

# **Syntéza nových derivátů chinazolinu s indolovým uskupením v molekule**

Bc. Sylvie Jurečková

---

Diplomová práce  
2016



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav chemie

akademický rok: 2015/2016

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Sylvie Jurečková**

Osobní číslo: **T14496**

Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**

Studijní obor: **Chemie potravin a bioaktivních látek**

Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Syntéza nových derivátů chinazolinu s indolovým uskupením v molekule**

Zásady pro vypracování:

### I. Teoretická část

1. Provedte literární rešerši zaměřenou na zkoumané sloučeniny, jejich výskyt v přírodě, syntézu a biologickou aktivitu.

### II. Praktická část

1. Připravte potřebné deriváty 2-(indol-2-karboxamido)benzoových kyselin.
2. Tyto sloučeniny se pokuste převést na odpovídající deriváty chinazolin-4-onu.
3. Pokud to bude možné, provedte testy připravených sloučenin na růst některých mikroorganismů.
4. Vypracujte komentář a vyhodnocení dosažených výsledků.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] Kafka, S.; Proisl, K.; Kašpárková, V.; Urankar, D.; Kimmel, R.; Košmrlj, J. *Tetrahedron* 2013, 69, 10826–10835.

[2] Proisl, K.; Kafka, S.; Urankar, D.; Gazvoda, M.; Kimmel, R.; Košmrlj, J. *Org. Biomol. Chem.* 2014, 12, 9650–9664.

[3] Články v časopisech a případně patenty vyhledané pomocí databází Reaxys a SciFinder.

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Stanislav Kafka, CSc.**

Ústav chemie

Datum zadání diplomové práce: **15. ledna 2016**

Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2016**

Ve Zlíně dne 15. ledna 2016

doc. Ing. František Buňka, Ph.D.  
*děkan*



doc. Ing. Stanislav Kafka, CSc.  
*ředitel ústavu*

Příjmení a jméno: JUREČKOVÁ SYLVIE


Obor: CHPBL

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby <sup>1)</sup>;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 <sup>2)</sup>;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považuji se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 16.5.2016



<sup>1)</sup> zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

<sup>2)</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

<sup>3)</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpirá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihledne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

## **ABSTRAKT**

Vzrůstající rezistence bakterií vůči konvenčním antibiotikům je závažným problémem, který ukazuje, že i téměř devadesát let po Flemingově objevu penicilinu má smysl hledat nové antibakteriální sloučeniny. V literární části práce shrnuje poznatky o derivátech kyseliny anthranilové, které se vyskytují v přírodě a zabývá se také biologicky aktivními syntetickými deriváty se zaměřením na protimikrobní účinky. Dále popisuje syntézy zmíněných sloučenin a poskytuje stručný úvod k derivátům chinazolonu, které jsou ze zkoumaných sloučenin teoreticky dostupné. V praktické části je popsána příprava série derivátů kyseliny anthranilové s indolovým uskupením v molekule, u kterých byla následně zkoumána protimikrobní aktivita a některé z nich byly také převedeny na nové deriváty chinazolonu. U připravených sloučenin byla zjištěna výrazná antibakteriální aktivita, která je v diplomové práci podrobněji popsána.

Klíčová slova: kyselina anthranilová, antibakteriální aktivita, 2-aminobenzamid, chinazolon, organická syntéza

## **ABSTRACT**

Increasing drug resistance has become a serious issue showing that even almost ninety years since Fleming's discovery of penicillin it is worthwhile to investigate new antibacterial compounds. In a literature review this work summarizes knowledge of naturally occurring anthranilic acid derivatives and also deals with synthetic antibacterial compounds. Work also describes the synthesis of mentioned compounds and provides a brief introduction to quinazolone derivatives, which are theoretically available from investigated compounds. In practical part of work, synthesis of a series of novel anthranilic acid derivatives is described. Bioassays of potential antimicrobial activity of isolated compounds were also conducted. Significant antibacterial activity of selected compounds is discussed.

Keywords: anthranilic acid, antibacterial activity, 2-aminobenzamide, quinazolone, organic synthesis

V první řadě bych ráda poděkovala vedoucímu mé práce, doc. Ing. Stanislavu Kafkovi, CSc., za vedení mé práce, za podnětné připomínky, úsilí a čas, který mi věnoval.

Srdečné poděkování patří Ing. Karlu Proislovi, který dal této práci myšlenku a směr. Mnohokrát mu děkuji za rady při sepisování práce a praktické rady v laboratoři a za nesmírnou podporu.

Velký dík náleží panu doc. RNDr. Janu Růžičkovi, PhD., který mi umožnil provést velké množství mikrobiologických experimentů v laboratořích ÚIOŽP a zároveň se ochotně a trpělivě podílel na plánování, realizaci i interpretaci výsledků jednotlivých testů.

Děkuji také prof. Dr. Janezi Košmrljovi a Damijaně Urankar z Univerzity v Ljublaně za měření spekter NMR. Za provedení elementárních analýz a měření EIMS spekter děkuji paní Ing. Lence Trhlíkové.

Ráda bych poděkovala Ing. Filipu Křemenovi a všem kolegům z laboratoří ÚCh a ÚIOŽP, kteří mi vždy ochotně poradili a vytvářeli příjemné pracovní prostředí.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

# OBSAH

ÚVOD.....	10
<b>I LITERÁRNÍ ČÁST .....</b>	<b>11</b>
<b>1 SOUČASNÝ STAV ZKOUMANÉ PROBLEMATIKY .....</b>	<b>12</b>
1.1 PŘÍRODNÍ 2-AMINOBEZOOVÉ KYSELINY A JEJICH ESTERY .....	12
1.2 PŘÍRODNÍ 2-AMINOBEZAMIDY.....	17
1.3 VÝZNAMNÉ SYNTETICKÉ DERIVÁTY KYSELINY ANTHRANILOVÉ .....	19
1.4 SYNTETICKÉ DERIVÁTY KYSELINY 2-AMINOBEZOOVÉ A JEJICH ANTIMIKROBIÁLNÍ ÚČINKY .....	20
1.5 SYNTETICKÉ 2-AMINOBEZAMIDY A JEJICH ANTIMIKROBIÁLNÍ ÚČINKY.....	22
1.6 VÝZNAMNÉ CHINAZOLIN-4-ONY .....	23
1.7 SYNTÉZA DERIVÁTŮ KYSELINY ANTHRANILOVÉ.....	25
<b>2 DISKUSE .....</b>	<b>31</b>
2.1 DISKUSE CHEMICKÝCH EXPERIMENTŮ.....	31
2.2 DISKUSE MIKROBIOLOGICKÝCH TESTŮ .....	41
<b>II EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....</b>	<b>51</b>
<b>3 CHEMICKÉ EXPERIMENTY .....</b>	<b>52</b>
3.1 3-BUTYL-4-HYDROXYCHINOLIN-2(1 <i>H</i> )-ONY (1) .....	52
3.2 3-BUTYL-3-HYDROXYCHINOLIN-2,4(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> )-DIONY (2).....	54
3.3 2-[(2-OXOHEXANOYL)AMINO]BEZOOVÉ KYSELINY (3).....	55
3.4 2-PENTANOYL-4 <i>H</i> -BENZO[ <i>D</i> ][1,3]OXAZIN-4-ON (4).....	56
3.5 PŘÍPRAVA 2-[(2-OXOALKANOYL)AMINO]BEZAMIDŮ (5) .....	56
3.6 FISCHEROVA INDOLOVÁ REAKCE 2-[(2-OXOALKANOYL)AMINO]BEZAMIDŮ 5 .....	59
3.7 FISCHEROVA INDOLOVÁ REAKCE 2-[(2- OXOHEXANOYL)AMINO]BEZOOVÝCH KYSELIN 3 V KYSELINĚ PROPIONOVÉ .....	61
3.8 REAKCE INDOLYLBENZOXAZINONŮ 9 S AMINY .....	66
3.9 DEHYDRATAČE AMIDŮ 10 .....	79
<b>4 MIKROBIOLOGICKÉ EXPERIMENTY .....</b>	<b>83</b>
4.1 MATERIÁL .....	83
4.1.1 Roztoky a živná média .....	83
4.1.2 Použité kultury mikroorganismů.....	84
4.1.3 Příkladové vybavení.....	84
4.2 METODIKA .....	84
4.2.1 Orientační testy citlivosti mikroorganismů na vybrané látky .....	85
4.2.2 Test citlivosti bakterií a kvasinek na látku 10i v mikrotitrační destičce .....	86
4.2.3 Stanovení MIC látky 10i vůči vláknitým mikroskopickým houbám .....	88
4.2.4 Test citlivosti G+ bakterií na látku 10i v mikrotitrační destičce .....	89
4.2.5 Test citlivosti bakterií a kvasinek na látku 10l v mikrotitrační destičce .....	90
4.2.6 Stanovení MIC látky 10l vůči <i>Aspergillus niger</i> CCM 8155.....	91
4.2.7 Test citlivosti bakterií a kvasinek na látku 10l a 10m v mikrotitrační destičce .....	93
4.2.8 Test citlivosti bakterií a kvasinek na 8 sloučenin mikrotitrační destičce.....	95
<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>97</b>



<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>	<b>98</b>
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>100</b>
<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>101</b>
<b>SEZNAM PŘÍLOH.....</b>	<b>103</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>109</b>

## ÚVOD

V mé diplomové práci jsem zkoumala syntézu nových derivátů kyseliny anthranilové s indolovým uskupením v molekule. Navázala jsem tak na výzkum, který na Ústavu chemie FT UTB ve Zlíně již několik let probíhá. Některé z připravených amidů kyseliny anthranilové jsem také úspěšně převedla na deriváty chinazolonu. Ústředními sloučeninami mé diplomové práce jsou amidy anthranilových kyselin, u kterých jsem také hlouběji zkoumala jejich antibakteriální aktivitu.

## I. LITERÁRNÍ ČÁST

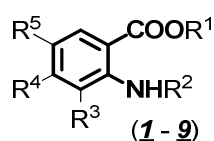
# 1 SOUČASNÝ STAV ZKOUMANÉ PROBLEMATIKY

V literární části jsem se pokusila shrnout poznatky o přírodních derivátech kyseliny anthranilové a také o derivátech syntetických, které vykazují antibakteriální účinky. Dále jsem se snažila stručně přiblížit tematiku chinazonů a přiblížit možnosti syntézy diskutovaných sloučenin.

