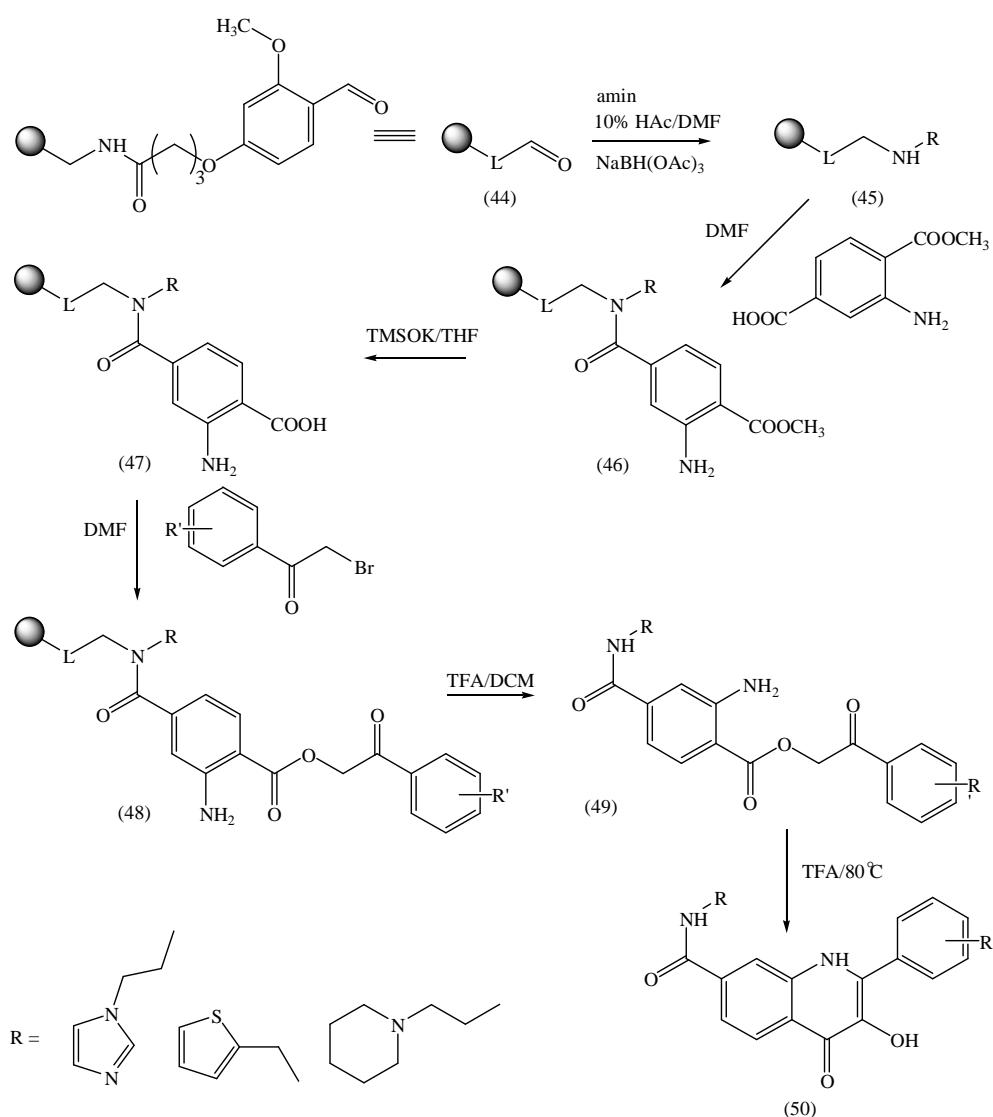


Schéma 14

Modifikací výše zmíněné metody je tvorba bisheterocyklických derivátů hydroxychinolonu s heterocyklem v poloze 2 (Schéma 15). Pro tyto účely se používají halogenketony odvozené od heterocyklických sloučenin<sup>1</sup>.

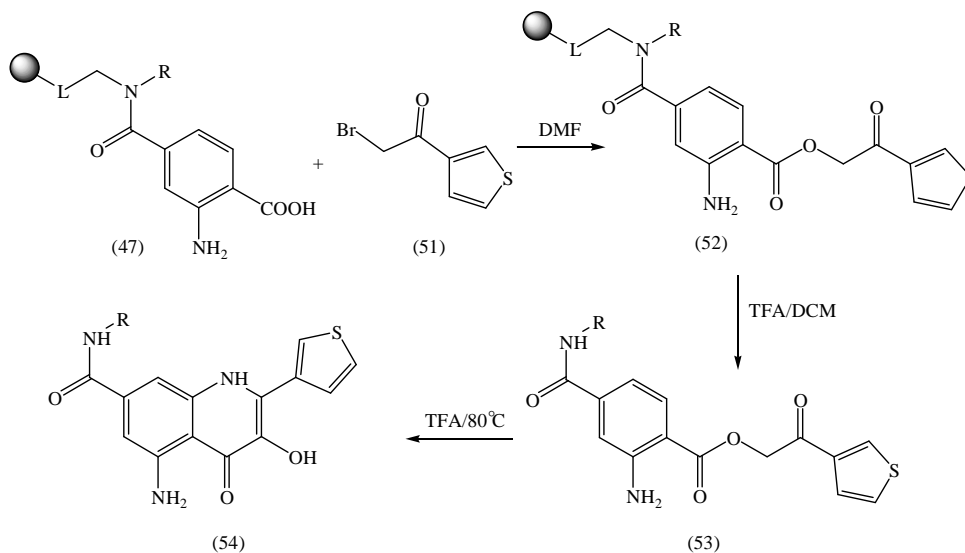


Schéma 15

Na obdobném principu, popsaném ve schématu 14, je založena syntéza bisheterocyklů tvořených purinem a 3-hydroxy-4(1*H*)-chinolonem spojených přes alkyl S (Schéma 16). Takové látky jsou velmi zajímavé, neboť purinové deriváty mají schopnost interagovat s nukleovými kyselinami a enzymy, které aktivují jejich biologické transformace<sup>18</sup>. Reakce začíná arylací sekundárního aminu navázaného na pevné fázi (45) 2,6-dichlorpurinem (55). V dalším kroku se provede alkylace purinu na *N*<sup>9</sup> za následné nukleofilní substituce v poloze 2 vhodným diaminem. Intermediát (58) představuje výchozí materiál pro imobilizaci monoesteru kyseliny 2-aminotereftalové, přičemž další reakční kroky jsou stejné jako u syntézy popsané ve schématu 14.



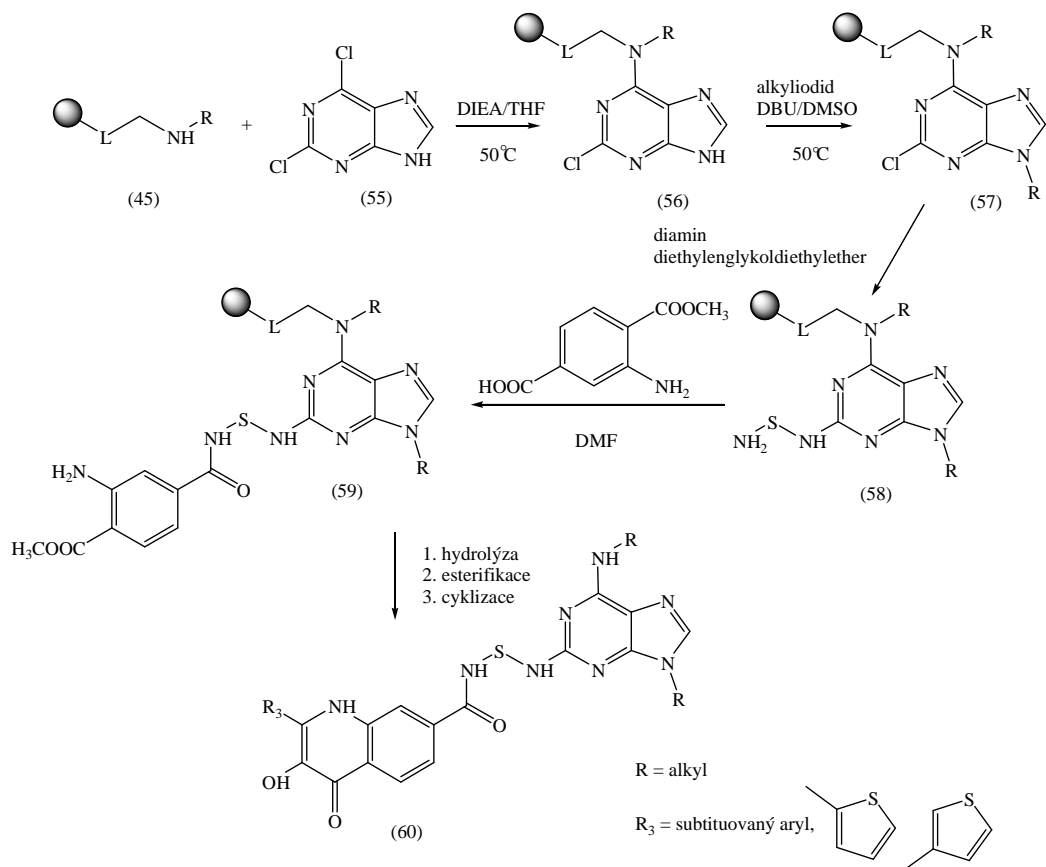


Schéma 16

K syntéze jiných bisheterocyklických 3-hydroxychinolonů se využívá 4-chlor-2-fluor-5-nitrobenzoová kyselina (62) jako polyfunkční synthon<sup>2</sup> (Schéma 17). Rozdílná reaktivita fluoridového (F) a chloridového (Cl) substituentu umožňuje imobilizaci kyseliny (62) v poloze 2 na Rinkově pryskyřici jako 4-chlor-5-nitroanthranilovou kyselinu (63). Po aminaci a následné esterifikaci se meziprodukt (65) převede do roztoku a cyklizace (66) na konečný derivát 3-hydroxychinolonu (67) je realizována v kyselině sírové.

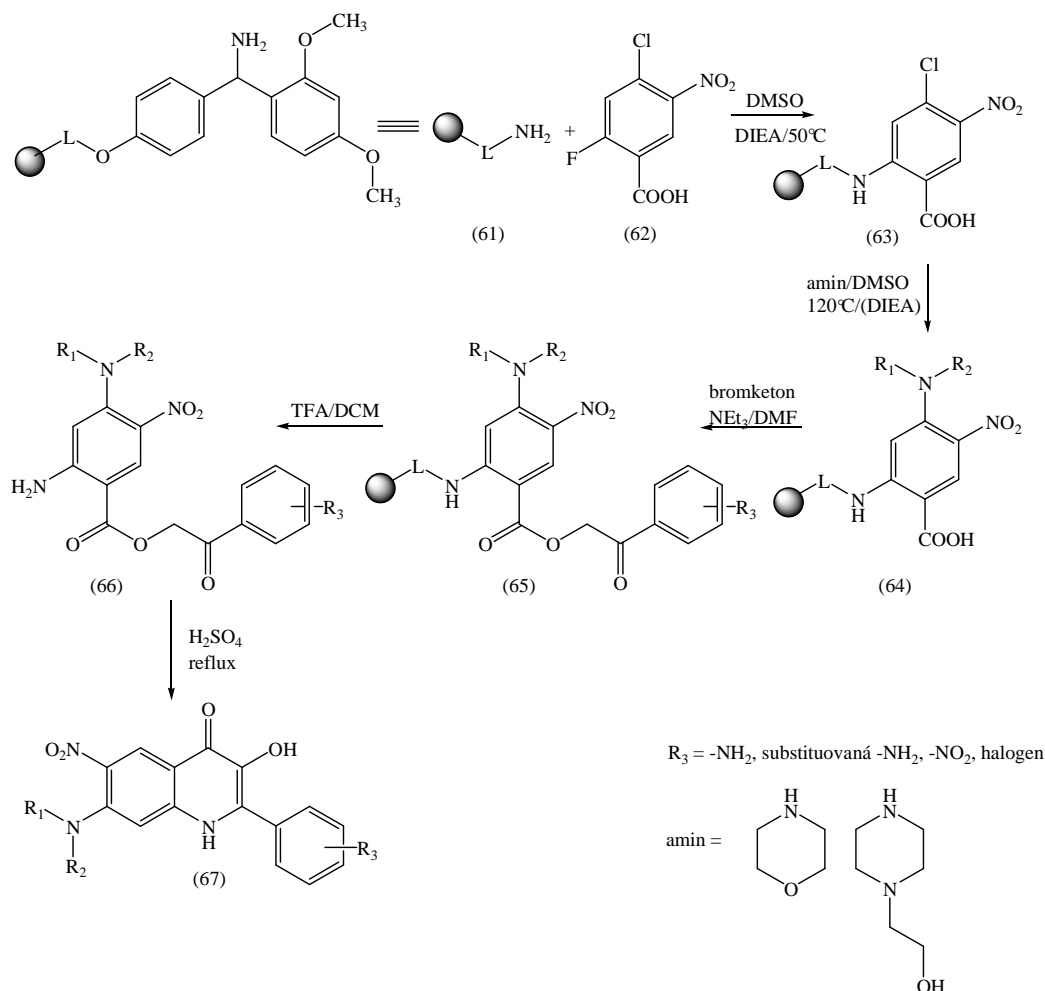
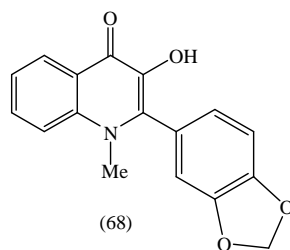


Schéma 17

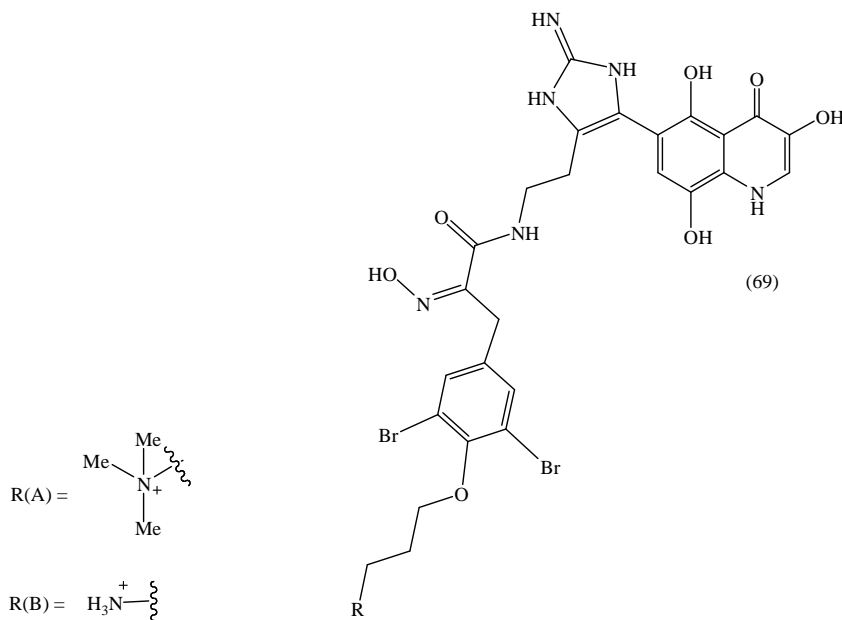
## 4. Biologická aktivita vybraných derivátů 3-hydroxy-4(1H)-chinolonů

První zmínka o biologických efektech hydroxychinolonů se objevila v roce 1986, kdy byl z rostliny *Ruta chalepensis* izolován 3-hydroxygraveolin (68), jenž byl testován v rámci prevence gravidity u krys<sup>19</sup>. Předmětem intenzivního studia se sloučeniny s hydroxychinolovým skeletem staly teprve až v posledním desetiletí, přičemž v současnosti jsou zmíněné látky známé pro široké spektrum biologických účinků. Nejčastěji se jedná o antiprotozoální, fungicidní, virostatické, imunosupresivní, herbicidní a kancerostatické působení. Mechanismus účinku je u řady sloučenin založen na inhibici topoisomerázy II, DNA gyrázy, IMPDH a reverzní transkriptázy. V případě některých látek není způsob jejich činnosti v organismu doposud znám, proto je současný výzkum v oblasti biologické aktivity hydroxychinolonů zaměřen také na identifikaci molekulárního cíle vybraných derivátů.



#### 4.1. Antiprotozoální a fungicidní aktivita hydroxychinolonů

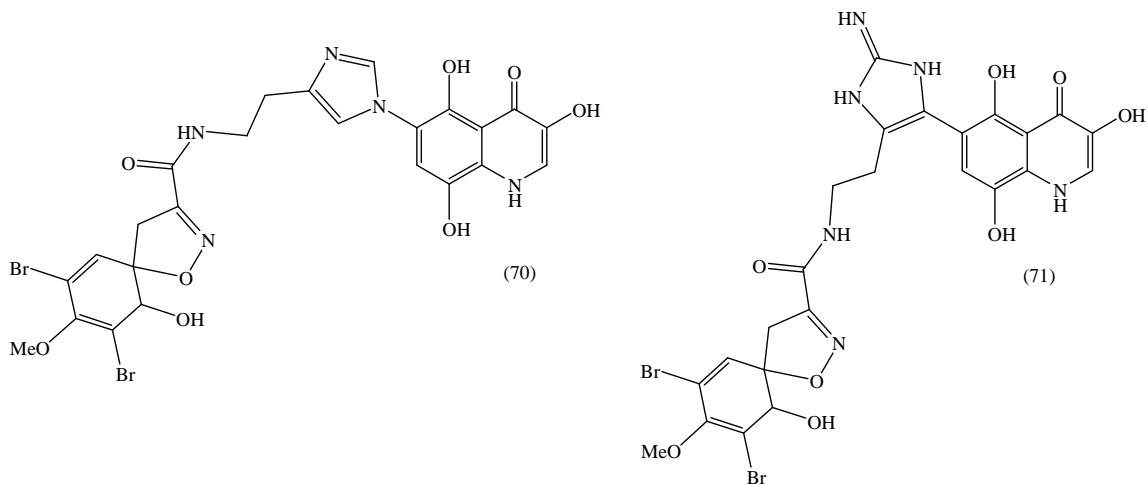
V nedávné studii<sup>20</sup> byla popsána izolace vzácných bromtyrosinových derivátů 3-hydroxychinolonů (tyrokeradin A, B) (69) z mořských hub skupiny Okinawan Verongid (SS-301). Oba alkaloidy obsahují ve struktuře imidazolyl-hydroxychinolonový skelet, přičemž antiprotozoální a fungicidní aktivitu vykazuje pouze derivát (B) (Tabulka 1).



Tabulka 1

Binomický název	MIC(B) ≈	Binomický název	MIC(B) ≈
<i>Micrococcus luteus</i>	25,0 µg/mL	<i>Cryptococcus neoformans</i>	12,5 µg/mL
<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Candida albicans</i>	
<i>Trishophyton mentagrophytes</i>		<i>Aspergillus niger</i>	

V roce 2010 byly z houby Okinawan Verongid (*Pseudocerotina sp. SS-214*) izolovány další bromtyrosinové alkaloidy s hydroxychinolovým strukturálním motivem<sup>21</sup> (70), (71). Uvádí se, že zmíněné deriváty mají fungicidní účinky (Tabulka 2).

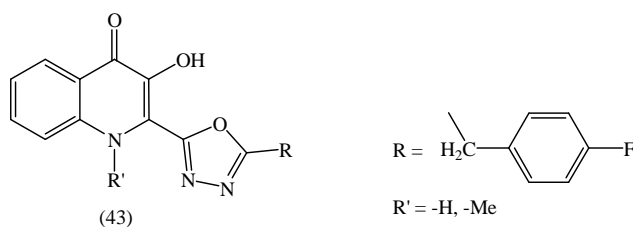


Tabulka 2

Binomický název	MIC(70) ≈	MIC(71) ≈	Binomický název	MIC(70) ≈	MIC(71) ≈
<i>Cryptococcus neoformans</i>	4 μg/mL	8 μg/mL	<i>Candida albicans</i>	2 μg/mL	4 μg/mL

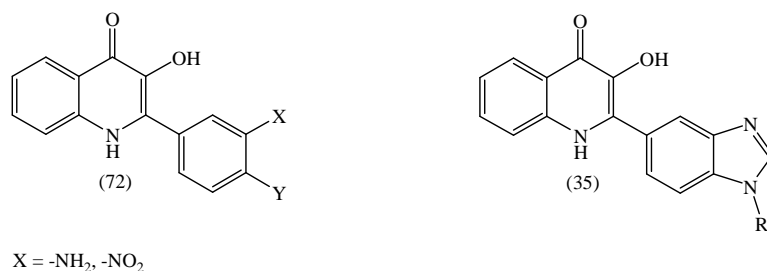
#### 4.2. Virostatická aktivita hydroxychinolonů

Významným zástupcem s antivirálními vlastnostmi je 2-[5-(4-fluoro-benzyl)-[1,3,4]oxadiazol-2-yl]-3-hydroxy-4(1H)-chinolon (43), jehož příprava je uvedena ve schématu 13<sup>17</sup>. Mechanismus působení je založen na inhibici integrázy, což je klíčový enzym umožňující přepsat genetickou informaci retrovirů do DNA. Deriváty vykazující zmíněné účinky jsou v současné době intenzivně studovány zejména v souvislosti s léčbou HIV.



### 4.3. Imunosupresivní aktivita hydroxychinolonů

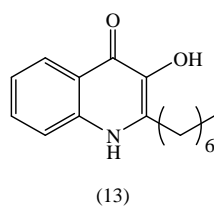
Je známo, že některé 3-hydroxychinolony mají schopnost působit na polyklonální mytogeny odpovědné za aktivaci a proliferaci lymfocytů, což je podstatou regulace imunitní odezvy živého systému<sup>12</sup>. Výsledky MTT testů vybraných selektivních inhibitorů (72) a (35) jsou uvedeny v tabulce 3, přičemž syntéza sloučeniny (35) byla blíže popsána v kapitole 3.3. (Schéma 11).



Tabulka 3

Sloučenina	Substituence Y (resp. R)	Inhibice lymfocytů aktivovaných ConA [IC <sub>50</sub> ] = μM
72		0,60
72		0,50
35		0,80

Mezi další látky využívané jako imunosupresiva se řadí 2-*n*-heptyl-3-hydroxy-4(1*H*)-chinolony (13) (Schéma 5)<sup>22</sup>. Zmíněné deriváty jsou obecně nazývány *Pseudomonas chinolone signal* (PQS) a v současnosti se o nich hovoří spíše ve spojení s antibakteriálními účinky<sup>9, 23</sup>.

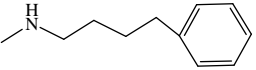


#### 4.4. Cytotoxická aktivita hydroxychinolonů

V rámci biologického screeningu je doposud největší pozornost zaměřena na studium kancerostatických účinků. K tomuto účelu je využíván *in vitro* MTT cytotoxický test<sup>24</sup>. Potenciální antitumorové působení uvedených derivátů 3-hydroxychinolonů bylo sledováno na vybraných nádorových liniích: CEM (T-lymfoblastická leukémie), CEM-DNR-BULK (T-lymfoblastická leukémie rezistentní na doxorubicin), K562 (lidská myeloidní leukémie), K562-TAX (lidská myeloidní leukémie rezistentní na paclitaxel), A549 (karcinom plic) a HCT116 (karcinom tlustého střeva).

Dříve uvedené sloučeniny (72) a (35) vykazují kromě imunopresivních účinků také cytotoxickou aktivitu (Tabulka 4).

Tabulka 4

Sloučenina	Substituce Y, R	[IC <sub>50</sub> ] = μM				
		CEM	CEM-DNR-BULK	K562	K562-TAX	A549
72	—N(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0,70	2,20	0,60	1,20	1,10
72		6,50	2,50	0,60	0,93	7,20
35	—(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> S(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> OH	0,80	2,20	3,10	4,50	3,60

Nejnovější studie<sup>25</sup> se zabývá přípravou a testováním hydroxychinolon-7-karboxamidů. Autoři uvádí možnost efektivního sledování vztahů mezi strukturou a aktivitou vybraných 2-substituovaných-3-hydroxychinolin-4(1H)-on-7-karboxamidů (73) využitím syntézy na pevné fázi. Pro potřeby výzkumu byl vyvinut proces optimalizace cílových sloučenin („generation library I, II, III“), jehož schéma je znázorněno níže. Zmíněná procedura zahrnuje přípravu série látek, které ve struktuře obsahují dále modifikovatelné substituenty. Aplikací postupu (Schéma 18) na set studovaných látek je možné sledovat trend závislosti cytotoxických účinků hydroxychinolonů na jejich substituci.

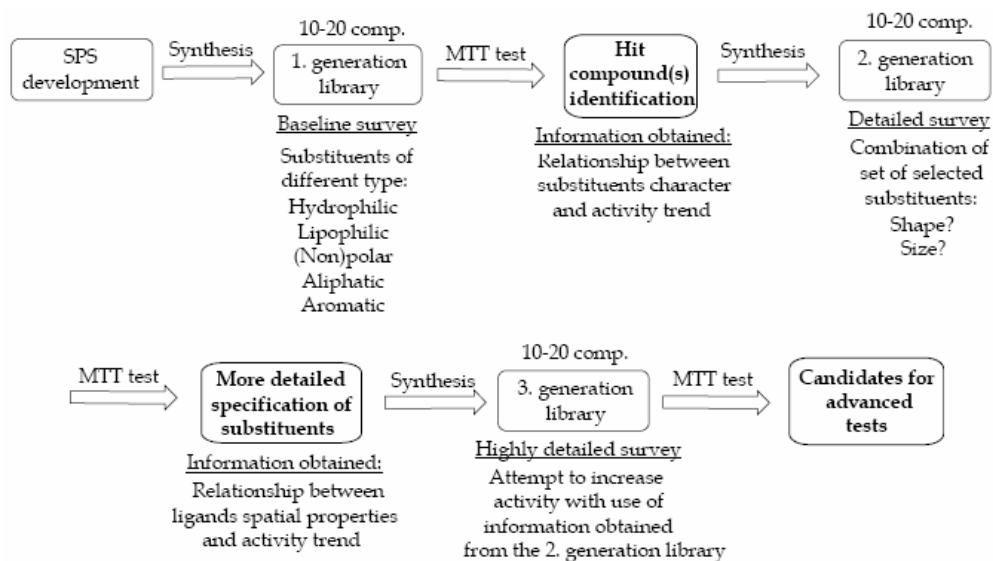
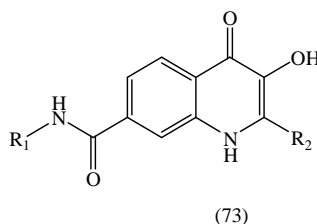


Schéma 18

Výsledky výše uvedené studie prokázaly, že aktivitu hydroxychinolon-7-karboxamidů výrazně ovlivňuje charakter ligandu na amidické skupině (Tabulka 5).



