

Univerzita Hradec Králové

Přírodovědecká fakulta

Katedra chemie

**Příprava pyridin-2-aldoximových kvarterních
amoniových solí jako potenciálních reaktivátorů
cholinesteras**

Bakalářská práce

Autor: Markéta Neugebauerová
Studijní program: B1407 Chemie
Studijní obor: Chemie se zaměřením na vzdělávání
Biologie se zaměřením na vzdělávání
Vedoucí práce: RNDr. Dávid Maliňák, PhD.

Hradec Králové

duben 2017

UNIVERZITA HRADEC KRÁLOVÉ
Přírodovědecká fakulta
Akademický rok: 2016/2017

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE
(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Markéta Neugebauerová**
Osobní číslo: **S14CH015BP**
Studijní program: **B1407 Chemie**
Studijní obory: **Chemie se zaměřením na vzdělávání**
Biologie se zaměřením na vzdělávání
Název tématu: **Příprava pyridin-2-aldoximových kvarterních amoniových solí**
jako potenciálních reaktivátorů cholinesteras
Zadávací katedra: **Katedra chemie**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Rešerše syntézy a biologické aktivity sloučenin využívaných jako reaktivátory cholinesteras popsaných v odborné literatuře. 2. Syntéza, určení struktury a fyzikálně-chemických vlastností nově připravených kvarterních amoniových solí obsahujících pyridin-2-aldoximovou složku, které budou následně poskytnuty na biologické testování jako potenciální reaktivátory cholinesteras. 3. Sepsání bakalářské práce.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

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

Seznam odborné literatury:

Databáze Reaxys, Chemical abstract, Web of Science, Scopus.

Vedoucí bakalářské práce: **RNDr. Dávid Maliňák, PhD.**

Katedra chemie

Datum zadání bakalářské práce: **23. září 2014**

Termín odevzdání bakalářské práce: **28. dubna 2017**

doc. RNDr. PaedDr. Pavel Trojovský, Ph.D.
děkan

L.S.

doc. PharmDr. Kamil Musílek, Ph.D.
vedoucí katedry

dne

Prohlášení:

„Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že jsem v seznamu použité literatury uvedla všechny prameny, ze kterých jsem vycházela.“

V Hradci Králové dne 28. 4. 2017

Markéta Neugebauerová

Poděkování:

Upřímně děkuji RNDr. Dávidu Maliňákovi, PhD. za pomoc při práci v laboratoři, poskytnutí odborných materiálů i za cenné rady a připomínky k tomuto textu.

Anotace

Ve své práci se zabývám přípravou pyridin-2-aldoximových kvarterních amoniových solí jako potenciálních reaktivátorů cholinesteras. V teoretické části popisuji inhibici a reaktivaci acetylcholinesterasy a současně uvádím nové poznatky v oblasti reaktivátorů acetylcholinesterasy. V praktické části se soustřeďuji na přípravu dvou monokvarterních a deseti biskvarterních amoniových solí obsahujících pyridin-2-aldoximovou složku, ale lišících se délkou spojovacího řetězce a druhem napojeného heterocyklu (pyridin, chinolin, isochinolin, nikotinamid a isonikotinamid). Připravené sloučeniny charakterizují pomocí metod NMR a MS.

Klíčová slova

Acetylcholinesterasa, reaktivátory, oximy, pyridin-2-aldoxim

Annotation

The bachelor thesis deals with the preparation of pyridine-2-aldoxime quaternary ammonium salts as potential cholinesterase reactivators. In the theoretical part, I describe the inhibition and reactivation of acetylcholinesterase, and at the same time I present new findings in the field of acetylcholinesterase reactivators. In the practical part, I concentrate on the preparation of two monoquaternary and ten bisquaternary ammonium salts containing a pyridine-2-aldoxime component, but differing in the length of the connecting chain and the type of fused heterocycle (pyridine, quinoline, isoquinoline, nicotinamide and isonicotinamide). The prepared compounds are characterized by NMR and MS methods.

Keywords

Acetylcholinesterase, reactivators, oximes, pyridine-2-aldoxime

Obsah

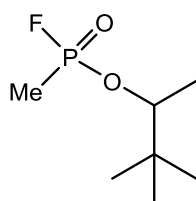
Úvod	9
1 Teoretická část	11
1.1 Acetylcholin, acetylcholinové receptory a acetylcholinesterasa.....	11
1.2 Inhibice acetylcholinesterasy.....	12
1.3 Reaktivace acetylcholinesterasy – oximy.....	14
1.4 Nejvýznamnější reaktivátory AChE.....	16
1.4.1 Syntéza a biologická aktivita pralidoximu	17
1.4.2 Syntéza a biologická aktivita HI-6	18
1.4.3 Syntéza a biologická aktivita HLö-7.....	20
2 Cíle práce	24
3 Výsledky a diskuse	26
3.1 Příprava monokvarterních amoniových solí obsahujících pyridin-2-aldoximovou složku	26
3.1.1 Příprava 1-(5-brompentyl)-2-((hydroxyimino)methyl) pyridinium bromidu.....	26
3.1.2 Příprava 1-(6-bromhexyl)-2-((hydroxyimino)methyl) pyridinium bromidu.....	27
3.2 Příprava biskvarterních amoniových solí obsahujících pyridin-2-aldoximovou složku	28
3.2.1 Příprava biskvarterních amoniových solí s pětiuhlíkatým spojovacím řetězcem.....	29
3.2.2 Příprava biskvarterních amoniových solí s šestiuhlíkatým spojovacím řetězcem.....	31
4 Experimentální část.....	33
4.1 Postup přípravy monokvarterních amoniových solí obsahujících pyridin-2-aldoximovou složku.....	33
4.2 Postup přípravy biskvarterních amoniových solí obsahujících pyridin-2-aldoximovou složku	35
5 Závěr	41
6 Použitá literatura.....	42

Seznam zkratek použitých v textu

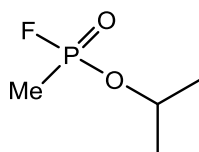
ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesterasa
BuOH	butanol
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
Et ₂ O	diethylether
EtOAc	ethylacetát
EtOH	ethanol
l.t.	laboratorní teplota
MeOH	methanol
MS	hmotnostní spektroskopie
NMR	nukleární magnetická rezonance
OP	organofosfáty
S _N 2	nukleofilní substituce bimolekulární
THF	tetrahydrofuran
TLC	tenkovrstevná chromatografie

Úvod

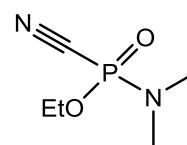
Látky známé jako organofosfáty (OP) jsou dnes hojně rozšířené v zemědělství, kde se využívají jako pesticidy. Mezi takové patří např. parathion nebo diazinon. Dále se s nimi můžeme setkat v průmyslové a farmaceutické výrobě. Nebezpečnou skupinu OP tvoří chemické bojové látky, které působí jako nervově paralytické látky [1]. Známé jsou hlavně látky soman (**1**), sarin (**2**), tabun (**3**), cyklosarin (**4**), VX (**5**) (Obrázek 1). Jejich charakteristikou je rychlé pronikání do organismu všemi cestami, rychlý nástup účinku, vysoká toxicita a letalita [2].



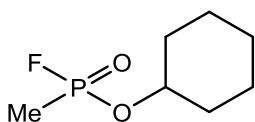
Soman (**1**)



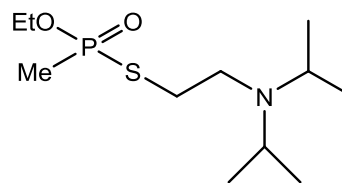
Sarin (**2**)



Tabun (**3**)



Cyklosarin (**4**)



VX (**5**)

Obrázek 1: Nejznámější nervově paralytické látky.

Jako první byla syntetizována látka **3** postupem vyvinutým Gerhardem Schradem v Německu. Následně byly syntetizovány další látky podobné struktury – **1** a **2**, které jsou ještě nebezpečnější [1]. Po zjištění, že tyto látky působí toxicky na člověka, se začaly hojně zneužívat jako chemické bojové látky. Během 2. světové války mělo Německo připraveno 30 tun **2**, tehdy ale naštěstí nebyl použit. Ke zneužívání těchto látek docházelo až v dalších válečných konfliktech. V březnu a dubnu roku 1988 použil Irák ve válce proti Íránu taktéž **2**. Obětí byly tehdy tisíce. Asi nejznámější je použití **2** při teroristických útocích v japonském městě Macumoto v roce 1994 a o rok později v metru v Tokiu [3]. Posledním známým

útokem bylo zavraždění Kim Čong-nama, bratra severokorejského vůdce Kim Čong-una. Použita byla látka 5 [4].

Působení OP je založeno na ireverzibilní inhibici enzymu acetylcholinesterasy (AChE). Tento enzym hydrolyticky rozkládá neuromediátor acetylcholin (ACh). Blokádou enzymu se ACh nahromadí v nervových synapsích a to způsobí trvalou aktivaci obou ACh receptorů – muskarinových i nikotinových [5].

Při intoxikaci OP dochází v těle k centrální cholinergní krizi. Příznaky jsou rýma, bolest hlavy, nauzea a halucinace. Při vyšších dávkách se objevuje kašel a dýchací potíže, křeče, kóma a smrt v důsledku dýchacího a kardiovaskulárního selhání [1].

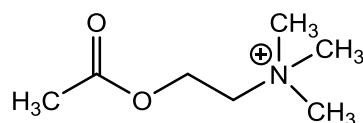
V případě otravy OP je nutné okamžitě zahájit léčbu. Mezi nefarmakologickou léčbu patří resuscitace, odstranění jedu z těla (např. z kůže, očí) a dostatečný příjem kyslíku. Farmakologická léčba využívá léky, které působí symptomaticky nebo kauzálně. Symptomatický účinek mají parasymptolytika (nejčastěji atropin) a antikonvulziva (nejčastěji diazepam). Oproti tomu v kauzální léčbě se dnes hojně využívají oximové reaktivátory AChE. Nejběžněji se setkáme s pralidoximem, methoximem, trimedoximem, HI-6 a HLö-7 [6].

Cílem mé práce je příprava pyridin-2-aldoximových kvarterních amoniových solí jako potenciálních reaktivátorů cholinesteras.

1 Teoretická část

1.1 Acetylcholin, acetylcholinové receptory a acetylcholinesterasa

Acetylcholin (ACh) (6) (Obrázek 2) je neurotransmitter, který zodpovídá za přenos nervového vzruchu v synaptických štěrbinách [1]. Velkou roli hraje v autonomním nervovém systému, ale také v periferním nervovém systému, kde působí jako hlavní aktivátor kosterního svalstva [7]. Tento neurotransmitter se v cytoplazmě syntetizuje z cholinu, který přijímáme potravou. Cholin podléhá acetylaci acetylkoenzymem A, za což může enzym zvaný acetyltransferasa [8]. Vzniklý ACh se následně díky zvýšenému akčnímu potenciálu dostane do synaptické štěrbin, kde se naváže na ACh receptory [2]. Tímto navázáním receptor změní svoje prostorové uspořádání. Synaptická membrána začne propouštět ionty, které migrují z buňky do buňky. Tím vznikne elektrický potenciál, který se šíří k dalšímu spojení dvou neuronů [8].



Acetylcholin (6)

Obrázek 2: Struktura acetylcholinu (6).

Receptory pro ACh na postsynaptické membráně známe pod názvy nikotinový a muskarinový. Receptory nikotinového typu se nacházejí v autonomních gangliích, motorických ploténkách, dřeni nadledvin a zčásti v centrální nervové soustavě. Název je odvozen od alkaloidu nikotinu, který působí jako agonista ACh [9]. Podráždění nikotinových receptorů navozuje třes a záškuby ve svalech, zvyšuje bdělost a snižuje agresivitu [10]. Receptory muskarinového typu dostaly svůj název podle muskarinu, což je jed obsažený v muchomůrce červené. Muskarin působí opět agonisticky s ACh, avšak na nikotinové receptory nemá žádný efekt. Tento typ receptorů se vyskytuje v centrální nervové soustavě a v cílových cholinergních orgánech [9]. Aktivované muskarinové receptory způsobují slinění, akomodaci oka na blízko a prokrvení žaludku a střev [10].

AChE je enzym patřící do skupiny serinových hydroláz. Aktivní místo AChE je tvořeno dvěma částmi – anionickou a esterovou. Esterovou část tvoří katalytická triáda zbytků aminokyselin. Jsou to Ser203, His447 a Glu334, které jsou umístěny v centru hluboké štěrbině (20 Å) lemované aromatickými residui. Anionická část je

lokalizována na okraji štěrbině a obsahuje další aromatické zbytky, aminokyseliny tryptofan (Trp286), tyrosin (Tyr72, Tyr124, Tyr341) a kyselinu asparagovou (Asp74) [5].

AChE ukončuje nervový přenos tím, že katalyzuje hydrolýzu ACh v synaptické štěrbině [6]. V prvním kroku hydrolýzy vzniká meziproduct mezi ACh a serinovým zbytkem AChE. Část ACh se kovalentně naváže na hydroxylovou skupinu serinu v AChE a vznikne acylderivát AChE. Odštěpí se cholin a následně z acylovaného enzymu odstoupí acyl, který reakcí s vodou poskytne kyselinu octovou (Schéma 1). Cholin se vrací zpět do presynaptického neuronu a účastní se syntézy nového ACh [11].