## 1.1 Přírodní 2-aminobenzoové kyseliny a jejich estery

Kyselina anthranilová je aromatická  $\beta$ -aminokyselina, která je produkována četnými mikroorganismy<sup>1,2,3</sup> a byla izolována také z vyšších rostlin – např. z borytu barvířského<sup>4</sup> (*Isatis tinctoria*). Methylestery kyseliny anthranilové a *N*-methylantranilové jsou součástí vonných silic pomeranče, bergamotu<sup>5</sup> a mandarinky<sup>6</sup>. V odborné literatuře byla popsána celá řada jednoduchých derivátů kyseliny anthranilové, které byly izolovány z přírody (

*Tabulka 1*) a vykazují různorodé účinky na živé organismy. Ternantranin (**1**) v nedávno uskutečněných experimentech na myších<sup>7</sup> tlumil bolest účinněji než morfin, kyselina *N*-methylantranilová (**2**) se váže na některé proteiny teplotního šoku<sup>8</sup> a metabolit *L*-kynureninu **3** vykazuje pestré biologické účinky<sup>9-11</sup>. Jeho využití jako imunomodulátoru je patentováno<sup>12</sup>. Sloučenina **4** inhibuje<sup>13</sup> tyrosinkinasu, využití dimethoxyderivátu **5** je patentováno<sup>14</sup> při léčbě cukrovky, ester **6** působí mírně antibakteriálně<sup>15</sup> a kyselina **7** inhibuje<sup>16</sup> enzymy glykogen fosforylasu a  $\alpha$ -glukosidasu. Některé bakterie produkují také málo rozšířené chlorderiváty **8** a **9**.

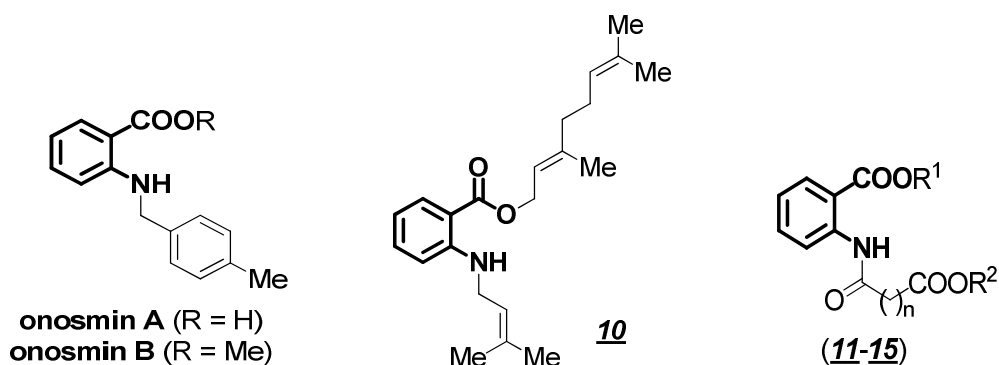


*Tabulka 1.* Deriváty anthranilových kyselin **1** – **9** a přírodní zdroje, ze kterých byly izolovány.

<b>1 - 9</b>	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	R <sup>5</sup>	Izolace z přírody
<b>1</b>	<i>i</i> -Pr	Me	H	H	H	<i>Choisya ternata</i> (mexický keř) <sup>17</sup>
<b>2</b>	H	Me	H	H	H	<i>Streptomyces</i> sp. (bakterie) <sup>18</sup> <i>Zanthoxylum integrifolium</i> (strom) <sup>19</sup>
<b>3</b>	H	H	OH	H	H	<i>Rhizopus oligosporus</i> (plíseň) <sup>20</sup> tempeh (potravina) <sup>20</sup> <i>Klebsiella pneumoniae</i> (bakterie) <sup>21</sup>
<b>4</b>	H	H	H	OH	OH	<i>Botrytis</i> sp. (plíseň) <sup>13</sup>

<u>5</u>	H	H	H	MeO	MeO	<i>Euxylophora paraensis</i> (brazilský strom) <sup>22</sup>
<u>6</u>	Me	H	OH	MeO	H	<i>Micrococcus</i> sp. (bakterie) <sup>15</sup>
<u>7</u>	H	H	OH	OH	MeO	<i>Cyclocarya paliurus</i> (lapina trnovcovitá) <sup>16</sup>
<u>8</u>	H	H	Cl	H	H	<i>Pseudomonas aureofaciens</i> (bakterie) <sup>23</sup>
<u>9</u>	Me	H	H	Cl	H	<i>Streptomyces griseus</i> (bakterie) <sup>24</sup>

Z některých vyšších rostlin byly izolovány anthranilové kyseliny nesoucí na dusíkovém atomu delší alifatický řetězec<sup>25-27</sup>, v plísních byly nalezeny<sup>28</sup> anthranilové kyseliny nesoucí na dusíkovém atomu cukerný zbytek. Z ruměnice *Onosma hispidum*<sup>29</sup> byly získány inhibitory lipooxygenasy – onosminy A a B. Ester 10 byl izolován<sup>30</sup> z americké routovité rostliny *Esenbeckia yaaxhokob* a vykazuje mírnou antibakteriální aktivitu (Příloha I).

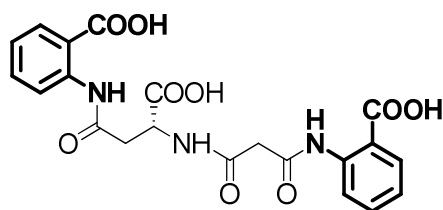


Struktury 11 – 15 (Tabulka 2) jsou příkladem sloučenin obsahujících v molekule zbytek dikarboxylové kyseliny. Ester 12 inhibuje<sup>31</sup> chymotrypsin a vykazuje antibakteriální účinky (Příloha I).

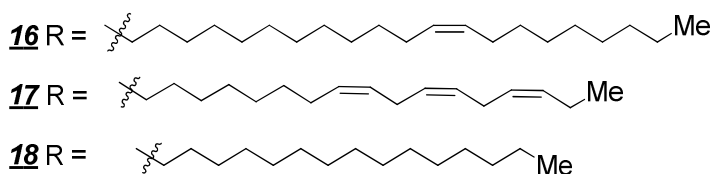
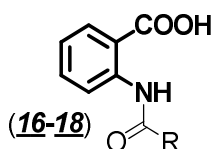
Tabulka 2. Sloučeniny 11 – 15 a přírodní zdroje, ze kterých byly izolovány.

<u>11 - 15</u>	n	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	Izolace z přírody
<u>11</u>	1	H	H	<i>Arachis hypogaea</i> (podzemnice olejná) <sup>32</sup>
<u>12</u>	2	Me	Me	<i>Aconitum leave</i> (oměj) <sup>33</sup> <i>Jolyna laminarioides</i> (chaluha) <sup>31</sup>
<u>13</u>	2	Me	H	<i>Aconitum leave</i> (oměj) <sup>33</sup>
<u>14</u>	2	H	Me	<i>Aconitum leave</i> (oměj) <sup>33</sup>
<u>15</u>	2	Et	Et	<i>Aconitum septentrionale</i> (oměj) <sup>34</sup>

Z mechorostu *Metzgeria rufula* byl izolován<sup>35</sup> rufulamid, který v molekule obsahuje dvě jednotky kyseliny anthranilové a svou strukturou připomíná oligopeptid.

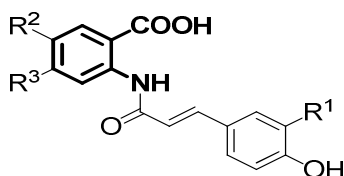


rufulamid



Jednoduché *N*-acylanthranilové kyseliny se v přírodě vyskytují poměrně hojně<sup>36,37</sup>, zajímavé jsou kyseliny, obsahující na dusíkovém atomu 2-aminobenzoového systému zbytek mastné kyseliny. Sloučenina **16** obsahuje zbytek kyseliny erukové a byla izolována spolu se svým methylesterem<sup>38</sup> z jehlice lepkavé (*Ononis viscosa*), analog nesoucí zbytek kyseliny  $\alpha$ -linolenové **17** a palmitoylderivát **18** byly nalezeny<sup>39</sup> ve dřevě a listech australského stromu *Geijera parviflora*. Sloučenina **18** vykazovala<sup>39</sup> výrazné antibakteriální účinky vůči některým bakteriím rodu *Staphylococcus* (Příloha 1).

Anthranilové kyseliny nesoucí zbytek kyseliny skořicové představují důležitou skupinu biologicky aktivních látek ovsu setého<sup>40</sup>, byly však nalezeny i v jiných rostlinách (Tabulka 3). Tyto sloučeniny jsou souhrnně označovány jako avenanthramidy. Obsah avenanthramidů v ovsu vzrůstá v důsledku nepříznivých podmínek, při poranění či v důsledku nákazy patogenními houbami, tohoto jevu lze<sup>41</sup> využít i k cílené produkci avenanthramidů.

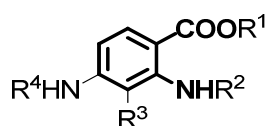


Tabulka 3. Přehled avenanthramidů **A – E** a sloučenin **19 – 21**.

	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	Izolace z přírody
Avenanthramid A	H	OH	H	<i>Avena sativa</i> (oves setý) <sup>40</sup>
Avenanthramid B	MeO	H	OH	<i>Avena sativa</i> (oves setý) <sup>40</sup>
Avenanthramid C	OH	OH	H	<i>Avena sativa</i> (oves setý) <sup>40</sup>
Avenanthramid D	H	H	H	<i>Avena sativa</i> (oves setý) <sup>40</sup> <i>Hygroryza aristata</i> (hygroryza osinatá) <sup>42</sup> <i>Dianthus caryophyllus</i> (hvozdík karafiát) <sup>43</sup>
Avenanthramid E	MeO	H	H	<i>Avena sativa</i> (oves setý) <sup>40</sup>
<b>19</b>	MeO	OH	OH	<i>Avena sativa</i> (oves setý) <sup>40</sup>
<b>20</b>	OH	OH	OH	<i>Avena sativa</i> (oves setý) <sup>40</sup>
<b>21</b>	H	OH	OH	<i>Avena sativa</i> (oves setý) <sup>40</sup>

Avenanthramidy jsou strukturně blízké syntetickému léčivu tranilast (str. 17). Mimořádná antioxidační a antimutagenní aktivita avenanthramidů byla dobře prozkoumána<sup>44,45</sup>, jsou známy i jejich protizánětlivé účinky. Studie z roku 2007 prokázala<sup>46</sup> dostupnost avenanthramidů po perorálním podání u zdravých dobrovolníků a také jejich zdravotní přínos při zvýšené fyzické zátěži. Po požití ovesných výrobků se avenanthramidy akumulují<sup>47</sup> v játrech a v srdeční a kosterní svalovině. Avenanthramid C inhibuje<sup>48</sup> proliferaci cévních buněk hladkého svalstva, což je jeden z předpokládaných mechanismů rozvoje aterosklerózy. Recentně byly popsány<sup>49</sup> dimerní sloučeniny odvozené od avenanthramidu B, označované jako bisavenanthramidy. Existují i názory, že některé avenanthramidy mohou být izolačními artefakty<sup>50</sup>.