Tabulka 5

	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	[IC <sub>50</sub> ] = μM		
			CEM	K562	HCT116
I	Propyl	3,5-Cl-4-NH <sub>2</sub> -Ph	0,98	9,60	7,90
II	3-Me-Bn	3,5-Cl-4-NH <sub>2</sub> -Ph	0,75	3,10	4,10
III	Naftyl-1-Me	3,5-Cl-4-NH <sub>2</sub> -Ph	0,69	2,40	2,40

#### 4.5. Další využití hydroxychinolonů

Některé deriváty 3-hydroxychinolonů lze využít k diagnostice neurologických dysfunkcí typu Alzheimerovy choroby<sup>26</sup>. Systém vhodný ke značení musí obsahovat radioaktivní ligand, který se do struktury zavádí prostřednictvím nukleofilní substituce přes organokovové sloučeniny (Schéma 19).

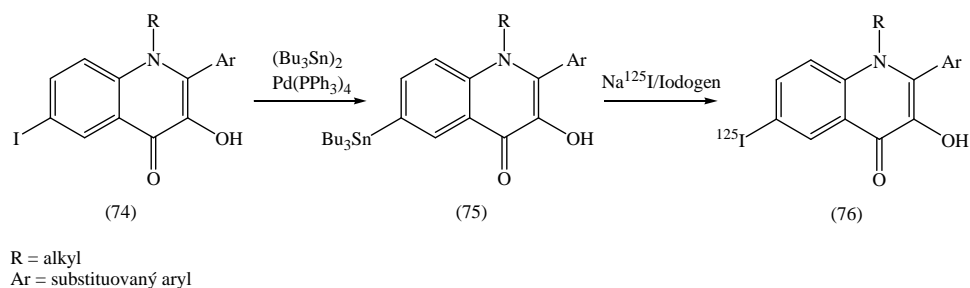
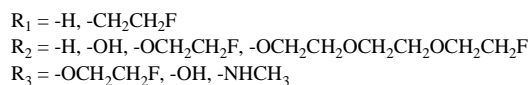
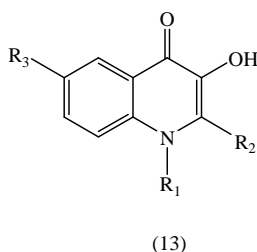


Schéma 19

Literatura<sup>24</sup> dále uvádí použití derivátů fluoru (77) jako radioaktivních analogů pro detekci biomarkerů Alzheimerovy choroby.



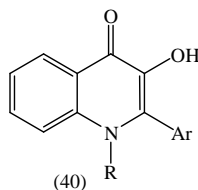
## 5. Fluorescenční vlastnosti 2-substituovaných-3-hydroxy-4(1H)-chinolonů

Fluorescenční spektroskopie je jednou z nejdůležitějších metod pro sledování molekulárních procesů v biologických systémech. Původně byly k těmto účelům využívány 3-hydroxyflavony (3HFs), které působily jako účinné nástroje pro výzkum elektrostatických efektů v mikroheterogenních soustavách a proteinech. Stinná stránka 3HFs spočívala v jejich omezené fotostabilitě a nízkém kvantovém výtěžku, proto byly hledány látky, které by 3HFs optimálně nahradily. Potenciálně vhodnými kandidáty pro značení biomolekul se jeví strukturně analogické 3-hydroxy-4(1H)-chinolony (3HQs).

Skelet hydroxychinolonů umožňuje koexistenci dvou tautomerních forem, což se ve spektru projeví vznikem dvou oddělených maxim (Obrázek 1). Na základě tohoto jevu vystupují 3HQs jako tzv. duální fluorescenční sondy, které se s výhodou využívají ke značení proteinů a nukleových kyselin. Schopnost fluorescence 3HQs se výrazněji projevuje okolo 430-550 nm a ztrácí se v případě substituce molekuly nevhodnou funkční skupinou (např.

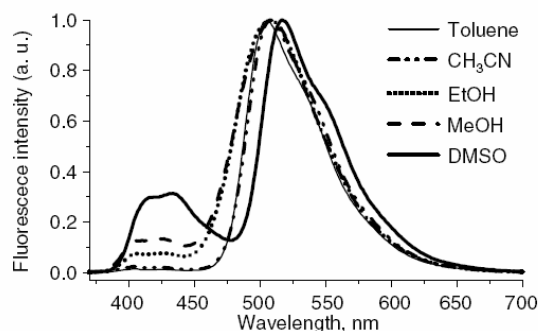
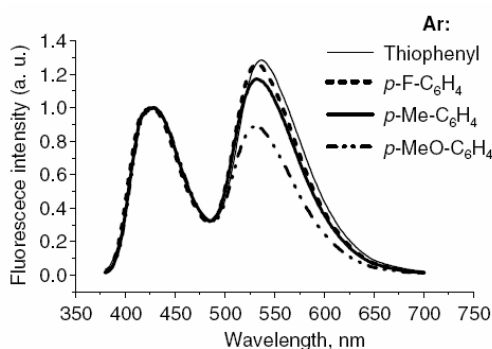


-NO<sub>2</sub>). Obrázek 2 demonstruje fluorescenční vlastnosti 3HQs (40) v různých rozpouštědlech, přičemž největšího kvantového výtěžku bylo dosaženo pro DMSO.<sup>13</sup>

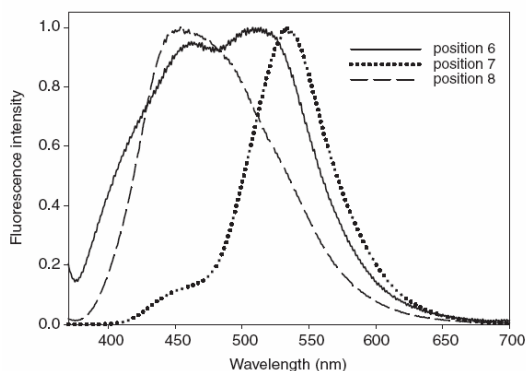


R = H, Me

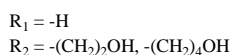
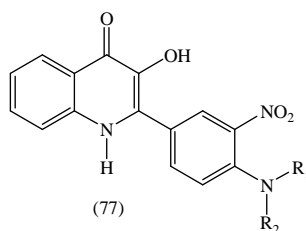
Ar = substituovaný aryl nebo heteroaryl



Kromě fluorescenčních vlastností 3HQs je dalším požadavkem pro studium procesů v organismu vhodný způsob navázání sondy na studovanou biomolekulu. Za tímto účelem byly výzkumu podrobeny 3-hydroxychinolon-6-, -7-, -8-karboxamidy, u nichž amidická skupina měla sloužit jako spojka mezi hydroxychinolovým skeletem a biologickým systémem<sup>27</sup>. Z naměřených spekter jasně vyplývá, že poloha amidické skupiny ovlivňuje vzdálenost obou maxim, přičemž v případě 3-hydroxychinolon-8-karboxamidů duální charakter spektra zcela zanikl (Obrázek 3).



Jiný typ obdobně testovaných látek představují 2-(4-amino-substituované-3-nitrofenyl)-3-hydroxychinolin-4(1*H*)-ony (77), ve kterých jako raménko spojující 3HQ a biomolekulu slouží substituent aminoskupiny navázané na 2-arylu (tj. R<sub>1</sub> nebo R<sub>2</sub>)<sup>13</sup>. U derivátů (77) bylo zjištěno, že by mohly být potenciálními adepty pro biomedicínální aplikace.



## 6. *O*-fenylendiaminy jako důležité prekurzory heterocyklických sloučenin

Tato kapitola se zabývá vybranými příklady syntéz konkrétních typů heterocyklů z derivátů *o*-fenylendiaminu a praktickým významem cílových sloučenin.

Snadná komerční dostupnost a možnost univerzálního použití staví *o*-fenylendiaminy do role užitečných intermediátů pro přípravu řady heterocyklických systémů. Přestože má výstavba heterocyklů dlouholetou tradici v oblasti roztokové chemie, je možné *o*-fenylendiaminy aplikovat i v případě syntézy na pevné fázi<sup>4</sup>, což obnáší výhody například v podobě tvorby rozsáhlých heterocyklických knihoven.

### 6.1. Benzimidazoly

Kondenzací *o*-fenylendiaminů s kyselinami, estery a aldehydy lze za vhodných podmínek připravit benzimidazolový skelet<sup>28</sup>. Literatura<sup>29</sup> navíc popisuje vliv teploty na složení konečných produktů. Je-li *o*-fenylendiamin zahříván s aldehydem v bezvodém nitrobenzenu nad 240°C, dochází ke vzniku směsi monosubstituovaného (79) a disubstituovaného (80) benzimidazolu. V případě, že je reakce vedena při 350°C, je vedle derivátů (79) a (80) současně přítomen také produkt cyklokondenzace (81) (Schéma 20).

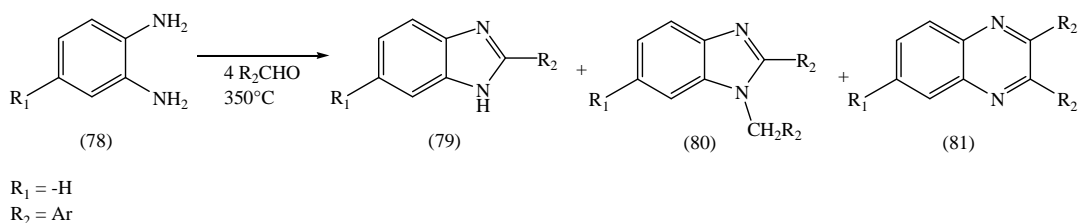


Schéma 20

Jak bylo zmíněno v úvodu této kapitoly, *o*-fenyldiaminy lze využít k přípravě heterocyklických i bisheterocyklických sloučenin pomocí syntézy na pevné fázi<sup>4</sup>. V takovém případě je *o*-fenyldiamin nejčastěji imobilizován na pryskyřici přes jednu z amino skupin (82), přičemž druhá amino skupina je následně podrobena acylaci za následného uzavření cyklu zahříváním v kyselině octové (Schéma 21).

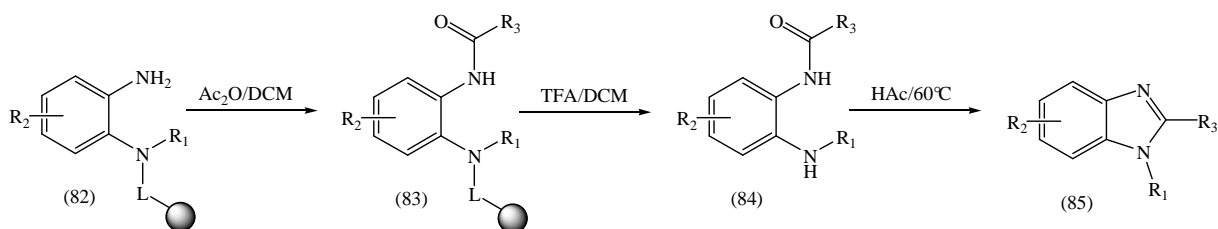
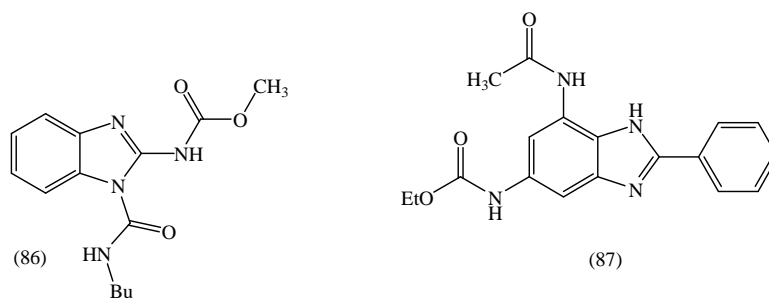


Schéma 21

Uplatnění derivátů benzimidazolu má rozsáhlý charakter. Např. reakcí *o*-fenyldiaminu s příslušným esterem lze připravit hojně používaný fungicid Benomyl (86)<sup>30</sup>. Z pohledu biologické aktivity představují zajímavou skupinu látek také např. trisubstituované benzimidazoly (87), u nichž byly prokázány antibakteriální účinky<sup>31</sup>.



## 6.2. Chinoxalin a jeho deriváty

Je dobře známo, že poměrně velké množství farmakologicky a biologicky aktivních sloučenin má ve struktuře inkorporovaný chinoxalinový skelet. Tyto látky jsou v současné

době zastoupeny v oblasti insekticidů, fungicidů, herbicidů a anthelmintik<sup>32</sup>. Zároveň se mohou uplatňovat jako barviva, elektroluminiscenční materiály nebo tzv. organické polovodiče<sup>32,33</sup>.

Nejjednodušší příprava chinoxalinů spočívá ve dvojnásobné kondenzaci *o*-fenylendiaminů s vhodnými 1,2-dikarbonylovými sloučeninami. Bylo zjištěno, že např. *o*-iodoxybenzoová kyselina příznivě ovlivňuje reakci (Schéma 22) za poskytnutí velmi vysokého výtěžku (až 99%)<sup>33</sup>.

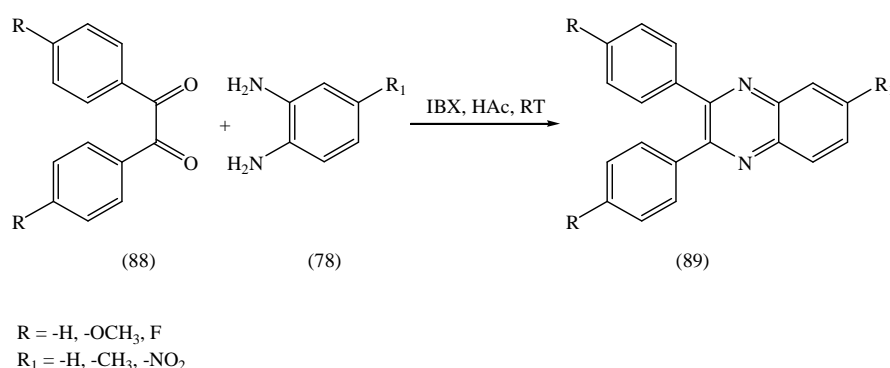


Schéma 22

Jinou alternativou je použití vicinálních diolů (90) za katalýzy rutheniem ve formě komplexu. Studie<sup>32</sup> popisuje možnost přidavku hydroxidu draselného, což v závislosti na substituci buď sníží, nebo zvýší reakční výtěžek (Schéma 23).

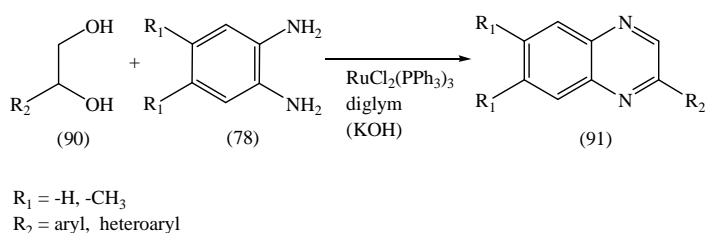


Schéma 23

### 6.2.1. Chinoxalin-2(1*H*)-ony

Deriváty chinoxalin-2(1*H*)-onu představují důležitou skupinu látek, které mohou interagovat s vazebnými centry purinových a pyrimidinových bazí, což má zásadní vliv na jejich funkci v organismu. Pro přípravu zmíněných sloučenin se standardně využívají jako prekurzory *o*-fenylendiaminy, přičemž mechanismus syntézy je nejčastěji založen na kondenzačních, dehydrogenačních, substitučních či adičních principech<sup>34</sup>.

Mezi metody poskytující vysoké výtěžky požadovaných produktů patří reakce  $\alpha$ -ketoesterů nebo  $\alpha$ -ketokyselin s *o*-fenyldiaminy<sup>35</sup>. Analogií pak může být použití  $\alpha$ -halogenesterů, kdy v první fázi vznikne tetrahydroderivát (93), který je následně podroben oxidaci peroxidem vodíku<sup>36</sup> (Schéma 24).

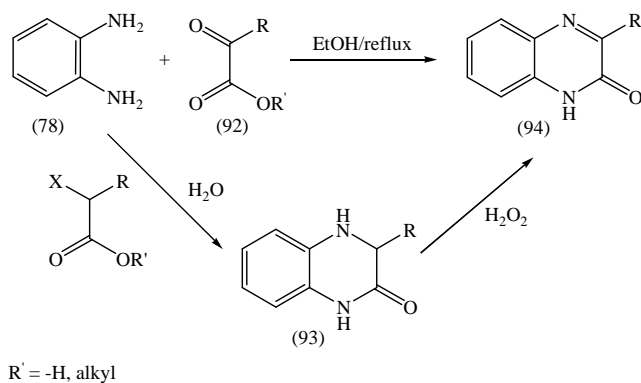


Schéma 24

V případě adičních reakcí se velmi často využívá látek, které ve struktuře obsahují trojnou vazbu. Příklad syntézy tohoto typu je uveden ve schématu 25<sup>37</sup>.

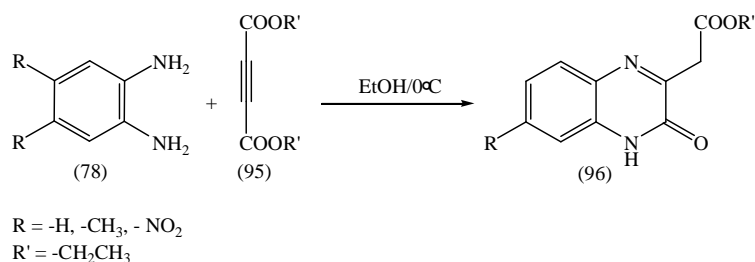


Schéma 25

Některé deriváty chinoxalin-2(1*H*)-onu jsou považovány za vhodné kandidáty k léčbě tumorů. Výsledky testů, které byly prováděny na viru Epstein-Barrové<sup>38</sup> prokázaly, že se jako vhodné kancerostatikum rakoviny kůže jeví látka (102). K přípravě sloučeniny (102) je pak možné zvolit několik přístupů popsaných ve schématu 26<sup>39</sup>.

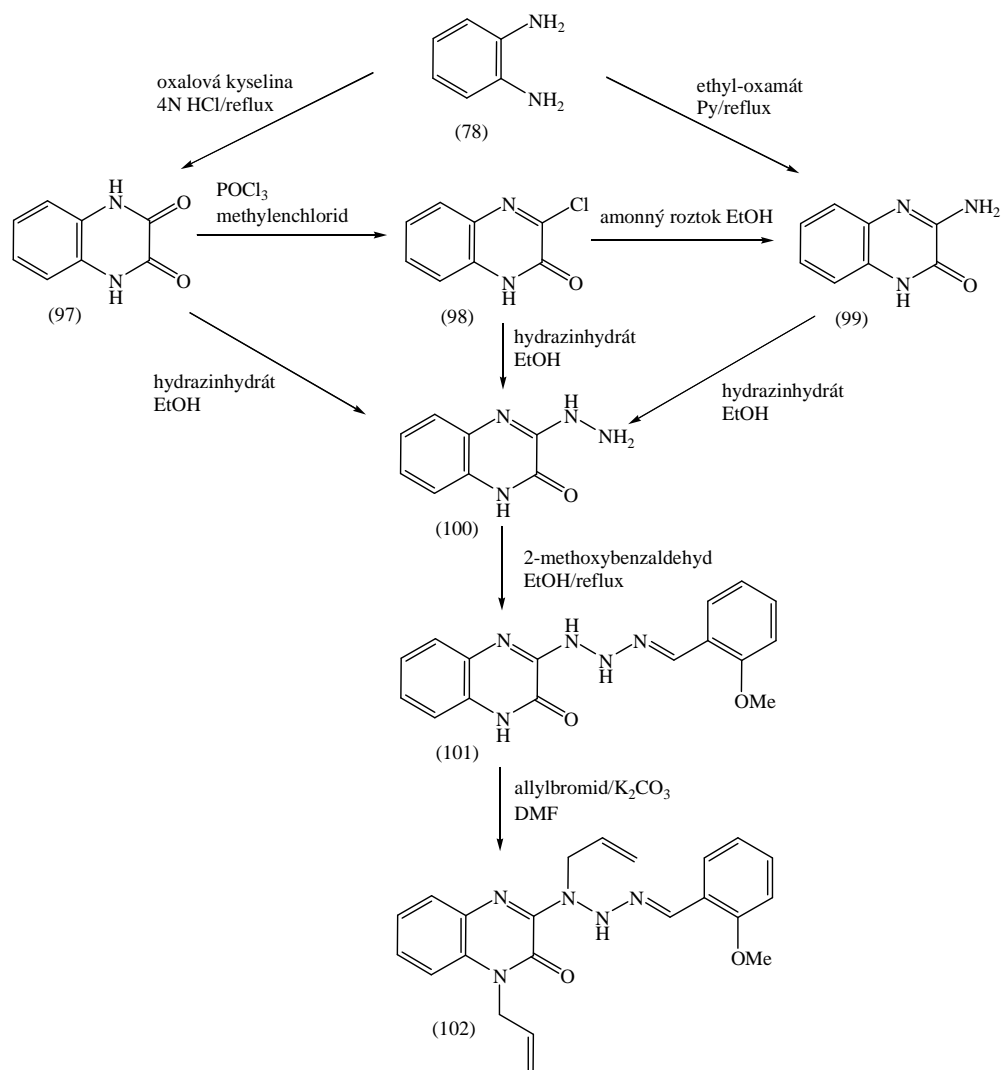


Schéma 26

## 6.2.2. Dihydrochinoxaliny

Částečně hydrogenované deriváty chinoxalínu lze připravit pomocí multikomponentní reakce *o*-fenylendiaminu (78) s ketonem (103) a isonitrilem (104) (schéma 27). Reakce probíhá za katalýzy EDTA (diaminů, amoniových solí) při teplotě 80°C s poměrně vysokými výtěžky (až 95%)<sup>40</sup>.

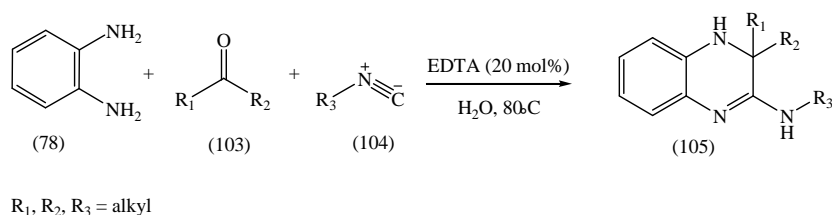


Schéma 27

### 6.2.3. Tetrahydrochinoxaliny

Literatura<sup>41</sup> popisuje přípravu tetrahydrochinoxalinů s využitím syntézy na pevné fázi (Schéma 28). Jako výchozí látka byl použit imobilizovaný derivát *o*-nitroanilinu (106). V prvním kroku reakce dochází k mesylaci hydroxyskupiny za vzniku intermediátů (107) a (108), přičemž množství chlorderivátu (108) závisí na typu substituentu R<sub>2</sub>. Po redukci nitroskupiny derivátu (107) následuje cyklizace na příslušný tetrahydrochinoxalin (109). Intermediát (110) podléhá cyklizaci na (109) až po zvýšení teploty na 45°C.

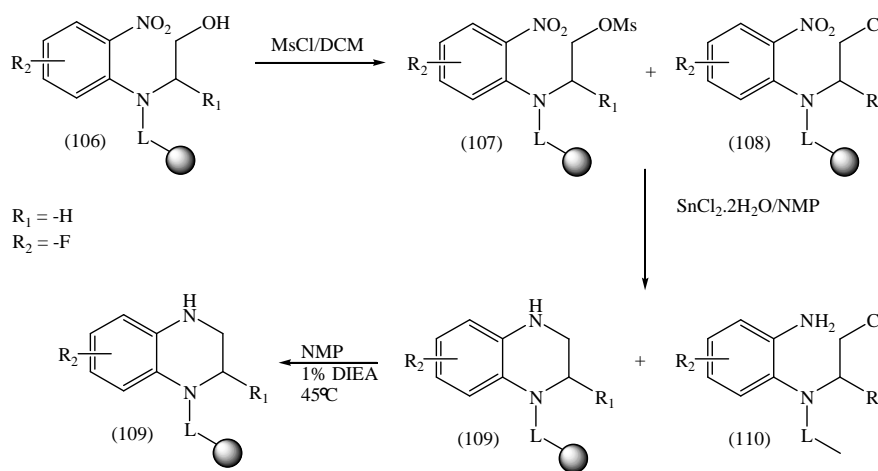


Schéma 28

### 6.3. Benzodiazepin a jeho deriváty

Deriváty benzodiazepinů patří mezi psychoaktivní látky, které se ordinují úzkostným lidem za účelem zklidnění nebo zmírnění poruch spánku<sup>42</sup>. Zmíněné látky se nejčastěji připravují kondenzačními reakcemi *o*-fenylendiaminů s nenasycenými nebo karbonylovými sloučeninami<sup>43, 44</sup>.

Příkladem je reakce popsaná ve schématu 29, která zahrnuje reakci *o*-fenylendiaminu (78) s různými ketony (111) za katalýzy oxidem zirkoničitým.

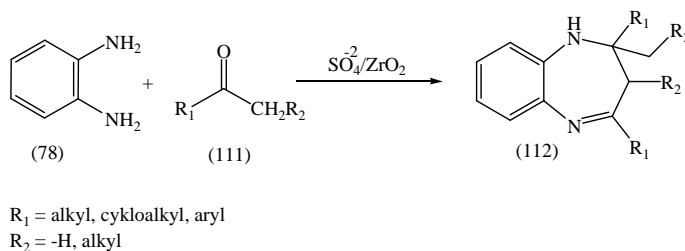


Schéma 29

### 6.3.1. Benzodiazepin-2-ony

Studie<sup>45</sup> se zabývá reakcemi nesubstituovaných a 4-substituovaných-*o*-fenylendiaminů s různými nenasyčenými kyselinami. Závěry poukazují na fakt, že skelet výsledných azaheterocyklů závisí jak na struktuře příslušné karboxylové kyseliny, tak na typu substituce zvoleného *o*-fenylendiaminu. Schéma 30 znázorňuje jednokrokovou syntézu derivátů benzimidazolu (114) a benzodiazepin-2-ony (115), které lze z reakční směsi oddělit kolonovou chromatografií.