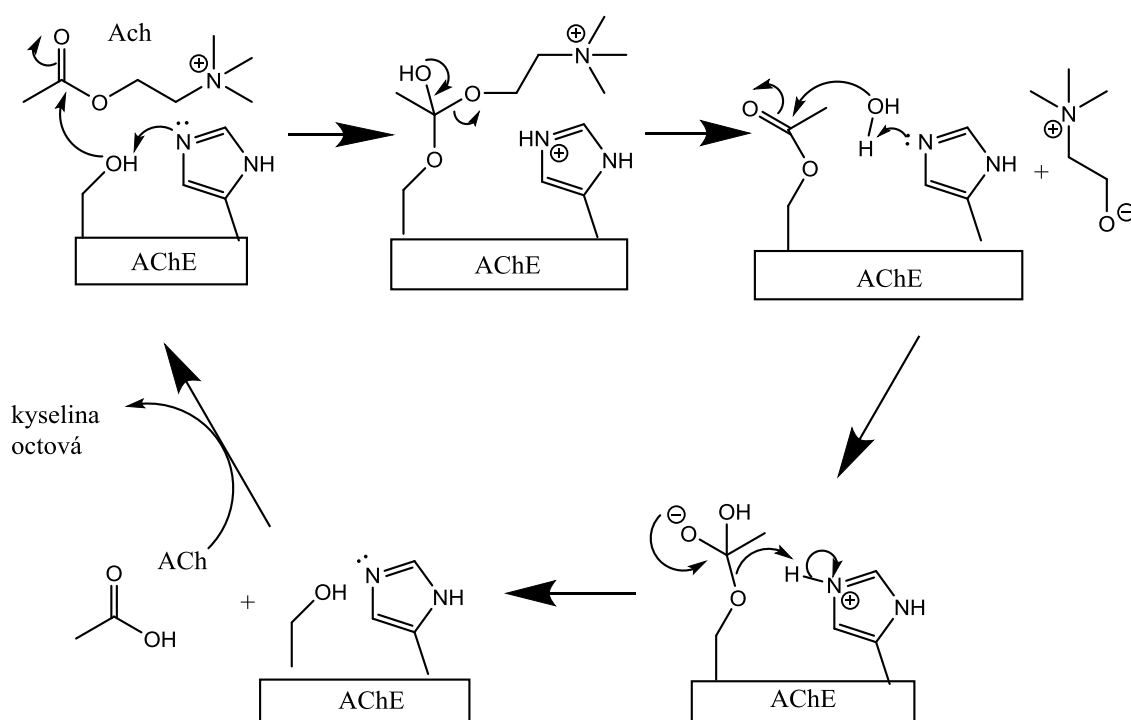
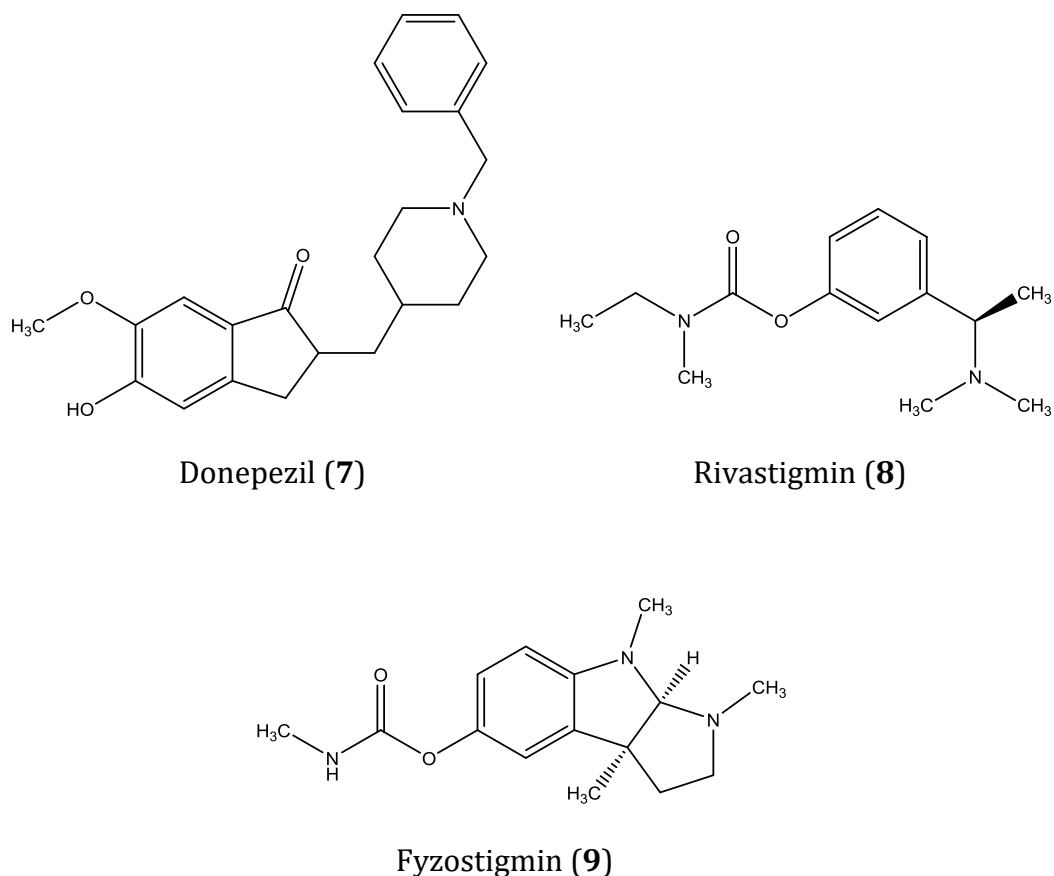


Schéma 1: Mechanismus hydrolýzy ACh působením AChE.

1.2 Inhibice acetylcholinesterasy

Existuje spousta sloučenin, které působí jako inhibitory AChE. Dělíme je na reversibilní (vratné) a ireversibilní (nevratné) [5].

Reversibilní inhibitory AChE se často využívají ve farmaceutickém průmyslu pro léčbu různých neurologických onemocnění jako je Alzheimerova choroba nebo Myasthenia gravis [5]. Jako příklady lze uvést donepezil (**7**), rivastigmin (**8**) a fyzostigmin (**9**) (Obrázek 3).



Obrázek 3: Nejznámější reverzibilní inhibitory AChE.

Ireverzibilní inhibitory AChE zahrnují právě OP (např. nervově paralytické látky, pesticidy). OP jsou mnohem nebezpečnější, protože se kovalentně navážou na aktivní místo AChE, konkrétně na serinovou část [5]. Vznikne fosforylovaný serin, jehož esterová funkční skupina snadno podléhá hydrolýze. Tomuto jevu se říká dealkylace neboli stárnutí enzymu (Schéma 2) [10]. Inhibice AChE způsobí zastavení hydrolytické reakce ACh a hromadění neurotransmiteru v synapsích. Dojde k přesycení muskarinových i nikotinových receptorů [5] a začnou se rozvíjet somatické příznaky otravy. Mezi muskarinové příznaky patří slinění, slzení a míoza, nikotinové jsou zastoupeny svalovými křečemi. V případě pozdního podání antidot (reaktivátorů AChE) může dojít k selhání dýchání a smrti [12].

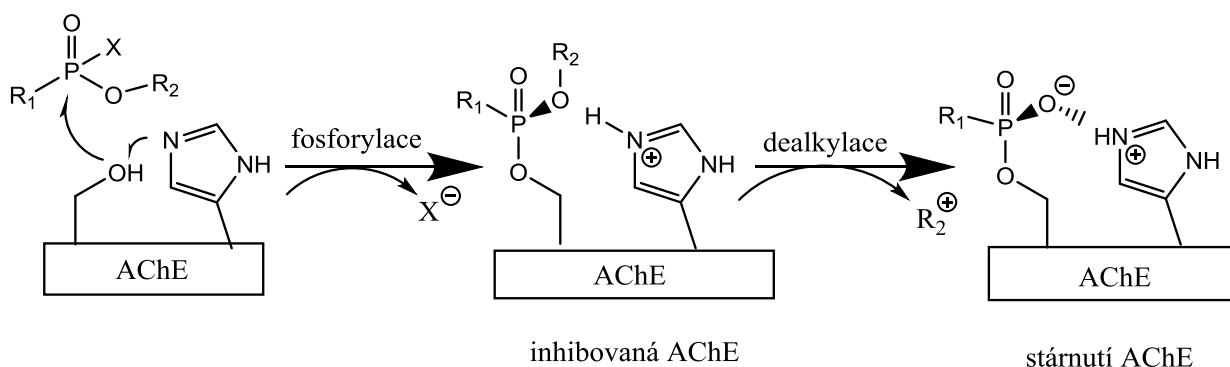
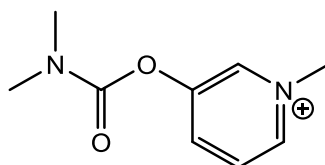


Schéma 2: Mechanismus inhibice AChE.

1.3 Reaktivace acetylcholinesterasy – oximy

Léčba intoxikací OP se dělí na tři skupiny – profylaxe, symptomatická a kauzální léčba [12].

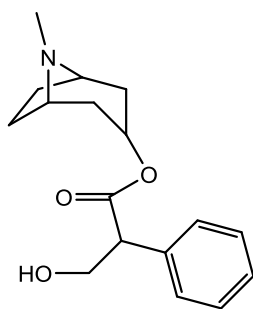
Mezi profylaktická léčiva patří např. karbamát pyridostigmin (**10**) (Obrázek 4), který se řadí do skupiny reverzibilních inhibitorů AChE. Takové látky se podávají v případě, že se očekává kontakt s OP (např. riziková práce vojáků). Pyridostigmin zablokuje vazbu OP a tím reaktivuje komplex OP – AChE [12]. Na stejném principu pracuje i další karbamát **9**.



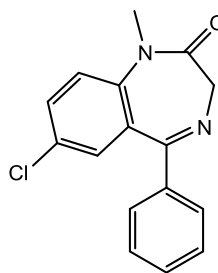
Pyridostigmin (**10**)

Obrázek 4: Struktura pyridostigminu (**10**).

Druhou možností léčby je podávání parasympatolytik např. atropin (**11**) nebo antikonvulziv např. diazepam (**12**) (Obrázek 5). Látky se využívají pro symptomatickou léčbu. To znamená, že pouze odstraňují příznaky intoxikace, ale neřeší její příčinu. Parasympatolytika pracují jako antagonisté ACh díky vazbě na cholinergní receptory. Antikonvulziva zmírňují svalové křeče [8].



Atropin (**11**)



Diazepam (**12**)

Obrázek 5: Symptomatická léčiva atropin (**11**) a diazepam (**12**).

Třetí skupinou je kauzální léčba, při které se aplikují reaktivátory AChE [12]. Jako reaktivátory AChE fungují sloučeniny obsahující oximovou skupinu. Tyto sloučeniny se využívají jako léčiva při otravách OP, protože nezmírňují pouze příznaky otravy jako parasymptolytika nebo antikonvulziva, ale odstraňují příčinu intoxikace. Princip reaktivace závisí na afinitě reaktivátoru a fosforylovaného enzymu. Proces je založen na dvou po sobě jdoucích krocích. Nejdříve oxim napadá atom fosforu v komplexu OP-AChE a vznikne reverzibilní komplex zvaný EPOX. V druhém kroku se reaktivuje AChE a vytvoří se komplex oximu s atomem fosforu (POX) (Schéma 3). Oximů dnes existuje celá řada, žádný ale nemá univerzální účinek pro všechny OP. Důležitá je proto doplňující léčba antikonvulzivy, aby se zabránilo svalovým křečím [12].

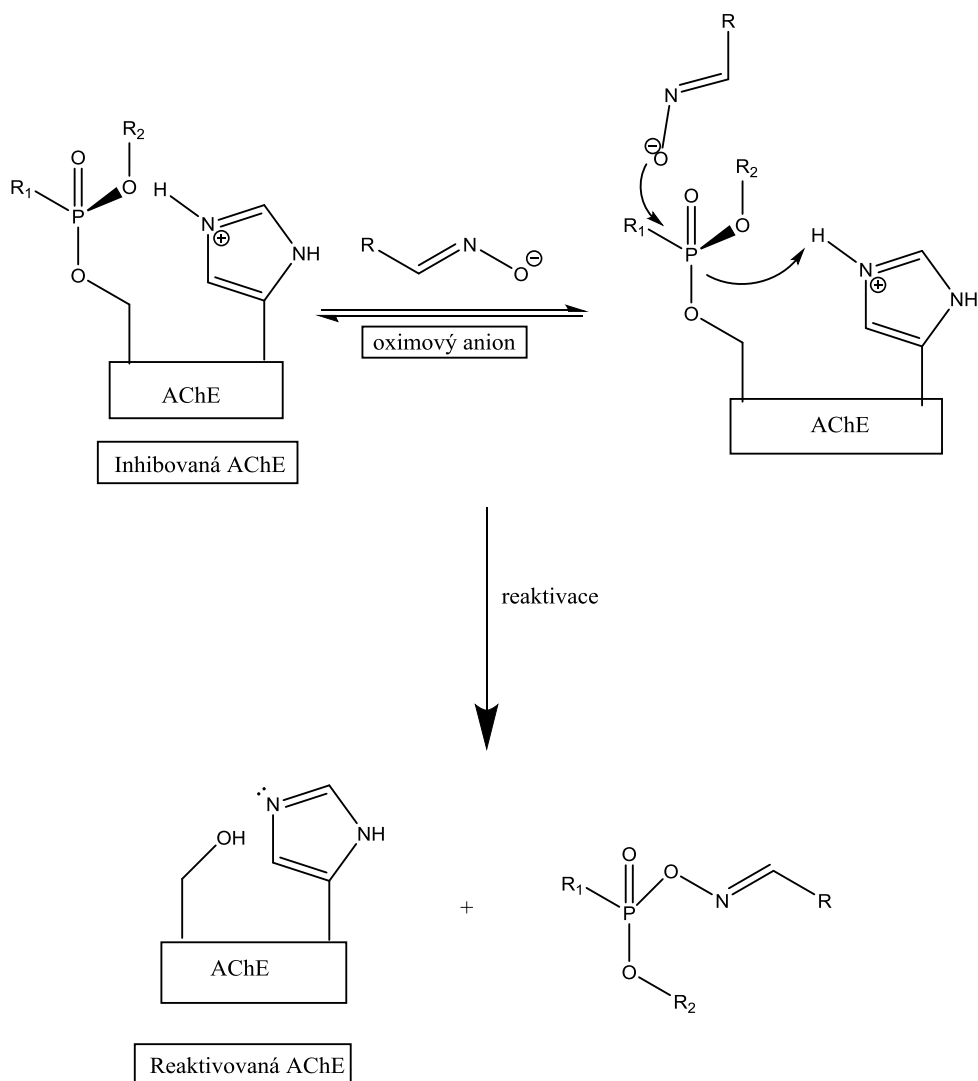
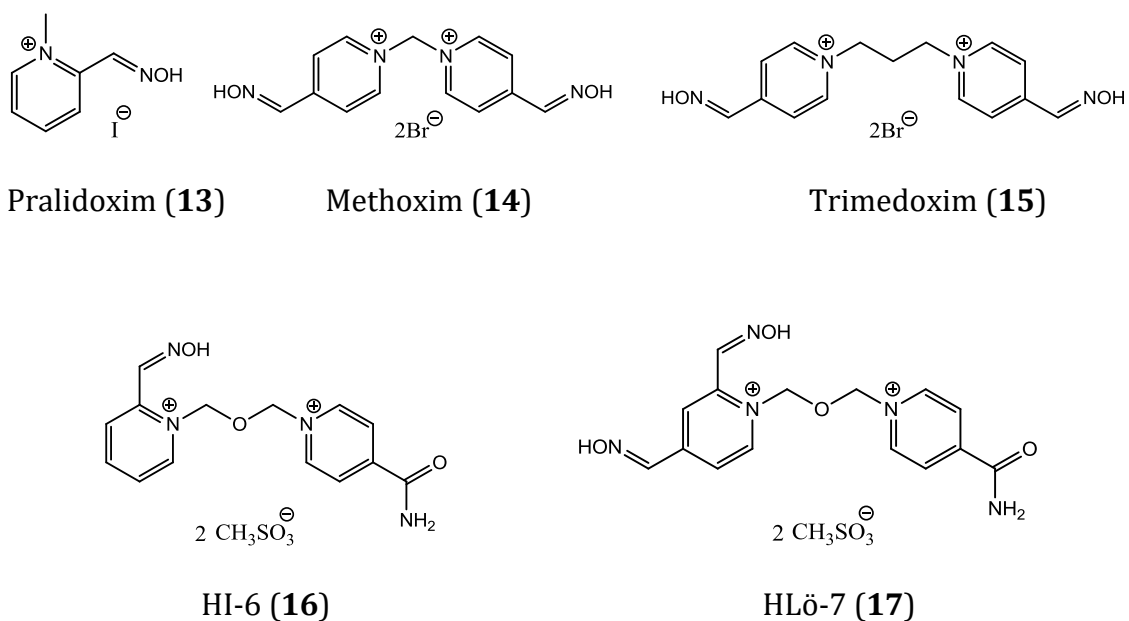


Schéma 3: Mechanismus reaktivace AChE.