Za přírodní sloučeniny lze považovat i některé deriváty kyseliny 2,4-diaminobenzoové. Kyselina **22** a karotamin byly izolovány<sup>51</sup> z mrkve obecné (*Daucus carrota* L.). Damascenin byl izolován<sup>52</sup> z černuchy damašské (*Nigella damascena*).

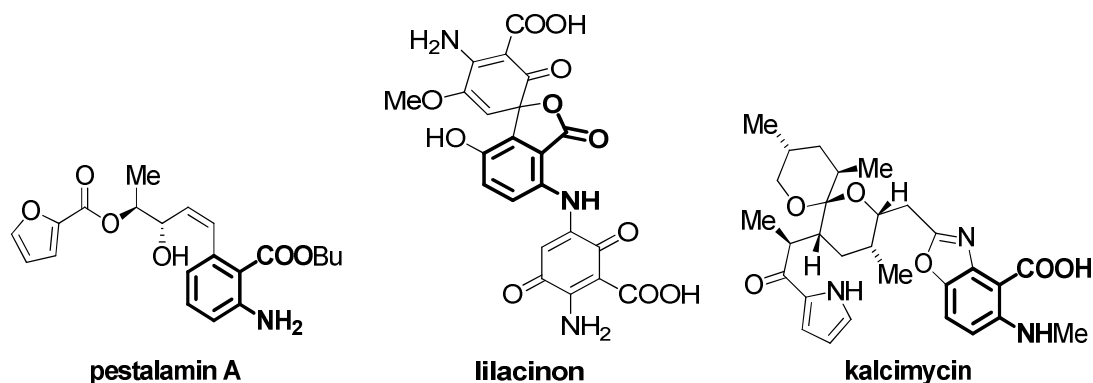


**22** (R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> = H)

**karotamin** (R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> = H, R<sup>4</sup> = 4-aminobenzoyl)

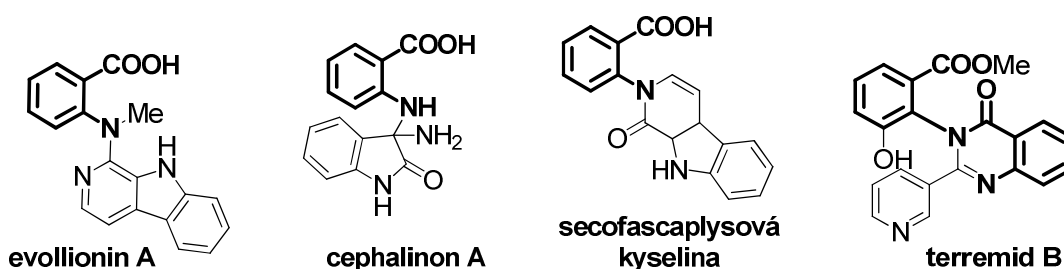
**damascenin** (R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> = Me, R<sup>3</sup> = OH, R<sup>4</sup> = Me)

Další skupinou přírodních derivátů kyseliny anthranilové jsou sloučeniny, které mají na aromatickém jádře připojené složitější heterocyklické uskupení. Cytotoxický alkaloid pestalamin A byl izolován<sup>53</sup> z askomycety *Pestaliopsis vaccinii*.



Pigmenty některých jedlých ryzců jsou odvozeny<sup>54</sup> od kyseliny anthranilové, z ryzce lilákového (*Lactarius lilacinus*) byl například izolován červený pigment lilacinon, v jehož struktuře lze nalézt celkem tři podjednotky kyseliny anthranilové. Strukturní podjednotku kyseliny anthranilové lze nalézt i v molekule ionoforového antibiotika<sup>55</sup> (Příloha 1) kalcimycinu produkovaného bakteriemi rodu *Streptomyces*. Vzhledem ke schopnosti zvyšovat koncentraci vápenatých iontů ve většině buněk vykazuje kalcimycin pestrou škálu biologických účinků a je i značně toxický (LD<sub>50</sub> u myši je<sup>55</sup> 10 mg.kg<sup>-1</sup>). V buňkách uvolňuje arachidonovou kyselinu<sup>56,57</sup>, výrazně ovlivňuje hladké svalstvo cév<sup>58</sup> a vyvolává také agreagaci krevních destiček<sup>59</sup>. Kalcimycin je hojně využíván<sup>56,57,59</sup> v biochemickém výzkumu.

Některé přírodní anthranilové kyseliny mají na dusíkovém atomu aromatického kruhu navázán heterocyklický zbytek. Příkladem sloučenin s takovou strukturou je evollionin A nalezený<sup>60</sup> v plodech ampáku routoplodého (*Tetradium ruticarpum*) a cephalinon A, který byl izolován<sup>61</sup> z orchideje *Cephalantheropsis gracilis*.

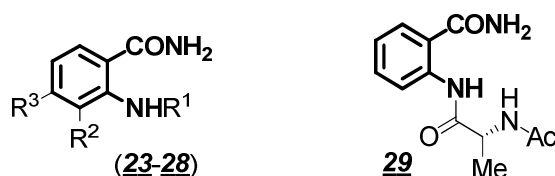


Poslední skupinou přírodních anthranilových kyselin jsou sloučeniny, u nichž je dusíkový atom na aromatickém jádře součástí heterocyklického systému. Některé z nich byly izolovány z mořských houbců<sup>62,63</sup>, příkladem takové sloučeniny je secofascaplysová kyselina. Z řady podobných přírodních sloučenin bych ráda zmínila terreimid B, který byl izolován<sup>64</sup> z plísně *Aspergillus terreus* a vykazuje antibakteriální účinky (Příloha 1).



## 1.2 Přírodní 2-aminobenzamidy

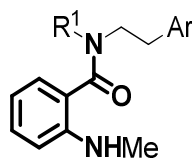
Jednoduché 2-aminobenzamidy **23** – **28** jsou produkovány některými mikroorganismy (Tabulka 4). 2-Aminobenzamid **23** mírně inhibuje růst bakterií<sup>65</sup> a sloučenina **25** je účinným inhibitorem<sup>66</sup> kapsasy-3, což je důležitý enzym podílející se na programované buněčné smrti. Acetamid **27** vykazuje<sup>67</sup> výrazné inhibiční účinky na růst některých fytopatogenních plísní a podobná sloučenina **28** zasahuje<sup>68</sup> do metabolismu auxinů u rostlin. Z mořských plísní rodu *Penicillium* byl izolován<sup>69</sup> dipeptid **29** u něhož byly neúspěšně hledány případné antibakteriální účinky (Příloha 1).



Tabulka 4. Přírodní 2-aminobenzamidy **23** – **28** a mikroorganismy, které je produkuje.

<b>23 - 28</b>	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	Produkující mikroorganismus
<b>23</b>	H	H	H	<i>Streptomyces</i> sp. (bakterie) <sup>66</sup>
<b>24</b>	H	H	Cl	<i>Streptomyces griseus</i> (bakterie) <sup>24</sup>
<b>25</b>	H	OH	H	<i>Streptomyces</i> sp. (bakterie) <sup>66</sup>
<b>26</b>	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CHCO	OH	H	<i>Streptomyces</i> sp. (bakterie) <sup>66</sup>
<b>27</b>	Ac	H	H	<i>Streptomyces aurantiogriseus</i> (bakterie) <sup>67</sup>
<b>28</b>	CH <sub>3</sub> COCO	H	H	<i>Penicillium</i> sp. (plíseň) <sup>68,70</sup>

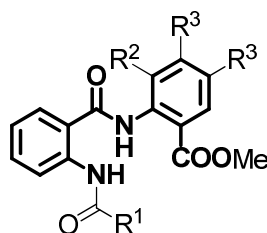
Málo probádanou skupinu přírodních 2-aminobenzamidů představují 2-aminobenzamidy (Tabulka 5) odvozené od biogenních aminů. Glykoamidy, methoxydoisuthin a sloučenina **30** obsahující strukturální jednotku fenethylaminu se vyskytují<sup>71,72</sup> v asijských keřích rodu *Glycosmis*, tryptaminová analoga evodiamid a sloučenina **31** byly nalezeny<sup>73</sup> v plodech ampáku.



Tabulka 5. Přírodní 2-aminobenzamidy odvozené od biogenních aminů.

	R <sup>1</sup>	Ar	Izolace z přírody
glykoamid A	H	Ph	<i>Glycosmis cochinchinensis</i> <sup>71</sup>
glykoamid B	H	4-methoxyfenyl	<i>Glycosmis cochinchinensis</i> <sup>71</sup>
methoxydoisuthin	Me	4-methoxyfenyl	<i>Glycosmis ovoidea</i> <sup>72</sup>
evodiamid	Me	indol-3-yl	<i>Tetradium ruticarpum</i> <sup>73</sup>
<u>30</u>	Me	Ph	<i>Glycosmis ovoidea</i> <sup>72</sup>
<u>31</u>	H	indol-3-yl	<i>Tetradium ruticarpum</i> <sup>73</sup>

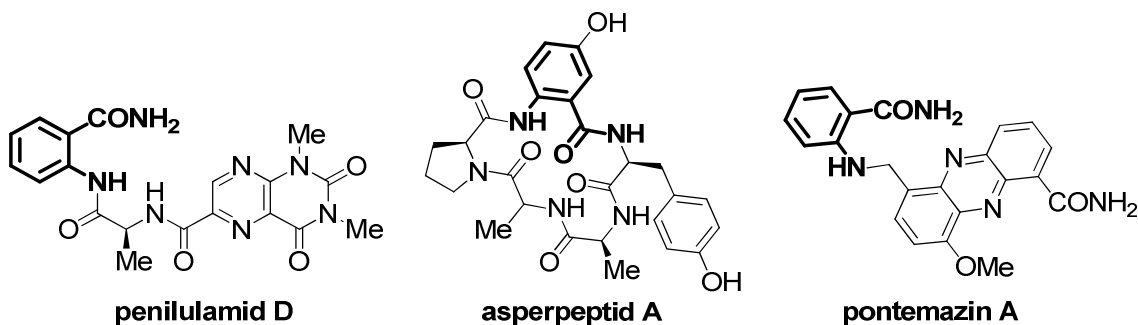
V přírodě se vyskytují také sloučeniny<sup>37,64,74</sup> které lze považovat za substituované dipeptidy složené ze dvou jednotek kyseliny anthranilové (Tabulka 6). Terremid A a podobná sloučenina 33 obsahují ve své struktuře zbytek kyseliny nikotinové a vykazují<sup>64,75</sup> antibakteriální účinky (Příloha 1). Sloučenina 33 rovněž inhibuje<sup>76</sup> růst buněk lymfomu u myši a vyvolává<sup>77</sup> u nich kontrakce hladkého svalstva.