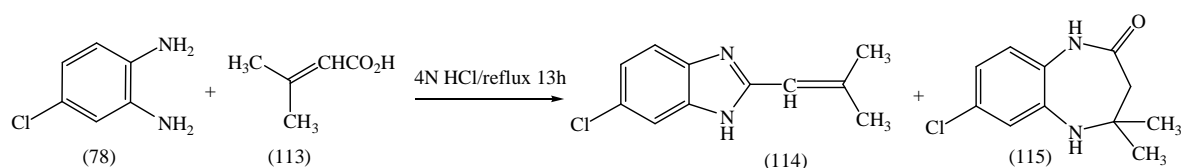


Schéma 30

### 6.4. Benzotriazoly

Další dusíkaté heterocykly, které lze připravit z *o*-fenylendiaminových prekurzorů, jsou benzotriazoly. Jedná se o sloučeniny hojně využívané jako inhibitory koroze<sup>46</sup>. Syntéza je založena na tvorbě diazoniových solí za následné cyklizace na konečný produkt (111) (Schéma 31)

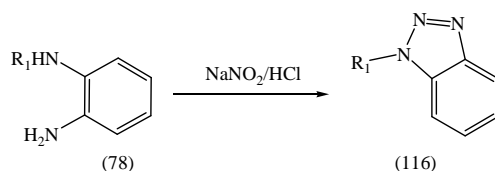


Schéma 31

## 7. Výsledky a diskuse

### 7.1. První strategie syntézy cílového benzimidazol-hydroxychinolonu

Pro ověření přípravy modelového bisheterocyklu (XVI) byla vybrána metoda B (Schéma 32), která měla vycházet z imobilizace raménka (III) na polystyrenové pryskyčici přes kyselé labilní linker. Následně měl být na jednom konci raménka vystavěn prekurzor



benzimidazolu (IV) a na druhém konci raménka vytvořena vhodná funkční skupina (-NHR<sub>1</sub>) sloužící k výstavbě hydroxychinolového skeletu.

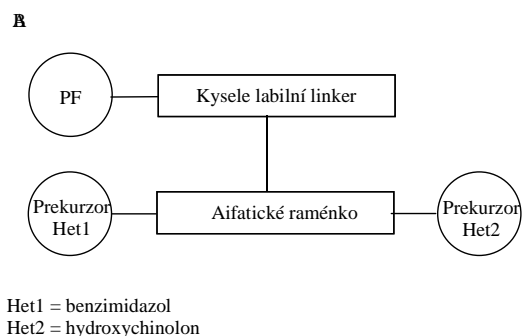


Schéma 32

### 7.1.1. Syntéza prekurzoru (VIII)

První část práce byla zaměřena na přípravu systému **polymer ⇒ kyselý labilní linker ⇒ raménko ⇒ prekurzor benzimidazolu**. K účelům navržené syntézy měla sloužit polystyrenová aminomethylová pryskyřice vybavená kyselým labilním linkerem (II), přičemž primárním krokem sekvence měla být reaktivní aminace systému (II) 3-aminopropanolem. Vzniklý intermediát (III) měl být dále podroben arylaci za vzniku derivátu (IV), jehož hydroxy skupina měla být transformována na sekundární amino skupinu za vzniku derivátu (VIII) (Schéma 33).

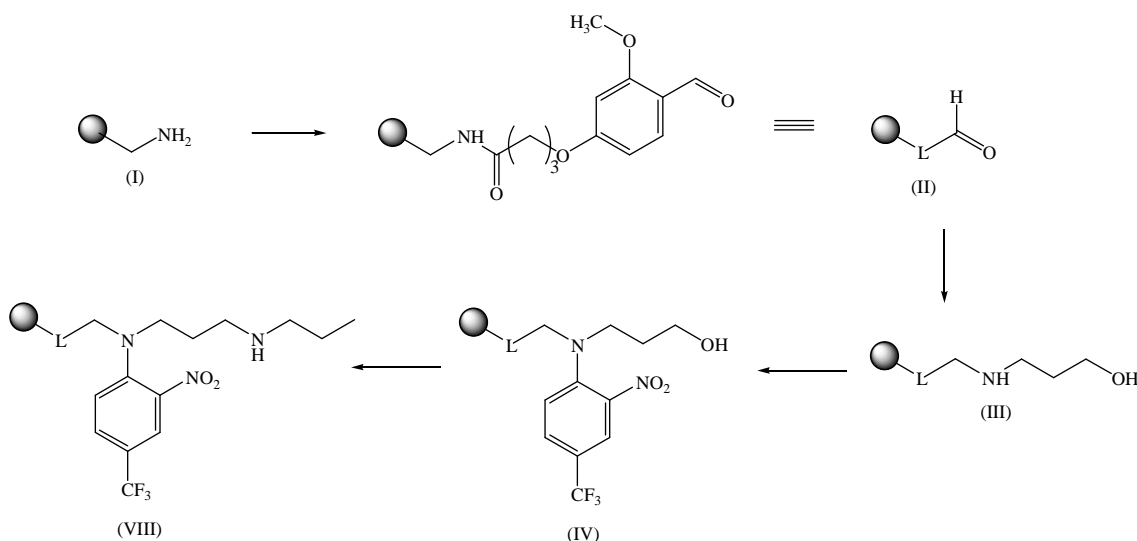
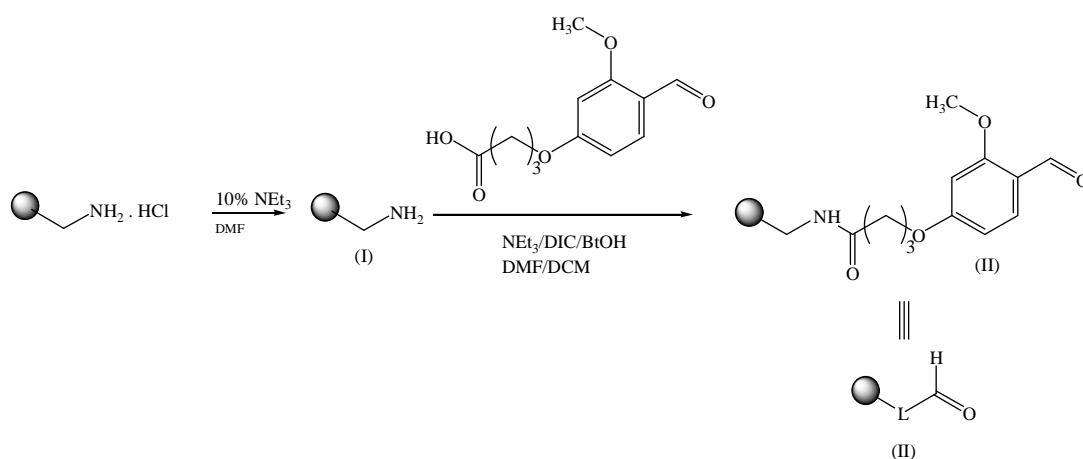


Schéma 33

### 7.1.1.1. Imobilizace 3-aminopropanolu

Aminomethylová pryskyřice (kopolymer styrenu a 2% divinylbenzenu, loading 0,78 mmol/g) je uchovávána ve formě hydrochloridu. Z tohoto důvodu bylo nutné polymer nejdříve protřepat s 10% roztokem triethylaminu v dimethylformamidu, který uvolnil aminoskupinu pro účely její acylace. Jako acylační činidlo byla použita 4-(4-formyl-3-methoxy-fenoxy)butanová kyselina, resp. její *in situ* připravený BtOH ester (Schéma 34). Pro ověření průběhu této reakce byl proveden test, který zahrnuje smíchání roztoku bromfenolové modře v dichlormethanu a *N*-methylpyrrolidonu se vzorkem výsledné pryskyřice. Absence modrého zbarvení pryskyřice indikovalo kvantitativní acylaci, čemuž odpovídá teoretický loading systému pryskyřice-linker 0,66 mmol/g.



Reduktivní aminace (II) byla provedena dle popsaného protokolu<sup>1</sup>, přičemž průběh této reakce byl zhodnocen kvantitativně pomocí HPLC (metoda vnějšího standardu s použitím Fmoc-Ala) analýzou *N*-Fmoc-3-aminopropanolu (IIIb), který byl připraven z derivátu (III) pomocí Fmoc-OSu z definovaného množství pryskyřice (Schéma 35). Loading pryskyřice po reductivní aminaci činil 0,48 mmol/g (výtěžek 76%).

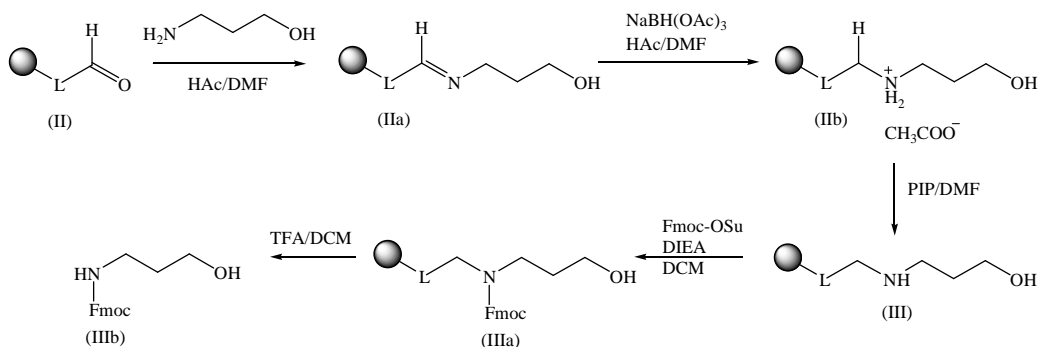


Schéma 35

Dalším krokem sekvence byla arylace imobilizovaného aminopropanolu (III), přičemž LC-MS analýza potvrdila přítomnost intermediátu (IV) bez přítomnosti výchozí látky a nečistot (Schéma 36).

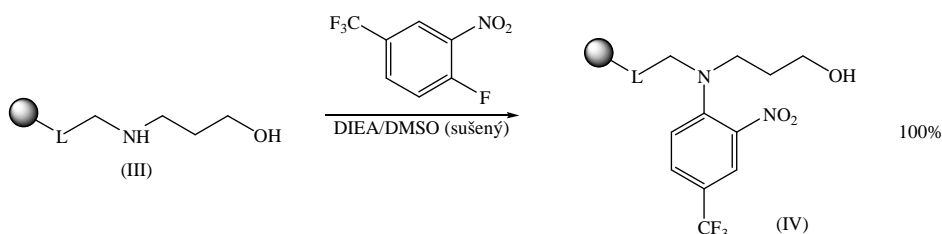
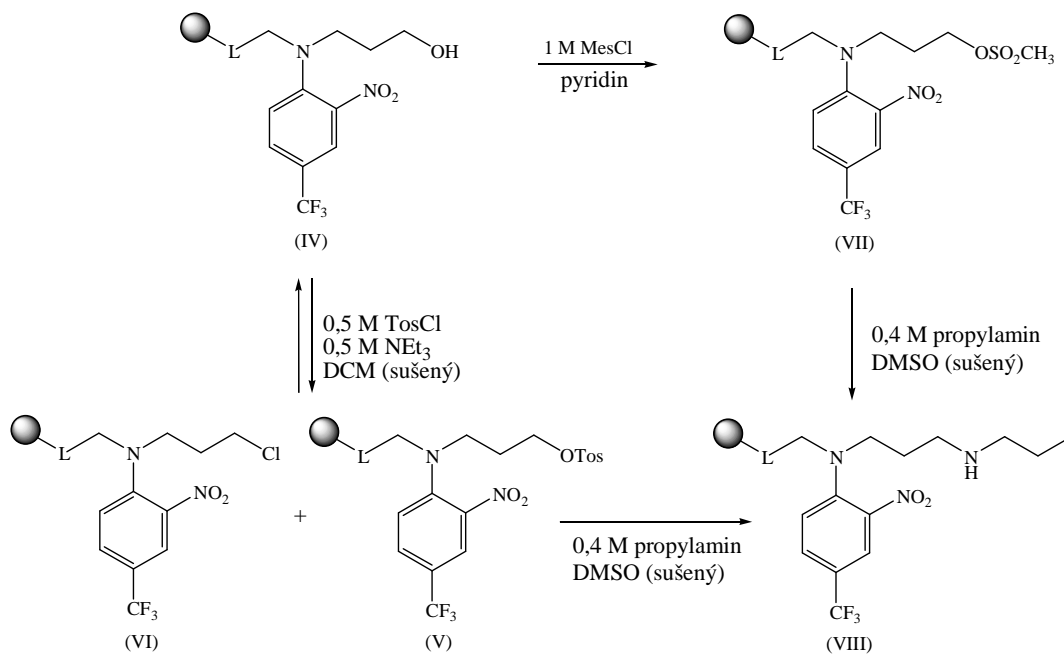


Schéma 36

### 7.1.1.2. Modifikace hydroxy skupiny

Pokus o konverzi hydroxy skupiny na amino skupinu (Schéma 37) byl nejdříve proveden přes tosylyaci za přítomnosti triethylaminu jako báze. Výsledky analýzy první testovací reakce naznačily, že bude zapotřebí najít vhodné podmínky pro doreagování výchozí látky (IV) (Tabulka 6). Zvýšení koncentrace tosylchloridu (0,25 M  $\rightarrow$  0,5 M) se projevilo vznikem směsi tosylesteru (V) a chloridu (VI). Tato směs měla být následně převedena reakcí s propylaminem na požadovaný produkt (VIII). Oproti očekávání však tosylát při této reakci podléhal částečné hydrolyze zpět na alkohol (IV). Od této reakční cesty bylo tedy upuštěno.

Další snaha o modifikaci hydroxy skupiny (Schéma 37) byla vedena přes mesylyaci. Také v tomto případě bylo nutné upravit reakční podmínky tak, aby měl výsledný intermediát (VII) optimální čistotu (Tabulka 7). Optimalizace bylo dosaženo po zvýšení koncentrace mesylchloridu na 1 M roztok, což umožnilo po reakci s propylaminem získat výchozí prekurzor pro modelový bisheterocyklus (VIII) s maximálním výtěžkem 100%.



Tabulka 6

Optimalizace tosylace			
<b>TosCl</b>	0,25 M	0,40 M	0,50 M
<b>Báze (Net<sub>3</sub>)</b>	0,50 M	0,50 M	0,50 M
<b>Reakční doba</b>	24 hod	24 hod	48 hod
<b>Tosylát (V)</b>	82%	81%	87%
<b>Chlorid (VI)</b>	0%	7%	13%
<b>Výchozí látka (IV)</b>	18%	12%	0%

Tabulka 7

Optimalizace mesylace				
<b>MesCl</b>	0,25 M	0,40 M	0,40 M	1,00 M
<b>Báze (Net<sub>3</sub>)</b>	0,50 M	x	x	x
<b>Rozpouštědlo</b>	DCM	Py	Py	Py
<b>Reakční doba</b>	24 hod	3 hod	24 hod	1 hod
<b>Mesylát (VII)</b>	23%	43%	76%	100 %
<b>Výchozí látka (IV)</b>	77%	57%	24%	0%

### 7.1.2. Výstavba bisheterocyklu benzimidazol-hydroxychinolonu

Sekundární amino skupina systému (VIII) byla zvolena jako vhodný výchozí bod pro syntézu prekursoru hydroxychinolonového skeletu. Za tímto účelem měl být imobilizovaný synthon (VIII) nejdříve acylován 1-methyl-2-aminotereftalátem. Hydrolyzou takto připraveného esteru (IX) měl dále vzniknout meziprodukt (X), který by po následné esterifikaci bromacetofenonem poskytl intermediát (XI) vedoucí k očekávanému hydroxychinolonu. Derivát benzimidazolu pak měl být připraven redukcí nitro skupiny derivátu (XI) a následnou acylací amino skupiny sloučeniny (XII). Připravený intermediát (XIII) pak měl být cyklizován na benzimidazolové uspořádání (Schéma 38).

Další část experimentální fáze měla být následně věnována ověření cyklizace prekursoru (XIII) na cílový bisheterocyklický derivát hydroxychinolonu (XVI), jejíž úspěšnost je obvykle silně závislá na struktuře výchozího substrátu (XIII).

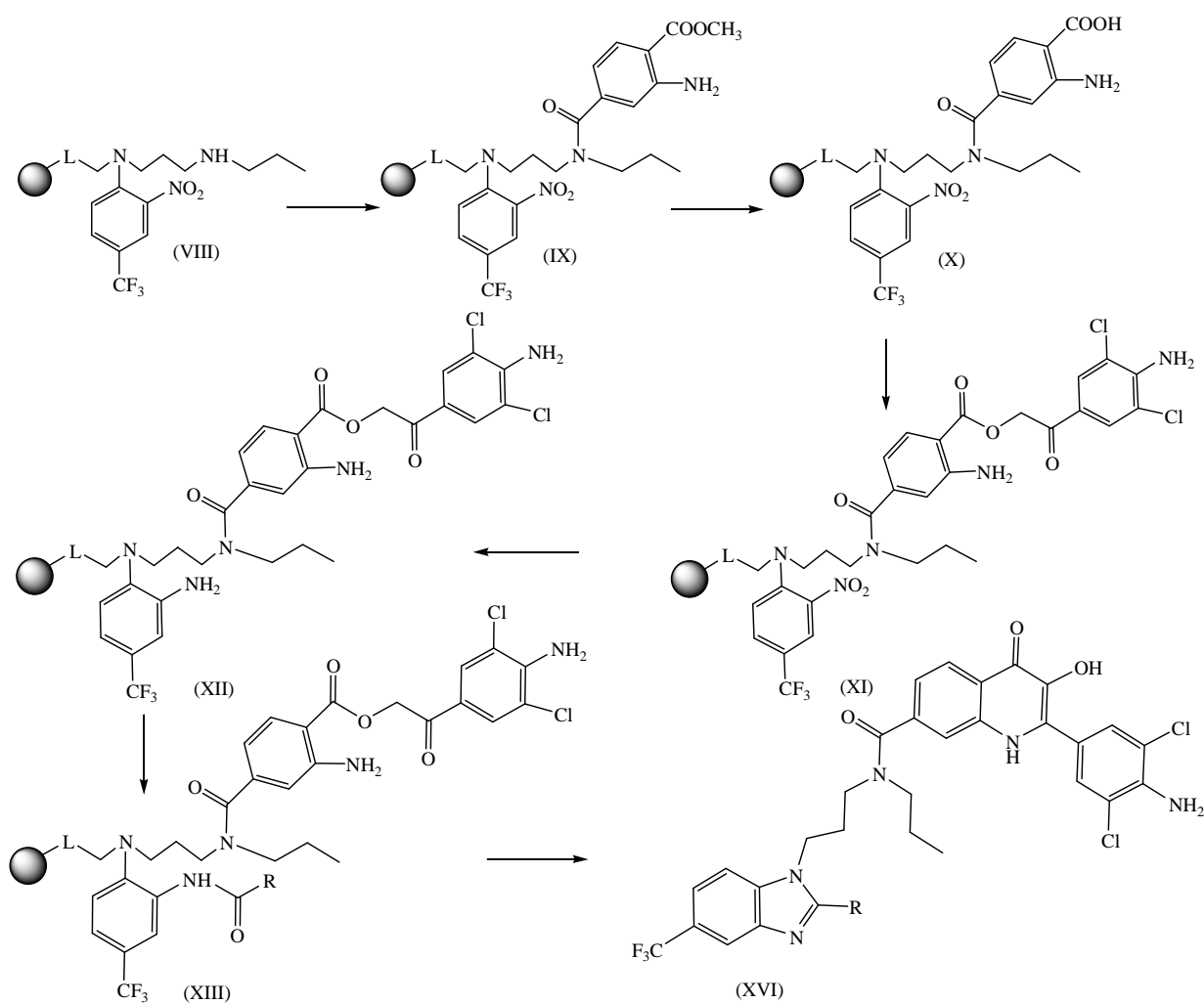


Schéma 38

### 7.1.2.1. První pokus o experimentální syntézu bisheterocyklu

První část přípravy byla založena na zmíněné acylaci sekundárního aminu (VIII) pomocí *in situ* připraveného BtOH esteru 1-methyl-2-aminotereftalátu. Analýza LC-MS jasně potvrdila bezproblémový průběh reakce a připravený ester (IX) byl následně podroben hydrolýze pomocí TMSOK. Pro přípravu prekursoru (XI) vedoucího k hydroxychinolovému skeletu bylo dále zapotřebí provést esterifikaci intermediátu (X) bromacetofenonem. Jak hydrolýza, tak esterifikace představují reakční kroky podléhající kvantitativní konverzi (Schéma 39).

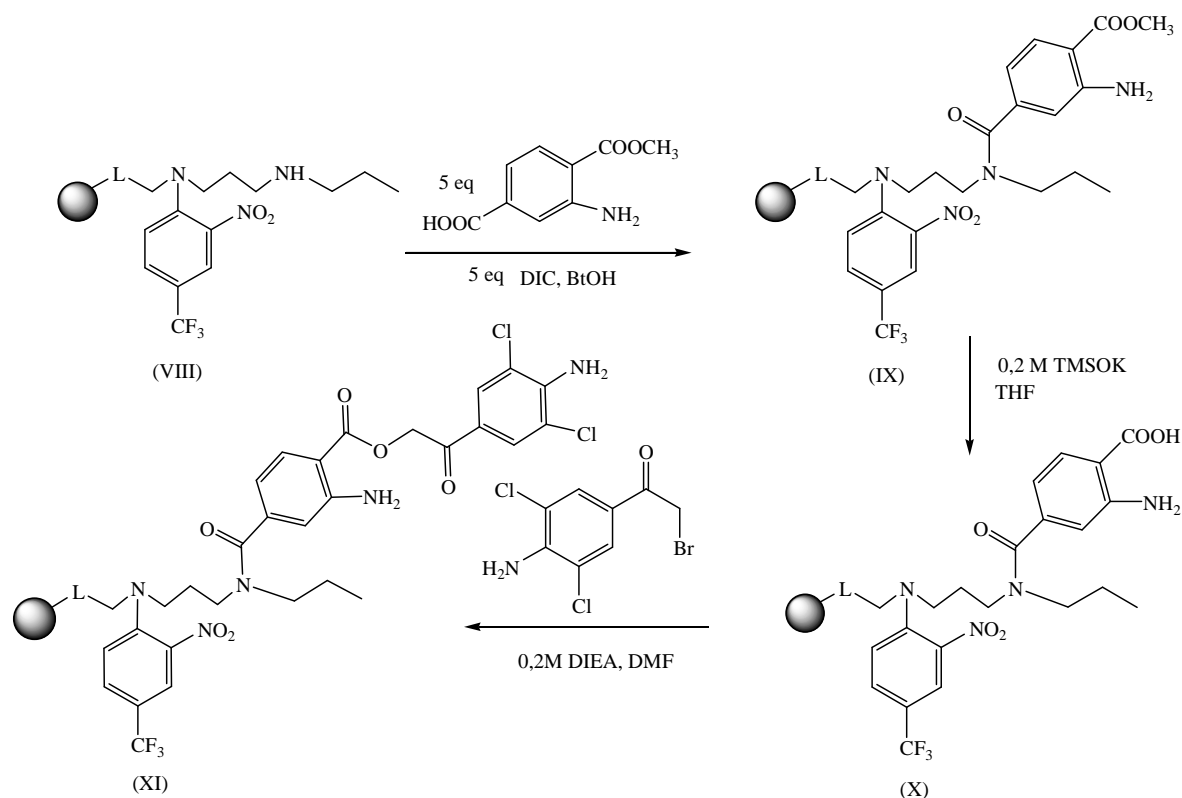


Schéma 39

Zvolený derivát *o*-fenylendiaminu (XIII) byl připraven redukcí nitro skupiny sloučeniny (XI) a následnou acylací meziprojektu (XII). V případě zmíněné acylace amino skupiny byly použity celkem tři postupy. První metoda využívala tzv. BtOH techniku s kyselinou octovou, která je založena na *in situ* tvorbě acetanhydridu. Paralelně byla vyzkoušena i reakce s kyselinou propionovou. Nicméně i přes modifikaci reakčních podmínek obou postupů, nebyl výtěžek reakce vyšší než 10%. Jako další acylační činidlo byl vyzkoušen acetanhydrid. Po dvou hodinách nebyla reakční směs zcela doreagována a navíc vedle sebe vznikaly produkty odpovídající meziprojektům (XIII) a (XIV). Po zvýšení reakční doby na

24 hodin byl ve směsi prokázán již pouze minoritní monoacetylderivát (XIII) a majoritní diacetylderivát (XIV). K triacetylaci intermediátu (XII) nedocházelo ani prodloužením reakčního času na 3 dny (Schéma 40).

Hlavním předmětem zájmu bylo zjistit, která z amino skupin ( $\alpha$ ,  $\beta$ ) v případě diacetylderivátu (XIV) podléhá acylační reakci. Za tímto účelem byly provedeny dva experimenty. První pokus byl založen na cyklizaci směsi (XIII) a (XIV), neboť acylace amino skupiny ( $\alpha$ ) by znemožnila uzavření kruhu na hydroxychinolon (XVI). Následná analýza prokázala, že k cyklizaci vůbec nedošlo. Z tohoto výsledku však není patrné, zdali je za situaci zodpovědná naacylovaná amino skupina ( $\alpha$ ) nebo zda k cyklizaci nedošlo vlivem struktury substrátu (XIII) (Schéma 40).

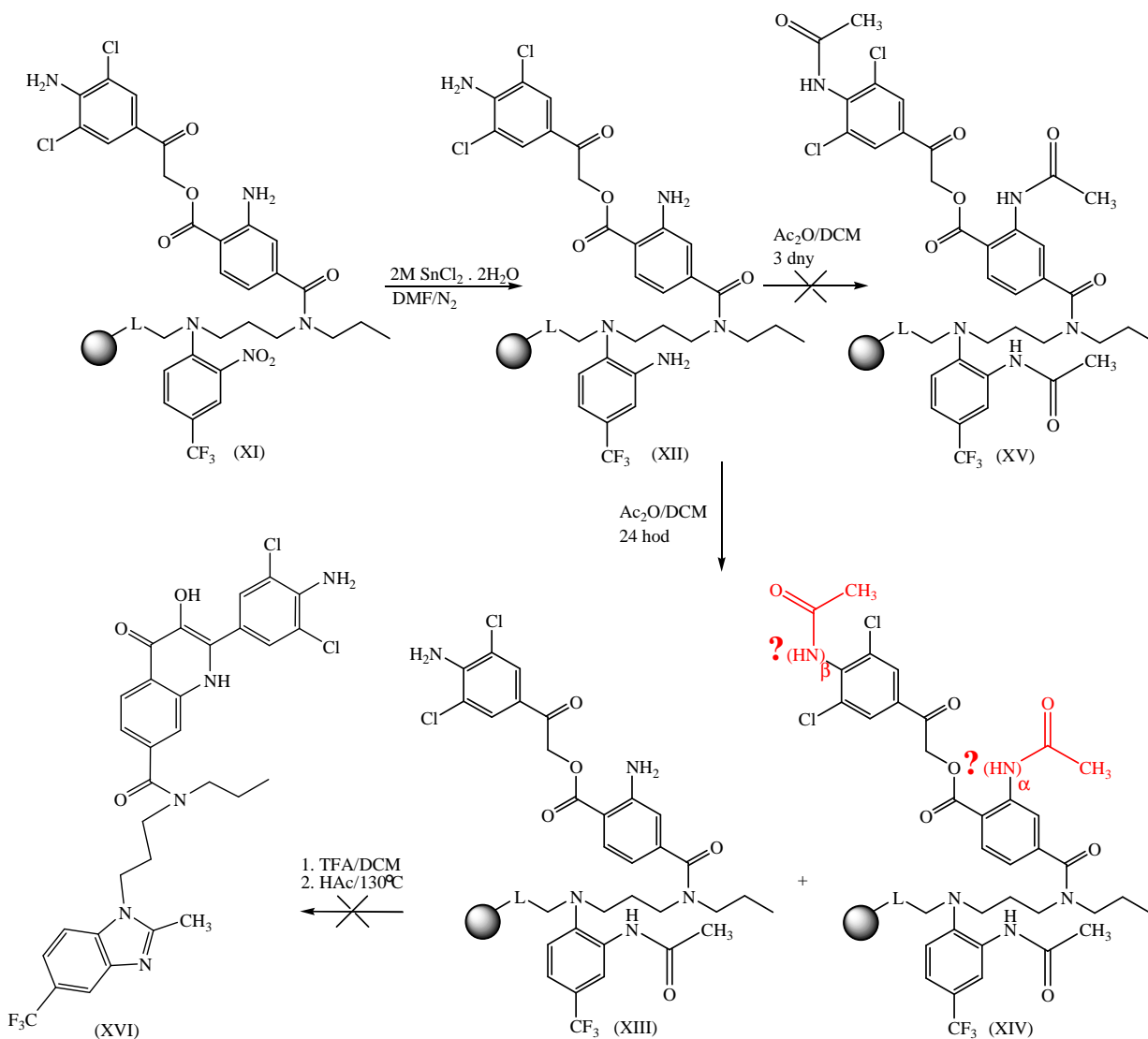


Schéma 40

Druhý experiment spočíval v redukcí nitro skupiny ve stádiu meziprojektu (IX) za následné acetylce intermediátu (XVII) (Schéma 41). Pomocí LC-MS analýzy bylo prokázáno, že vedle látky (XVIII) (56%) vzniká v menším množství diacetylderivát (XIX) (34%). Dosavadní strategie syntézy byla tedy na základě zjištěných poznatků účelově pozměněna.