1.4 Nejvýznamnější reaktivátory AChE

Mezi nejvýznamnější zástupce oximů, které reaktivují AChE, patří pralidoxim (**13**), methoxim (**14**), trimedoxim (**15**), HI-6 (**16**) a HLö-7 (**17**) (Obrázek 6). Tyto reaktivátory byly vyvinuty jako antidota pro léčbu intoxikací OP [13]. Kromě těchto komerčně využívaných reaktivátorů se mnoho vědeckých laboratoří po celém světě snaží vyvinout nové a lepší reaktivátory. Je to hlavně z důvodu narůstající hrozby terorismu. Žádný z dosud používaných reaktivátorů AChE se nedá uplatnit pro všechny typy inhibitorů AChE. Látky **16** a **17** se jeví jako nejlepší možnost, protože se dají využít k pokrytí nejširší škály nervových paralytických látek [1].



Obrázek 6: Nejvýznamnější zástupci oximů.

1.4.1 Syntéza a biologická aktivita pralidoximu

Pralidoxim (2-((hydroxyimino)methyl)-1-methylpyridinium jodid, 2-PAM) (**13**) byl poprvé syntetizován Wilsonem a Ginsburgem v roce 1955 [14] a stal se první látkou, která se využívala v praxi jako reaktivátor AChE [6]. Sloučenina **13** vykazovala nesčetněkrát vyšší účinnost než hydroxylamin, který byl do té doby jedinou sloučeninou schopnou odštěpit zbytek fosfátu z AChE. Poprvé byl **13** použit v Japonsku v roce 1956 jako antidotum při otravě parathionem [5]. Jedná se o monokvarterní pyridiniovou sůl, která má v porovnání s biskvarterními solemi výrazně nižší účinek. Často se využívá jako protilátka při otravě pesticidy. Aldoxim **13** vykazuje mnohem větší lipofilitu než biskvarterní oximy. I přes nižší reaktivační účinek je **13** schopen reaktivovat AChE v mozkové tkáni, protože jeho prostupnost přes hematoencefalickou bariéru je 10%. Biskvarterní pyridiniové soli vykazují prostupnost pouze 6% [12]. Sloučenina **13** se začala používat v klinické praxi bez dostačujících klinických studií, testy se prováděly až v průběhu posledních dvou desetiletí. Proto je jeho užívání při otravách organofosfáty sporné [6].

Musílek a kol. popsali v roce 2008 přípravu **13** a jeho derivátů vycházejících z pyridin-2-aldoximu (**18**). Reakcí oximu s methyljodidem (CH_3I) v acetonitrilu (CH_3CN) za refluxu byl po 6,5 hodinách získán produkt **13** ve výtěžku 69% (Schéma 4). Podobně byly připraveny i jeho deriváty. Reakcí buď v CH_3CN , nebo acetonu za refluxu po dobu 6,5 – 48 hodin byly získány produkty ve výtěžnostech 6

– 94%. Výsledné produkty byly čištěny rekrystalizací z CH₃CN. Struktura **13** a jeho derivátů byla potvrzena na základě NMR, ESI-MS a elementární analýzy [12].

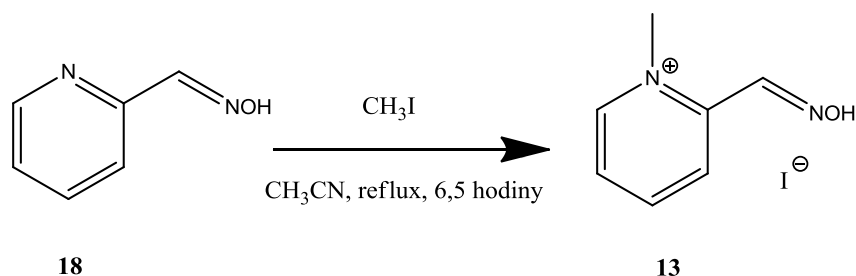


Schéma 4: Musílkova syntéza pralidoximu (**13**).

1.4.2 Syntéza a biologická aktivita HI-6

Poprvé byla sloučenina HI-6 dimethylsulfonát (1-(((4-karbamoylpyridin-1-ium-1-yl)methoxy)methyl)-2-((hydroxyimino)methyl)pyridinium dimethylsulfonát, Asoxim) (**16**) popsána v roce 1969 Hagedornem [15]. Tato sloučenina **16** je jedním z nověji syntetizovaných oximů, od kterého se očekávaly slibné výsledky [13]. Byl vyvinut jako nejvíce širokospektrý reaktivátor inhibované AChE [6]. Využití má při otravách somanem, sarinem a VX [16]. Nevýhodou však zůstává slabá reaktivace při intoxikaci tabunem a pesticidy [13]. Podobně jako methoxim i **16** má nižší schopnost reaktivace při intoxikacích dimethyl- a diethylorganofosfáty oproti ostatním oximovým reaktivátorům [6].

Yang a kol. popsali v roce 2003 přípravu aldoximu **16**, který vychází z **18**. Reakcí **18** s bis(methansulfonoxymethyl)etherem (**19**) a isonikotinamidem (**20**) v CH₃CN za laboratorní teploty byl po 15 hodinách získán produkt **16** ve výtěžnosti 11% (Schéma 5). Výsledný produkt byl čištěn rekrystalizací z EtOH. Struktura produktu byla stanovena na základě NMR analýzy [16].

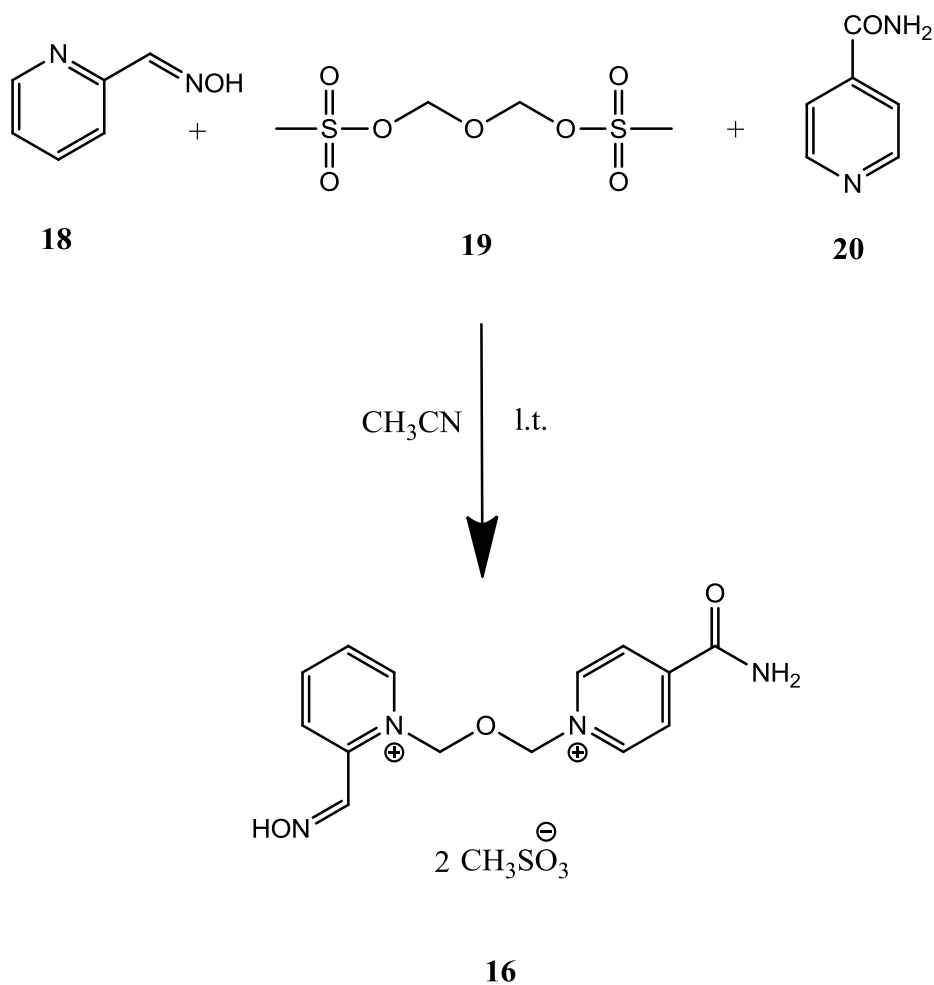


Schéma 5: Yangova syntéza HI-6 dimethylsulfonatu (**16**).

Taktéž byl připraven Huangem a kol. HI-6 dichlorid (1-(((4-karbamoylpyridin-1-ium-1-yl)methoxy)methyl)-2-((hydroxyimino)methyl)pyridinium dichlorid) (**22**) z meziprojektu 1-((chlormethoxy)methyl)-2-((hydroxyimino)methyl)pyridinium chloridu (**21**) reakcí derivátu **21** s **20** v DMF za refluxu ve výtěžku 96% (Schéma 6). Struktura **22** byla potvrzena na základě NMR analýzy [17].

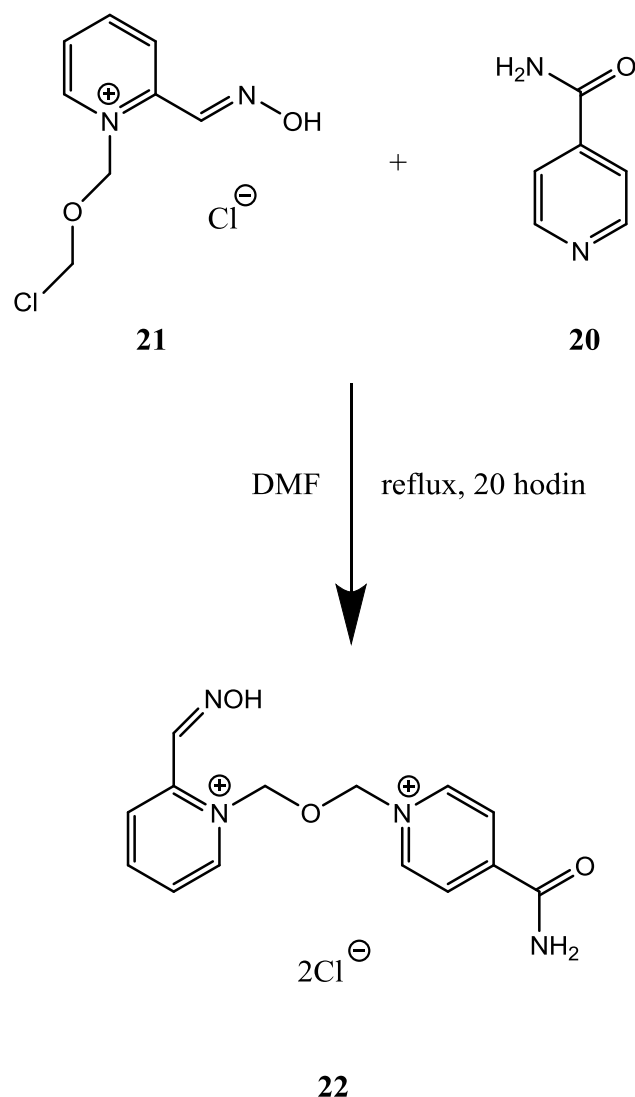


Schéma 6: Huangova syntéza HI-6 dichloridu (**22**).

1.4.3 Syntéza a biologická aktivita HLö-7

Dialdoxim HLö-7 dimethylsulfonat (1-(((4-karbamoylpyridin-1-ium-1-yl)methoxy)methyl)-2,4-bis((hydroxyimino)methyl)pyridinium dimethylsulfonat) (**17**) patří mezi nejnověji popsané reaktivátory AChE při organofosfátových intoxikacích [18]. Poprvé byl syntetizován Hagedornem a Löfflerem v roce 1986 [19]. V porovnání s látkou **16** vykazuje mnohem účinnější reaktivaci při otravách somanem, sarinem, tabunem a cyklosarinem. Největší nevýhodou HLö-7 diiodidu (1-(((4-karbamoylpyridin-1-ium-1-yl)methoxy)methyl)-2,4-bis((hydroxyimino)methyl)pyridinium diiodid) (**25**) byla malá rozpustnost ve vodě a poměrně nízká

stabilita. Proto byl syntetizován dialdoxim **17**, který je ve vodě rozpustný a stabilní ve formě aerosolu [18].

Spöhrer a kol. popsali přípravu **17** přes 2,4-bis((hydroxyimino)methyl)-1-(((methylsulfonyl)oxy)methoxy)methyl)pyridinium methylsulfonat (**24**) jako meziprodukt. Reakcí etheru **19** s pyridin-2,4-dialdoximem (**23**) ve směsi CH₃CN/THF za laboratorní teploty byl po 8 hodinách získán meziprodukt **24**. Po přidání **20** v CH₃CN byl při 40°C po 4 hodinách získán produkt **17** ve výtěžku 17% (Schéma 7). Produkt byl rekrystalizován z MeOH. Struktura **17** byla potvrzena na základě NMR analýzy [18].