Tabulka 6. Přírodní 2-aminobenzamidy obsahující dvě podjednotky kyseliny anthranilové.

	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	Izolace z přírody
vaginatunin A	Me <sub>2</sub> (OH)C	H	H	<i>Aconitum vaginatum</i> (oměj) <sup>37</sup>
vaginatunin B	EtMe(OH)C	H	H	<i>Aconitum vaginatum</i> (oměj) <sup>37</sup>
terremid A	pyridin-3-yl	OH	H	<i>Aspergillus terreus</i> (plíseň) <sup>64</sup>
<u>32</u>	Me	H	H	<i>Aconitum pseudo-leave</i> (oměj) <sup>74</sup>
<u>33</u>	pyridin-3-yl	MeO	MeO	<i>Aspergillus</i> sp. (plíseň) <sup>75</sup>

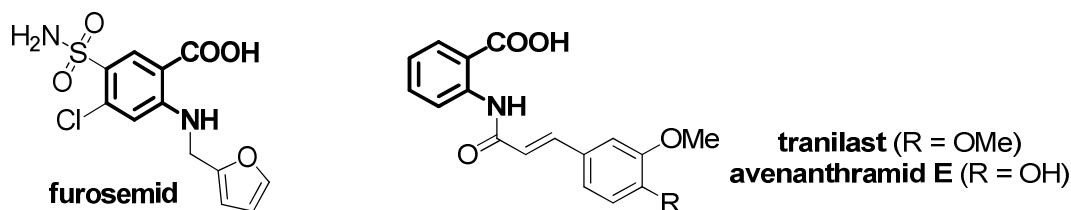
Zajímavé 2-aminobenzamidy byly izolovány<sup>78</sup> z kultivačního média mořských plísní rodu *Aspergillus*, které byly získány z vnitřních dutin koloniálních žahavců *Muricella abnormalis*. Penilulamid D je strukturně příbuzný dipeptidu 29 (str. 15), místo acetylového uskupení však ve své struktuře obsahuje objemný heterocyklický acyl.



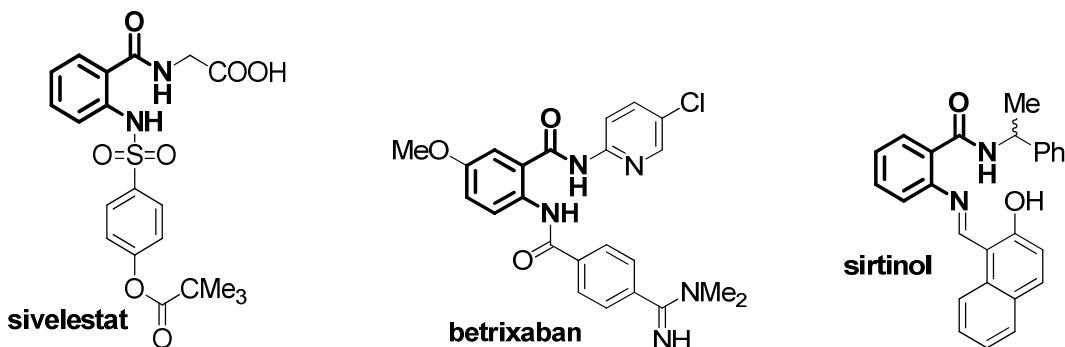
Ze stejné plísně byl izolován<sup>78</sup> cyklický pentapeptid asperpeptid A, který vykazuje výrazné antibakteriální účinky (Příloha 1). Z bakterií rodu *Streptomyces* byl izolován<sup>79</sup> fenazinový derivát pontemazin A, vykazující v testech *in vitro* neuroprotektivní efekt. Dipeptidy kyseliny anthranilové tvoří někdy také estery s forbolem, které jsou známy jako rostlinné toxiny a karcinogeny, takové sloučeniny byly izolovány např. z latexu sukulentních prýsčů *Euphorbia leuconeura*<sup>80</sup>.

### 1.3 Významné syntetické deriváty kyseliny anthranilové

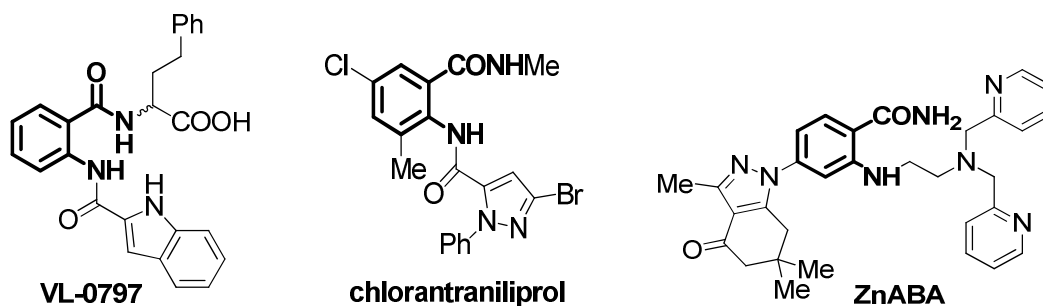
Některé *N*-arylanthranilové kyseliny (fenamáty) jsou nesteroidními analgetiky a antiflogistiky<sup>81</sup>. Významným léčivem je diuretikum furosemid, který je indikován pro řadu chorobných stavů.



V Japonsku a v Jižní Koreji je od roku 1982 používáno antialergikum<sup>82</sup> tranilast, který je strukturně velmi blízký přírodním avenanthramidům (str. 15) a avenanthramid E je i jedním z jeho metabolitů. 2-Aminobenzamidy vykazují pestrou biologickou aktivitu. Sivelestat<sup>83</sup> inhibuje lidskou neutrofilní elastasu a je indikován při léčbě respiračního selhání, v ČR však jako léčivo registrován není. Některé tyto sloučeniny inhibují faktor krevní srážlivosti Xa a představují nadějná perorálně účinná antikoagulantia, betrixaban<sup>84</sup> prošel již několika klinickými testy. Podobné sloučeniny obsahující zbytek kyseliny thiofen-2-karboxylové jsou v současnosti<sup>85</sup> intenzivně zkoumány. Mezi 2-aminobenzamidy patří experimentální inhibitory<sup>86</sup> P-glykoproteinu, potenciálně využitelné ke snížení rezistence rakovinných buněk vůči cytostatikům či sirtinol, který inhibuje enzym histondeacetylasy a vykazuje cytotoxické účinky<sup>87</sup>.



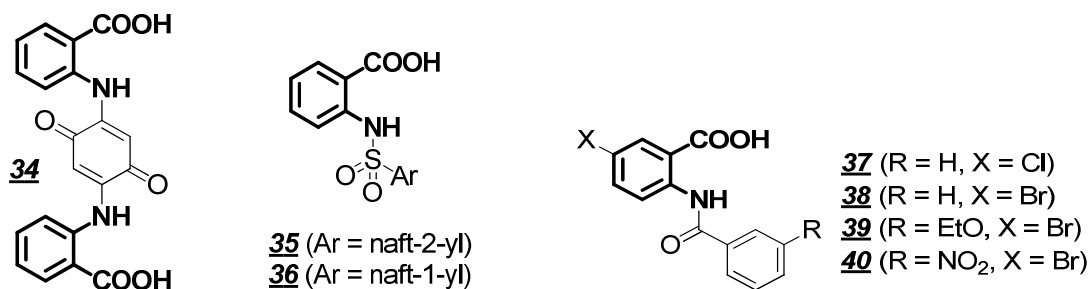
Některé deriváty 2-aminobenzamidů účinně inhibují replikaci neurotopních alfavirů<sup>88</sup>, jiné působí<sup>89</sup> proti viru *Herpes simplex*. Sloučenina VL-0797 je selektivní inhibitor<sup>90</sup> receptorů pro cholecystokinin CCK<sub>1</sub> a mohla by nalézt uplatnění při léčbě žaludečního vředu či chronické a akutní pankreatitidy.



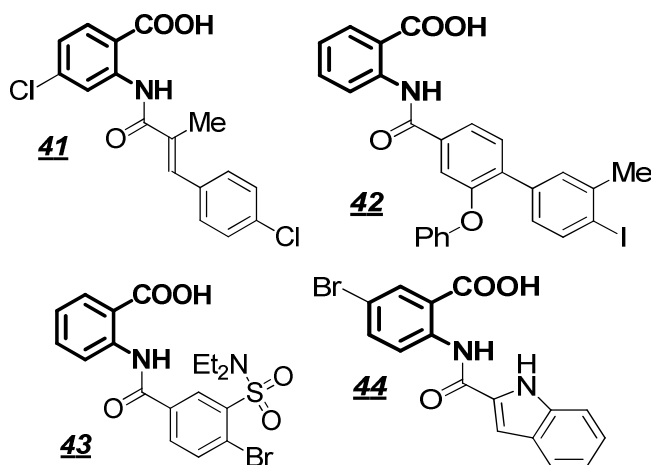
Kromě potenciálních medicijních aplikací mohou nalézat amidy kyseliny anthranilové i technické uplatnění, chlorantraniliprol je používán jako insekticid<sup>91</sup> v zemědělství, sloučenina označovaná jako ZnABA je příkladem<sup>92</sup> fluorescenční sondy.