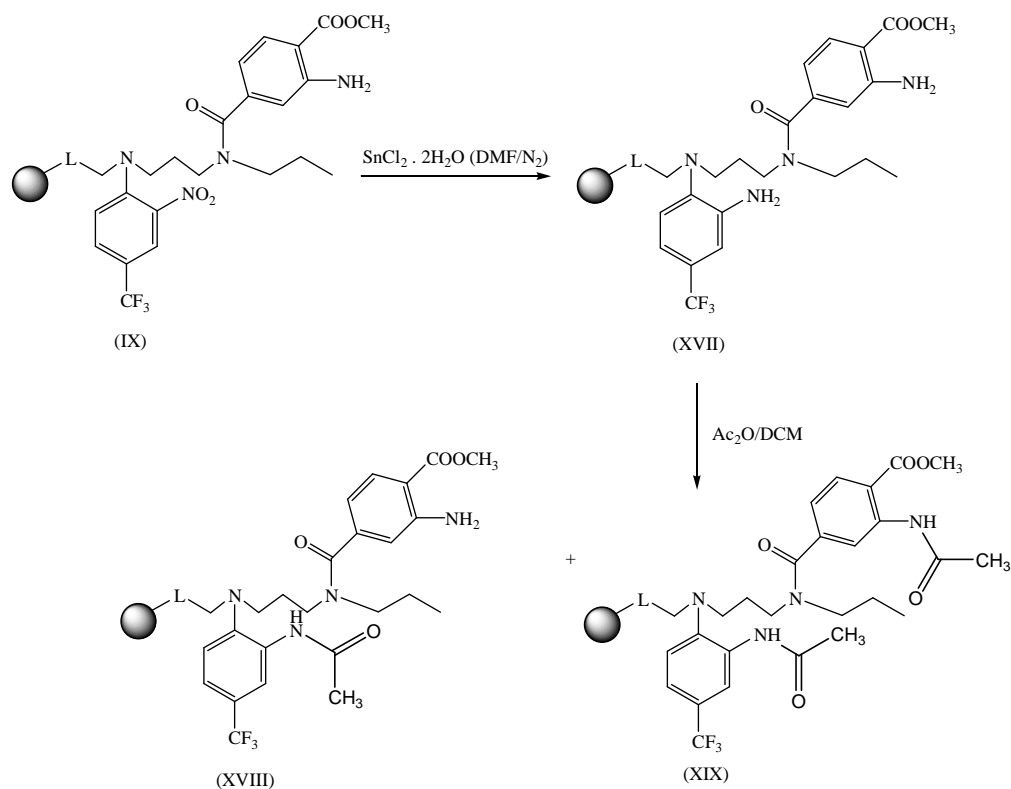


Schéma 41

## 7.2. Druhá strategie syntézy cílového benzimidazol-hydroxychinolonu

V případě dalšího pokusu o syntézu modelového bisheterocyklu benzimidazol-hydroxychinolon (XVI) byla opět využita dříve popsaná metoda B (Schéma 32). První fáze syntézy měla být založena na protekci sekundárního aminu (VIII) pomocí chránící Fmoc skupiny. Takto připravený intermediát (XX) měl snadno podlehnout redukcí nitro skupiny na primární amin (XXI), který měl být dále podroben acylaci. Následná deproteckce sekundární amino skupiny měla vést ke vzniku očekávaného prekurzoru benzimidazolového uspořádání (XXIII), přičemž další kroky reakční sekvence měly být naprosto totožné s první strategií syntézy cílového bisheterocyklu (XVI) (Schéma 42).



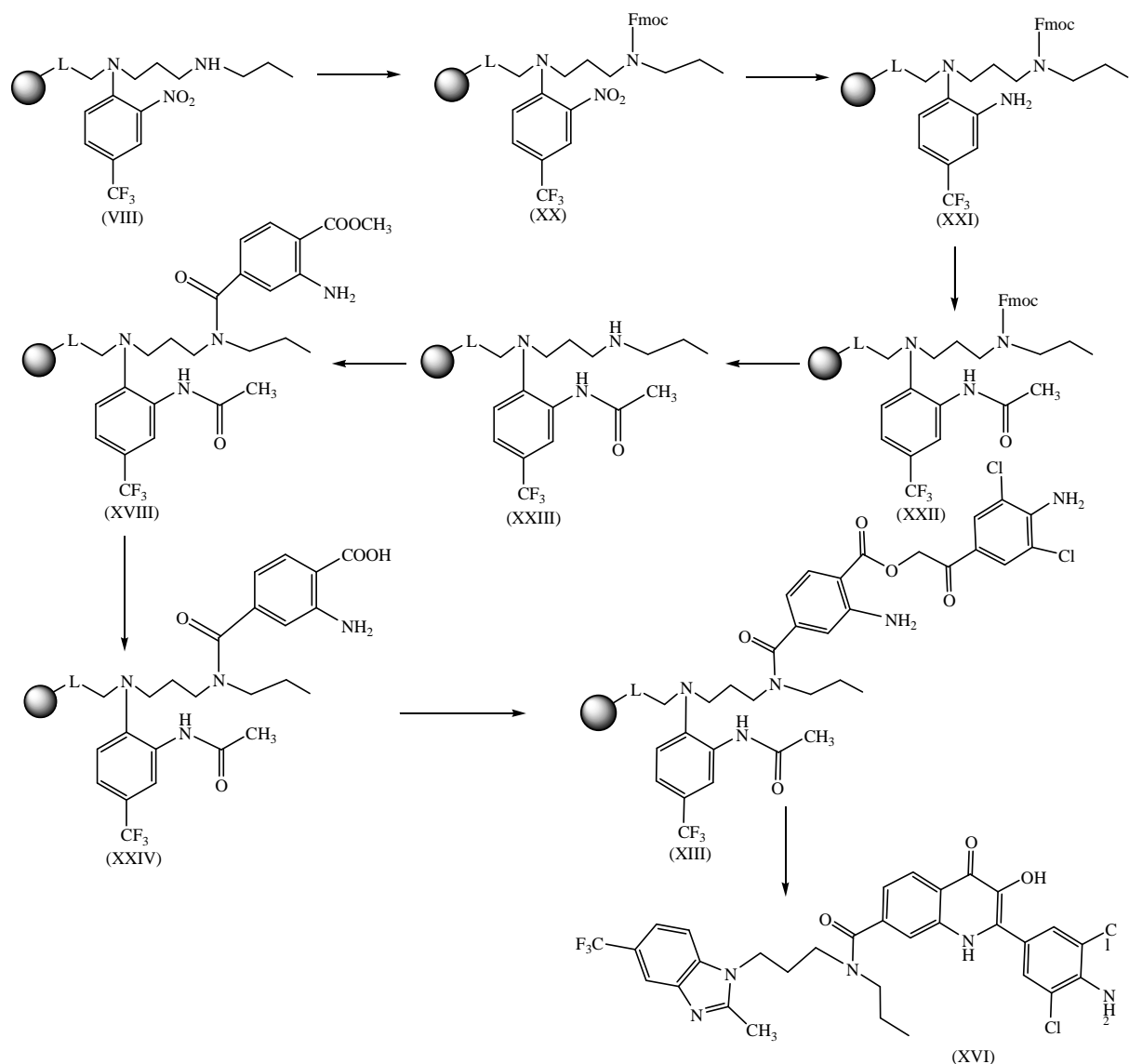


Schéma 42

### 7.2.1. Syntéza výchozího prekurzoru (XXIII)

Primárním krokem sekvence byla protekce sekundárního aminu (VIII) pomocí Fmoc-OSu. Reakce vykazovala bezproblémový průběh, proto byla dále provedena redukce nitro skupiny meziprojektu (XX) za následné acylace amino skupiny sloučeniny (XXI). Je známo, že vazba  $R_1R_2N$ -Fmoc podléhá štěpení v bazickém prostředí, přičemž pro účely deprotektce se standardně používá 50% roztok piperidinu (PIP) v dimethylformamidu (DMF). Analýza LC-MS však prokázala, že PIP pro odchránění substrátu (XXII) není vhodný, neboť ve spektru bylo přítomno majoritní množství výchozí látky i po zvýšení reakční doby z 15 minut na 2 hodiny. Obtížná deprotektce intermediátu (XXII) je v tomto případě pravděpodobně

způsobena sterickým bráněním acetylskupinou, což bylo potvrzeno sérií experimentů. Pokusy spočívaly v odchránění meziproductů (XX), (XXI) a (XXII) pomocí 50% PIP v DMF. V případě sloučenin (XX) a (XXI) byla vazba  $R_1R_2N$ -Fmoc kvantitativně štěpena. Látka (XXII) podlehla deprotekcí teprve až po použití 50% roztoku strukturně menšího propylaminu v DMF (Schéma 43).

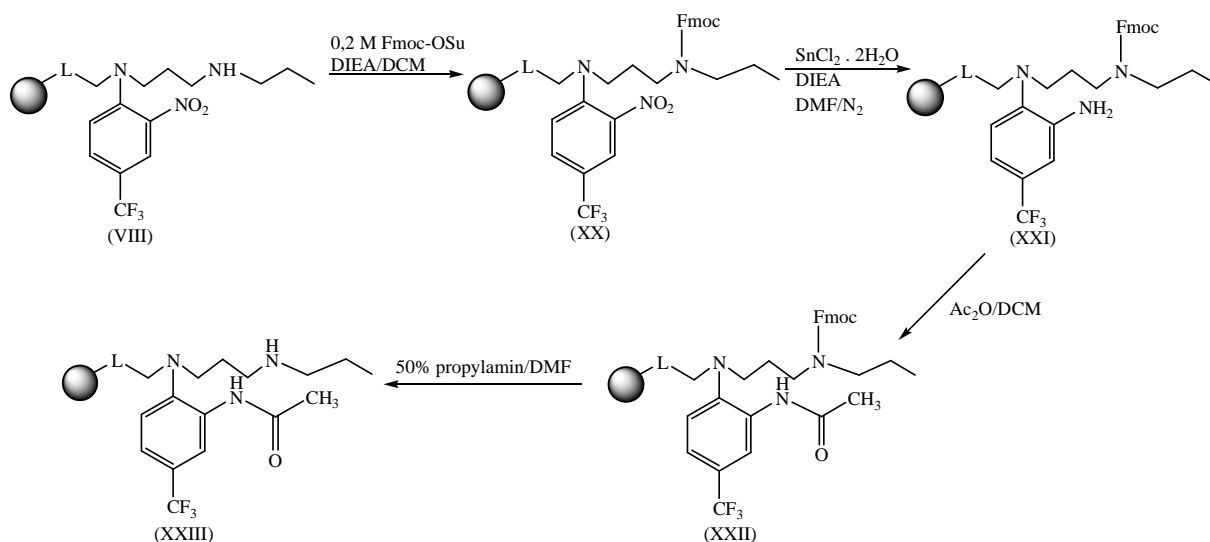


Schéma 43

## 7.2.2. Druhý pokus o experimentální syntézu bisheterocyklu

Další kroky syntézy jsou analogické s popisem uvedeným v kapitole 7.1.2.1. Odchráněný amin (XXIII) byl nejdříve naacylován pomocí *in situ* BtOH esteru 1-methyl-2-aminotereftalátu. Takto připravený ester (XVIII) byl následně hydrolyzován roztokem TMSOK a poté podroben reakci s bromacetofenonem, která vedla k přípravě výchozího prekursoru (XIII) požadovaného benzimidazol-hydroxychinolonu (XVI). Nutno říci, že v případě saponifikace i následné esterifikace bylo potřeba (oproti prvnímu pokusu o syntézu bisheterocyklu) zvýšit reakční dobu dvojnásobně, aby došlo ke kvantitativní transformaci (Schéma 44).

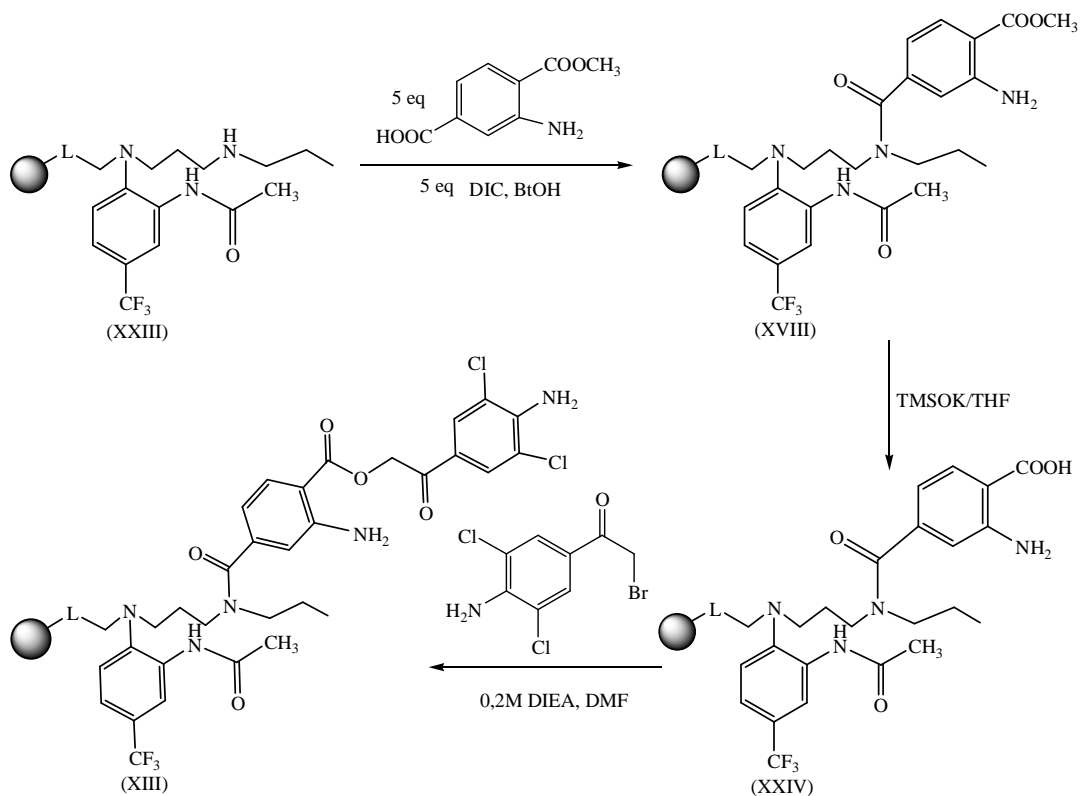


Schéma 44

V rámci snahy o ověření možnosti cyklizace intermediátu (XIII) na cílový bisheterocyklus (XVI) bylo provedeno několik pokusů inspirovaných protokoly<sup>1,2</sup> (Schéma 46). Použitá metoda zahrnovala primární odštěpení látky (XIII) od polymerního nosiče pomocí 50% roztoku kyseliny trifluoroctové v dichlormethanu.

- V další fázi následoval pokus o paralelní uzavření obou heterocyklů zahříváním v kyselině octové při 130°C a v kyselině trifluoroctové při 100°C bez použití olejové lázně. Tato metoda se však ukázala jako příliš drastická, neboť došlo v obou případech k fragmentaci intermediátu (XIII).
- Strategie byla modifikována použitím olejové lázně s cílem zjistit, zdali je možné za mírnějších podmínek uzavřít nejdříve benzimidazolový cyklus (XXV) (Schéma 45). Pro tento účel byl tedy vzorek zahříván v kyselině octové nejdříve při 60°C, přičemž po 2 hodinách obsahovala reakční směs stále výchozí látku, i když intermediát (XXV) vznikal. Teplota byla následně zvýšena na 130°C a udržována po dobu 1 hodiny. Následná analýza LC-MS neprokázala přítomnost výchozí látky, současně však nebyl prokázán intermediát (XXV) ani produkt (XVI). Stejná situace byla zaznamenána i v případě použití kyseliny trifluoroctové. Finální spektra vyhodnocující výsledek obou postupů byla poměrně nečitelná.

c) Další pokus o optimalizaci využíval opět kyselinou octovou, kdy byl vzorek udržován při 60°C po dobu 3 dnů. Během prvních 24 hodin bylo hmotnostní spektrum téměř identické se spektrem výchozího prekursoru (XIII). Po dvou dnech se množství derivátu benzimidazolu (XXV) snížilo ze 47% na 38% v důsledku vzniku dalších neidentifikovatelných fragmentů, část spektra byla již v této fázi značně nečitelná. Po 72 hodinách LC-MS analýza nepotvrdila přítomnost produktu ani výchozí látky stejně jako v případě postupu b).

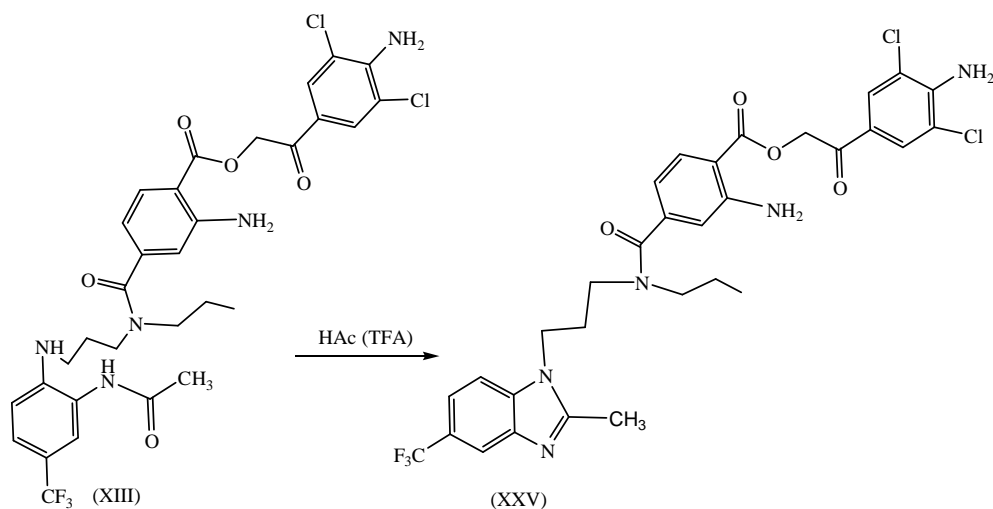


Schéma 45

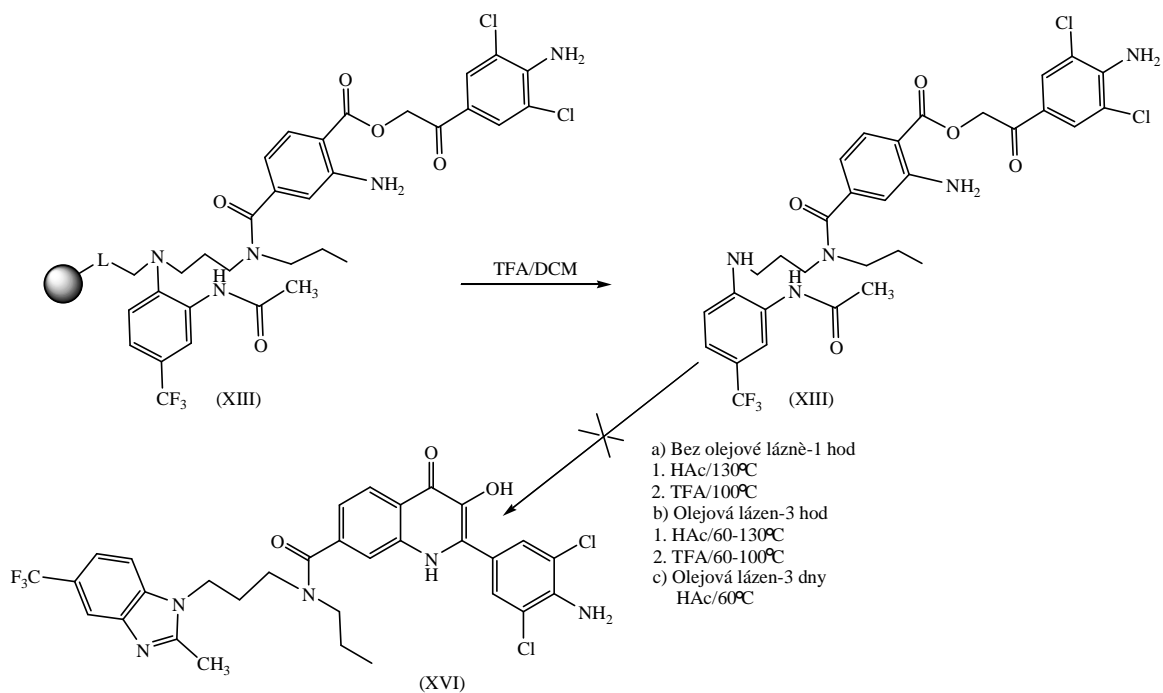


Schéma 46

## 8. Experimentální část

Pro přípravu látek pomocí syntézy na pevné fázi byly jako reakční nádoby použity injekční stříkačky s polypropylenovou fritou. Reakce byly realizovány za laboratorní teploty, přičemž homogenní promíchání reakční směsi bylo zajištěno stolní třepačkou s horizontálním pohybem. Pro účely cyklizace byly použity Erlenmayerovy baňky umístěné na magnetické míchače s ohřevem.

Všechny vzorky byly analyzovány metodou LC-MS a vyhodnocení záznamu bylo provedeno pomocí softwaru Excalibur<sup>IM</sup>.

### Parametry LC-MS

- **UPLC-chromatograf (Accela Thermo Scientific):**
  - ⇒ gradientová kvartérní pumpa (USA, SN: 82738)
  - ⇒ autosampler s termostatem (SN: 82794)
  - ⇒ odplyňovač
  - ⇒ předkolona (Macherey-Nagel, Nucleodur C18 Gravity – 3,0 µm)
  - ⇒ kolona (Macherey-Nagel, Nucleodur C18 Gravity – 1,8 µm)
  - ⇒ termostat (30°C)
- **Parametry UPLC:** nástřík – 5 µl
  - mobilní fáze – acetonitril (A) : amonium acetát 0,1% (B)
  - gradientová eluce – 10 A : 90 B (0 min); 80 A : 20 B (2,5 min); 80 A : 20 B (4 min); 10 A : 90 B (4,5 min); 10 A : 90 B (5 min)
- **Hmotnostní spektrometr**
  - ⇒ trojitý kvadrupól
  - ⇒ detektor TSQ Quantum Access (Thermo Scientific, USA, SN: TQU01482)

### **8.1. Obecný postup štěpení reakčních produktů z polymerního nosiče (standardní štěpení)**

Analýza LC-MS vyžaduje uvolnění výsledného produktu z pevné fáze, přičemž se k tomuto účelu běžně využívá 50% roztok trifluoroctové kyseliny v dichlormethanu. Pro přípravu analytického vzorku bylo odebráno malé množství pryskyřice (5-10 mg), za následného přidavku 0,5 ml štěpícího koktejlu TFA v DCM. Po 30 minutovém třepání reakční

směsi byla těkavá kapalná fáze odpařena pod dusíkem. K odparku byl přidán MeOH (1 ml) a směs byla ve finálním kroku zfiltrována.

Při interpretaci hmotnostních spekter je nutné brát v úvahu, že trifluoroctová kyselina velmi ochotně reaguje s primárními aminy a alkoholy za vzniku trifluoracetylderivátů, případně může být příčinou vzniku produktů cyklizace po odštěpení substrátu z polystyrenové pryskyřice. Takto vytvořené intermediáty jsou ve výsledcích LC-MS analýzy uváděny bez pořadového čísla.

## **8.2. Experimentální syntéza na pevné fázi**

### **Příprava systému polymer – kyselě labilní linker (II)**

Hydrochlorid aminomethylové pryskyřice (1 g; 0,78 mmol) byl nejdříve smíchán s roztokem triethylaminu v DMF (10 ml; 10%) a směs byla následně protřepávána 10 minut. Po promytí pryskyřice (I) 3x v DMF byl k polymeru přidán roztok připravený rozpuštěním 4-(4-formyl-3-methoxy-fenoxy)butanové kyseliny (372 mg; 1,56 mmol) a 1-hydroxybenzotriazol hydrátu (239 mg; 1,56 mmol) v DMF (5 ml) za přídavku diisopropylkarbodiimidu (0,42 ml; 1,56 mmol) a DCM (5 ml). Reakční směs byla třepána přes noc a další den byla naacylovaná pryskyřice (II) promyta 3x v DMF, DCM a vysušena pod dusíkem. Průběh acylace byl kvalitativně zhodnocen odběrem malého množství polymeru (II) (1 mg), který byl smíchán s roztokem bromfenolové modře ve směsi N-methylpyrrolidonu a DCM (1 ml). Jelikož se směs nezabarvila modře, byla vizuálně indikována nepřítomnost amino skupiny.

### **8.2.1. První strategie syntézy**

#### **Imobilizace alifatického raménka (III) reduktivní aminací**

Systém polymer-kyselě labilní linker (II) (1 g; 0,66 mmol) byl 2x promyt bezvodým DMF za následného protřepání s roztokem 3-aminopropanolu (240  $\mu$ l; 3,9 mmol) ve směsi kyseliny octové a bezvodého DMF (10 ml; 10%). Po 24 hodinách třepání byl k pryskyřici přidán triacetoxhydroborid sodný (212 mg; 1 mmol) v roztoku s kyselinou octovou a bezvodým DMF (5 ml; 5%). Reakční nádoba byla umístěna do vertikální polohy a propíchnuta těsně pod pístem, což mělo za následek uvolnění vznikajícího vodíku. Po 1 hodině třepání byl přidán pevný triacetoxhydroborid sodný (212 mg; 1 mmol) a následující hodinu byl tento krok zopakován, načež byla směs dále protřepávána 2 hodiny. Po ukončení

reakce byla pryskyřice promyta 3x v DMF a následně protřepána ve směsi piperidinu a DMF (10 ml; 20%). V posledním kroku byl polymer s imobilizovaným aminopropanolem (**III**) promyt 3x v DMF, DCM a poté vysušen pod dusíkem.