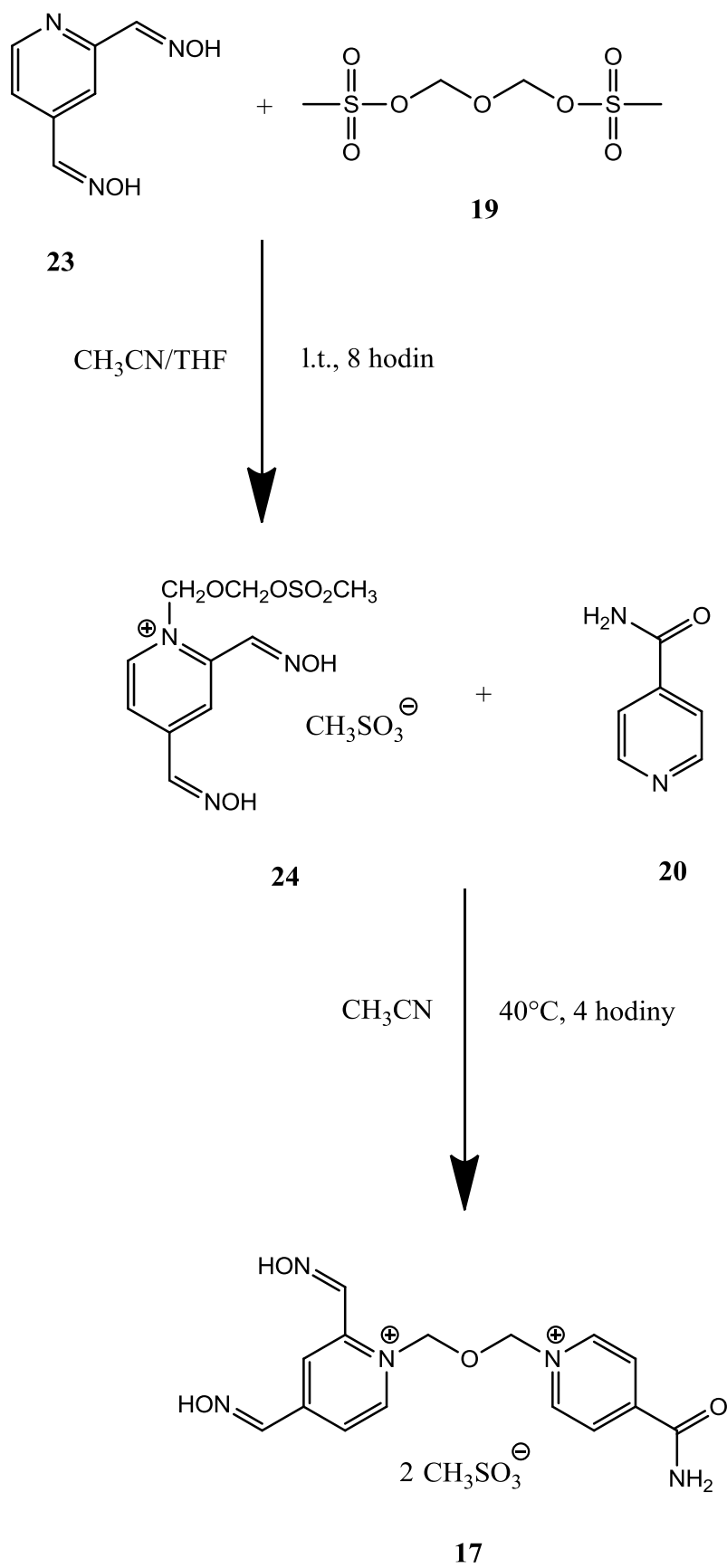


Schéma 7: Spöhrerova syntéza HLö-7 dimethylsulfonatu (**17**).

Iontovýmiennou reakcí **25** s methansulfonátem stříbrným ($C_2H_6O_6S_2Ag$) (**26**) v CH_3CN byl při $60^\circ C$ získán produkt **17** ve výtěžku 95% (Schéma 8). Produkt byl rekrystalizován z horkého MeOH. Struktura dialdoximu **17** byla opět potvrzena na základě NMR analýzy [18].

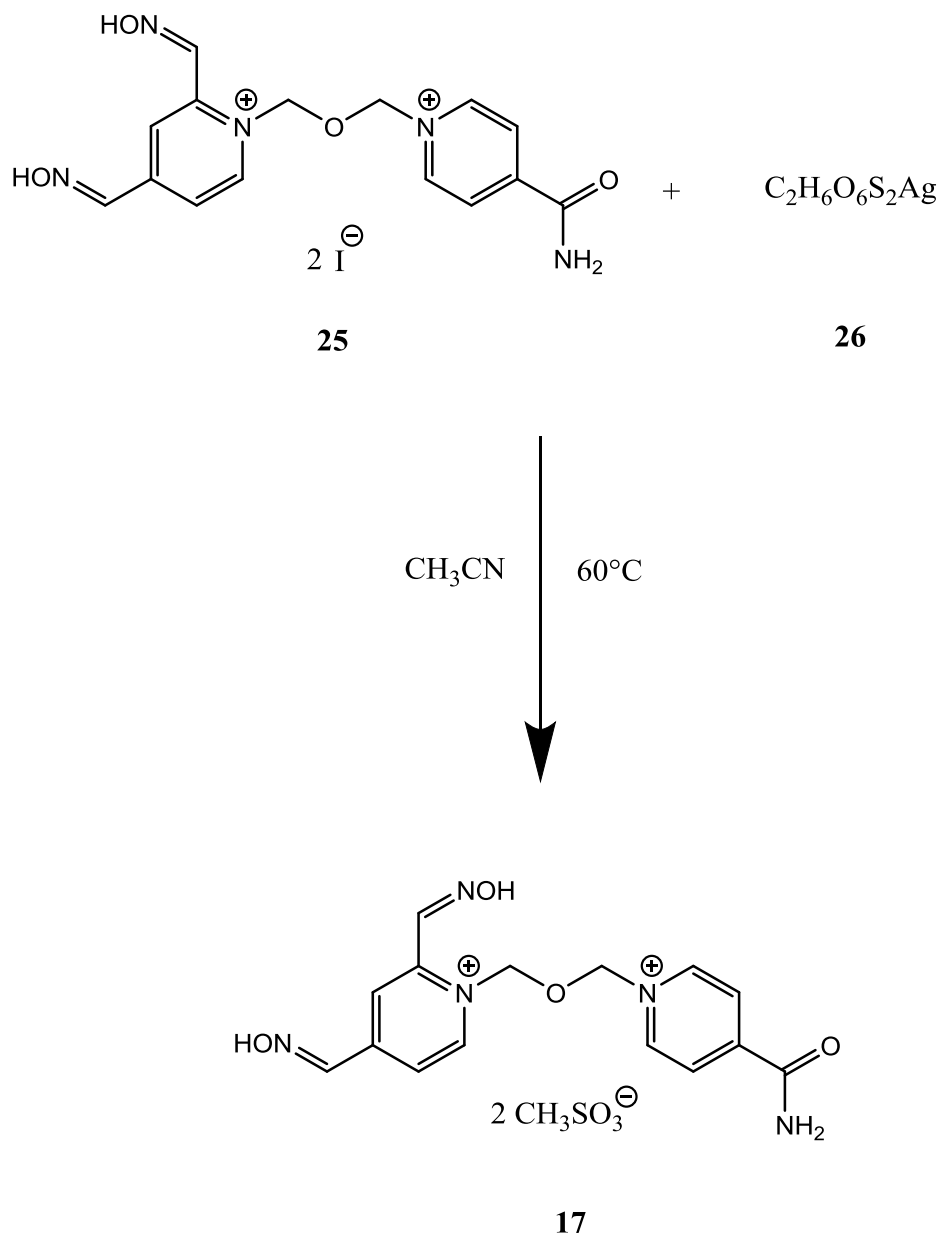
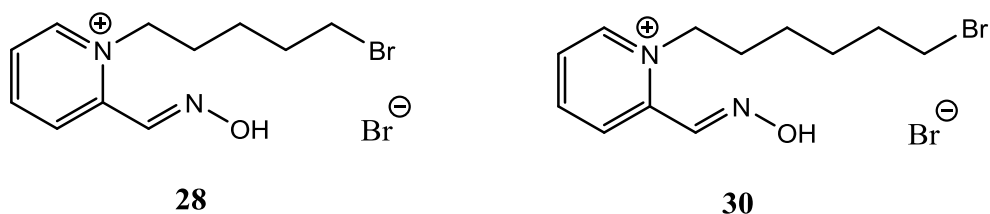


Schéma 8: Iontovýmienná příprava HLö-7 dimethylsulfonatu (**17**).

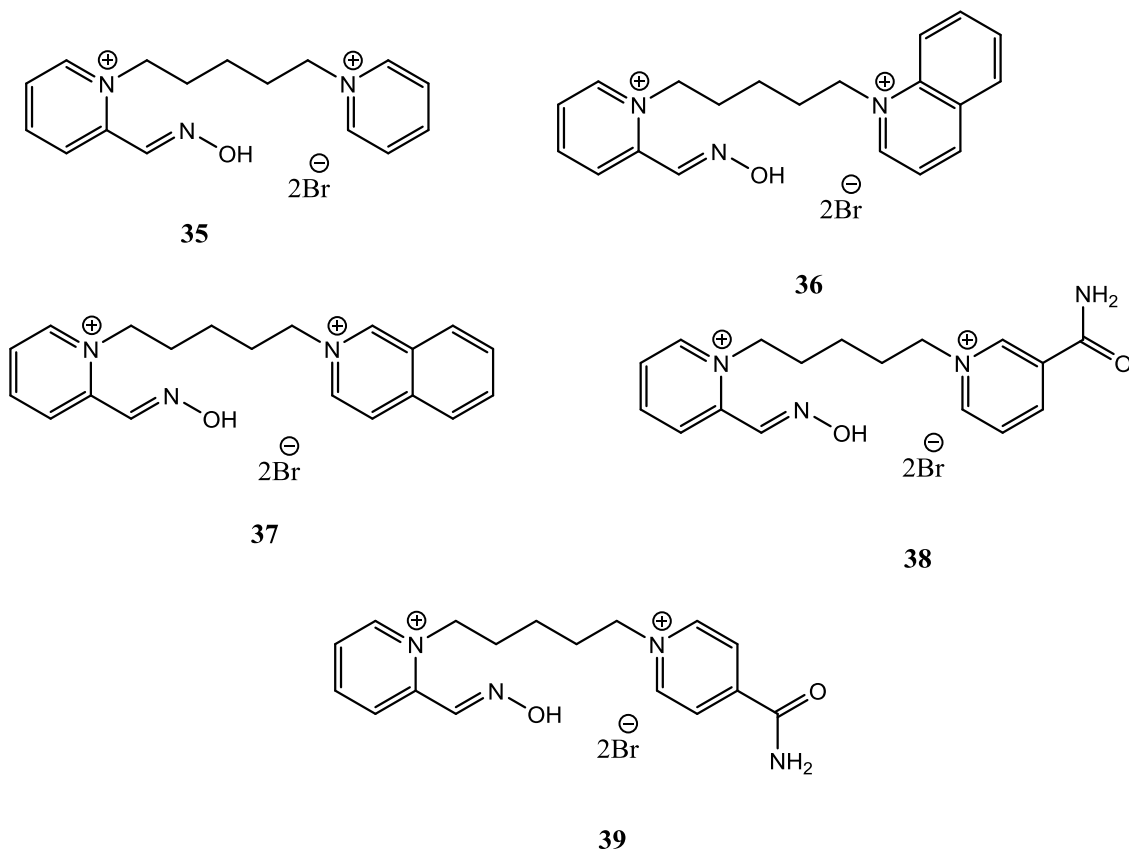
2 Cíle práce

Prvním cílem práce byla příprava monokvarterních amoniových solí obsahujících pyridin-2-aldoximovou složku a pětiuhlíkatý (**28**) nebo šestiuhlíkatý (**30**) řetězec (Obrázek 7).

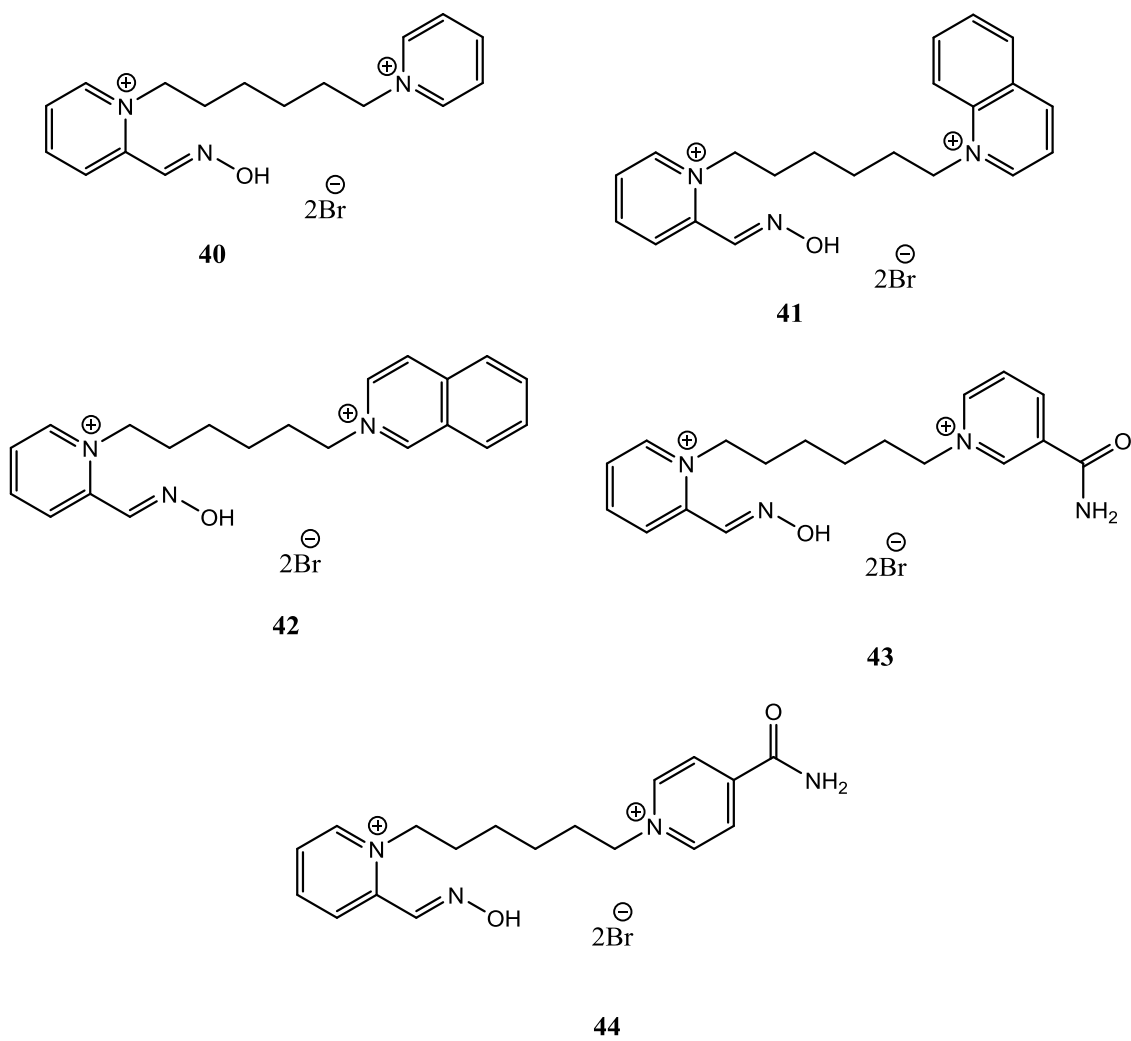


Obrázek 7: Monokvarterní amoniové soli (**28** a **30**).