#### 1.4 Syntetické deriváty kyseliny 2-aminobenzoové a jejich antimikrobiální účinky

Chinon **34** obsahující dvě jednotky kyseliny anthranilové inhibuje<sup>93</sup> bakteriální enzym NAD syntas, sulfonamidy **35** a **36** inhibují<sup>94</sup> bakteriální penicilin vázající proteiny. V mikrobiologických testech však pouze sloučenina **35** vykazovala<sup>94</sup> mírné antibakteriální účinky (*Příloha 2*). Z mnoha jednoduchých derivátů kyseliny anthranilové byla antibakteriální aktivita pozorována u některých iminů<sup>95-97</sup> odvozených od kyseliny anthranilové a u některých<sup>98,99</sup> *N*-arylanthranilových kyselin (*Příloha 2*).



Největší skupinou syntetických anthranilových kyselin, které vykazují antimikrobiální aktivitu jsou *N*-acylanthranilové kyseliny. Benzoylderiváty **37** – **39** inhibují<sup>100</sup> penicilin vázající proteiny a působí antibakteriálně, nitroderivát **40** vykazuje<sup>101</sup> protizánětlivé a mírné bakteriostatické účinky (Příloha 2). Recentně se mezi *N*-acylanthranilovými kyselinami začíná utvářet skupina inhibitorů enzymu KAS III (EC 2.3.1.180). Tento enzym je nezbytný pro biosyntézu mastných kyselin u rostlin a u bakterií a v současnosti je intenzivně studován jako potenciální molekulární cíl pro vývoj nových antibakteriálních léčiv. Sloučenina **41** byla vyvinuta jako účinný inhibitor<sup>102</sup> enzymu KAS III a lze si u ní povšimnout strukturní podobnosti s přírodními avenanthramidy (str. 15). Příkladem dalších nedávno popsaných inhibitorů<sup>103,104</sup> enzymu KAS III jsou sloučeniny **42** a **43**. V mikrobiologických experimentech bylo zjištěno<sup>102,103</sup>, že sloučeniny **41** a **42** inhibují bakteriální transkripci a vykazují výrazné antibakteriální účinky (Příloha 3). Využití těchto inhibitorů enzymu KAS III na bázi anthranilových kyselin je zatím omezeno<sup>103</sup>, protože dosud známé sloučeniny se silně vážou na sérový albumin.



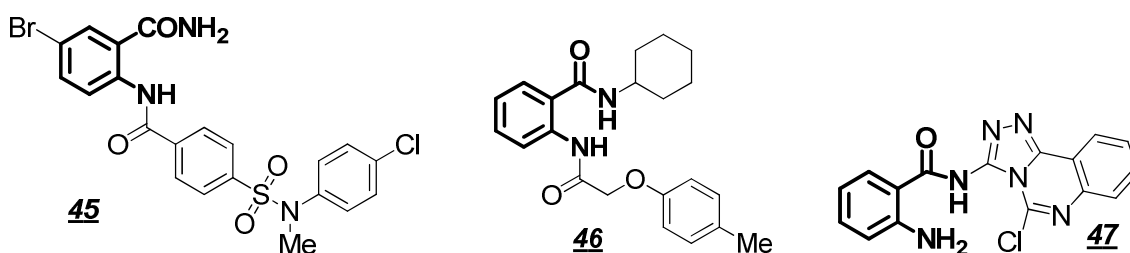
U sloučeniny **43** byla objevena<sup>104</sup> schopnost inhibovat blízce příbuzný homologní enzym PqsD, který zajišťuje biosyntézu signálních molekul *quorum sensingu* u bakterie *Pseudomonas aeruginosa*. Tyto signální molekuly pseudomonád ovlivňují virulenci či tvorbu biofilmu a regulují transkripci. Vývoj inhibitorů enzymů PqsD budí v odborných

kruzích zájem, protože tento enzym je rovněž novým molekulárním cílem pro vývoj sloučenin využitelných v boji proti bakteriálním infekcím.

Byla popsána řada dalších antibakteriálně působících *N*-acylanthranilových kyselin (Příloha 4), provedené mikrobiologické experimenty se však omezovaly<sup>100,105</sup> pouze na inhibiční účinky vůči bakterii *Staphylococcus aureus*. Tato aktivita byla pozorována u anthranilových kyselin nesoucích na dusíkovém atomu aromatický či heteroaromatický acyl, téměř nejvýraznější schopnost inhibovat růst bakterie *Staphylococcus aureus* byla pozorována u indolového derivátu **44** (Příloha 4).

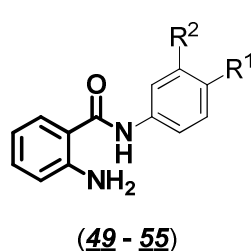
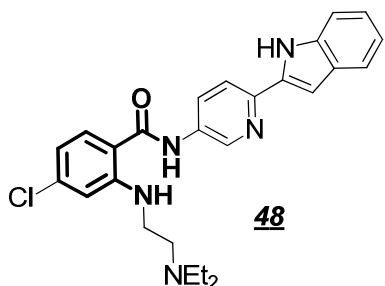
### 1.5 Syntetické 2-aminobenzamidy a jejich antimikrobiální účinky

Jak bylo zmíněno výše, některé anthranilové kyseliny inhibují bakteriální enzym FAS III a představují novou skupinu inhibitorů bakteriální transkripce. Není proto zvláštní, že se některé výzkumné skupiny snažily<sup>106</sup> připravit také obdobné 2-aminobenzamidy. Převedením karboxylové funkce na amidové uskupení však sloučeniny inhibiční aktivitu ztratily<sup>106</sup>. Příkladem takové inaktivní sloučeniny je amid **45**.



Antibakteriální účinky byly zjištěny u některých jednoduchých 2-aminobenzamidů<sup>107,108</sup> a především u hydrazidů kyseliny anthranilové<sup>109-113</sup>, většinou však byly posuzovány pouze agarovou difuzní metodou. Sloučenina **46** inhibuje<sup>114</sup> enzym uridyltransferasa izolovaný z plísně *Xanthomonas oryzae*, v mikrobiologických testech však nevykazovala antifungální účinky. Aminobenzamid **47**, obsahující ve své struktuře složitější heterocyklický systém vykazoval<sup>115</sup> inhibiční účinky na růst bakterií (Příloha 3). Některé 2-aminobenzamidy obsahují strukturální motivy již známých antibakteriálních sloučenin, v odborné literatuře byly nalezeny sulfonamidy<sup>116</sup>, které narušují syntézu peptidoglykanu, antibakteriálně působící thiazolidy<sup>117</sup> a semisyntetický penicilin, který však působil<sup>118</sup> pouze na bakterie rodu *Bacillus*.

Pro své výrazné protimikrobní účinky bylo patentováno<sup>119</sup> několik 2-aminobenzamidů, které ve své struktuře obsahují motiv 1,2-diaminoethanu. Nejúčinnější sloučeninou byl *N,N*-diethylderivát **48** (Příloha 3).

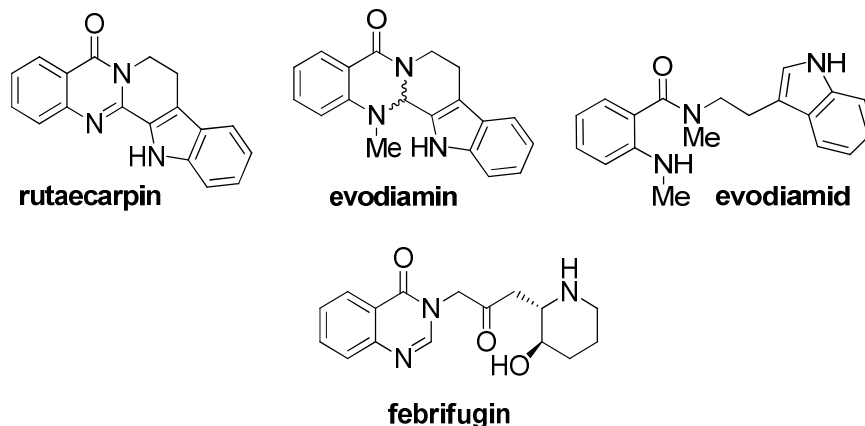


- 49** (R<sup>1</sup> = F, R<sup>2</sup> = H)  
**50** (R<sup>1</sup> = Cl, R<sup>2</sup> = H)  
**51** (R<sup>1</sup> = COOMe, R<sup>2</sup> = H)  
**52** (R<sup>1</sup> = MeO, R<sup>2</sup> = H)  
**53** (R<sup>1</sup> = Me, R<sup>2</sup> = H)  
**54** (R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = Me)  
**55** (R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = Cl)

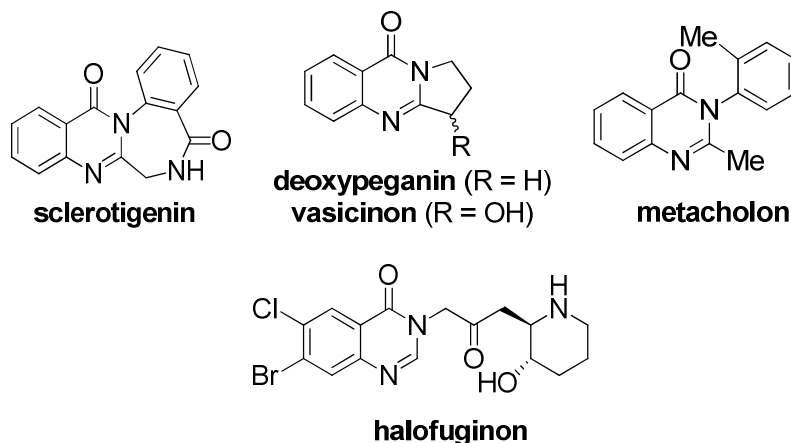
Zdá se, že samostatnou skupinou antimikrobiálních 2-aminobenzamidů jsou anilidy **49** – **55**. Tyto látky dle dostupné literatury<sup>65,120</sup>, výrazně inhibují růst bakterií a plísní. Dosud popsanou nejúčinnější sloučeninou tohoto typu je anilid **52**. Autoři původních sdělení se shodují, že nezbytnou součástí farmakoforu těchto antibakteriálních sloučenin je arylové uskupení na amidovém dusíku a přítomnost nesubstituované aminoskupiny v poloze 2 na aromatickém jádře. Možný mechanismus antibakteriálního účinku těchto sloučenin však dosud znám není.