### Kvantitativní zhodnocení průběhu reaktivní aminace

Definované množství pryskyřice (**III**) (30 mg) bylo nejdříve smícháno s roztokem *N*-(9-fluorenylmethoxykarbonyloxy)sukcinimidu (65 mg; 0,25 mmol) a diisopropylethylaminu (45  $\mu$ l; 0,26 mmol) v DCM (0,5 ml). Po 30 minutách třepání byl systém (**IIIa**) promyt 5x v DCM, 3x v MeOH a vysušen pod dusíkem. Z takto připraveného polymeru byly odebrány dva vzorky po 10 mg, které byly smíchány se štěpícím koktejlem kyseliny trifluoroctové v DCM (0,5 ml, 50%). Dále bylo provedeno standardní štěpení podle výše popsaného scénáře. Oba vzorky (**IIIb**) spolu s vnějším standardem, jehož příprava spočívala v rozpuštění fluorenylmethoxykarbonylalaninu (1 mg) v MeOH (1 ml), byly podrobeny LC-MS analýze. Na základě výsledků analýzy a jednoduchého výpočtu (Obrázek 4)<sup>47</sup> bylo zjištěno, že loading pryskyřice po imobilizaci 3-aminopropanolu činí 0,48 mmol/g, výtěžek reakce je 76%.

$$\eta(\%) = \frac{\left( n_{Fmoc.Ala} \cdot \frac{\bar{X}_{SP}}{X_{Fmoc.Ala}} \right) \cdot 100}{l_A}$$

$n_{Fmoc.Ala}$  látkové množství standardu Fmoc-Ala odpovídající 1 mg (mmol/mg)

$\bar{X}_{SP}$  průměr ploch píku dvou měření 10 mg imobilizované pryskyřice

$X_{Fmoc.Ala}$  plocha píku 1 mg standardu Fmoc-Ala

$l_A$  loading imobilizované pryskyřice za podmínky 100% výtěžku (mmol/g)

Obrázek 4

### 3-(2-nitro-4-trifluormethylfenylamino)propan-1-ol (**IV**)

K produktu (**III**) (500 mg; 0,24 mmol) byla přidána směs 1-fluor-2-nitro-4-trifluormethylbenzenu (168  $\mu$ l; 1,2 mmol) a diisopropylethylaminu (209  $\mu$ l; 1,2 mmol) v bezvodém DMSO (5 ml), pryskyřice byla následně ponechána třepání přes noc. Po uplynutí reakční doby byl polymer promyt 3x v DMF, DCM a následně bylo provedeno standardní štěpení.

**LC-MS:** Celkový výtěžek reakce je 100%

- 3-(2-nitro-4-trifluormethylfenylamino)propan-1-ol (**IV**) (76%)  
[M - H]<sup>-</sup> = 263,85; rt = 1.57
- (propyl)-3-(2-nitro-4-trifluormethylfenylamino)trifluoracetát (24%)  
[M - H]<sup>-</sup> = 359,85; rt = 2.29

**[3-(2-nitro-4-trifluormethylfenylamino)propyl]toluen-4-sulfonát (V) a (3-chlorpropyl)-(2-nitro-4-trifluormethylfenyl)amin (VI)**

Tosylchlorid (190 mg, 1 mmol) ve směsi triethylaminu (140 µl, 1mmol) a bezvodého DCM (1 ml) byl smíchán s polymerem (**IV**) (100 mg; 0,048 mmol). Po 48 hodinách třepání byla pryskyřice promyta 5x bezvodým THF a následně standardně štěpena.

**LC-MS:** Celkový výtěžek reakce je 82%

- [3-(2-nitro-4-trifluormethylfenylamino)propyl]toluen-4-sulfonát (**V**) (82%)  
[M - H]<sup>-</sup> = 417,89; rt = 2.30
- (3-chlorpropyl)-(2-nitro-4-trifluormethylfenyl)amin (**VI**) (13%)  
[M - H]<sup>-</sup> = 281,99; rt = 2.16

**[3-(2-nitro-4-trifluormethylfenylamino)propyl]methylsulfonát (VII)**

K (**IV**) (100 mg; 0,048 mmol) byl přidán roztok mesylchloridu (77 µl; 1 mmol) v pyridinu (1 ml). Reakční směs byla třepána 1 hodinu a následně byla 5x promyta v bezvodém THF a standardně štěpena.

**LC-MS:** Celkový výtěžek reakce je 100%

- [3-(2-nitro-4-trifluormethylfenylamino)propyl]methylsulfonát (**VII**)  
[M - H]<sup>-</sup> = 342,12; rt = 1.89

**N-(2-nitro-4-trifluormethylfenyl)-N'-propylpropan-1,3-diamin (VIII)**

Látka (**VIII**) byla připravena přidáním roztoku propylaminu (82 µl; 0,4 mmol) v bezvodém DMSO (1 ml) k meziprojektu (**VII**) (100 mg; 0,048 mmol). Pryskyřice byla po 24 hodinách třepání promyta 3x v DMF, DCM a standardně štěpena.

**LC-MS:** Celkový výtěžek reakce je 100%

- N-(2-nitro-4-trifluormethylfenyl)-N'-propylpropan-1,3-diamin (**VIII**)  
[M + H]<sup>+</sup> = 306,01; rt = 1.49



**(methyl)-2-amino-N-[3-(2-nitro-4-trifluormethylfenylamino)propyl]-N-propyl tereftalamid (IX)**

Acylační směs obsahující 1-hydroxybenzotriazol hydrát (11 mg; 0,072 mmol), 1-methyl-2-aminotereftalát (14 mg; 0,072 mmol) a diisopropylkarbodiimid (11 µl; 0,072 mmol) v DMF/DCM (1 ml; 50%) byla přidána k produktu (VIII) (50 mg; 0,024 mmol). Po 24 hodinách třepání byla pryskyřice promyta 3x v DMF, DCM a standardně štěpena.

**LC-MS:** Celkový výtěžek reakce je 100%

- (methyl)-2-amino-N-[3-(2-nitro-4-trifluormethylfenylamino)propyl]-N-propyltereftalamid (IX)

$$[M + H]^+ = 483,10; \text{rt} = 2.30$$

**2-amino-N-[3-(2-nitro-4-trifluormethylfenylamino)propyl]-N-propyltereftalamidová kyselina (X)**

Hydrolyza esteru (IX) (50 mg; 0,024 mmol) byla provedena jeho smícháním s roztokem trimethylsilanolátu draselného (27 mg; 0,2 mmol) v bezvodém THF (1 ml). Reakční směs byla třepána 3 hodiny a po ukončení reakce byl polymer promyt 3x v THF, DCM a standardně štěpen.

**LC-MS:** Celkový výtěžek reakce je 100%

- 2-amino-N-[3-(2-nitro-4-trifluormethylfenylamino)propyl]-N-propyltereftalamidová kyselina (X)

$$[M + H]^+ = 469,05; [M - H]^- = 467,96; \text{rt} = 1.78$$

**[2-(4-amino-3,5-dichlorfenyl)-2-oxoethyl]-2-amino-N-[3-(2-nitro-4-trifluormethylfenylamino)propyl]-N-propyltereftalamid (XI)**

K (X) (50 mg; 0,024 mmol) byl přidán 4-amino- $\alpha$ -brom-3,5-dichloracetofenon (56,4 mg; 0,2 mmol) ve směsi s diisopropylethylaminem (35 µl; 0,2 mmol) v DMF (1 ml). Směs byla protřepávána po dobu 24 hodin a po ukončení esterifikace byla pryskyřice promyta 3x v DMF, DCM a standardně štěpena.

**LC-MS:** Celkový výtěžek reakce je 100%

- [2-(4-amino-3,5-dichlorfenyl)-2-oxoethyl]-2-amino-N-[3-(2-nitro-4-trifluormethylfenylamino)propyl]-N-propyltereftalamid (XI)

$$[M + H]^+ = 670,00; [M - H]^- = 669,26; \text{rt} = 2.53$$

**[2-(4-amino-3,5-dichlorfenyl)-2-oxoethyl]-2-amino-N-[3-(2-amino-4-trifluormethylfenylamino)propyl]-N-propyltereftalamid (XII)**

Pryskyřice (XI) (50 mg; 0,024 mmol) byla primárně promyta roztokem DMF, který byl nejdříve zbaven rozpuštěného kyslíku pod proudem dusíku (DMF/N<sub>2</sub>). Následně byl k (XI) přidán roztok připravený rozpuštěním dihydrátu chloridu cínatého (460 mg; 2 mmol) a ekvivalentu diisopropylethylaminu (348 µl; 2 mmol) v DMF/N<sub>2</sub> (1 ml). Reakční směs byla třepána přes noc, poté byla pryskyřice promyta 3x DMF, DCM a standardně štěpena.

**LC-MS:** Celkový výtěžek reakce je 100%

- [2-(4-amino-3,5-dichlorfenyl)-2-oxoethyl]-2-amino-N-[3-(2-amino-4-trifluormethylfenylamino)propyl]-N-propyltereftalamid (XII)

$$[M + H]^+ = 640,07; \text{rt} = 2.40$$

**Acylace amino skupiny látky (XII)**

Roztok acetanhydridu (19 µl; 0,2 mmol) v DCM (1 ml) byl přidán ke dvěma analytickým vzorkům (XII) obsahujícím definované množství pryskyřice (10 mg; 0,0048 mmol). První z nich byl protřepáván po dobu 24 hodin a druhý vzorek 3 dny. Následně byl polymer promyt 5x v DCM a standardně štěpen.

**LC-MS:** Celkový výtěžek reakce je 38%

- [2-(4-amino-3,5-dichlorfenyl)-2-oxoethyl]-N-[3-(2-acetylamino-4-trifluormethylfenylamino)propyl]-2-amino-N-propyltereftalamid (XIII) (38%)

$$[M + H]^+ = 682,06; \text{rt} = 2.50$$

- [2-(4-amino-3,5-dichlorfenyl)-2-oxoethyl]-2-acetylamino-N-[3-(2-acetylamino-4-trifluormethylfenylamino)propyl]-N-propyltereftalamid (XIV) (62%)

$$[M + H]^+ = 724,03; \text{rt} = 2.26$$

- [2-(4-acetylamino-3,5-dichlorfenyl)-2-oxoethyl]-2-acetylamino-N-[3-(2-acetylamino-4-trifluormethylfenylamino)propyl]-N-propyltereftalamid (XV)

$$[M + H]^+ = \text{Analýza neprokázala přítomnost produktu (XV)}$$

**{[3-(2-methyl-5-trifluormethylbenzimidazol-1-yl)propyl]propyl}-2-(4-amino-3,5-dichlorfenyl)-3-hydroxy-4-oxo-1,4-dihydrochinolin-7-karboxamid (XVI)**

Ze vzorku obsahujícího sloučeniny (XIII) a (XIV) byl pod proudem dusíku odpařen MeOH. K odparku byla následně přidána kyselina octová (1 ml) a směs byla zahřívána po dobu 1 hodiny při 130°C na olejové lázni.

**LC-MS:** Analýza neprokázala přítomnost produktu (XVI)

**(methyl)-2-amino-N-[3-(2-amino-4-trifluormethylfenylamino)propyl]-N-propyl tereftalamid (XVII)**

Pryskyřice (IX) (10 mg; 0,0048) byla nejdříve promyta DMF/N<sub>2</sub> a dále k ní byl přidán roztok připravený rozpuštěním dihydrátu chloridu cínatého (230 mg; 2 mmol) a diisopropylethylaminu (174 µl; 2 mmol) v DMF/N<sub>2</sub> (0,5 ml). Reakční směs byla třepána přes noc, následně byl polymer promyt 3x v DMF, DCM a standardně štěpen.

**LC-MS:** Celkový výtěžek reakce je 100%

- (methyl)-2-amino-N-[3-(2-amino-4-trifluormethylfenylamino)propyl]-N-propyl tereftalamid (XVII) (76%)  
[M + H]<sup>+</sup> = 453,13; rt = 2.14
- (methyl)-2-amino-N-propyl-N-{3-[2-(2,2,2-trifluoracetylamo)-4-trifluormethylfenyl amino]propyl}tereftalamid (24%)  
[M + H]<sup>+</sup> = 549,06; rt = 2.28

**Acylace amino skupiny látky (XVII)**

Acylace (XVII) (10 mg; 0,0048 mmol) byla provedena přidavkem roztoku acetanhydridu (19 µl; 0,2 mmol) v DCM (1 ml) k pryskyřici. Reakční směs byla třepána po dobu 24 hodin za následného promytí polymeru 5x v DCM a standardního štěpení.

**LC-MS:** Testovací reakce

- (methyl)-N-[3-(2-acetylamo-4-trifluormethylfenylamino)propyl]-2-amino-N-propyl tereftalamid (XVIII) (56%)  
[M + H]<sup>+</sup> = 495,07; rt = 2.40
- (methyl)-2-acetylamo-N-[3-(2-acetylamo-4-trifluormethylfenylamino)propyl]-N-propyltereftalamid (XIX) (34%)  
[M + H]<sup>+</sup> = 537,09; rt = 2.13

- (methyl)-2-acetylamino-N-[3-(2-methyl-5-trifluormethylbenzimidazol-1-yl)propyl]-N-propyltereftalamid (10%)  
[M + H]<sup>+</sup> = 505,06; rt = 2.09

## 8.2.2. Druhá strategie syntézy

### **[(9H-fluoren-9-yl)methyl]-[3-(2-nitro-4-trifluormethylfenylamino)propyl]propyl karbamát (XX)**

K (**VIII**) (100 mg; 0,048 mmol) byl přidán roztok Fmoc-OSu (68 mg; 0,2 mmol) a diisopropylethylaminu (34  $\mu$ l; 0,2 mmol) v DCM (1 ml). Po 30 minutách třepání byla pryskyřice promyta 5x v DCM a dále byla standardně štěpena.

**LC-MS:** Celkový výtěžek reakce je 100%

- [(9H-fluoren-9-yl)methyl]-[3-(2-nitro-4-trifluormethylfenylamino)propyl]propyl karbamát (**XX**)  
[M + H]<sup>+</sup> = 528,09; rt = 2.90

### **[(9H-fluoren-9-yl)methyl]-[3-(2-amino-4-trifluormethylfenylamino)propyl]propyl karbamát (XXI)**

Roztok připravený rozpuštěním dihydrátu chloridu cínatého (230 mg; 2 mmol) v DMF/N<sub>2</sub> (0,5 ml) za přídavku diisopropylethylaminu (174  $\mu$ l; 2 mmol) byl smíchán se vzorkem pryskyřice (**XX**) (20 mg; 0,096 mmol) promytým v DMF/N<sub>2</sub>. Po 24 hodinách třepání byl polymer podroben umytí 3x v DMF, DCM a standardně štěpen.

**LC-MS:** Celkový výtěžek reakce je 100%

- [(9H-fluoren-9-yl)methyl]-[3-(2-amino-4-trifluormethylfenylamino)propyl]propyl karbamát (**XXI**)  
[M + H]<sup>+</sup> = 498,06; rt = 2.79

### **Acylace amino skupiny látky (XXI) a následná deproteckce (XXII)**

Syntéza byla realizována přídavkem roztoku acetanhydridu (19  $\mu$ l; 0,2 mmol) v DCM (1 ml) k produktu (**XXI**) (20 mg; 0,096 mmol). Reakční směs byla třepána přes noc, a poté byla pryskyřice promyta 5x v DCM za následného standardního štěpení.

**LC-MS:** Celkový výtěžek reakce je 100%

- [(9H-fluoren-9-yl)methyl]-[3-(2-acetylamino-4-trifluormethylfenylamino)propyl]propyl karbamát (**XXII**) (70%)  
[M + H]<sup>+</sup> = 540,09; rt = 2.79
- [(9H-fluoren-9-yl)methyl]-[3-(2-methyl-5-trifluormethylbenzimidazol-1-yl)propyl]propyl karbamát (30%)  
[M + H]<sup>+</sup> = 522,10; rt = 2.65

Deprotekce Fmoc skupiny za vzniku produktu (**XXIII**) byla provedena protřepáním polymeru s roztokem propylaminu v DMF (0,5 ml; 50%). Dále byla pryskyřice promyta 3x v DMF, DCM a standardně štěpena.

**LC-MS:** Celkový výtěžek reakce je 100%

- N-{2-[(3-propylamino)propylamino]-5-trifluormethylfenyl}acetamid (**XXIII**)  
[M + H]<sup>+</sup> = 318,02; [M - H]<sup>-</sup> = 315,98; rt = 1.01

**(methyl)-N-[3-(2-acetylamino-4-trifluormethylfenylamino)propyl]-2-amino-N-propyl tereftalamid (**XVIII**)**

K (**XXIII**) (100 mg; 0,048 mmol) byla přidána acylační směs připravená rozpuštěním 1-hydroxybenzotriazol hydrátu (22 mg; 0,144 mmol), 1-methyl-2-aminotereftalátu (28 mg; 0,144 mmol) a diisopropylkarbodiimidu (22  $\mu$ l; 0,144 mmol) v roztoku DMF/DCM (1 ml; 50%). Pryskyřice byla třepána přes noc za následného promytí 3x v DMF, DCM a standardního štěpení.

**LC-MS:** Celkový výtěžek reakce je 98%

- (methyl)-N-[3-(2-acetylamino-4-trifluormethylfenylamino)propyl]-2-amino-N-propyl tereftalamid (**XVIII**) (37%)  
[M + H]<sup>+</sup> = 495,06; [M - H]<sup>-</sup> = 493,11; rt = 2.19
- (methyl)-N-[3-(2-methyl-5-trifluormethylbenzimidazol-1-yl)propyl]-2-amino-N-propyl tereftalamid (61%)  
[M + H]<sup>+</sup> = 477,07; rt = 1.92

### **N-[3-(2-acetylamino-4-trifluormethylfenylamino)propyl]-2-amino-N-propyl tereftalamidová kyselina (XXIV)**

K saponifikaci byl opět použit roztok trimethylsilanolátu draselného (51 mg; 0,4 mmol) v THF (1 ml), který byl přidán k (XXIII) (100 mg; 0,048 mmol). Průmysl byla třepána 2 dny a v konečné fázi byla promyta 5x THF a standardně štěpena.

**LC-MS:** Celkový výtěžek reakce je 100%

- N-[3-(2-acetylamino-4-trifluormethylfenylamino)propyl]-2-amino-N-propyl tereftalamidová kyselina (XXIV) (39%)  
 $[M + H]^+ = 481,01$ ;  $[M - H]^- = 479,11$ ;  $rt = 1.58$
- 2-amino-N-[3-(2-methyl-5-trifluormethylbenzimidazol-1-yl)propyl]-N-propyl tereftalamidová kyselina (61%)  
 $[M + H]^+ = 463,06$ ;  $[M - H]^- = 461,02$ ;  $rt = 1.38$

### **[2-(4-amino-3,5-dichlorfenyl)-2-oxoethyl]-N-[3-(2-acetylamino-4-trifluormethylfenylamino)propyl]-2-amino-N-propyltereftalamid (XIII)**

Ester (XIII) byl připraven smícháním 4-amino- $\alpha$ -brom-3,5-dichloracetofenonu (56,4; 0,2 mmol), diisopropylethylaminu (35  $\mu$ l; 0,2 mmol) a DMF (1 ml) s polymerem (XXIV) (100 mg; 0,048 mmol). Po 2 dnech třepání byla průmysl promyta 3x v DMF, DCM a standardně štěpena. Při této reakci změnila pevná fáze barvu ze žluté na hnědočervenou.

**LC-MS:** Celkový výtěžek reakce je 100%

- [2-(4-amino-3,5-dichlorfenyl)-2-oxoethyl]-N-[3-(2-acetylamino-4-trifluormethylfenylamino)propyl]-2-amino-N-propyltereftalamid (XIII) (44%)  
 $[M + H]^+ = 682,05$ ;  $rt = 2.49$
- [2-(4-amino-3,5-dichlorfenyl)-2-oxoethyl]-2-amino-N-[3-(2-methyl-5-trifluormethylbenzimidazol-1-yl)propyl]-N-propyltereftalamid (56%)  
 $[M + H]^+ = 664,04$ ;  $rt = 2.25$

### **Cyklizační reakce**

Intermediát (XIII) byl v první fázi oddělen od polymerního nosiče pomocí standardního štěpení.

- a) Těkavý štěpící koktejl byl vysušen pod proudem dusíku a k odparce byla přidána kyselina octová (1 ml). Reakční směs byla zahřívána bez použití olejové lázně při 130°C po dobu 1

hodiny. Dále bylo ze směsi odebráno malé množství roztoku (40 µl) za následného odpaření kyseliny octové pod dusíkem a přidavkem MeOH (1 ml). Vzorek byl ve finální fázi analyzován.

**LC-MS:** Analýza neprokázala přítomnost produktu (**XVI**)

Stejný postup byl aplikován také pro kyselinu trifluoroctovou, přičemž reakce byla vedena při teplotě 100°C

**LC-MS:** Analýza neprokázala přítomnost produktu (**XVI**)

b) Při druhém pokusu o cyklizaci byla k odparku opět přidána kyselina octová a reakční směs byla zahřívána na olejové lázni nejdříve při 60°C, po 2 hodinách byla provedena analýza.

**LC-MS:** Celkový výtěžek reakce 39%

- [2-(4-amino-3,5-dichlorfenyl)-2-oxoethyl]-N-[3-(2-acetylamino-4-trifluormethylfenyl amino)propyl]-2-amino-N-propyltereftalamid (**XIII**) (25%)

$[M + H]^+ = 681,96$ ;  $[M - H]^- = 679,84$ ;  $rt = 2.57$

- [2-(4-amino-3,5-dichlorfenyl)-2-oxoethyl]-2-amino-N-[3-(2-methyl-5-trifluormethyl benzimidazol-1-yl)propyl]-N-propyltereftalamid (**XXV**) (39%)

$[M + H]^+ = 663,93$ ;  $[M - H]^- = 661,94$ ;  $rt = 2.34$

Z důvodu potřeby doreagování reakční směsi a ověření možnosti vzniku produktu (**XVI**) byl roztok následně zahříván při 130°C, poté byla opět provedena analýza.

**LC-MS:** Analýza neprokázala přítomnost produktu (**XVI**)

Stejný postup byl realizován i pro kyselinu trifluoroctovou s tím rozdílem, že reakční směs byla primárně zahřívána 2 hodiny při 60°C za následného provedení analýzy.

**LC-MS:** Celkový výtěžek reakce je 27%

- [2-(4-amino-3,5-dichlorfenyl)-2-oxoethyl]-N-[3-(2-acetylamino-4-trifluormethylfenyl amino)propyl]-2-amino-N-propyltereftalamid (**XIII**) (14%)

$[M + H]^+ = 681,976$ ;  $[M - H]^- = 679,63$ ;  $rt = 2.57$

- [2-(4-amino-3,5-dichlorfenyl)-2-oxoethyl]-2-amino-N-[3-(2-methyl-5-trifluormethyl benzimidazol-1-yl)propyl]-N-propyltereftalamid (**XXV**) (27%)

$[M + H]^+ = 663,93$ ;  $[M - H]^- = 662,25$ ;  $rt = 2.34$

- N-[3-(2-acetylamino-4-trifluormethylfenylamino)propyl]-2-amino-N-propyl tereftalamidová kyselina (**XXIV**) (4%)  
[M + H]<sup>+</sup> = 480,99; rt = 1.67
- 2-amino-N-[3-(2-methyl-5-trifluormethylbenzimidazol-1-yl)propyl]-N-propyl tereftalamidová kyselina (9%)  
[M + H]<sup>+</sup> = 462,99; [M - H]<sup>-</sup> = 460,74; rt = 1.47

Dále byla teplota zvýšena na 100°C a po 1 hodině byl vzorek znovu analyzován

**LC-MS:** Analýza neprokázala přítomnost produktu (**XVI**)

- c) V poslední řadě byl proveden pokus o cyklizaci na benzimidazol (**XXV**). K tomuto účelu byla použita kyselina octová přidaná k odparku. Reakční směs byla zahřívána na 60°C po dobu 72 hodin, přičemž každý den byla provedena kontrolní analýza.

**LC-MS (1. den):** Celkový výtěžek reakce je 93%

- [2-(4-amino-3,5-dichlorfenyl)-2-oxoethyl]-N-[3-(2-acetylamino-4-trifluormethylfenyl amino)propyl]-2-amino-N-propyltereftalamid (**XIII**) (47%)  
[M + H]<sup>+</sup> = 682,09; rt = 2.51
- [2-(4-amino-3,5-dichlorfenyl)-2-oxoethyl]-2-amino-N-[3-(2-methyl-5-trifluormethyl benzimidazol-1-yl)propyl]-N-propyltereftalamid (**XXV**) (46%)  
[M + H]<sup>+</sup> = 664,02; rt = 2.27

**LC-MS (2. den):** Celkový výtěžek reakce je 38%

- [2-(4-amino-3,5-dichlorfenyl)-2-oxoethyl]-N-[3-(2-acetylamino-4-trifluormethylfenyl amino)propyl]-2-amino-N-propyltereftalamid (**XIII**) (14%)  
[M + H]<sup>+</sup> = 682,09; rt = 2.62
- [2-(4-amino-3,5-dichlorfenyl)-2-oxoethyl]-2-amino-N-[3-(2-methyl-5-trifluormethyl benzimidazol-1-yl)propyl]-N-propyltereftalamid (**XXV**) (38%)  
[M + H]<sup>+</sup> = 664,05; rt = 2.39

**LC-MS (3. den):** Analýza neprokázala přítomnost produktu (**XVI**)



## 9. Závěr

V úvodu předložené diplomové práce je nastíněna problematika příprav doposud známých 3-hydroxy-4(1*H*)-chinolonů a jejich bisheterocyklických derivátů. Zároveň jsme chtěli poukázat na rozmanité spektrum biologických účinků a rozsáhlou oblast potencionálního i praktického využití zmíněných látek. V neposlední řadě byl náš zájem věnován rešerši ukázek syntéz vedoucích k derivátům *o*-fenylendiaminu, které lze s výhodou využívat jako prekurzory k výstavbě dusíkatých heterocyklů.

Primárním cílem této práce bylo připravit nové bisheterocyklické deriváty 2-substituovaných-3-hydroxychinolin-4(1*H*)-on-7-karboxamidů, přičemž koncept cílových sloučenin byl založen na propojení hydroxychinolonového skeletu s dalším heterocyklem přes alifatické raménko. Pro účely přípravy konkrétního bisheterocyklu benzimidazol-hydroxychinolon byla využita syntéza na pevné fázi.