Druhým cílem práce byla příprava deseti biskvarterních amoniových solí obsahujících pyridin-2-aldoximovou složku, ale lišících se délkou spojovacího řetězce a druhem napojeného heterocyklu (pyridin, chinolin, isochinolin, nikotinamid a isonikotinamid) (Obrázek 8 a 9).



Obrázek 8: Biskvarterní amoniové soli obsahující pětiuhlíkatý řetězec (**35**-**39**).



Obrázek 9: Biskvarterní amoniové soli obsahující šestiuhlíkatý řetězec (**40-44**).

3 Výsledky a diskuse

3.1 Příprava monokvarterních amoniových solí obsahujících pyridin-2-aldoximovou složku

Pro splnění cílů práce jsme jako první krok syntetizovali dvě výchozí látky pro přípravu konečných produktů. K syntéze těchto sloučenin jsme použili komerčně dostupné látky: pyridin-2-aldoxim (**18**), 1,5-dibrompentan (**27**) a 1,6-dibromhexan (**29**).

3.1.1 Příprava 1-(5-brompentyl)-2-((hydroxyimino)methyl)pyridinium bromidu

Přípravu výchozí látky pro pět dalších produktů jsme provedli dle Schématu 9. Výchozí látkou byla sloučenina **18**, která S_N2 reakcí s dibromderivátem **27** při teplotě 70°C v CH_3CN po 72 hodinách poskytla 1-(5-brompentyl)-2-((hydroxyimino)methyl)pyridinium bromid (**28**) ve výtěžku 4%. Průběh reakce jsme kontrolovali TLC metodou. Připravenou monokvarterní sůl jsme několikrát rekrystalizovali z acetonu pro dosažení úplné čistoty látky. Nízká výtěžnost reakce byla pravděpodobně způsobena jednak nízkou reaktivitou výchozí látky **18**, protože aldoximová skupina v poloze 2 na pyridinu snižuje nukleofilní charakter dusíkového atomu, který je součástí pyridinového kruhu, jednak opakovanou krystalizací. Strukturu **28** jsme stanovili pomocí NMR a MS analýz. Tato látka se stala výchozí látkou pro dále syntetizované sloučeniny **35** – **39**.

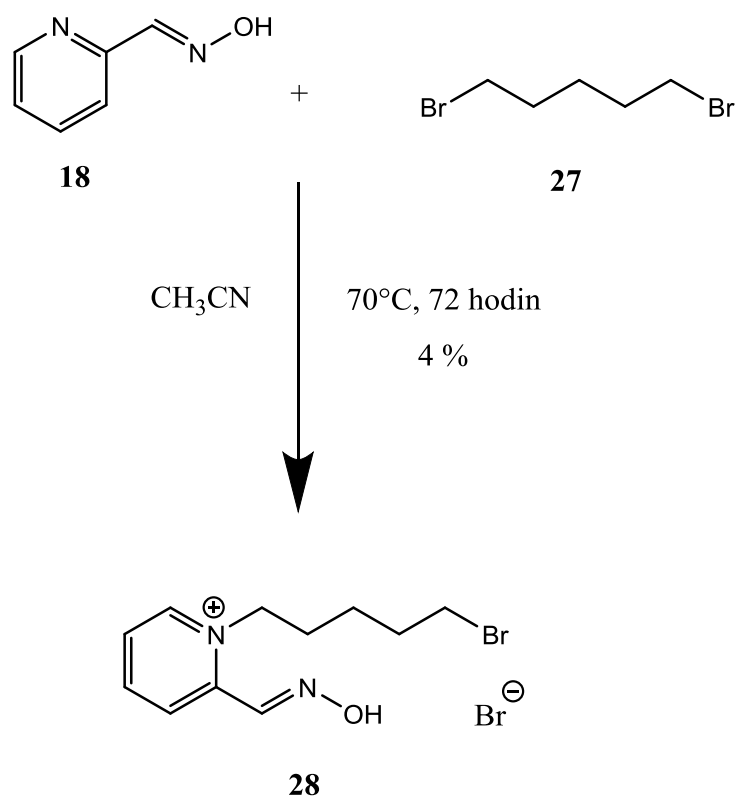


Schéma 9: Příprava 1-(5-brompentyl)-2-((hydroxyimino)methyl)pyridinium bromidu (**28**).

3.1.2 Příprava 1-(6-bromhexyl)-2-((hydroxyimino)methyl)pyridinium bromidu

Přípravu 1-(6-bromhexyl)-2-((hydroxyimino)methyl)pyridinium bromid (**30**) jsme provedli podle Schématu 10. Výchozí látku **18** jsme rozpustili v acetonu. Po přidání 1,6-dibromhexanu (**29**) jsme směs zahřívali při 60°C . Reakce po 72 hodinách poskytla produkt **30** ve výtěžnosti 3%. Průběh reakce jsme kontrolovali pomocí TLC metody. Připravený bromid jsme rekrystalizovali z diethyletheru (Et_2O) a ethylacetátu (EtOAc). I v tomto případě byla nízká výtěžnost pravděpodobně způsobena nízkou reaktivitou výchozí látky **18** a opakovanou krystalizací. Strukturu **30** jsme potvrdili na základě NMR a MS analýz. Sloučeninu **30** jsme následně použili jako výchozí látku pro syntézu biskvarterních amoniových solí **40** - **44**.

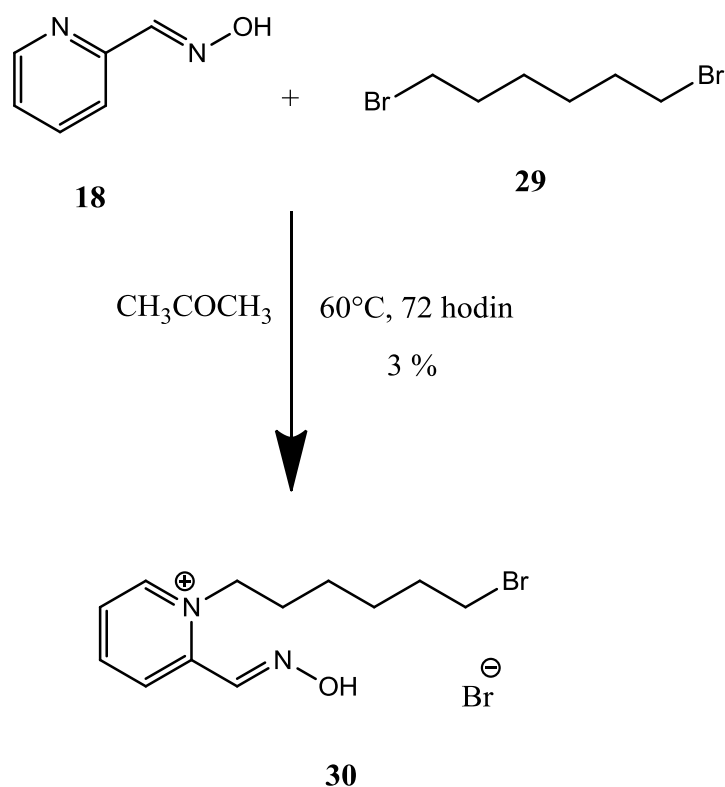


Schéma 10: Příprava 1-(6-bromhexyl)-2-((hydroxyimino)methyl)pyridinium bromidu (30).

3.2 Příprava biskvarterních amoniových solí obsahujících pyridin-2-aldoximovou složku

Druhým cílem byla příprava potenciálních biskvarterních reaktivátorů AChE. Výchozí látky **28** a **30** jsme syntetizovali v prvním kroku. Všechny ostatní použité sloučeniny - isonikotinamid (**20**), pyridin (**31**), chinolin (**32**), isochinolin (**33**) a nikotinamid (**34**) byly opět komerčně dostupné.

3.2.1 Příprava biskvarterních amoniových solí s pětiuhlíkatým spojovacím řetězcem

Připravili jsme pět sloučenin, jejichž společnou výchozí látkou byla monokvarterní amoniová sůl **28**, jejíž přípravu jsme popsali v předcházející kapitole 3.1.1. Nukleofilní substitucí heterocyklických dusíkatých sloučenin - isonikotinamid (**20**), pyridin (**31**), chinolin (**32**), isochinolin (**33**) a nikotinamid (**34**) s bromidem **28** jsme v DMF při 70°C po 48 hodinách připravili biskvarterní soli **35** - **39** (Schéma 11). Reakce probíhaly S_N2 mechanismem, proto jsme v těchto případech použili aprotické polární rozpouštědlo DMF. Reakce jsme se pokoušeli uskutečnit i v CH₃CN, ale bohužel neúspěšně, což mohlo být způsobeno špatnou rozpustností výchozí látky **28**. Kontrolu průběhu reakcí v DMF jsme prováděli metodou TLC. Konečné produkty jsme precipitovali z horkého acetonu. Jako precipitáty jsme získali čisté produkty (biskvarterní soli), přičemž výchozí látky zůstaly rozpuštěné v horkém acetonu. Ty jsme následně odstranili filtrací. Získali jsme produkty s následujícími výtěžnostmi - 2-((hydroxyimino)methyl)-1-(5-(pyridin-1-ium-1-yl)pentyl)pyridinium dibromid (**35**) (55%), 1-(5-(2-((hydroxyimino)methyl)pyridin-1-ium-1-yl)pentyl)chinolinium dibromid (**36**) (37%), 2-(5-(2-((hydroxyimino)methyl)pyridin-1-ium-1-yl)pentyl)isochinolin-2-ium dibromid (**37**) (55%), 1-(5-(3-karbamoylpyridin-1-ium-1-yl)pentyl)-2-((hydroxyimino)methyl)pyridinium dibromid (**38**) (70%), 1-(5-(4-karbamoylpyridin-1-ium-1-yl)pentyl)-2-((hydroxyimino)methyl)pyridinium dibromid (**39**) (61%). Nejnižší výtěžnost jsme pozorovali při přípravě derivátu **36**. Předpokládáme, že tato nízká výtěžnost byla způsobena sterickými efekty příslušného cholinového substrátu. U všech připravených produktů jsme stanovili strukturu pomocí metod NMR a MS. Podobným postupem jsme se pokusili připravit i deriváty obsahující akridinovou a fenantridinovou složku. Reakce s těmito substráty neprobíhaly pravděpodobně ze sterických důvodů, protože reakce probíhají S_N2 mechanismem.

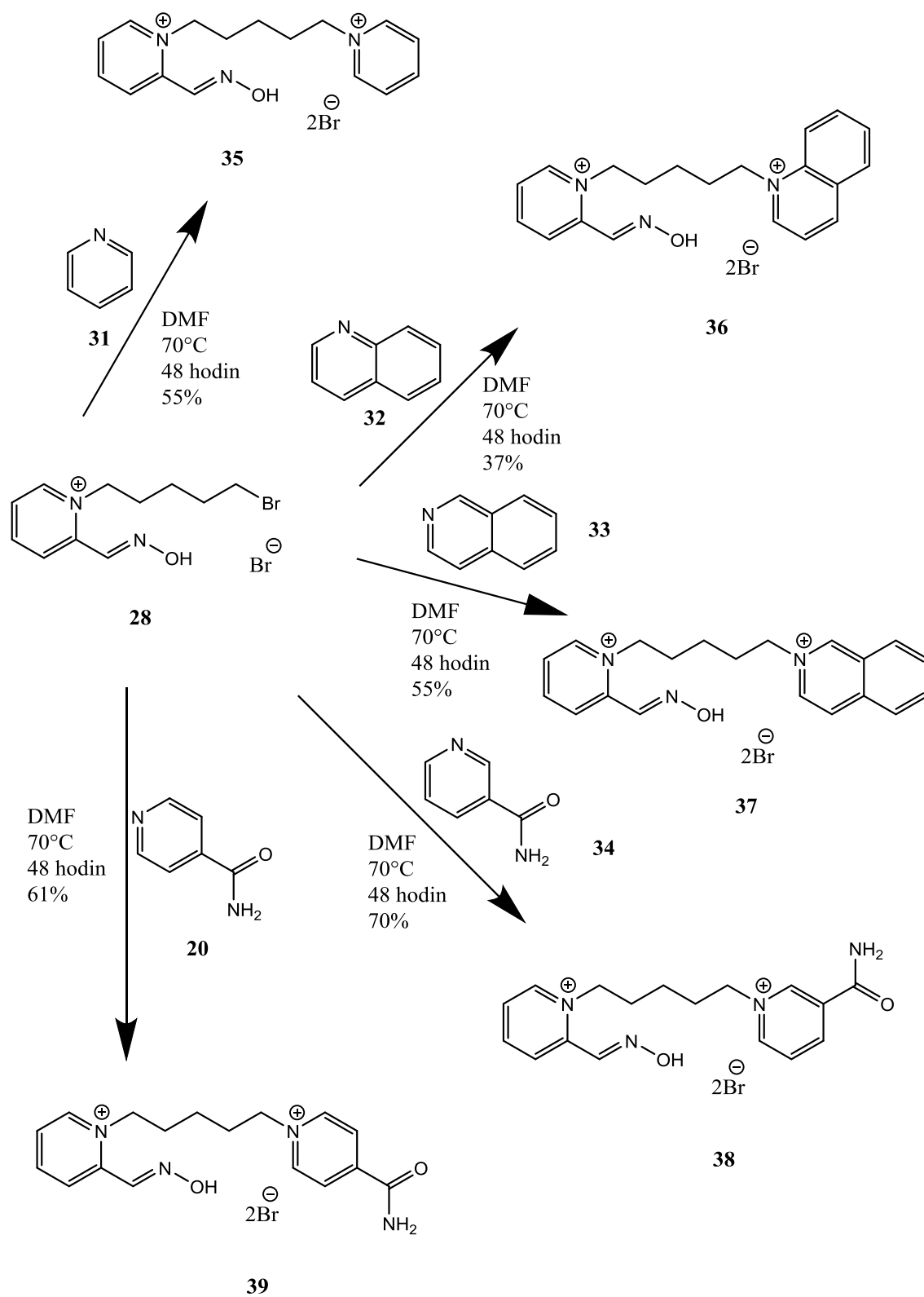


Schéma 11: Příprava biskvarterních amoniových solí s pětiuhlíkatým spojovacím řetězcem.