## 1.6 Významné chinazolin-4-ony

Chinazolin-4-ony jsou bohatě zastoupeny v přírodě, na rozdíl od derivátů kyseliny anthranilové existuje na toto téma řada dobře zpracovaných přehledných článků<sup>121-123</sup>. Alkaloidy rutaecarpin<sup>124</sup> a evodiamin, které obsahují ve své molekule indolové uskupení, byly izolovány z ampáku *Tetradium ruticarpum* a vykazují rozmanité biologické účinky. Rutaecarpin představuje nový druh účinných inhibitorů cyklooxygenasy COX-2, evodiamin vykazuje termogenní<sup>125</sup> a stimulační účinky. Na tomto místě bych ráda připomenula, že z plodů ampáku byl izolován i chemicky blízký evodiamid (str. 18). Febrifugin je známý alkaloid<sup>126</sup> z Čínské léčivé byliny *Dichroa febrifuga*, je však přítomen i v řadě okrasných hortenzií (rod *Hydrangea*). Febrifugin vykazuje<sup>127</sup> antiplasmodické a kokcidistatické účinky.

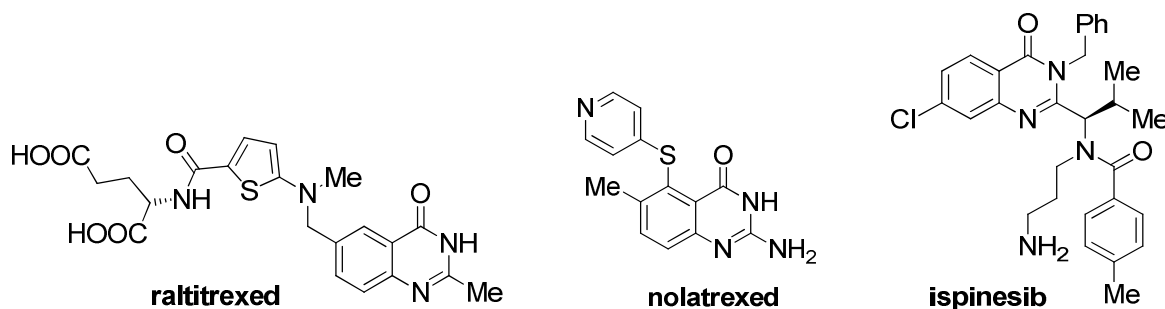


Některé přírodní chinazolony mají v molekule přikondenzovaný benzodiazepinový kruh, nejjednodušší sloučeninou tohoto typu je insekticidní sclerotigenin produkovaný<sup>128</sup> plísní *Penicillium sclerotigenum*. Deoxypeganin<sup>129</sup> a vasicinon byly izolovány z harmaly stepní (*Peganum harmala*), vasicinon byl izolován také z nesměny *Adhatoda vasica* a bylo zjištěno, že inhibuje<sup>130</sup> acetylcholinesterasu.

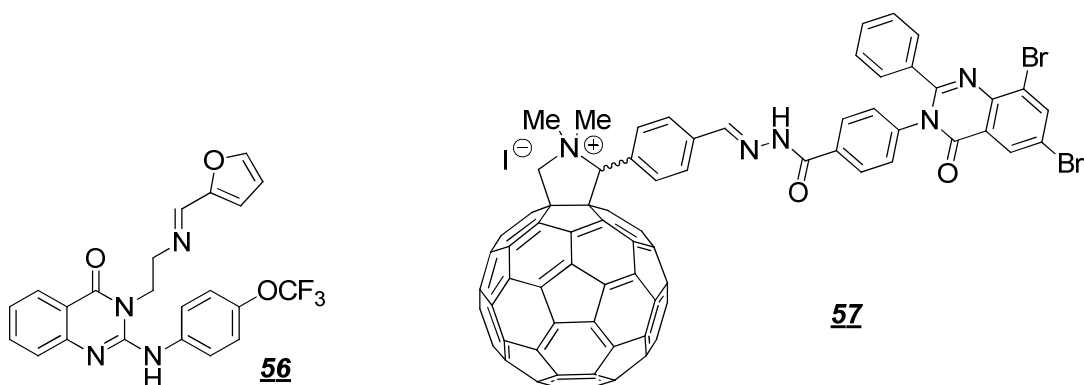


Jedno z prvních farmak, obsahující chinazolin-4-onový systém byl metacholon, který byl pro své sedativní a hypnotické účinky v roce 1962 patentován<sup>131</sup>. Vzhledem k návykovosti se od jeho lékařského využití upustilo, některá analoga metacholonu se však i dnes omezeně jako psychofarmaka používají. Důležitou sloučeninou je používané kokcidostatikum halofuginon<sup>127</sup>, jehož struktura vychází z přírodního alkaloidu febrifuginu. Raltitrexed<sup>132</sup> a nolatrexed jsou antimetabolity kyseliny listové vyvinuté pro chemoterapii rakoviny, raltitrexed je pro léčbu onkologických onemocnění používán od roku 1998, nolatrexed je v současnosti pro tuto aplikaci zkoumán. Ispinesib inhibuje enzym KSP ovlivňující buněčné dělení a je také zkoumán jako farmakum pro léčbu rakoviny. Cytotoxické účinky vykazuje také celá řada dalších chinazolin-4-onů.





Škála biologických účinků je u chinazolin-4-onů neobvykle pestrá a mnoho sloučenin představuje vzorové molekuly pro vývoj nových léčiv. Některé chinazolony vykazují účinky protivirové, jiné hubí prvky z rodu *Leishmania* a mohly by být využitelné k léčbě leishmaniózy. Některé chinazolony vykazují antiepileptické, analgetické, trypanocidní a protizánětlivé účinky. Antibakteriální účinky byly u chinazolinonů rovněž pozorovány. Sloučenina **56** je příkladem chinazolonu s výraznými antifungálními účinky, zajímavou skutečností je přítomnost 1,2-diaminoethanového motivu, který je v mé diplomové práci několikrát zmiňován.



Sloučenina **57** je funkcionalizovaný fullerén C<sub>60</sub> účinně inhibující růst *Mycobacterium tuberculosis*. Antimykobakteriální účinek fullerénového derivátu je srovnatelný s používanými antituberkulotiky (isoniazid a rifampicin).

## 1.7 Syntéza derivátů kyseliny anthranilové

Během vývoje organické syntézy bylo objeveno několik metod přípravy derivátů anthranilových kyselin, které se využívají tradičně. Příkladem může být Sandmayerova syntéza anthranilových kyselin<sup>133</sup>, vycházející ze substituovaných aminobenzenů, které jsou převedeny na deriváty isatinu a následně oxidačně štěpeny na příslušné anthranilové kyseliny (Schéma 1, metoda A).

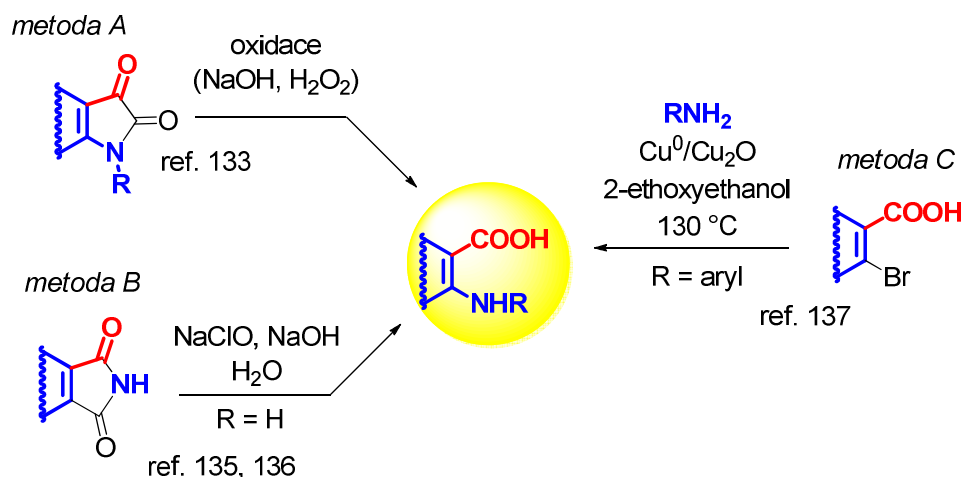


Schéma 1. Syntézy anthranilových kyselin založené na tradičních postupech.

K ověřeným metodám syntézy anthranilových kyselin a jejich amidů patří také Hoffmanovo odbourávání ftalimidů chlornanem v alkalickém vodném prostředí<sup>134</sup> (Schéma 1, metoda B), modernější alternativou tohoto postupu může být recentně popsaná reakce<sup>135</sup> využívající sloučeniny trojmocného jodu generované *in-situ* v reakční směsi. Farmaceuticky významné *N*-arylanthranilové kyseliny mohou být průmyslově vyráběny<sup>81</sup> rovněž reakcí 2-halogenbenzoových kyselin s aniliny za vysokých teplot, nedávno byly takové reakce popsány<sup>136</sup> v pohodlném laboratorním provedení (Schéma 1, metoda C). Dlouhodobě využívaným přístupem k anthranilovým kyselinám a 2-aminobenzamidům je redukce odpovídajících 2-nitrobenzoových kyselin či 2-nitrobenzamidů. Recentně byly tímto způsobem připraveny<sup>137</sup> 2-aminobenzamidy např. nitrací odpovídajících benzamidů s následnou redukcí nitroskupiny chloridem cínatým. Některé 2-aminobenzamidy byly také připraveny<sup>138</sup> hydratací příslušných benzonitrilů ve zředěné kyselině sírové. V literatuře je popsána také celá řada nových postupů k syntéze anthranilových kyselin, které často využívají reakce katalyzované paladiem, mědí a jejich solemi. Jedna z takových metod umožňuje zavedení karboxylové funkce katalyzované octanem paladnatým, kdy se na výchozí anilin působí oxidem uhelnatým a *p*-benzochinonem (Schéma 2, metoda A). Octanem palladnatým jsou katalyzovány i reakce umožňující zavedení aminoskupiny do molekuly benzoových kyselin, kdy je donorem aminoskupiny substituovaný hydroxylamin<sup>139</sup> (Schéma 2, metoda B) či substituovaný benzensulfonamid<sup>133</sup> (Schéma 2, metoda C).