První část experimentu byla věnována přípravě prekurzoru benzimidazolu (**VIII**). Prvotní fáze zahrnovala reakci aminomethylové pryskyřice (**I**) s BAL linkerem za následné imobilizace 3-aminopropanolu, což mělo za následek vytvoření výchozího systému **polymer**  $\Rightarrow$  **kysele labilní linker**  $\Rightarrow$  **raménko** (**III**). V další fázi následovala arylace sekundárního aminu (**III**) pomocí 1-fluor-2-nitro-4-trifluormethylbenzenu za vzniku intermediátu (**IV**).

Pozornost byla dále věnována konverzi terminální hydroxy skupiny (**IV**) na sekundární amino skupinu prekurzoru (**VIII**). Pro tyto účely byly vyzkoušeny dvě reakční cesty. První spočívala v aktivaci hydroxy skupiny tosylchloridem za vzniku dvou produktů (**V**) a (**VI**). Reakcí s propylaminem se chlorid (**VI**) ukázal jako málo reaktivní a tosylát (**V**) jako poměrně nestabilní, neboť částečně hydrolyzoval zpět na (**IV**). Vhodnou alternativou se následně stala mesylace hydroxy skupiny, která poskytla produkt (**VII**) ve výtěžku 100%. Reakce (**VII**) s propylaminem byla již naprosto bezproblémová.

Práce byla dále zaměřena na výstavbu prekurzoru hydroxychinolonu (**XIII**). Prvotní experiment spočíval v arylaci sekundární amino skupiny (**VIII**) 1-methyl-2-aminotereftalátem za následné hydrolyzy esteru (**IX**). Připravený intermediát (**X**) byl podroben esterifikaci bromacetofenonem za vzniku (**XI**). Derivát *o*-fenylendiaminu (**XII**) byl vytvořen redukcí nitro skupiny dihydrátem chloridu cínatého. Všechny zmíněné reakce poskytly produkty s maximálním výtěžkem 100%. Potíže při syntéze nastaly v acylačním reakčním kroku. Vedle očekávaného produktu (**XIII**) vznikal také diacetylderivát (**XIV**), v jehož případě byla acylována  $\alpha$ -amino skupina. Tento fakt byl potvrzen experimentálním pokusem za

identifikace intermediátů (**XVIII**) a (**XIX**). Finální cyklizace směsi (**XIII**) a (**XIV**) v kyselině octové nevedla ke vzniku požadovaného produktu (**XVI**) a zároveň nebylo potvrzeno, zdali je příčinou acylace  $\alpha$ -amino skupiny nebo struktura substrátu (**XIII**). Zjištěné poznatky vedly k potřebě reakční sekvenci částečně modifikovat.

Druhá část experimentální syntézy byla nejdříve zacílena na protekci sekundárního aminu (**VIII**) pomocí Fmoc-OSu, teprve poté byla nitroskupina látky (**XX**) zredukována za následné acylace aminu (**XXI**). Odchránění Fmoc skupiny bylo realizováno roztokem stericky méně náročného propylaminu v DMF. Tento reakční set opět poskytl produkty ve výtěžku 100%. Další sekvence byla totožná s první strategií syntézy. Jmenovitě se jednalo o arylaci sekundárního aminu (**XXIII**), hydrolýzu esteru (**XVIII**) a esterifikaci kyseliny (**XXIV**). Vyjma toho, že dvě poslední zmíněné reakce vyžadují dvakrát delší reakční dobu oproti původní syntéze, byly výtěžky v obou případech téměř srovnatelné.

Kamenem úrazu se ukázala být cyklizace prekurzoru (**XIII**). Pokus o uzavření systému na benzimidazol-hydroxychinolon (**XVI**) byl uskutečněn trojí modifikací reakčních podmínek, přičemž standardně byla k účelu použita kyselina octová a trifluoroctová. V případě všech snah o uskutečnění cyklizace analýza nepotvrdila přítomnost cílového produktu (**XVI**), přestože jednotlivé kroky realizované sekvence probíhaly bez závažnějších obtíží za poskytnutí produktů s vynikajícími výtěžky. Nutno zmínit, že uzavření (**XIII**) na konečné bisheterocyklické uspořádání (**XVI**) bude potřeba do budoucna podrobit pečlivé optimalizaci.

## Literatura

1. Soural M., Krchňák V.: *J. Comb. Chem.* **2007**, 9, 793 – 796
2. Křupková S., Soural M., Hlaváč J., Hradil P.: *J. Comb. Chem.* **2009**, 11, 951-955
3. Soural M.: Nепublikované výsledky
4. Soural M., Bouillon I., Krchňák V.: *J. Comb. Chem.* **2008**, 10, 923-933
5. Fülöpová V.: Bakalářská práce, UP Olomouc, **2009**
6. Hradil P., Jirman J.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1995**, 60, 1357 – 1366
7. Dong Q., Kanoui T., Wallace M.: *PCT Int. Appl.* **2008**, WO 2008/115890
8. Hodgkinson J., Bowden S. D., Galloway W. R. J. D., Spring D. R., Welch M.: *J. Bacteriol.* **2010**, 3833-3837
9. Lépine T., Déziel E., Milot S., Rahme L. G.: *Biochemica et Biophysica Acta* **2003**, 1622 (1), 36 – 41
10. Goldsworthy J., Ross W. J., Verge J. P.: Eur. Pat. Appl. EP 55068, 1982, *Chem. Abstr.* **1982**, 97, p. 162848n.
11. Iwanowicz E. J., Watterson S. H., Dhar T. G. M., Pitts W. J., Gu H. H.: *PCT Int. Appl.* **2001**, WO 2001081340
12. Krejčí P., Hradil P., Hlaváč J., Hajdúch M.: *PCT Int. Appl.* **2008**, WO 2008/028427
13. Motyka K., Hlaváč J., Soural M., Hradil P., Krejčí P., Kvapil L., Weiss M.: *Tetrahedron Letters* **2011**, 52, 715-717
14. Bilokin M. D., Shvadchak V. V., Yushchenko D. A., Duportail G., Mély Y., Pivovarenko V. G.: *J. Fluoresc.* **2009**, 19, 545-553
15. Yushchenko D. A., Bilokin M. D., Pyvovarenko O. V., Duportail G., Mély Y., Pivovarenko V. G.: *Tetrahedron Letters* **2006**, 47, 905-908
16. Hradil P., Hlaváč J., Soural M., Hajdúch M., Kolář M., Večeřová R.: *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* **2009**, 9, 696-702
17. Kiyama R., Kanda Y., Tada Y., Fujishita T., Kawasuji T., Takechi S., Fuji M.: *PCT Int. Appl.* (**2003**), 663 pp
18. Vaňková B., Hlaváč J., Soural M.: *J. Comb. Chem.* **2010**, 12, 890-894
19. Ulubelen A., Terem B., Tuzlaci E., Cheng K. F., Kong Y. C.: *Phytochemistry* **1986**, 25, 2692-2693
20. Mukai H., Kubota T., Aoyama K., Mikami Y., Fromont J., Kobayashi J.: *Bioorg. Chem. Lett.* **2009**, 1337-1339

21. Kon Y., Kubota T., Shibazaki A., Gono T., Kobayashi J.: *Bioorg. Chem. Lett.* **2010**, 4569-4572
22. Pritchard D.: *PCT Int. Appl.* **2008**, WO 02/47686
23. Ortori C. A., Dubern J. F., Chhabra S. R., Cámara M., Hardie K., Williams P., Barrett D. A.: *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, 399, 839-850
24. Nosková V., Džubák P., Kuzmina G., Ludková A., Stehlík D., Trojanec R., Janostáková A., Kořínková G., Mihál V., Hajdúch M.: *Neoplasma* **2002**, 49, 418
25. Sural M., Hlaváč J., Funk P., Džubák P., Hajdúch M.: *ACS Comb. Sci.* **2011**, 13, 39-44
26. Kolb H., Walsh J. C., Liang Q., Duclos B. A., Zhang W., Scott P. J., Chen K., Gao Z., Zhao T., Mocharla V. P., Kasi D., Chen G., Wang E.: *PCT Int. Appl.* **2009**, WO 2009/102498
27. Motyka K., Hlaváč J., Sural M., Funk P.: *Tetrahedron Letters* **2010**, 51, 5060-5063
28. Cescon L. A., Day A. R.: *Chem. Abstr.* **1962**, 27, 581-586
29. Ochoa C., Rodríguez J.: *J. Heterocyclic Chem.* **1997**, 34, 1053-1055
30. [http://www.cojeco.cz/index.php?id\\_desc=8860&s\\_lang=2&detail=1&title=benomyl](http://www.cojeco.cz/index.php?id_desc=8860&s_lang=2&detail=1&title=benomyl)
31. Kumar K., Awasthi D., Lee S. Y., Zanardi I., Ruzsicska B., Knudson S., Tonge P. J., Slayden R. A., Ojima I.: *J. Med. Chem.* **2011**, 54, 374-381
32. Cho Ch. S., Oh S. G.: *Tetrahedron Letters* **2006**, 47, 5633-5636
33. Heravi M. M., Bakhtiari K., Tehrani M. H., Javadi N. M., Oskooie H. A.: *ARKIVOC* **2006**, (xvi), 16-22, ISSN 1424-6376
34. Frýšová I.: Habilitační práce, UP Olomouc **2003**
35. Chen P., Barrish J. C., Iwanowicz E., Lin J., Bednarz M. S., Chen B. Ch.: *Tetrahedron Letters* **2001**, 42, 4293-4295
36. Sitaru S., Radulescu N., Ion I., Ionescu M., Ghetiu F., Stefan M., Vlad M., Botos Z., Iacob N., Ghica M.: *Rom.* **1991**, 3 pp CODEN: RUXXA3 RO103093 B1 19911029
37. Ismail M. M. F., Ammar Y. A., Ibrahim M. K., El-Zhaby H. S. A., Mahmoud S. S.: *Arzneimittel Forschung* **2005**, 55(12), 738-743, CODEN: ARZNAD ISSN: 0004-4172
38. <http://www.zuova.cz/informace/smd/smd160.pdf>
39. Galal S. A., Abdelsamine A. S., Tokuda H., Suzuki N., Lida A., El Hefnawi M. M., Ramadan R. A., Atta M. H. E., El Diwani H. I.: *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, 46, 327-340
40. Kolla S. R., Lee Y. R.: *Tetrahedron* **2010**, 66, 8938-8944
41. Krchňák V., Smith J., Vágner J.: *Tetrahedron Letters* **2001**, 42, 2443-2446

42. <http://www.chillio.org.cz/substance/benzodiazepiny>
43. Elliot R. L., Cameron K. O., Chin J. E., Barlett J. A., Beretta E. E., Chen Y., Jardine P., Dubins J. S., Gillaspay M. L., Hargrove D. M., Kalgutkar A. S., LaFlame J. A., Lame M. E., Martin K. A., Maurer T. S., Nardone N. A., Oliver R. M., Scott D. O., Sun D., Swick A. G., Trebino C. E., Zhang Y.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, 20, 6797-6801
44. Reddy B. M., Srekanth P. M.: *Tetr. Lett.* **2003**, 44, 4447-4449
45. Hasan M., Munawar S., Khan N.: *Turk. J. Chem.* **1998**, 22, 367-371
46. Bennamane N., Kaoua R., Hammal L., Nedjar-Kolli B.: *Org. Commun.* **2008**, 1:3, 62-68
47. Vaňková B.: Diplomová práce, UP Olomouc **2009**

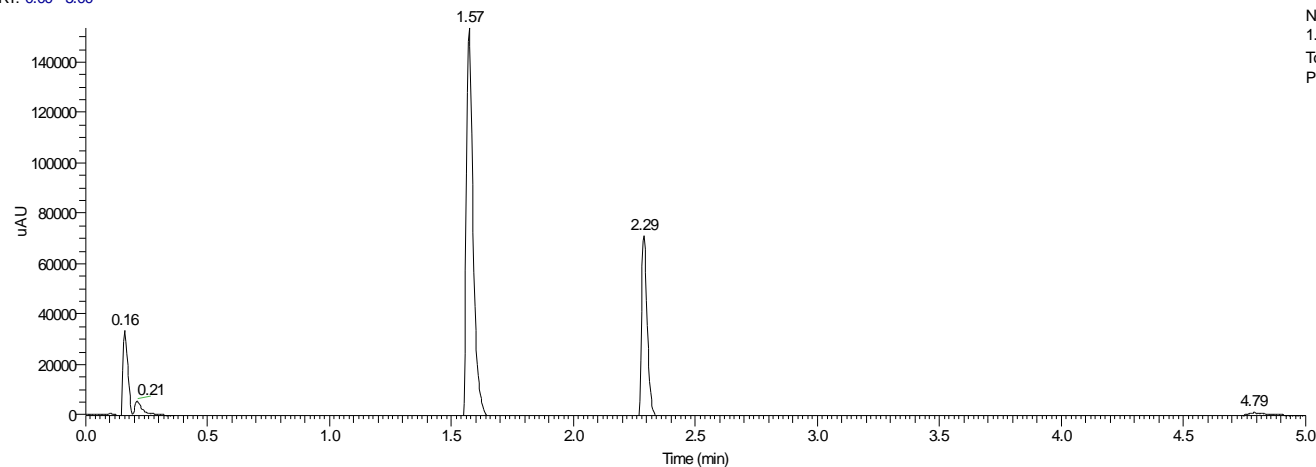
# Přílohy (první strategie syntézy)

Látka IV:

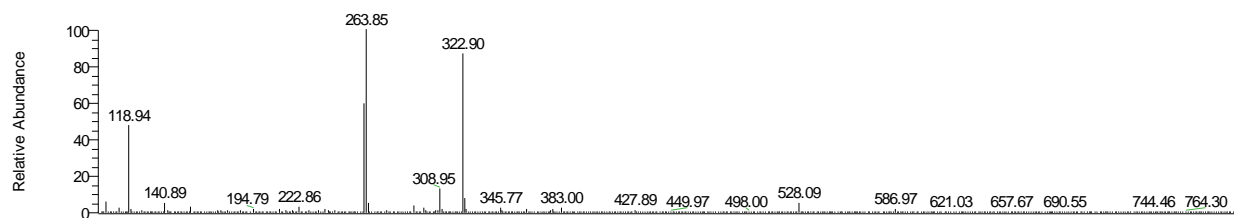
M:\vok 2011\Soural\VF67

12.11.2010 11:35:50

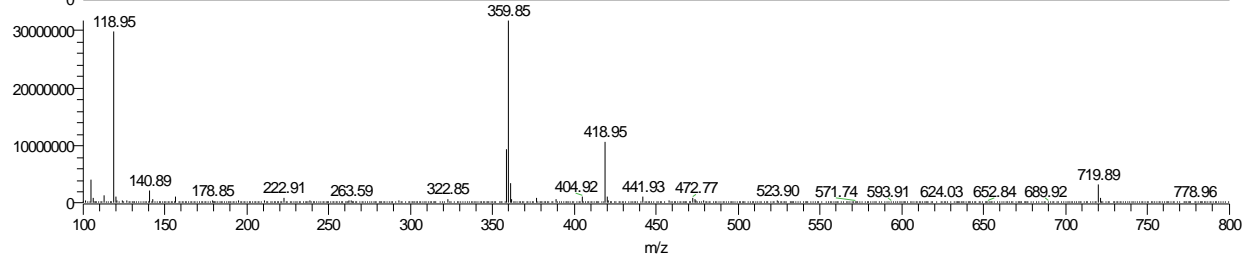
RT: 0.00 - 5.00



NL:  
1.53E5  
Total Scan  
PDA VF67



NL:  
4.15E7  
VF67#86 RT: 1.58  
AV: 1 F: - c APO  
Q1MS  
[100.000-800.000]



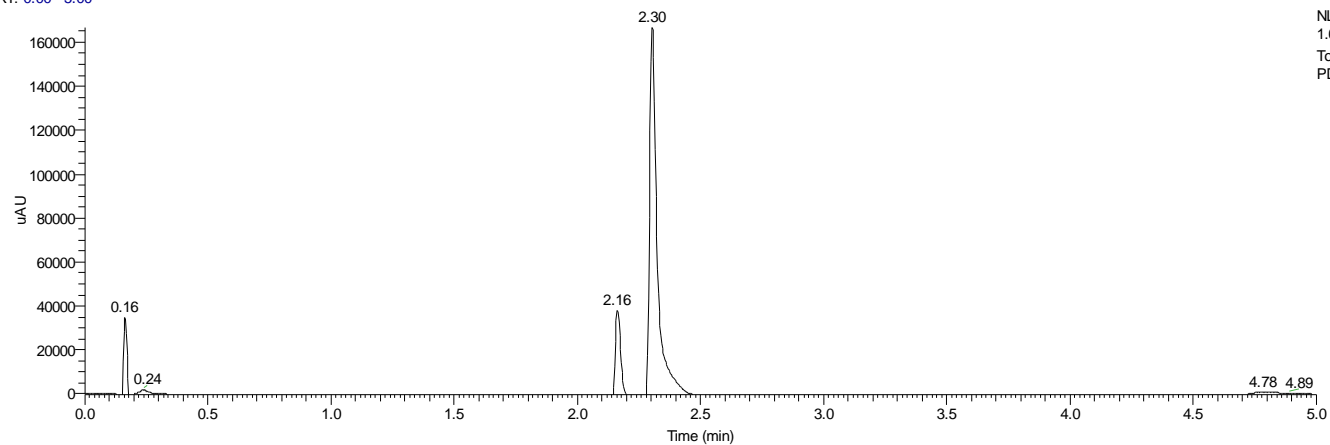
NL:  
3.16E7  
VF67#124 RT:  
2.28 AV: 1 F: - c  
APO Q1MS  
[100.000-800.000]

# Látka V, VI:

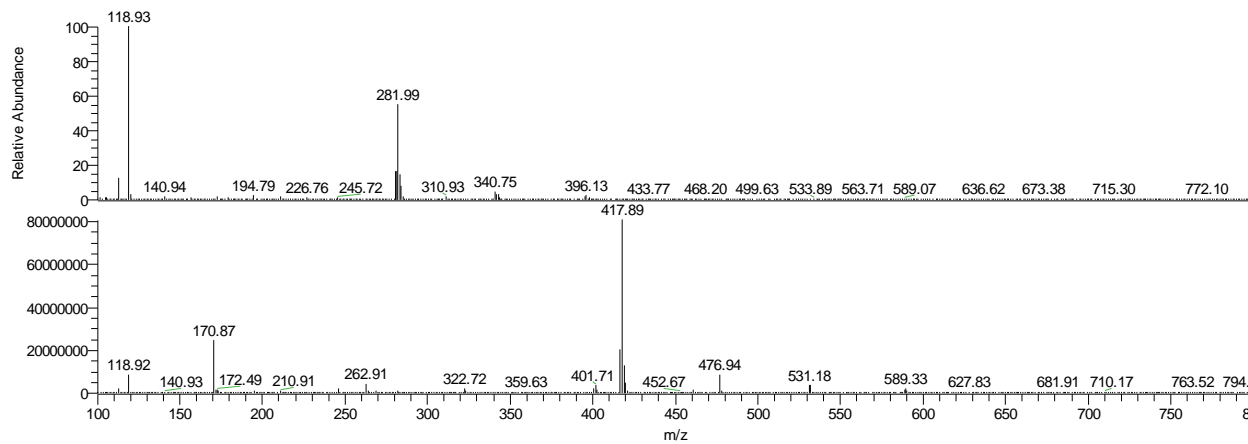
M:\rok 2011\Soural\63z

13.10.2010 12:51:32

RT: 0.00 - 5.00



NL: 1.67E5  
Total Scan  
PDA v63z



NL: 3.11E7  
v63z#118 RT:  
2.17 AV: 1 F: - c  
APCI Q1MS  
[100.000-800.000]

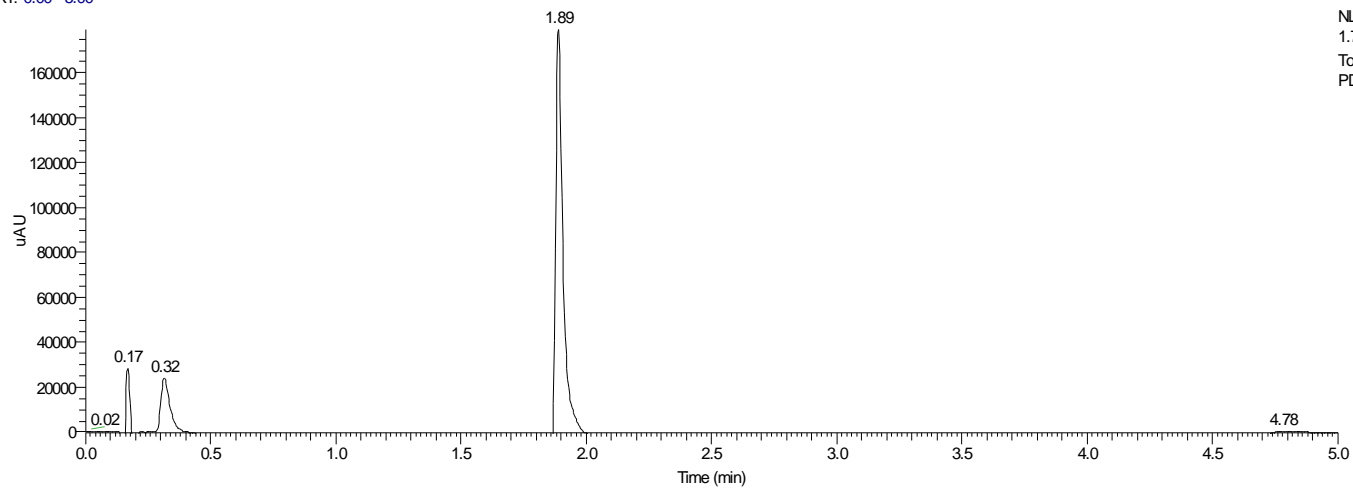
NL: 8.03E7  
v63z#126 RT:  
2.31 AV: 1 F: - c  
APCI Q1MS  
[100.000-800.000]

# Látka VII:

M:\rok 2011\Soual\VFPIV

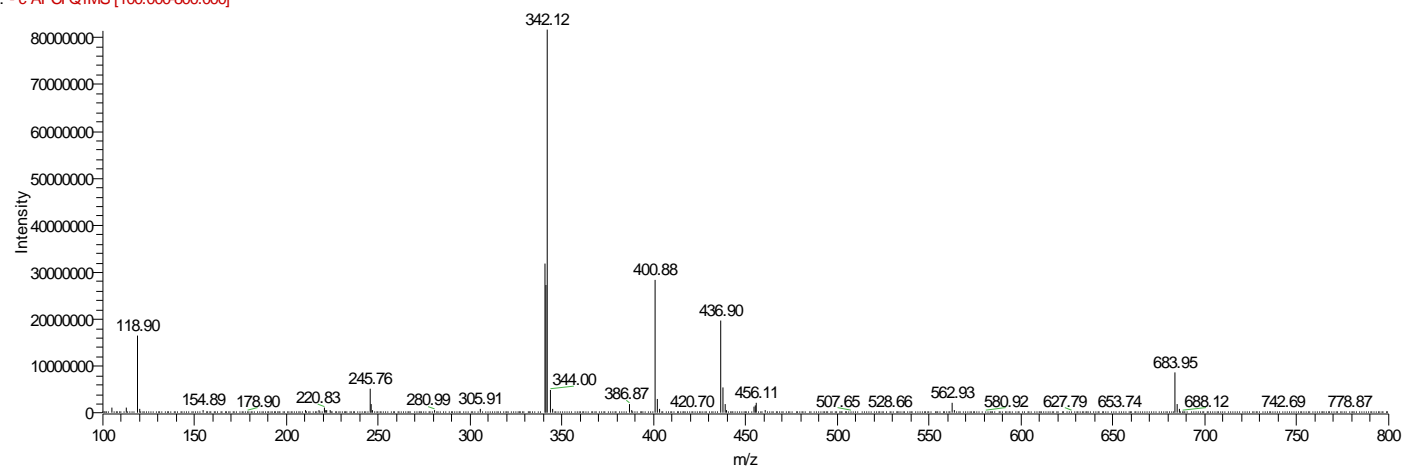
19.1.2011 15:53:46

RT: 0.00 - 5.00



NL:  
1.79E5  
Total Scan  
PDA VFPIV

VFPIV #186 RT: 1.88 AV: 1 NL: 8.13E7  
F: - c APCI Q1MS [100.000-800.000]



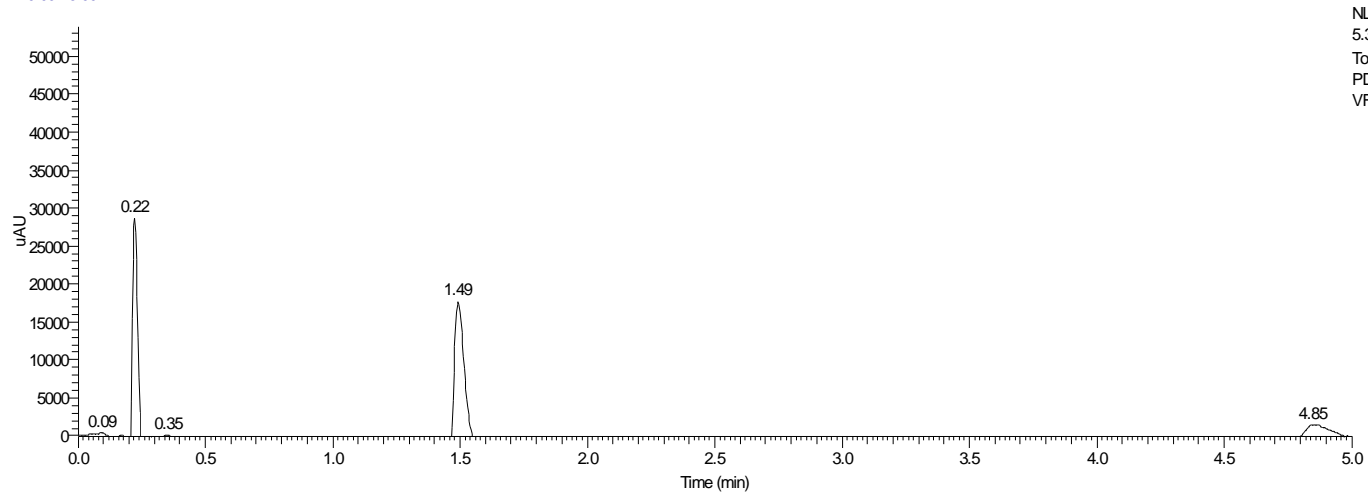


# Látka VIII:

M:\rok 2011\Sural\VFPIIZ

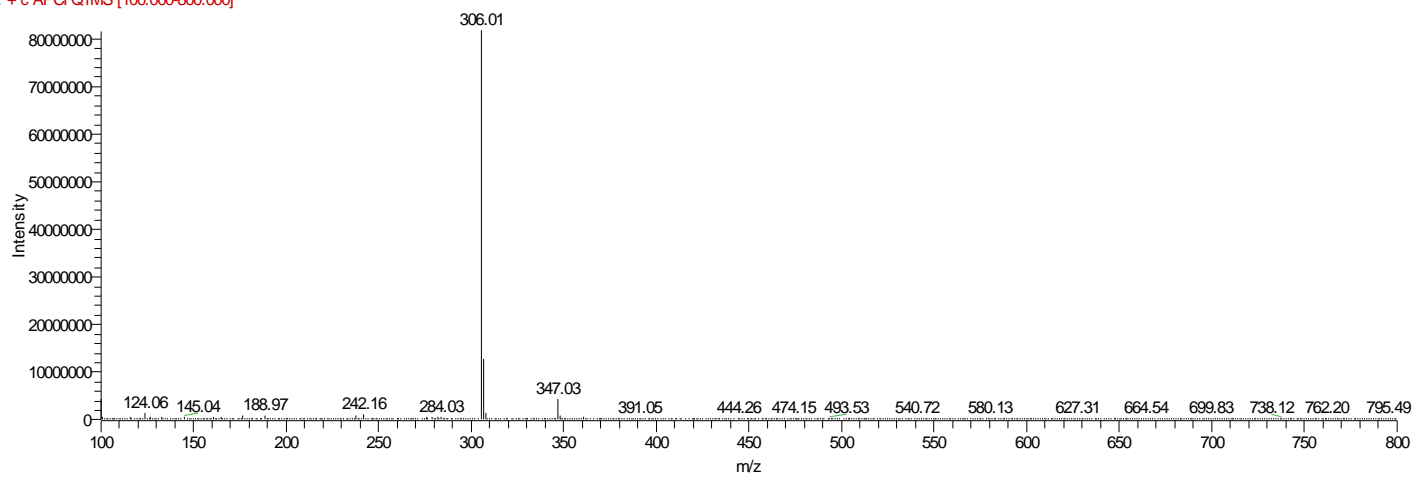
21.1.2011 13:20:53

RT: 0.00 - 5.00



NL:  
5.38E4  
Total Scan  
PDA  
VFPIIZ

VFPIIZ #149 RT: 1.51 AV: 1 NL: 8.14E7  
F: + c APCI Q1MS [100.000-800.000]