3.2.2 Příprava biskvarterních amoniových solí s šestiuhlíkatým spojovacím řetězcem

Sérii látek s šestiuhlíkatým spojovacím řetězcem jsme připravili dle Schématu 12. Výchozí látkou pro tyto syntézy byla sloučenina **30**. Mechanismem nukleofilní substituce S_N2 jsme na uhlíkatý řetězec výchozí látky **30** navázali dusíkaté heterocykly - isonikotinamid (**20**), pyridin (**31**), chinolin (**32**), isochinolin (**33**) a nikotinamid (**34**). Reakce opět probíhaly při 70°C v polárním aprotickém rozpouštědle DMF po dobu 48 hodin. I v tomto případě jsme se pokoušeli reakci uskutečnit v CH_3CN , ale opět bezúspěšně. Průběh reakcí jsme kontrolovali znovu TLC metodou. Výsledné produkty **40** - **44** jsme precipitovali z horkého acetonu a tím jsme odseparovali nezreagované monokvarterní soli a nečistoty. Získali jsme produkty s následujícími výtěžky - 2-((hydroxyimino)methyl)-1-(6-(pyridin-1-ium-1-yl)hexyl)pyridinium dibromid (**40**) (38%), 1-(6-(2-((hydroxyimino)methyl)pyridin-1-ium-1-yl)hexyl)chinolinium dibromid (**41**) (22%), 2-(6-(2-((hydroxyimino)methyl)pyridin-1-ium-1-yl)hexyl)isochinolin-2-ium dibromid (**42**) (62%), 1-(6-(3-karbamoylpyridin-1-ium-1-yl)hexyl)-2-((hydroxyimino)methyl)pyridinium dibromid (**43**) (29%) a 1-(6-(4-karbamoylpyridin-1-ium-1-yl)hexyl)-2-((hydroxyimino)methyl)pyridinium dibromid (**44**) (52%). Znovu jsme pozorovali nejnižší výtěžnost u stericky bráněného chinolinového derivátu **41**. Strukturu produktů jsme stanovili pomocí metod NMR a MS.

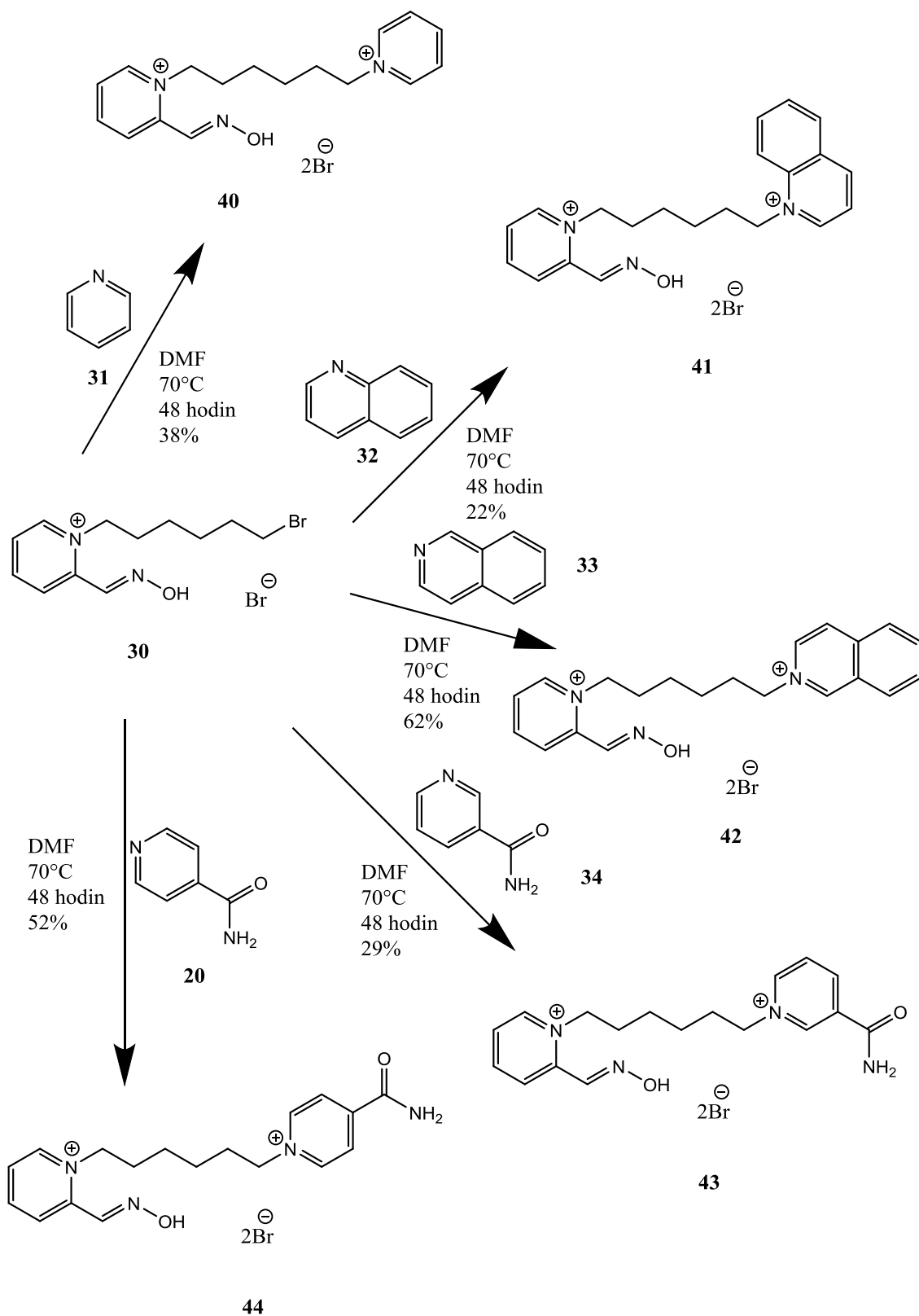


Schéma 12: Příprava biskvarterních amoniových solí s šestiuhlíkatým spojovacím řetězcem.

4 Experimentální část

Všechny chemikálie a rozpouštědla potřebné pro syntézu byly dodány firmou Sigma-Aldrich a VWR International (Česká republika). Průběh reakcí byl kontrolován pomocí tenkovrstevné chromatografie za použití TLC desek Merck Silica gel 60 F₂₅₄ (mobilní fáze: CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ 9/1/2%) a Cellulose F (mobilní fáze: BuOH/H₂O/CH₃COOH 5/2/1) získaných od firmy Merck (Německo). Detekce byla provedena UV lampou při vlnové délce 254 nm. Teploty tání byly stanoveny na bodotávku Büchi B-545 bez korekce.

¹H a ¹³C NMR spektra připravených sloučenin byly měřeny při laboratorní teplotě v deuterovaném dimethylsulfoxidu (DMSO- *d*₆) na FT NMR spektrometru Varian S500 (499,87 MHz pro ¹H a 125,71 MHz pro ¹³C). Chemické posuny (δ) protonů v ¹H NMR a uhlíků v ¹³C NMR spektrech jsou uváděny v jednotkách ppm. V ¹H NMR spektrech jsou uváděny vzhledem k centrálnímu píku DMSO-*d*₆ (δ = 2,50) a v ¹³C NMR spektrech vzhledem k centrálnímu píku DMSO-*d*₆ (δ = 39,43). Interakční konstanty (*J*) jsou uvedeny v Hz. Spinová multiplicita je vyjádřena jako s (singlet), d (dublet), t (triplet) nebo m (multiplet).

Hmotnostní spektra byla získána elektrosprejovou ionizací (ESI/MS) a selekcí iontu pomocí trojitého quadrupólu na přístroji Agilent 6470. Získaná spektra byla vyhodnocena prostřednictvím programu MassHunter Qualitative Analysis B.07.00 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA).

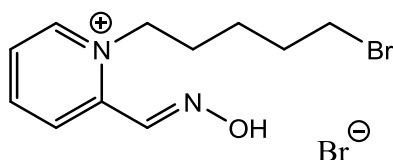
4.1 Postup přípravy monokvarterních amoniových solí obsahujících pyridin-2-aldoximovou složku

Při přípravě monokvarterní amoniové soli **28** byl nejdříve aldoxim **18** (5 g; 40,94 mmol) rozpuštěn ve 250 ml CH₃CN. Následně byl přidán dibromid **27** (22,2 ml; 163,76 mmol; 4 eq) a reakční směs byla zahřívána při 70°C po dobu 72 hodin. Po zreagování byl odpařen CH₃CN a přidán aceton. Ze směsi vykryštoval produkt **28**, který byl izolován filtrací za sníženého tlaku. Látka **28** však nebyla čistá, proto byla několikrát provedena rekrystalizace z acetonu při 65°C a následně byla směs zfiltrována.

Výchozí látkou pro přípravu monokvarterní amoniové soli **30** byl opět aldoxim **18** (5 g; 40,94 mmol), který byl rozpuštěn ve 40 ml acetonu. Následně byl přidán dibromid **29** (31,2 ml; 204,70 mmol; 5 eq) a směs byla zahřívána při 60°C po dobu 72 hodin. Po ukončení reakce byla směs zfiltrována. Produkt opět obsahoval nečistoty, proto byl rekrystalizován z několika rozpouštědel. Produkt **30** byl

nejprve rekrystalizován z acetonu (200 ml) při laboratorní teplotě. Po 1 hodině byla směs zfiltrována za sníženého tlaku a filtrát byl odpařen na vakuové odparce. Dalším rozpouštědlem, které bylo použito pro rekrystalizaci, byl Et₂O. Směs byla míchána při laboratorní teplotě po dobu 20 minut a poté zfiltrována za sníženého tlaku. Produkt **30** byl následně rekrystalizován při 70°C z EtOAc po dobu 40 minut. Nakonec byla látka **30** opět zfiltrována za sníženého tlaku a vysušena v exsikátoru.

1-(5-bromopentyl)-2-((hydroxyimino)methyl)pyridinium bromid, **28**.



Získaná sloučenina **28** byla izolována jako hnědá tuhá látka. C₁₁H₁₆Br₂N₂O. 352,07 g.mol⁻¹.

Výtěžnost: 0,564g (4%)

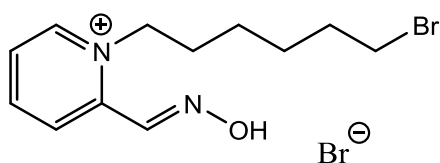
T_t = 148,3 – 150,3°C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,42-1,48 (m; 2H; CH₂), 1,80-1,87 (m; 4H; 2 x CH₂), 3,53 (t; J = 6,6 Hz; 2H; CH₂), 4,75-4,78 (m; 2H, CH₂), 8,12 (dd; J = 6,3; 7,7 Hz; 1H; ArH), 8,40 (d; J = 8,2 Hz; 1H; ArH), 8,56 (dd; J = 7,8; 8,2 Hz; 1H; ArH), 8,80 (s; 1H; CH), 9,11 (d; J = 6,3 Hz; 1H; ArH), 13,13 (s; 1H; OH) ppm.

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 24,4; 29,7; 31,8; 35,1; 57,9; 126,2; 127,8; 141,8; 145,5; 146,3; 147,1 ppm.

MS (ESI⁺): [M]⁺: vypočítaná hodnota pro C₁₁H₁₆BrN₂O⁺ (m/z): 271,0; experimentální hodnota: 271,2.

1-(6-bromohexyl)-2-((hydroxyimino)methyl)pyridinium bromid, **30**.



Sloučenina **30** byla získána jako zelená tuhá látka. C₁₂H₁₈Br₂N₂O. 366,10 g.mol⁻¹.

Výtěžnost: 0,401g (3%)

T_t = 114,5 – 116,3°C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,34-1,44 (m; 4H; 2 x CH₂), 1,75-1,83 (m; 4H; 2 x CH₂), 3,52 (t; J = 6,7 Hz; 2H; CH₂), 4,72-4,75 (m; 2H, CH₂), 8,09-8,12 (m; 1H; ArH), 8,39 (d; J = 8,2 Hz; 1H; ArH), 8,54-8,57 (m; 1H; ArH), 8,79 (s; 1H; CH), 9,10 (d; J = 5,4 Hz; 1H; ArH), 13,11 (s; 1H; OH) ppm.

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 24,4; 26,8; 30,1; 31,8; 34,9; 57,7; 125,8; 127,4; 141,4; 145,1; 145,9; 146,7 ppm.

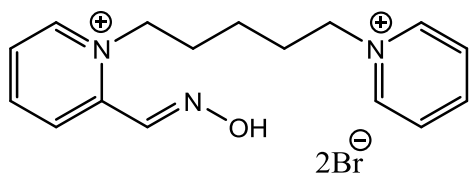
MS (ESI⁺): [M]⁺: vypočítaná hodnota pro C₁₂H₁₈BrN₂O⁺ (m/z): 285,1; experimentální hodnota: 285,3.