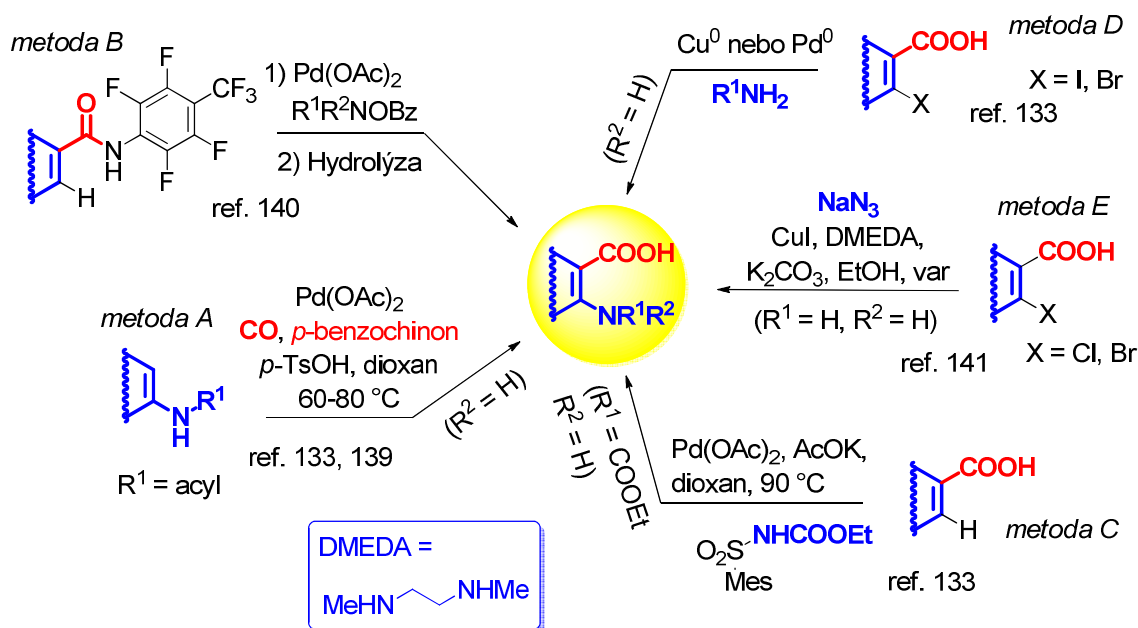


Schéma 2. Příklady moderních přístupů ke 2-aminobenzoovým kyselinám.

Další efektivní přístup (Schéma 2, metoda D) vychází z 2-halogenbenzoových kyselin, které jsou podrobeny Buchwaldově-Hartwigově reakci<sup>133</sup>. Z 2-halogenbenzoových kyselin vychází také metoda<sup>140</sup> využívající katalyzovanou reakci s azidem sodným (Schéma 2, metoda E). Zajímavá recentně popsaná<sup>141</sup> metoda přípravy některých *N,N*-disubstituovaných anthranilových kyselin je znázorněna příkladem ve Schéma 3, kdy anthranilové kyseliny vznikají reakcí benzynu generovaného v reakční směsi z prekursoru se sekundárním aminem a oxidem uhličitým.

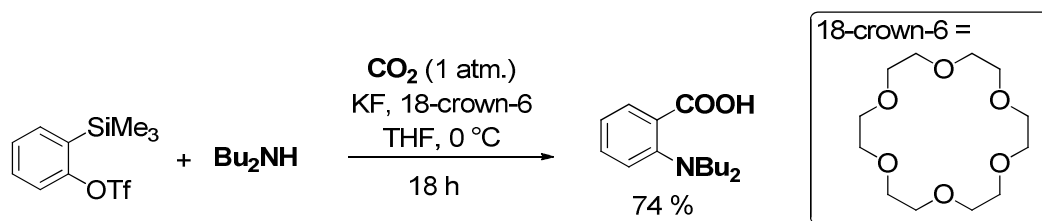


Schéma 3. Příprava *N,N*-dibutylanthranilové kyseliny přes benzynový meziprodukt.

Zdaleka nejpoužívanějším<sup>142-145</sup> přístupem k substituovaným 2-aminobenzamidům jsou reakce isatoových anhydridů s příslušným aminem. Ve Schématu 4 je uvedena aminolýza isatoového anhydridu působením butylaminu za různých podmínek.

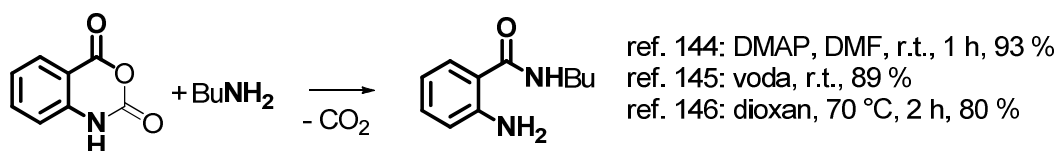


Schéma 4. Aminolýza isatoového anhydridu za různých podmínek.

V publikaci z roku 2015 byla popsána<sup>146</sup> neobvyklá syntéza 2-aminobenzamidů z 2-fluorbenzoových kyselin a symetricky substituovaných karbodiimidů (Schéma 5).

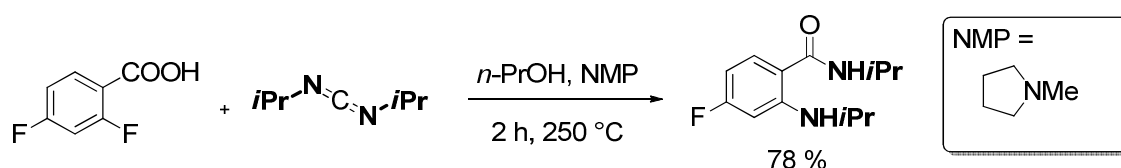


Schéma 5. Příklad reakce 2-fluorbenzoových kyselin s karbodiimidu.

Byla popsána<sup>147</sup> také příprava některých *N,N*-disubstituovaných 2-aminobenzamidů reakcí vhodných benzamidů s *N*-chloraminy, v některých případech příslušné 2-aminobenzamidy vznikaly kvantitativně (Schéma 6).

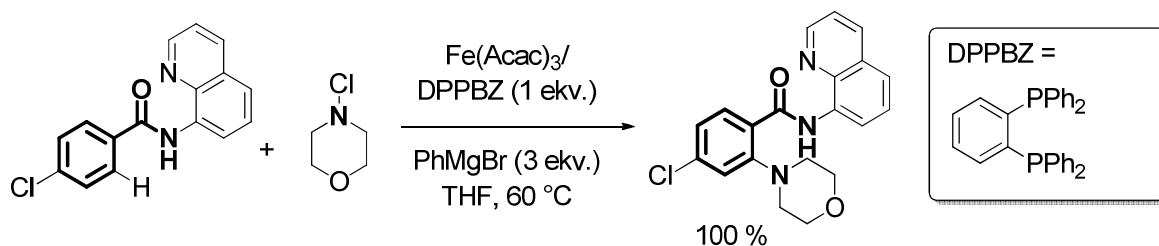


Schéma 6. Příklad reakce substituovaného benzamidu s *N*-chlormorfolinem.

Pohodlný způsob syntézy některých derivátů kyseliny anthranilové byl v posledních několika letech vypracován na Ústavu chemie FT UTB ve Zlíně a vycházel z oxidačního štěpení chinolin-2,4-dionů, které bylo popsáno již dříve<sup>148</sup>. Tato metoda<sup>149</sup> poskytuje příslušné *N*-( $\alpha$ -ketoacyl)anthranilové kyseliny (Schéma 7), které vzhledem k přítomnosti  $\alpha$ -ketoacylového uskupení představují poměrně zajímavé sloučeniny z hlediska dalšího syntetického využití.

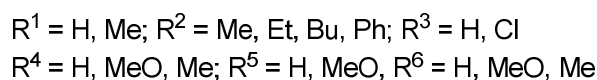
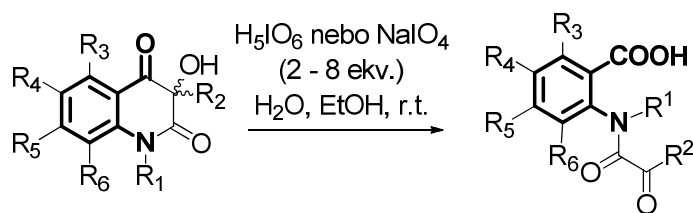


Schéma 7. Oxidační štěpení chinolin-2,4-dionů.

V recentní práci byla popsána<sup>150</sup> pohodlná transformace těchto sloučenin na anthranilové kyseliny nesoucí indolové uskupení (Schéma 8). Při těchto reakcích byla v některých případech získána i malá množství příslušných benzoxazinonů a fenyhydrazidů.

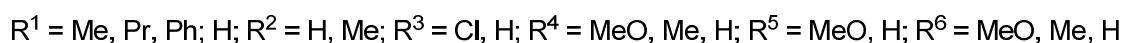
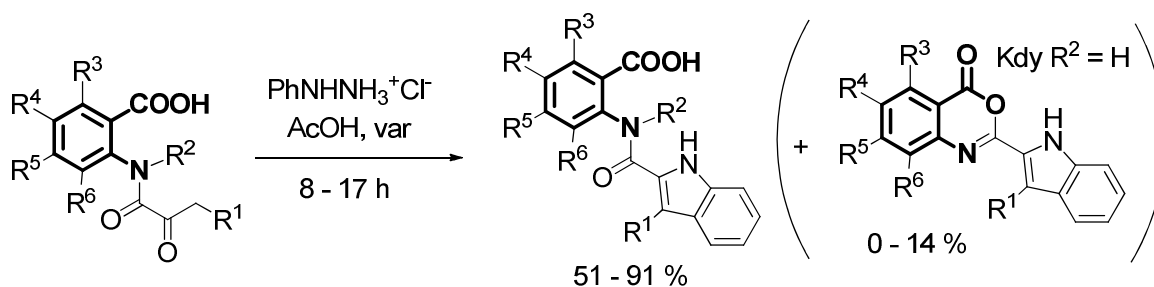
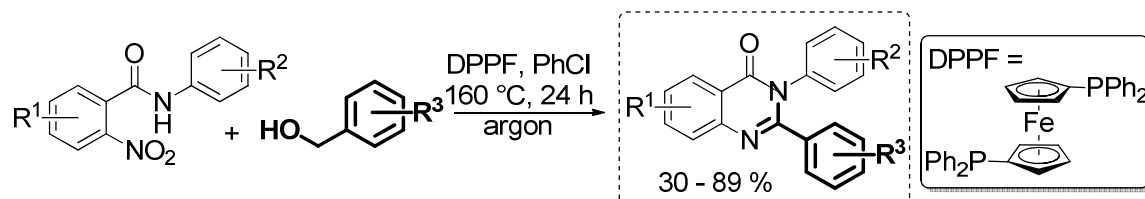


Schéma 8. Fischerova indolová reakce *N*-( $\alpha$ -ketoacyl)anthranilových kyselin.