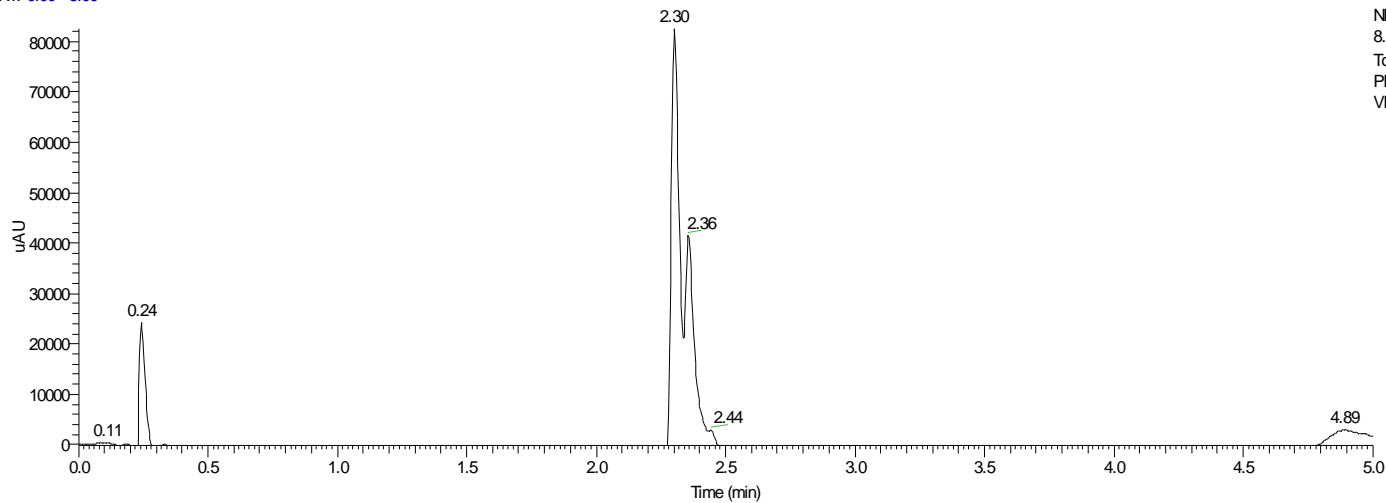


Látka IX:

M:\rok 2011\Soura\VFPVZ

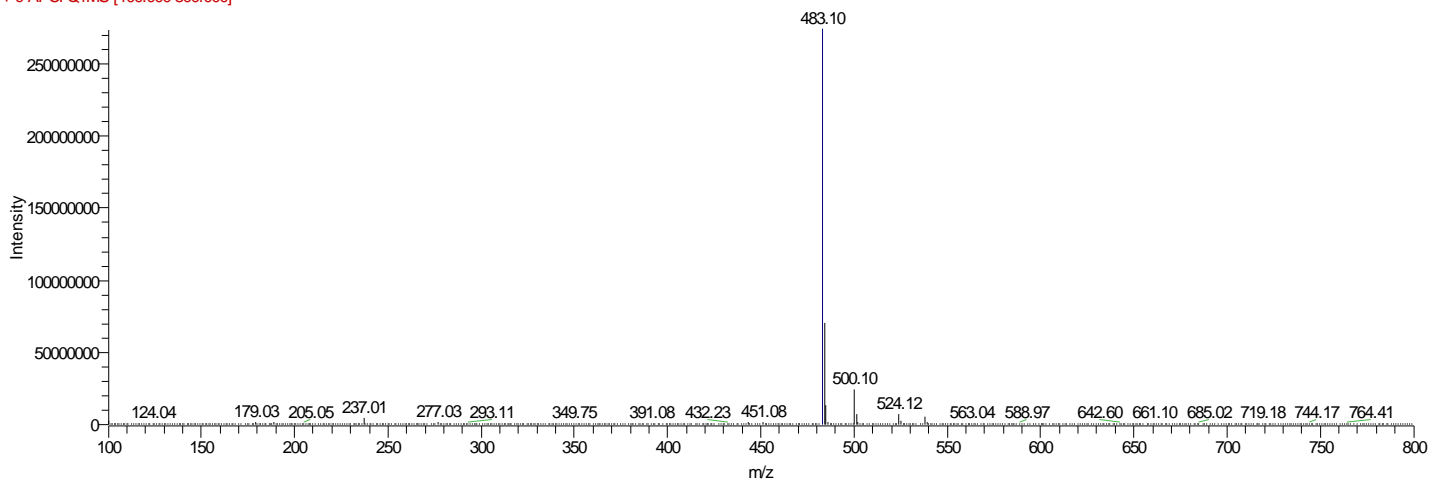
25.1.2011 11:09:01

RT: 0.00 - 5.00



NL:  
8.24E4  
Total Scan  
PDA  
VFPVZ

VFPVZ #229 RT: 2.32 AV: 1 NL: 2.73E8  
F: +c APCI Q1MS [100.000-800.000]

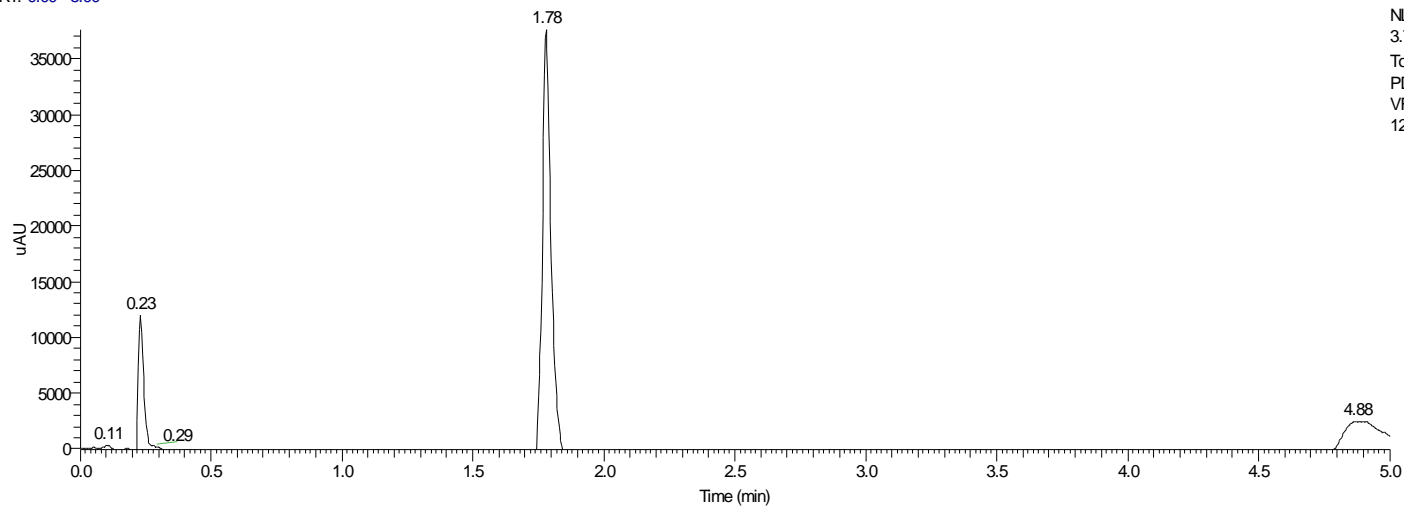


# Látka X:

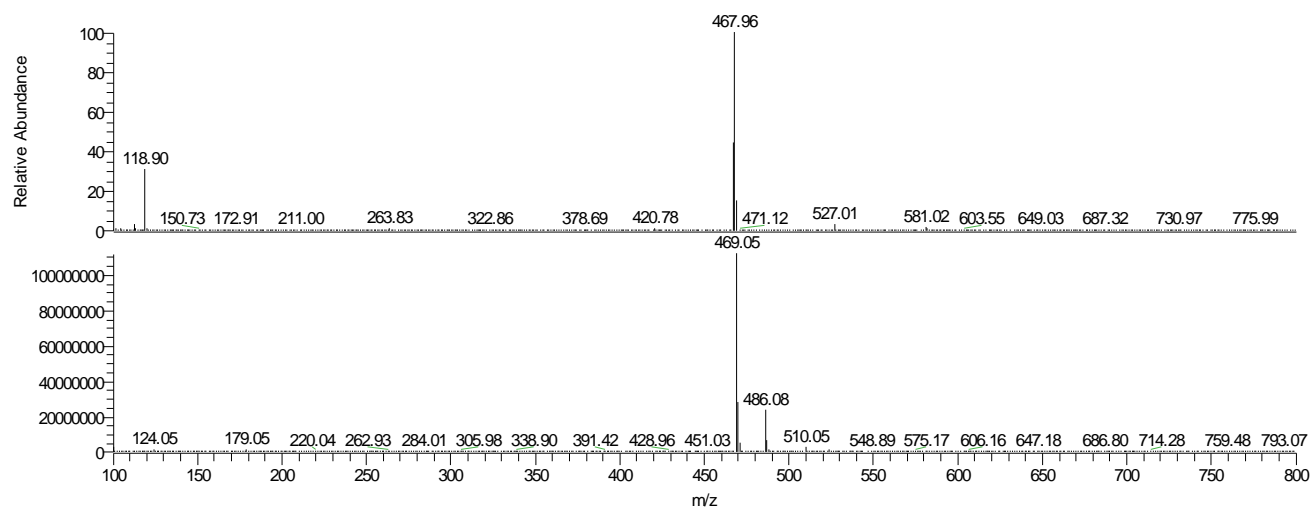
M:\rok 2011\Sural\VFPV\_110125160936

25.1.2011 16:09:36

RT: 0.00 - 5.00



NL:  
3.76E4  
Total Scan  
PDA  
VFPV\_110  
125160936



NL: 7.97E7  
VFPV\_1101251609  
36#176 RT: 1.78  
AV: 1 F: - c APCI  
Q1MS  
[100.000-800.000]

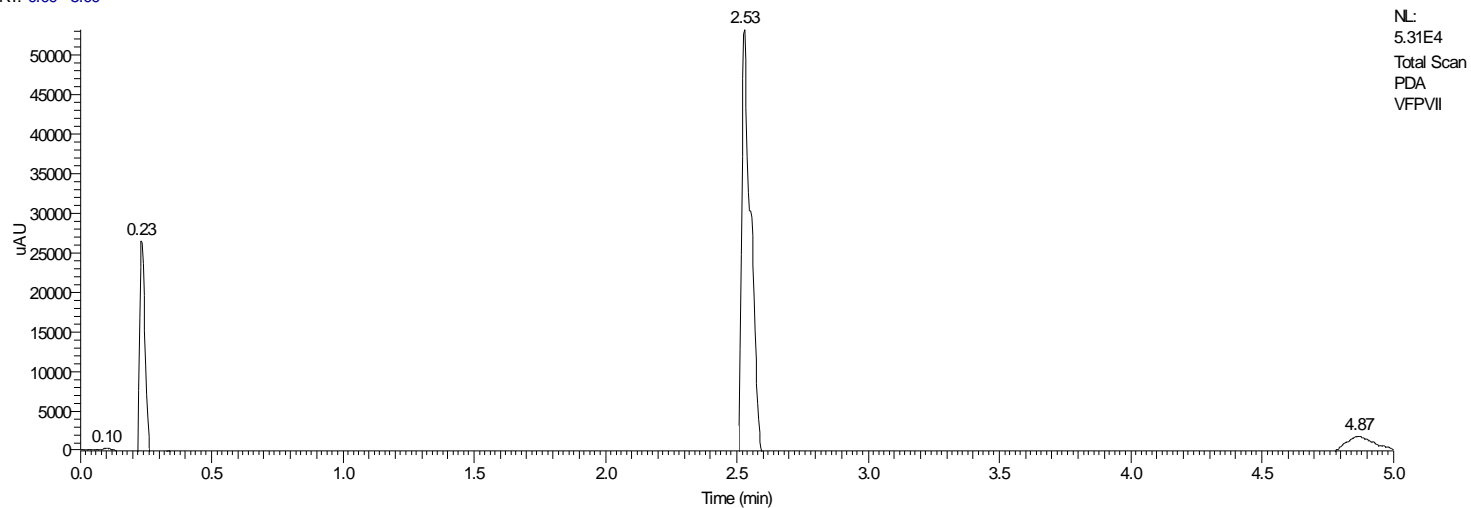
NL: 1.11E8  
VFPV\_1101251609  
36#177 RT: 1.79  
AV: 1 F: + c APCI  
Q1MS  
[100.000-800.000]

Látka XI:

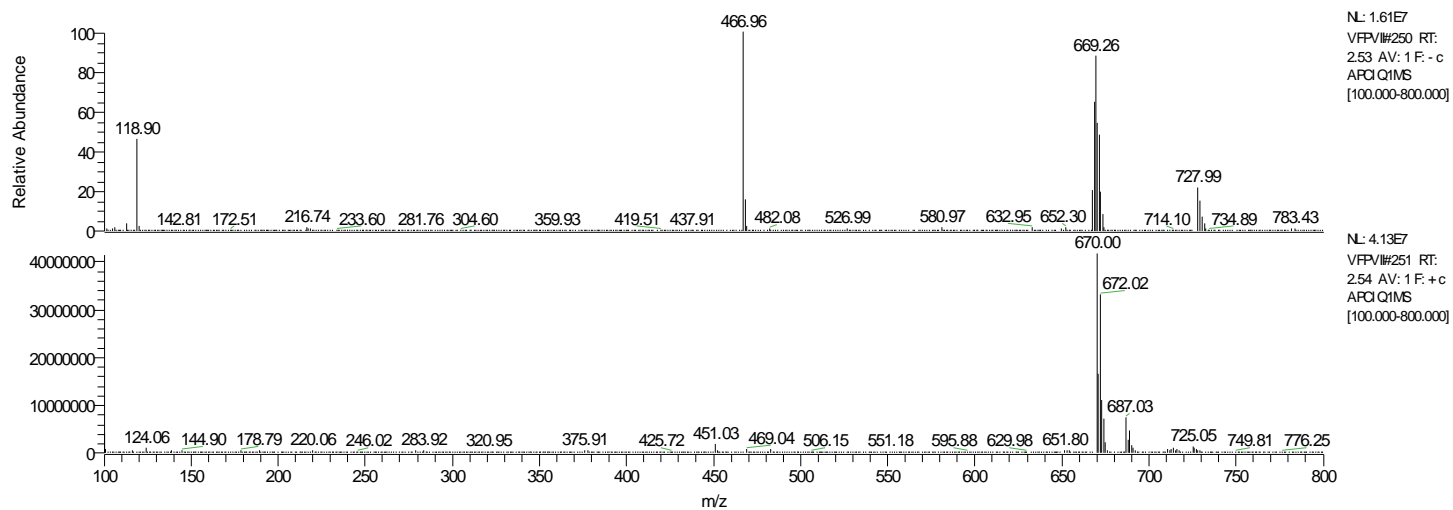
M:\rok 2011\Soural\VPV7

26.1.2011 13:02:40

RT: 0.00 - 5.00



NL:  
5.31E4  
Total Scan  
PDA  
VPV7

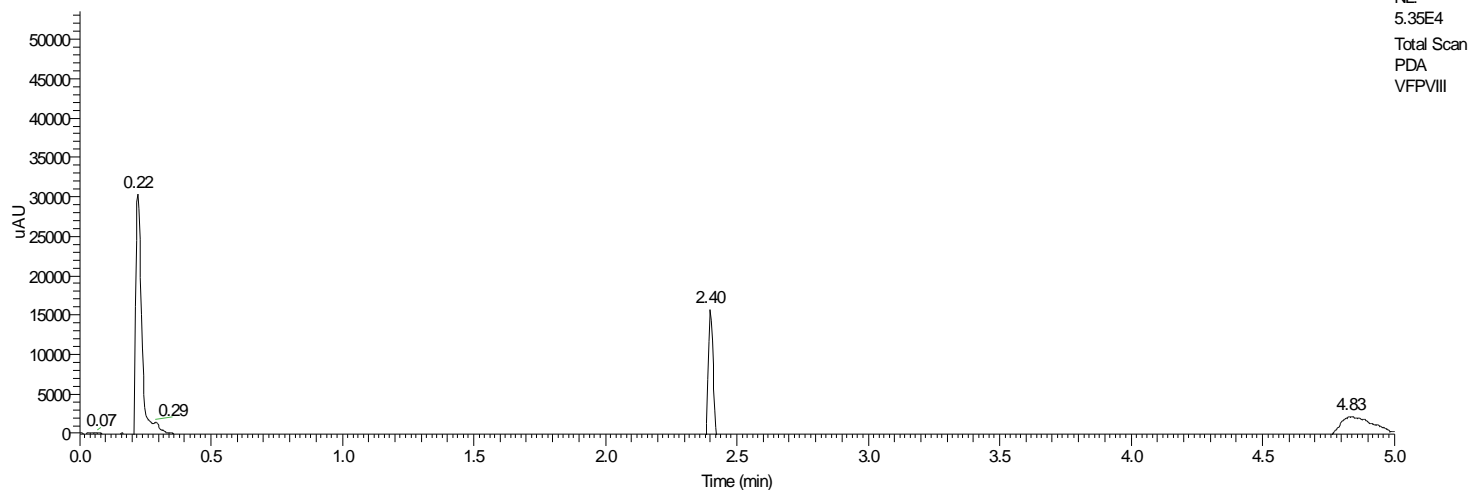


Látka XII:

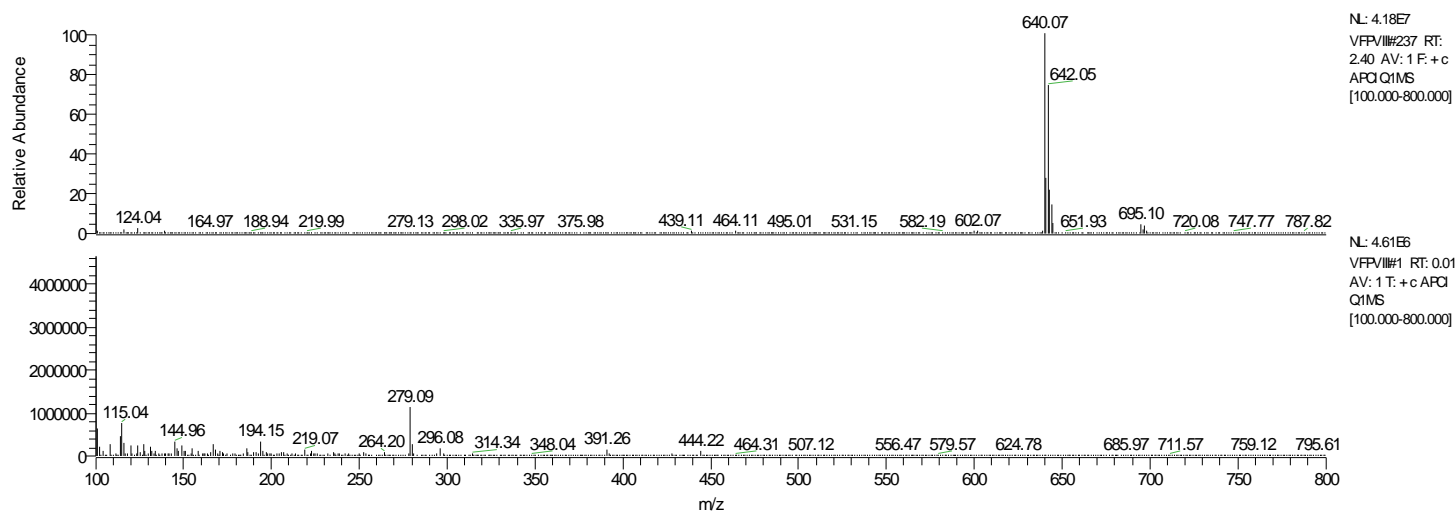
M'vok 2011/Soural/VFPVIII

27.1.2011 13:55:41

RT: 0.00 - 5.00



NL: 5.35E4  
Total Scan  
PDA  
VFPVIII



NL: 4.18E7  
VFPVIII#237 RT: 2.40  
AV: 1 F: +c  
APCI Q1MS  
[100.000-800.000]

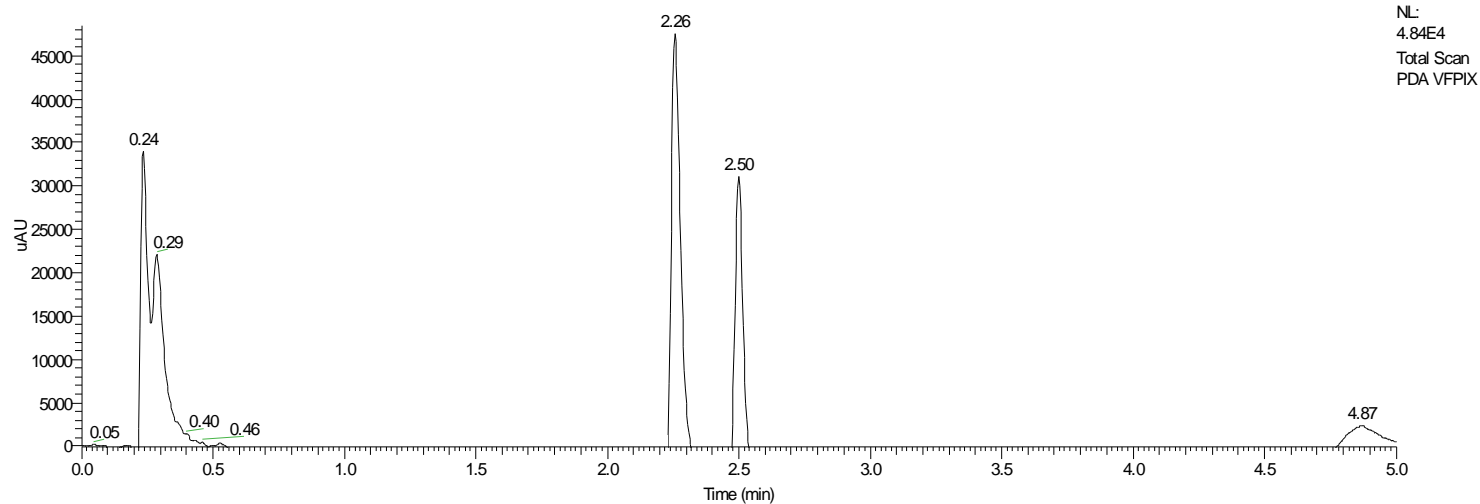
NL: 4.61E6  
VFPVIII#1 RT: 0.01  
AV: 1 T: +c APCI  
Q1MS  
[100.000-800.000]

Látka XIII, XIV:

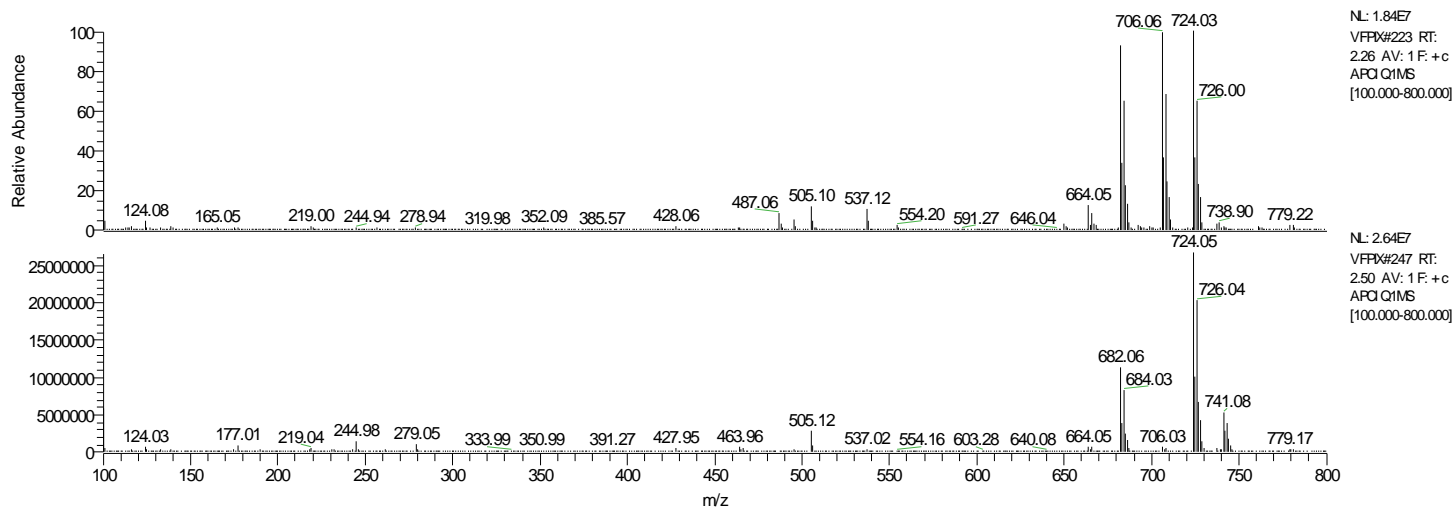
M/vrok 2011/Soural/VFPIX

28.1.2011 13:47:08

RT: 0.00 - 5.00



NL:  
4.84E4  
Total Scan  
PDA VFPIX



NL: 1.84E7  
VFPIX#223 RT:  
2.26 AV: 1 F: +c  
APCI Q1MS  
[100.000-800.000]