4.2 Postup přípravy biskvarterních amoniových solí obsahujících pyridin-2-aldoximovou složku

Pro přípravu biskvarterních amoniových solí **35** – **39** byla použita výchozí látka **28** (0,1 g; 0,284 mmol), která byla rozpuštěna ve 2 ml DMF a následně byl přidán příslušný heterocyklus **20** (0,07 g; 0,568 mmol; 2 eq), **31** (0,05 ml; 0,568 mmol; 2 eq), **32** (0,07 ml; 0,568 mmol; 2 eq), **33** (0,07 ml; 0,568 mmol; 2 eq), **34** (0,07 g; 0,568 mmol; 2 eq). Reakční směs byla zahřívána při 70°C po dobu 48 hodin. Po ukončení reakce byla směs ochlazena na laboratorní teplotu, bylo přidáno 16 ml acetonu. Směs byla zahřívána při 56°C po dobu 1 hodiny, následně byla za horka a sníženého tlaku zfiltrována. Produkty byly vysušeny v exsikátoru.

Při přípravě biskvarterních amoniových solí **40** – **44** byla použita výchozí látka **30** (0,1 g; 0,273 mmol), která byla rozpuštěna ve 2 ml DMF a následně byl přidán příslušný heterocyklus **20** (0,07 g; 0,546 mmol; 2 eq), **31** (0,05 ml; 0,546 mmol; 2 eq), **32** (0,07 ml; 0,546 mmol; 2 eq), **33** (0,07 ml; 0,546 mmol; 2 eq), **34** (0,07 g; 0,546 mmol; 2 eq). Reakční směs byla zahřívána 48 hodin při teplotě 70°C. Po zreagování byla směs ochlazena na laboratorní teplotu a bylo přidáno 16 ml acetonu. Následně byla směs zahřívána při 56°C. Po 1 hodině byla směs za horka a sníženého tlaku zfiltrována a izolované produkty byly nakonec vysušeny v exsikátoru.

2-((hydroxyimino)methyl)-1-(5-(pyridin-1-ium-1-yl)pentyl)pyridinium dibromid, **35**.



Produkt **35** byl izolován jako zelená tuhá látka. $C_{16}H_{21}Br_2N_3O$. 431,17 g.mol⁻¹.

Výtěžnost: 0,067g (55%)

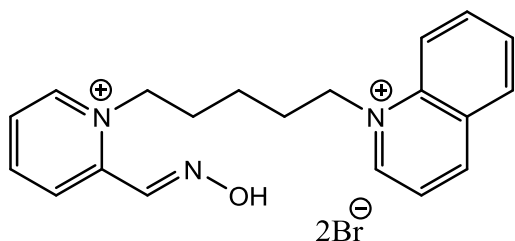
$T_f = 179,8 - 181,7^\circ C$

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,34-1,40 (m; 2H; CH₂), 1,83-1,89 (m; 2H; CH₂), 1,96-2,02 (m; 2H; CH₂), 4,66 (t; $J = 7,4$ Hz; 2H; CH₂) 4,76-4,79 (m; 2H; CH₂), 8,11-8,21 (m; 3H; 3 x ArH), 8,41 (d; $J = 8,1$ Hz; 1H; ArH), 8,56-8,65 (m; 2H; 2 x ArH), 8,79 (s; 1H; CH), 9,15-9,22 (m; 3H; 3 x ArH), 13,13 (s; 1H; OH) ppm.

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 21,8; 29,5; 29,9; 57,3; 60,1; 125,8; 127,4; 128,0; 141,3; 144,7; 145,1; 145,4; 145,9; 146,7 ppm.

MS (ESI⁺): [M]²⁺: vypočítaná hodnota pro $C_{16}H_{21}N_3O^{2+}$ (m/z): 135,6; experimentální hodnota: 135,5

1-(5-(2-((hydroxyimino)methyl)pyridin-1-ium-1-yl)pentyl)chinolinium dibromid, 36.



Produkt **36** byl získán jako zelená tuhá látka. $C_{20}H_{23}Br_2N_3O$. $481,23 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Výtěžnost: 0,076g (37%)

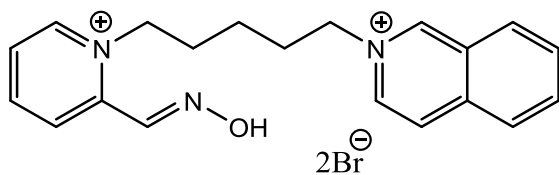
$T_f = 209,4 - 211,4^\circ\text{C}$

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 1,46-1,44 (m; 2H; CH_2), 1,86-1,92 (m; 2H; CH_2), 2,00-2,08 (m; 2H; CH_2), 4,75-4,78 (m; 2H; CH_2), 5,10 (t; $J = 7,0 \text{ Hz}$; 2H; CH_2), 8,05-8,13 (m; 2H; 2 x ArH), 8,21-8,30 (m; 2H; 2 x ArH), 8,41 (d; $J = 7,8 \text{ Hz}$; 1H; ArH), 8,52-8,65 (m; 3H; 3 x ArH), 8,78 (s; 1H; CH), 9,14 (d; $J = 5,7 \text{ Hz}$; 1H; ArH), 9,34 (d; $J = 8,1 \text{ Hz}$; 1H; ArH), 9,67 (d; $J = 5,2 \text{ Hz}$; 1H; ArH), 13,13 (s; 1H; OH) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 22,2; 28,7; 29,6; 56,8; 57,4; 118,9; 122,1; 125,7; 127,4; 129,6; 129,8; 130,7; 135,6; 137,3; 141,3; 145,1; 145,9; 146,7; 147,3; 149,6 ppm.

MS (ESI⁺): $[\text{M}]^{2+}$: vypočítaná hodnota pro $C_{20}H_{23}N_3O^{2+}$ (m/2z): 160,6; experimentální hodnota: 160,4.

2-(5-(2-((hydroxyimino)methyl)pyridin-1-ium-1-yl)pentyl)isochinolin-2-ium dibromid, 37.



Sloučenina **37** byla izolována jako hnědá tuhá látka. $C_{20}H_{23}Br_2N_3O$. $481,23 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Výtěžnost: 0,075g (55%)

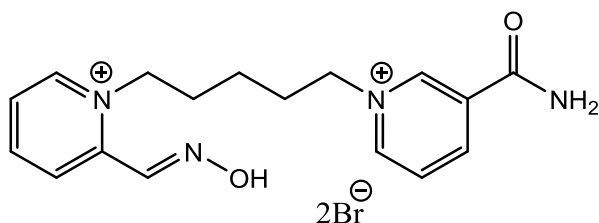
$T_f = 187,2 - 189,2^\circ\text{C}$

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 1,39-1,45 (m; 2H; CH_2), 1,86-1,92 (m; 2H; CH_2), 2,06-2,13 (m; 2H; CH_2), 4,75-4,79 (m; 4H; 2 x CH_2), 8,08-8,13 (m; 2H; 2 x ArH), 8,26-8,29 (m; 1H; ArH), 8,37-8,41 (m; 2H; 2 x ArH), 8,51-8,58 (m; 2H; 2 x ArH), 8,64 (d; $J = 6,7 \text{ Hz}$; 1H; ArH), 8,79 (s; 1H; CH), 8,87 (d; $J = 6,7 \text{ Hz}$; 1H; ArH), 9,17 (d; $J = 6,0 \text{ Hz}$; 1H; ArH), 10,26 (s; 1H; ArH), 13,13 (s; 1H; OH) ppm.

$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 21,9; 29,5; 29,6; 57,3; 60,1; 125,7; 127,1; 127,2; 127,4; 130,3; 131,1; 134,9; 136,7; 136,8; 141,3; 145,1; 145,9; 146,7; 149,9 ppm.

MS (ESI⁺): $[\text{M}]^{2+}$: vypočítaná hodnota pro $C_{20}H_{23}N_3O^{2+}$ (m/2z): 160,6; experimentální hodnota: 160,5.

1-(5-(3-karbamoylpyridin-1-ium-1-yl)pentyl)-2-((hydroxyimino)methyl)pyridinium dibromid, 38.



Sloučenina **38** byla izolována jako zelená tuhá látka. $C_{17}H_{22}Br_2N_4O_2$. 474,20 g.mol⁻¹.

Výtěžnost: 0,095g (70%)

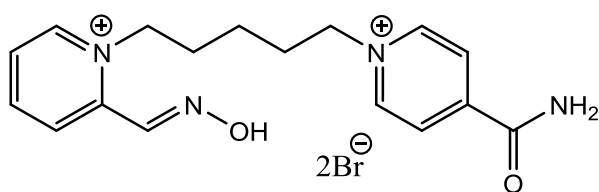
$T_t = 227,8 - 229,6^\circ C$

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,37-1,43 (m; 2H; CH₂), 1,84-1,90 (m; 2H; CH₂), 2,00-2,06 (m; 2H; CH₂), 4,70 (t; $J = 7,4$ Hz; 2H, CH₂), 4,78 (t; $J = 7,5$ Hz; 2H; CH₂), 8,11-8,14 (m; 1H; ArH), 8,18 (br s; 1H; NH₂), 8,28-8,31 (m; 1H; ArH), 8,41 (d; $J = 8,1$ Hz; 1H; ArH), 8,56-8,59 (m; 1H; ArH), 8,64 (br s; 1H; NH₂), 8,80 (s; 1H; CH), 8,98 (d; $J = 8,1$ Hz; 1H; ArH), 9,18 (d; $J = 6,0$ Hz; 1H; ArH), 9,31 (d; $J = 6,0$ Hz; 1H; ArH), 9,61 (s; 1H; ArH), 13,12 (s; 1H; OH) ppm.

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 21,8; 29,5; 29,8; 57,3; 60,5; 125,8; 127,4; 127,8; 133,7; 141,3; 143,4; 144,7; 145,1; 145,9; 146,3; 146,7; 162,7 ppm.

MS (ESI⁺): [M]²⁺: vypočítaná hodnota pro $C_{17}H_{22}N_4O_2^{2+}$ (m/2z): 157,1; experimentální hodnota: 157.1.

1-(5-(4-karbamoylpyridin-1-ium-1-yl)pentyl)-2-((hydroxyimino)methyl)pyridinium dibromid, 39.



Oxim **39** byl izolován jako zelená tuhá látka. $C_{17}H_{22}Br_2N_4O_2$. 474,20 g.mol⁻¹.

Výtěžnost: 0,082g (61%)

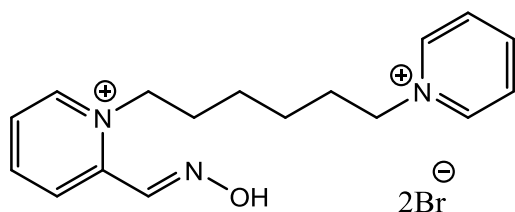
$T_t = 187,5 - 189,5^\circ C$

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,37-1,41 (m; 2H; CH₂), 1,84-1,89 (m; 2H; CH₂), 1,98-2,03 (m; 2H; CH₂), 4,70 (t; $J = 7,2$ Hz; 2H, CH₂), 4,76-4,79 (m; 2H; CH₂), 8,11-8,14 (m; 1H; ArH), 8,28 (br s; 1H; NH₂), 8,41 (d; $J = 8,0$ Hz; 1H; ArH), 8,48 (d; $J = 6,3$ Hz; 2H; 2 x ArH), 8,56-8,59 (m; 1H; ArH), 8,73 (br s; 1H; NH₂), 8,79 (s; 1H; CH), 9,18 (d; $J = 6,0$ Hz; 1H; ArH), 9,34 (d; $J = 6,4$ Hz; 2H; 2 x ArH), 13,13 (s; 1H; OH) ppm.

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 21,7; 29,5; 29,8; 57,3; 60,2; 125,8; 127,4; 141,3; 145,1; 145,7; 145,9; 146,7; 148,0; 163,2 ppm.

MS (ESI⁺): [M]²⁺: vypočítaná hodnota pro $C_{17}H_{22}N_4O_2^{2+}$ (m/2z): 157,1; experimentální hodnota: 156.9.

2-((hydroxyimino)methyl)-1-(6-(pyridin-1-ium-1-yl)hexyl)pyridinium dibromid, 40.



Produkt **40** byl získán jako žlutá tuhá látka.

$C_{17}H_{23}Br_2N_3O$. 445,20 g.mol⁻¹.

Výtěžnost: 0,046g (38%)

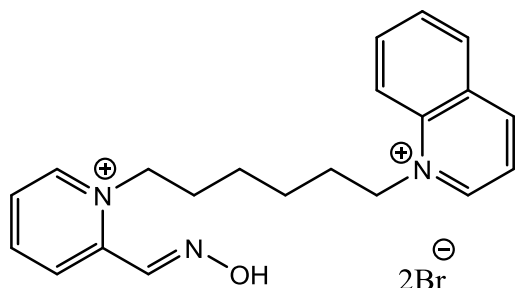
$T_f = 179,3 - 181,3^\circ C$

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,30-1,41 (m; 4H; 2 x CH₂), 1,77-1,82 (m; 2H; CH₂), 1,89-1,95 (m; 2H; CH₂), 4,64 (t; $J = 7,4$ Hz; 2H; CH₂) 4,76 (t; $J = 7,6$ Hz; 2H, CH₂), 8,10-8,19 (m; 3H; 3 x ArH), 8,40 (d; $J = 7,7$ Hz; 1H; ArH), 8,55-8,64 (m; 2H; 2 x ArH), 8,80 (s; 1H; CH), 9,15-9,18 (m; 3H; 3 x ArH), 13,12 (s; 1H; OH) ppm.

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 24,6; 24,7; 29,9; 30,3; 57,6; 60,4; 125,8; 127,4; 128,0; 141,4; 144,7; 145,1; 145,4; 145,9; 146,7 ppm.

MS (ESI⁺): [M]²⁺: vypočítaná hodnota pro $C_{17}H_{23}N_3O^{2+}$ (m/z): 142,6; experimentální hodnota: 142,4.

1-(6-(2-((hydroxyimino)methyl)pyridin-1-ium-1-yl)hexyl)chinolinium dibromid, 41.



Sloučenina **41** byla izolována jako žlutá tuhá látka. $C_{21}H_{25}Br_2N_3O$. 495,26 g.mol⁻¹.