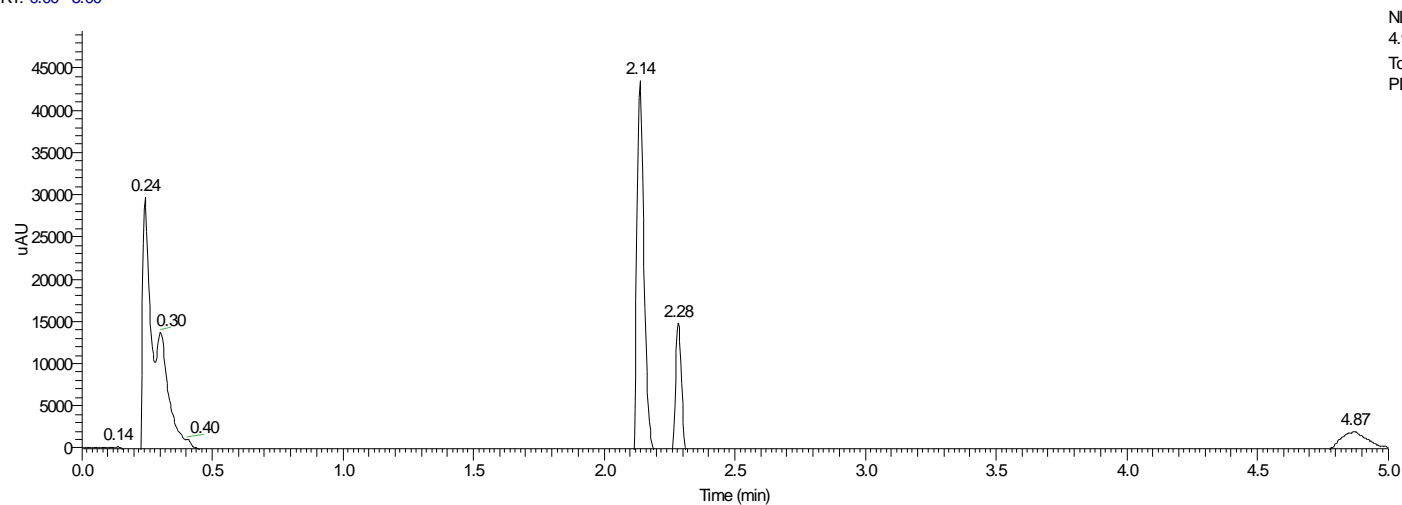
NL: 2.64E7  
VFPIX#247 RT:  
2.50 AV: 1 F: +c  
APCI Q1MS  
[100.000-800.000]

# Látka XVII:

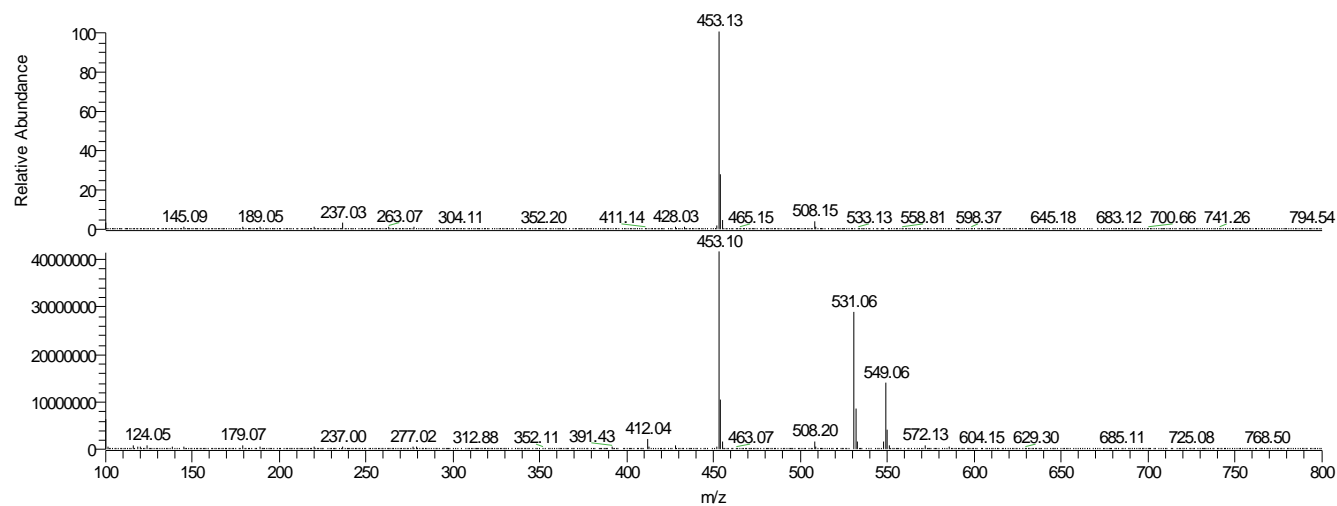
M:\rok 2011\Soual\VFPD

28.1.2011 13:41:00

RT: 0.00 - 5.00



NL:  
4.93E4  
Total Scan  
PDA VFPD



NL:  
1.61EB  
VFPD#213 RT:  
2.16 AV: 1 F: + c  
APCI Q1MS  
[100.000-800.000]

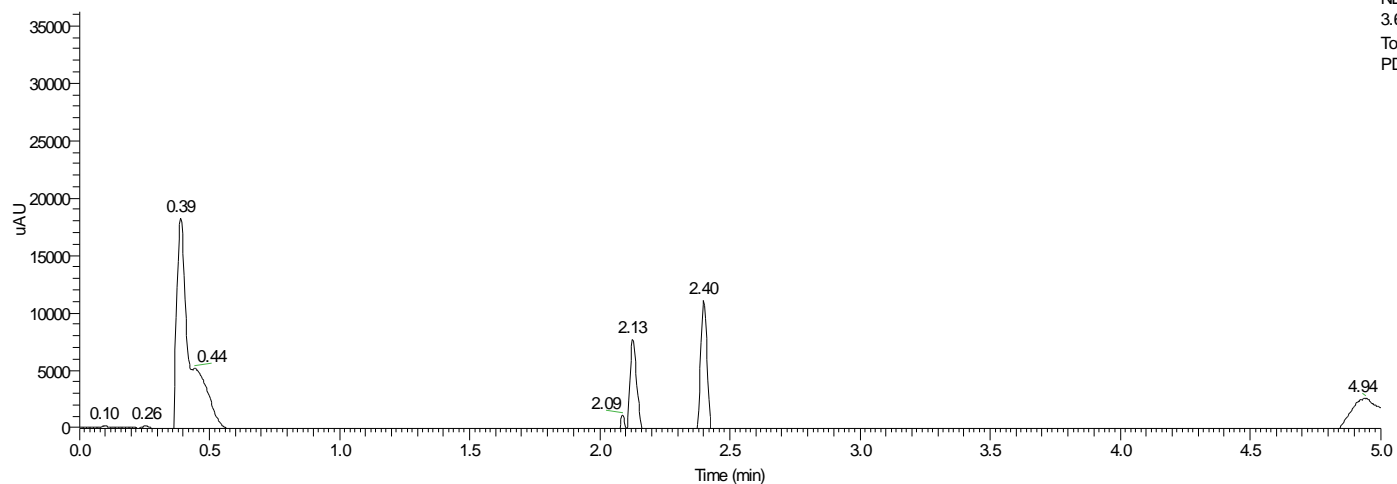
NL:  
4.13E7  
VFPD#225 RT:  
2.28 AV: 1 F: + c  
APCI Q1MS  
[100.000-800.000]

Látka XVIII, XIX:

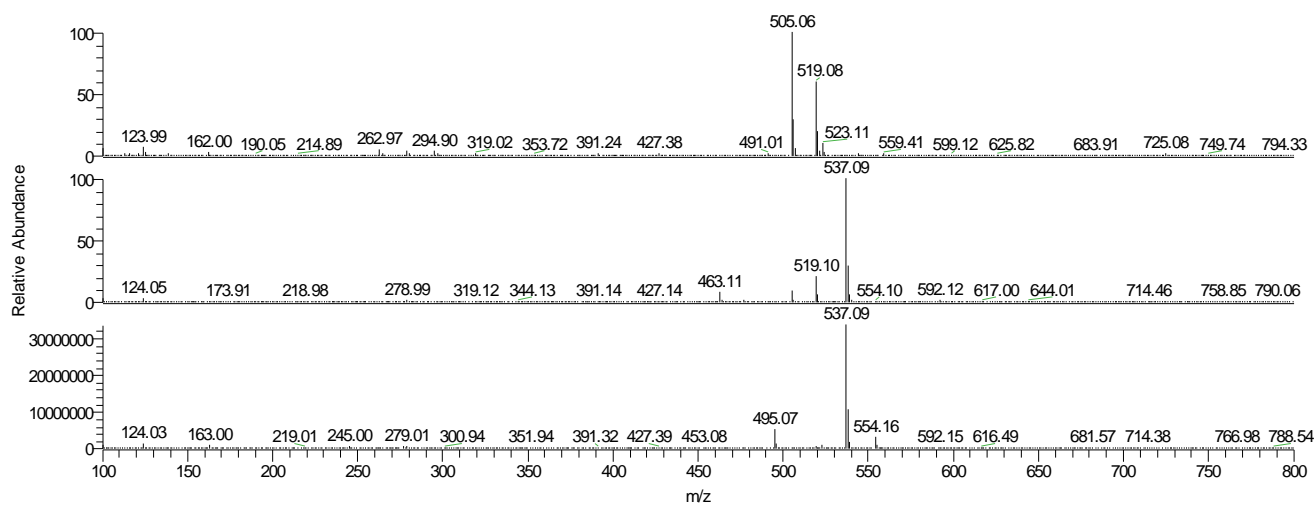
M:\rok 2011\Soural\VFPE

2.2.2011 12:30:08

RT: 0.00 - 5.00



NL:  
3.62E4  
Total Scan  
PDA VFPE



NL: 1.39E7  
VFPE#207 RT: 2.10  
AV: 1 F: +c APCI  
Q1MS  
[100.000-800.000]

NL: 4.22E7  
VFPE#211 RT: 2.14  
AV: 1 F: +c APCI  
Q1MS  
[100.000-800.000]

NL: 3.34E7  
VFPE#239 RT: 2.42  
AV: 1 F: +c APCI  
Q1MS  
[100.000-800.000]



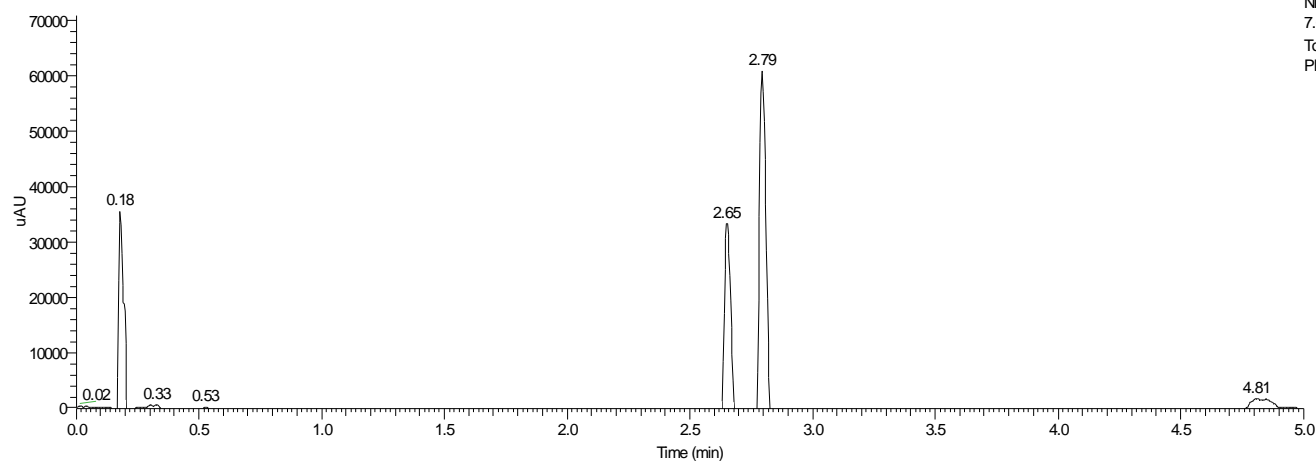
# Přílohy (druhá strategie syntézy)

Látka XXII:

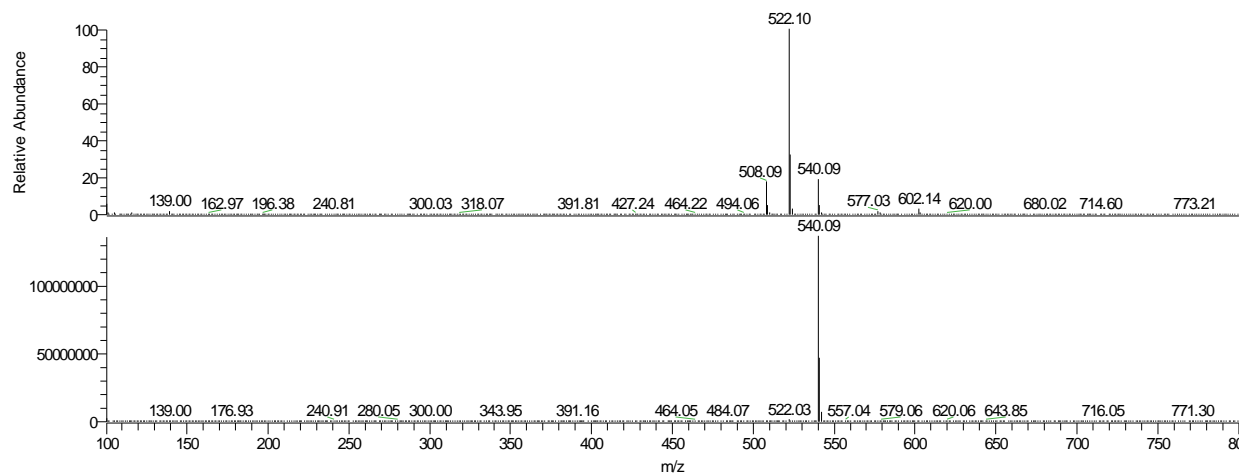
M:\rok 2011\Soura\VF70

3.3.2011 15:37:06

RT: 0.00 - 5.00



NL:  
7.07E4  
Total Scan  
PDA VF70



NL:  
3.48E7  
VF70#143 RT:  
2.63 AV: 1 F: + c  
APCI Q1MS  
[100.000-800.000]

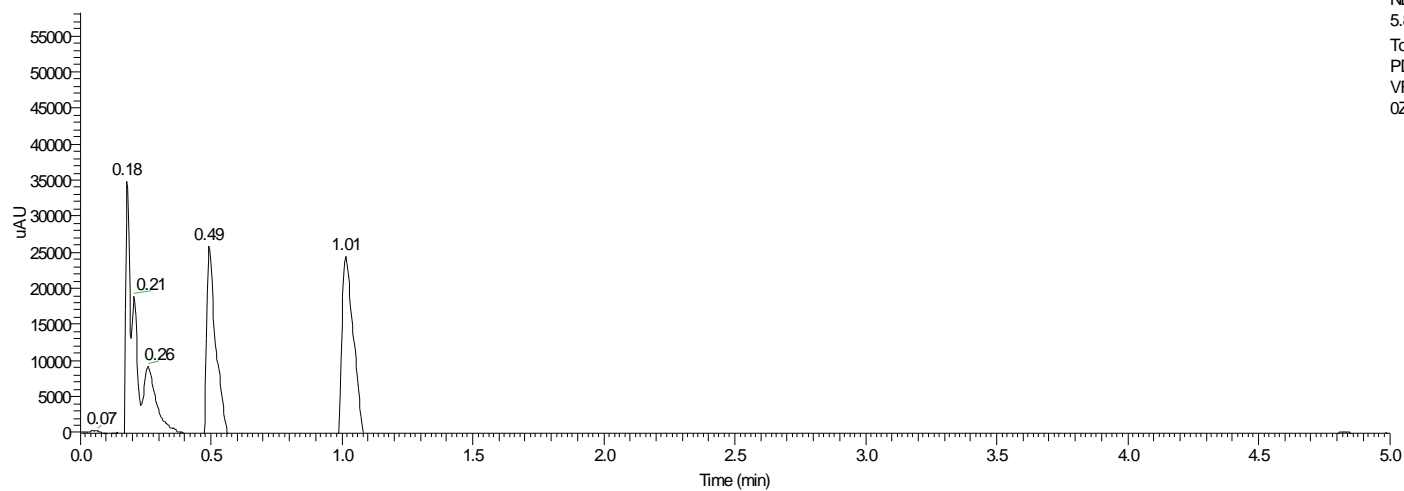
NL:  
1.36E8  
VF70#151 RT:  
2.78 AV: 1 F: + c  
APCI Q1MS  
[100.000-800.000]

Látka **XXIII**:

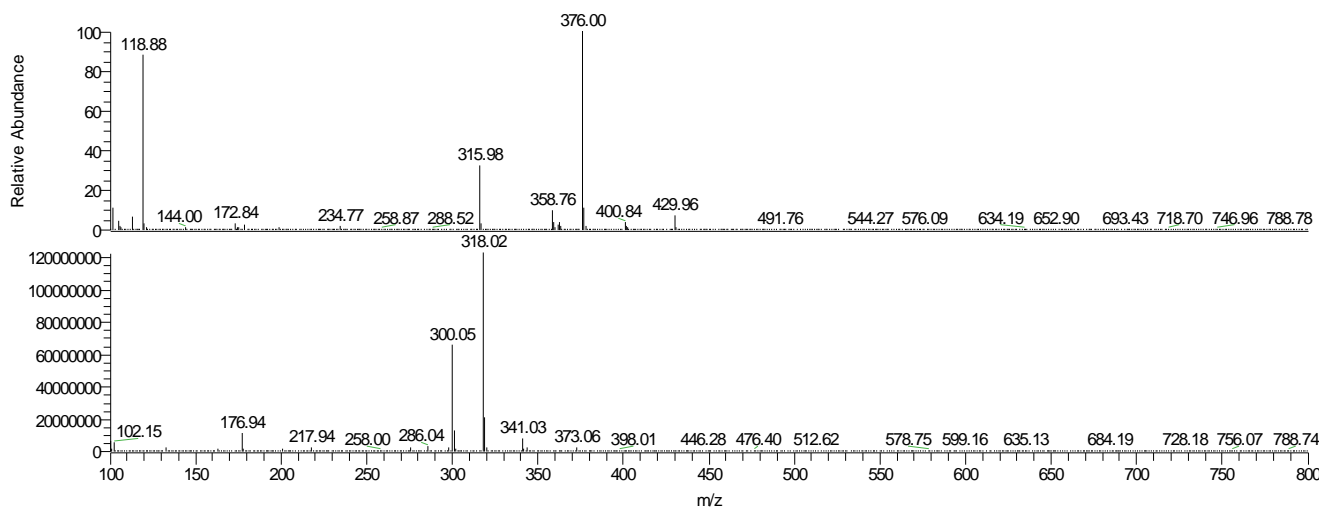
M:\rok 2011\Soual\VF-16-03-OZ

22.3.2011 12:25:03

RT: 0.00 - 5.00



NL:  
5.81E4  
Total Scan  
PDA  
VF-16-03-  
OZ



NL: 2.65E7  
VF-16-03-02#56 RT:  
1.02 AV: 1 F: - c  
APCI Q1MS  
[100.000-800.000]

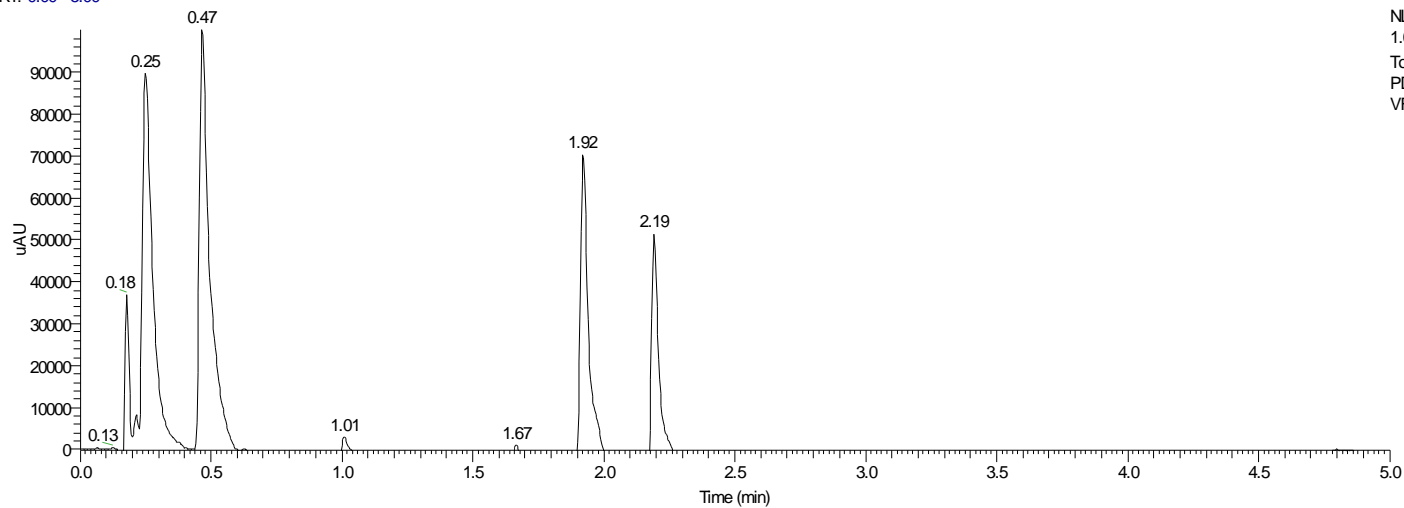
NL: 1.22E8  
VF-16-03-02#57 RT:  
1.04 AV: 1 F: + c  
APCI Q1MS  
[100.000-800.000]

# Látka XVIII:

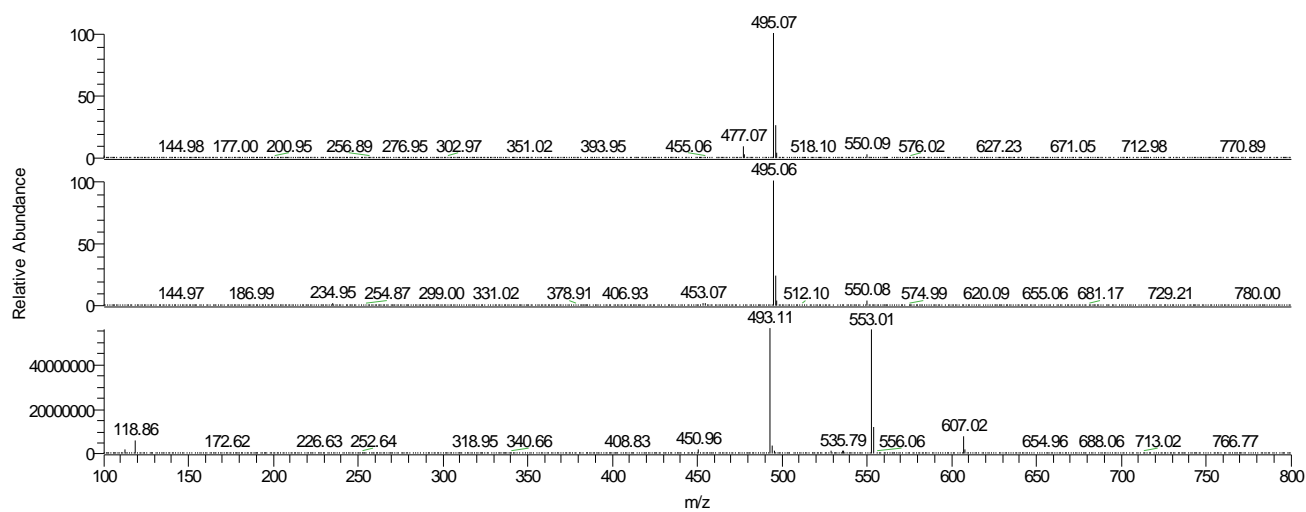
M:\rok 2011\Soual\VF16-03-1

30.3.2011 13:50:01

RT: 0.00 - 5.00



NL:  
1.00E5  
Total Scan  
PDA  
VF16-03-1

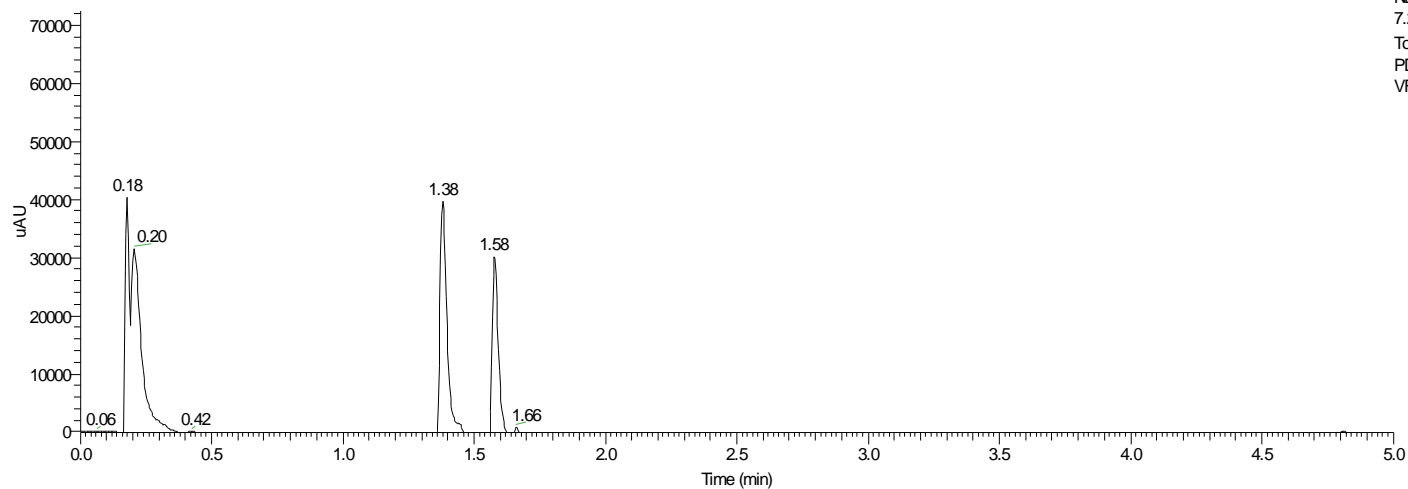


# Látka XXIV:

M:\rok 2011\Soural\VF29-3-76

31.3.2011 11:06:38

RT: 0.00 - 5.00



NL:  
7.24E4  
Total Scan  
PDA  
VF29-3-76