Výtěžnost: 0,030g (22%)

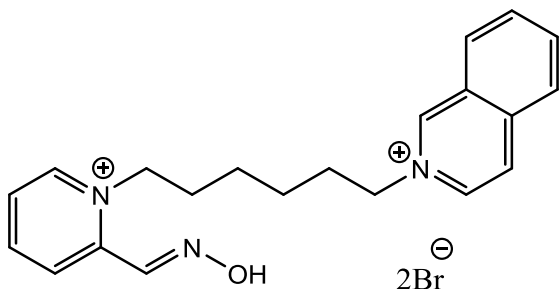
$T_f = 184,3 - 186,3^\circ C$

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,37-1,48 (m; 4H; 2 x CH₂), 1,76-1,82 (m; 2H; CH₂), 1,94-1,99 (m; 2H; CH₂), 4,76 (t; $J = 7,5$ Hz; 2H, CH₂), 5,09 (t; $J = 7,5$ Hz; 2H; CH₂), 8,04-8,12 (m; 2H; 2 x ArH), 8,20 (dd; $J = 5,9; 8,2$ Hz; 1H; ArH), 8,27-8,30 (m; 1H; ArH), 8,39 (d; $J = 7,5$ Hz; 1H; ArH), 8,51-8,57 (m; 2H; 2 x ArH), 8,65 (d; $J = 8,9$ Hz; 1H; ArH), 8,79 (s; 1H; CH), 9,13 (d; $J = 5,8$ Hz; 1H; ArH), 9,32 (d; $J = 8,3$ Hz; 1H; ArH), 9,65 (d; $J = 5,5$ Hz; 1H; ArH), 13,12 (s; 1H; OH) ppm.

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 24,7; 25,0; 29,1; 30,0; 57,0; 57,6; 118,9; 122,1; 125,8; 127,4; 129,6; 129,8; 130,7; 135,6; 137,3; 141,4; 145,1; 145,9; 146,7; 147,3; 149,5 ppm.

MS (ESI⁺): [M]²⁺: vypočítaná hodnota pro $C_{21}H_{25}N_3O^{2+}$ (m/z): 167,6; experimentální hodnota: 167,6.

2-(6-(2-((hydroxyimino)methyl)pyridin-1-ium-1-yl)hexyl)isochinolin-2-ium dibromid, 42.



Připravená sloučenina **42** byla izolována jako žlutá tuhá látka. $C_{21}H_{25}Br_2N_3O$. 495,26 g.mol⁻¹.

Výtěžnost: 0,085g (62%)

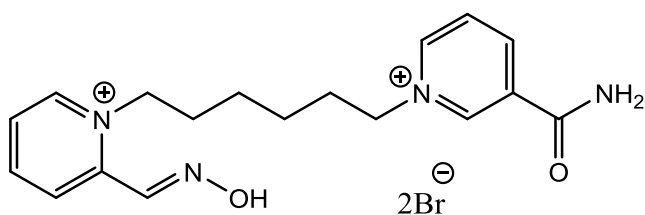
$T_t = 178,7 - 180,6^\circ C$

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,35-1,48 (m; 4H; 2 x CH₂), 1,78-1,84 (m; 2H; CH₂), 2,00-2,06 (m; 2H; CH₂), 4,74-4,79 (m; 4H, 2 x CH₂), 8,06-8,12 (m; 2H; 2 x ArH), 8,25-8,28 (m; 1H; ArH), 8,36-8,40 (m; 2H; 2 x ArH), 8,50-8,57 (m; 2H; 2 x ArH), 8,62 (d; $J = 6,7$ Hz; 1H; ArH), 8,80 (s; 1H; CH), 8,87 (d; $J = 6,6$ Hz; 1H; ArH), 9,16 (d; $J = 6,0$ Hz; 1H; ArH), 10,25 (s; 1H; ArH), 13,12 (s; 1H; OH) ppm.

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 24,6; 24,8; 30,0; 30,1; 57,6; 60,4; 125,7; 125,8; 127,1; 127,2; 127,4; 130,2; 131,1; 134,8; 136,7; 136,8; 141,4; 145,1; 145,9; 146,7; 149,9 ppm.

MS (ESI⁺): [M]²⁺: vypočítaná hodnota pro $C_{21}H_{25}N_3O^{2+}$ (m/z): 167,6; experimentální hodnota: 167,5.

1-(6-(3-karbamoylpyridin-1-ium-1-yl)hexyl)-2-((hydroxyimino)methyl)pyridinium dibromid, 43.



Sloučenina **43** byla získána jako žlutá tuhá látka. $C_{18}H_{24}Br_2N_4O_2$. 488,22 g.mol⁻¹.

Výtěžnost: 0,039g (29%)

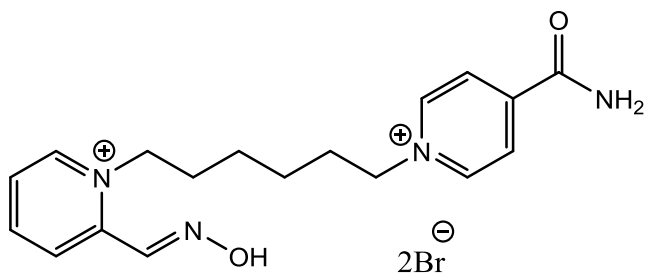
$T_t = 138,1 - 140,1^\circ C$

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,32-1,40 (m; 4H; 2 x CH₂), 1,78-1,83 (m; 2H; CH₂), 1,93-1,99 (m; 2H; CH₂), 4,69 (t; $J = 7,4$ Hz; 2H, CH₂), 4,76 (t; $J = 7,5$ Hz; 2H; CH₂), 8,10-8,13 (m; 1H; ArH), 8,17 (br s; 1H; NH₂), 8,26-8,29 (m; 1H; ArH), 8,40 (d; $J = 8,0$ Hz; 1H; ArH), 8,55-8,58 (m; 1H; ArH), 8,61 (br s; 1H; NH₂), 8,80 (s; 1H; CH), 8,96 (d; $J = 8,0$ Hz; 1H; ArH), 9,15 (d; $J = 6,1$ Hz; 1H; ArH), 9,29 (d; $J = 5,9$ Hz; 1H; ArH), 9,59 (s; 1H; ArH), 13,12 (s; 1H; OH) ppm.

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 24,6; 24,7; 30,0; 30,2; 57,6; 60,8; 125,8; 127,4; 127,7; 133,7; 141,4; 143,3; 144,6; 145,1; 145,9; 146,3; 146,7; 162,7 ppm.

MS (ESI⁺): [M]²⁺: vypočítaná hodnota pro C₁₈H₂₄N₄O₂²⁺ (m/z): 164,1; experimentální hodnota: 164.0.

1-(6-(4-karbamoylpyridin-1-ium-1-yl)hexyl)-2-((hydroxyimino)methyl)pyridinium dibromid, 44.



Produkt **44** byl izolován jako žlutá tuhá látka. C₁₈H₂₄Br₂N₄O₂. 488,22 g.mol⁻¹.

Výtěžnost: 0,070g (52%)

T_t= 185,6 – 187,6°C

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1,30-1,41 (m; 4H; 2 x CH₂), 1,77-1,83 (m; 2H; CH₂), 1,90-1,96 (m; 2H; CH₂), 4,68 (t; *J* = 7,4 Hz; 2H, CH₂), 4,77 (t; *J* = 7,6 Hz; 2H; CH₂), 8,10-8,13 (m; 1H; ArH), 8,28 (br s; 1H; NH₂), 8,40 (d; *J* = 7,6 Hz; 1H; ArH), 8,46 (d; *J* = 6,5 Hz; 2H; 2 x ArH), 8,55-8,58 (m; 1H; ArH), 8,71 (br s; 1H; NH₂), 8,80 (s; 1H; CH), 9,16 (d; *J* = 6,1 Hz; 1H; ArH), 9,33 (d; *J* = 6,6 Hz; 2H; 2 x ArH), 13,12 (s; 1H; OH) ppm.

¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆): δ 24,6; 24,7; 29,9; 30,2; 57,6; 60,5; 125,7; 125,8; 127,4; 141,4; 145,1; 145,6; 145,9; 146,7; 148,0; 163,2 ppm.

MS (ESI⁺): [M]²⁺: vypočítaná hodnota pro C₁₈H₂₄N₄O₂²⁺ (m/z): 164,1; experimentální hodnota: 163.9.

5 Závěr

V této bakalářské práci jsem shrnula obecné poznatky o ACh, AChE a její inhibici i reaktivaci. Popsala jsem dosud používané oximové reaktivátory AChE a v praktické části jsem syntetizovala nové potenciální reaktivátory AChE (**35** – **44**).

Cíle práce byly splněny. Připravila jsem dvě monokvarterní amoniové soli **28** a **30** jako výchozí látky pro zbylé produkty. Dále jsem úspěšně syntetizovala dvě série výsledných produktů **35** - **44**, které se liší délkou spojovacího řetězce a typem navázaného heterocyklu. Všechny výsledné potenciální reaktivátory AChE byly připraveny v požadované čistotě.

Připravené struktury byly stanoveny metodou NMR, MS a byla taktéž změřena jejich teplota tání. Dalším krokem ve vývoji reaktivátorů AChE připravených v této práci bude testování jejich biologické aktivity. Je potřeba zjistit, zda připravené produkty mají dostatečné vlastnosti k tomu, aby se mohly v budoucnu stát potenciálními reaktivátory.

6 Použitá literatura

[1] MUSÍLEK K.; KORÁBEČNÝ J.; JUN D.; KASSA J.; KUČA K. Novel cholinesterase reactivators. *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*. **2015**, s. 1071-1087.

[2] JURCZYK, Pavel. *Studium změny reaktivační účinnosti a možnosti prostupu přes hematoencefalickou bariéru po zavedení fluoru do struktury oximového reaktivátoru acetylcholinesterasy*. Hradec Králové, 2010. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze. Fakulta farmaceutická.

[3] NEKLAPILOVÁ, Vlasta. *Sarin a jeho teroristické zneužití*, 5. 2. 2015 [online]. Úrazová nemocnice v Brně [cit. 3. 2. 2017]. Dostupné z: <http://www.unbr.cz/Data/files/Konf%20MEKA%202015/16%20Abstrakt%20Ne klapilová.pdf>

[4] PADDOCK C. R., SANG-HUN CH. *Use of Nerve Agent in Kim Jong-nam Killing Is Condemned by Malaysia*, 2. 3. 2017 [online]. The New York Times [cit. 7. 4. 2017]. Dostupné z: https://www.nytimes.com/2017/03/02/world/asia/kim-jong-nam-malaysia.html?rref=collection%2Fsectioncollection%2Fasia&action=click&contentCollection=asia®ion=stream&module=stream_unit&version=latest&contentPlacement=7&pgtype=sectionfront&r=1

[5] SHARMA R., GUPTA B., SINGH N., ACHARYA J. R., MUSÍLEK K., KUČA K., GHOSH K. K. Development and Structural Modifications of Cholinesterase Reactivators against Chemical Warfare Agents in Last Decade: A Review. *Medicinal Chemistry*. **2015**, s. 58 – 72.

[6] MUSÍLEK K., HOLAS O., HOROVÁ A., POHANKA M., ŽDÁROVÁ-KARASOVÁ J., JUN D., KUČA K. Progress in Antidotes (Acetylcholinesterase Reactivators) Against Organophosphorus Pesticides. **2011**, s. 341 – 358.

[7] DOLEŽAL R., KORÁBEČNÝ J., MALIŇÁK D., HONEGR J., MUSÍLEK K., KUČA K. Ligand-based 3D QSAR analysis of reactivation potency of mono- and bis-pyridinium aldoximes toward VX-inhibited rat acetylcholinesterase. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. **2015**, s. 113 – 129

[8] BAJGAR J. Nervově paralytické látky. In Patočka et al.: *Vojenská toxikologie*. Grada: Praha, **2005**, s. 30-44. ISBN 80-247-0608-3.

[9] SILBERNAGL S.; DESPOPULOS A. Atlas fyziologie člověka. Grada: Praha, **2004**, s. 50-90. ISBN 80-247-0630-X.

[10] LINHART L. Látky ovlivňující přenos nervových vzruchů a mechanismy jejich působení. In Toxikologie Interakce škodlivých látek s živými organismy, jejich mechanismy, projevy a důsledky. *VŠCHT: Praha*, **2012**, s. 294-307. ISBN 978-80-7080-806-1.

[11] KUČERA I., MACHOLÁN L., BARTHOVÁ J. Enzymologie. *Brno: Masarykova univerzita*, **1994**. ISBN 80-210-1039-8.

[12] MUSÍLEK K., KUČERA J., JUN D., DOHNAL V., OPLETALOVÁ V., KUČA K. Monoquaternary pyridinium salts with modified side chain—synthesis and evaluation on model of tabun- and paraoxon-inhibited acetylcholinesterase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **2008**, s. 8218 – 8223.

[13] KUČA K., MUSÍLEK K., PAAR M., JUN D., STODŮLKA P., HRABINOVÁ M., MARAK J. Targeted Synthesis of 1-(4-Hydroxyiminomethylpyridinium)-3-pyridiniumpropane Dibromide – A New Nerve Agent Reactivator. *Molecules*. **2007**, s. 1974-1972.

[14] WILSON I.B., GINBURG B. A powerful reactivator of alkylphosphate-inhibited acetylcholinesterase. *Biochim. Biophys. Acta*. **1955**, s. 168-170.

[15] HAGEDORN I., GUNDEL W. H., SHOENE K. Reactivation of phosphorylated acetylcholine esterase with oximes: contribution to the study of the reaction course. *Arzneimittelforschung*. **1969**, s. 603-606. ISSN 0004-4172.

[16] YANG Y. G., YOON J., SEONG CH., PARK N., JUNG Y. Synthesis of Bis-pyridinium Oxime Antidotes Using Bis(methylsulfonylmethyl) Ether for Organophosphate Nerve Agents. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2003**, s. 1368-1370.

[17] AMPAC FINE CHEMICALS LLC, US. Process for halomethyl ether of hydroxyiminomethyl quaternary pyridinium salts. HUANG D., GETTYS G., DAPREMONT O., MALIK A. CA 2553578 A1 2008/01/26. **2008**.

[18] EYER P., HAGEDORN I., KLIMMEK R., LIPPSTREU P., LOFFLER M., OLDIGES H., SPOHRER U., STEIDL I., SZINICZ L., WOREK F. HLö 7 dimethanesulfonate, a potent bispyridinium-dioxime against anticholinesterases. *Archives of toxicology*. **1992**, s. 603-621.

[19] LÖFFLER M. *Quartäre Salze von Pyridin-2,4-dialdoxim als Gegenmittel für Organophosphat-Vergiftungen*. Freiburg, 1986. Dissertation. University of Freiburg.