Vzhledem k velkému významu derivátů chinazolin-4-onu, bylo vypracováno nepřeberně<sup>123</sup> množství jejich syntéz. Dehydratace 2-aminobenzamidů nesoucích na dusíkovém atomu acylové uskupení či přímo reakce substituovaných benzoxazin-4-onů s aminy za zvýšené teploty je stále intenzivně používanou<sup>123,151</sup> metodou jejich syntézy. Další zajímavé metody utváření chinazolonového systému byly shrnuty v přehledných<sup>123</sup> člancích.

V literatuře<sup>152</sup> byla například nedávno popsána reakce *in situ* připravených aroylthiokyanátů s 2-aminobenzamidem, kdy získané deriváty thiomocoviny účinkem báze poskytují příslušné chinazolony. Dalším příkladem recentně popsaného<sup>153</sup> přístupu k pestré škále 2-arylchinazonů je oxidativní cyklizace vycházející z 2-aminobenzamidů a substituovaných benzylalkoholů. Substituované benzylalkoholy jsou využívány také v zajímavé reakci<sup>154</sup> 2-nitrobenzaldehydů, která umožňuje snadnou přípravu široké palety 2,3-diarylchinazonů (Schéma 9).



R<sup>1</sup> = H, Me, MeO; R<sup>2</sup> = Me, MeO, F, Cl, Br, CF<sub>3</sub>, OCF<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub>; R<sup>3</sup> = H, Me, MeO, Cl, Br

Schéma 9. Příprava chinazolonů z 2-nitrobenzaldehydů a benzylalkoholů.

## 2 DISKUSE

Diskusní část mé diplomové práce je rozdělena na dva celky, které jsou však úzce propojeny. Zahrnuje komentáře chemických experimentů a také porovnání výsledků mikrobiologických testů.

### 2.1 Diskuse chemických experimentů

Z poznatků dostupných v literatuře vyplývá, že 2-aminobenzamidy mohou být velmi zajímavými sloučeninami z hlediska možné biologické aktivity. Ústřední sloučeniny této diplomové práce, amidy **10** nesoucí indolové uskupení, byly připraveny za účelem jejich mikrobiologického testování. Pro jejich syntézu byly zvoleny dvě strategie (Schéma 10). Obě vycházely z kyselin **3**, jejichž reaktivita je v posledních letech na ÚCh FT UTB studována.

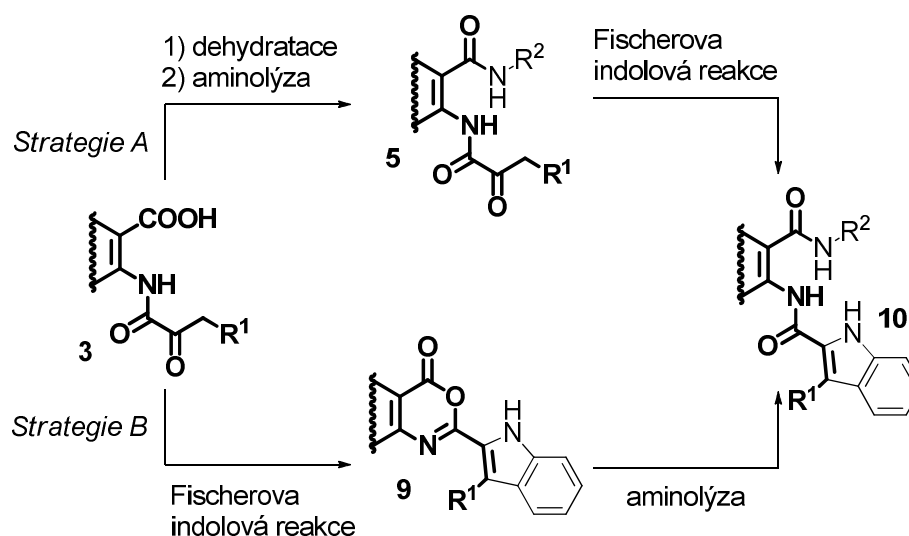


Schéma 10. Navržené strategie syntézy 2-aminobenzamidů **10**.

První z nich (Schéma 10, strategie A) zahrnovala převedení kyselin **3** na reaktivní heterocyklické meziproducty, které reakcí s vhodným aminem poskytnou amidy **5**. Sloučeniny **3** byly již dříve úspěšně převedeny na odpovídající deriváty indolu Fischerovou indolovou reakcí.<sup>150</sup> Cílem první strategie bylo především zjistit, zda je možné za stejných podmínek převést amidy **5** přímo na sloučeniny **10**. Druhá (Schéma 10, strategie B) spočívala v převedení sloučenin **3** na reaktivní benzoxazinony **9**, které ve své molekule již obsahují indolový systém, jejichž následná aminolýza by měla vést k amidům **10**.

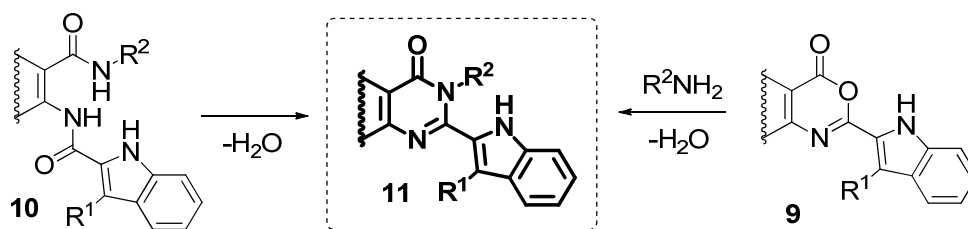


Schéma 11. Dva zvažované postupy vedoucí k chinazolinovým derivátům **11**.

Výzkum antimikrobiálních účinků 2-aminobenzamidů **10** však nebyl jediným cílem této diplomové práce, sloučeniny **10** představují také možné prekurzory derivátů s chinazolonovým skeletem, což je významný farmakofor. Bylo zajímavé ověřit, zda je možné tyto amidy využít k přípravě chinazolonů, nesoucích ve své struktuře indolové uskupení. Byly navrženy dva možné přístupy (Schéma 11), které jsou oba podloženy analogickými syntézami popsány v odborné literatuře. Prvním možným přístupem k chinazolinonům **11** je dehydratace amidů **10** buď tepelně, nebo použitím vhodného dehydratačního činidla, druhou zvažovanou možností byla reakce benzoxazinonů **9** s aminem za vhodných podmínek.

Cílem diplomové práce tedy bylo ověřit zmíněné syntetické postupy a připravit sérii 2-aminobenzamidů **10** u kterých by byla dále zkoumána jejich protimikrobní aktivita.

### Příprava výchozích sloučenin

K přípravě sloučenin **3** byl zvolen postup<sup>149</sup> vyvinutý na Ústavu chemie (Schéma 12), který využívá reakce již zmíněné v teoretické části (str. 28). Tepelnou kondenzací vhodného aminobenzenu se substituovaným diethyl-malonátem je získán chinolon **1**, který je v prvním kroku oxidován kyselinou peroxyoctovou na 3-hydroxychinolindion **2**, jehož oxidačním štěpením kyselinou pentahydrogenjodistou vzniká kyselina **3**.<sup>149</sup> Zásadní výhodou tohoto postupu je možnost připravit pestrá škála různě substituovaných sloučenin.

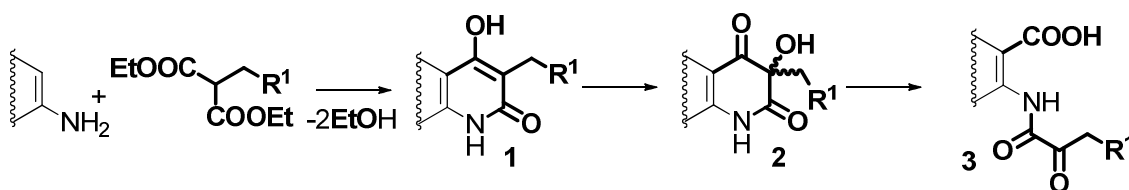


Schéma 12. Obecné schéma syntézy kyselin **3** z komerčně dostupných výchozích látek.



Z důvodu časové náročnosti syntéz a potřeby širší série substituovaných sloučenin jsem připravila jen dvě sloučeniny **3** (Schéma 13), ostatní *N*-( $\alpha$ -ketoacyl)anthranilové kyseliny byly připraveny analogicky a byly mi poskytnuty školitelem.

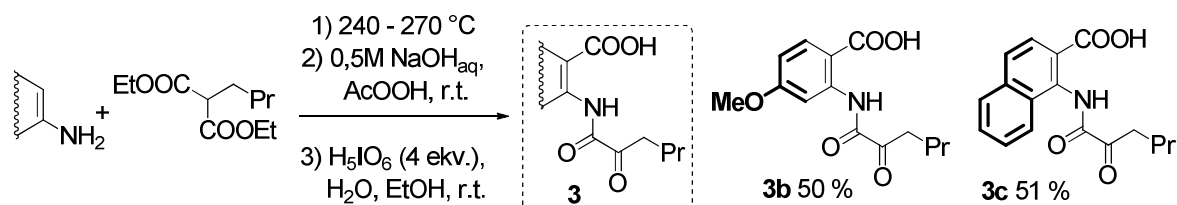


Schéma 13. Příprava kyselin **3b** a **3c** a jejich celkové výtěžky vztahované na výchozí anilin.

Ve schématu výše (Schéma 13) jsou uvedeny celkové výtěžky kyselin **3b** a **3c** vztahované na výchozí anilin. Sloučenina **3b** a její prekurzory jsou novými sloučeninami, ostatní látky již byly na Ústavu chemie dříve připraveny. Struktury nových sloučenin **1b** – **3b** byly potvrzeny NMR spektroskopii. Autenticita ostatních připravených výchozích sloučenin byla ověřena porovnáním IČ spekter, bodů tání a tenkovrstvou chromatografií.

Jedním z navržených přístupů k 2-aminobenzamidům nesoucím indolové uskupení byl postup vycházející z příslušných amidů **5** (Schéma 10, str. 31), jejichž vznik byl dříve pozorován při pokusech o převedení reaktivních sloučenin **4** a **5** na dusíkaté heterocykly reakcemi s aminy. Tyto poznatky byly v mé práci využity k cílené přípravě amidů **5a** – **c** (Schéma 14).

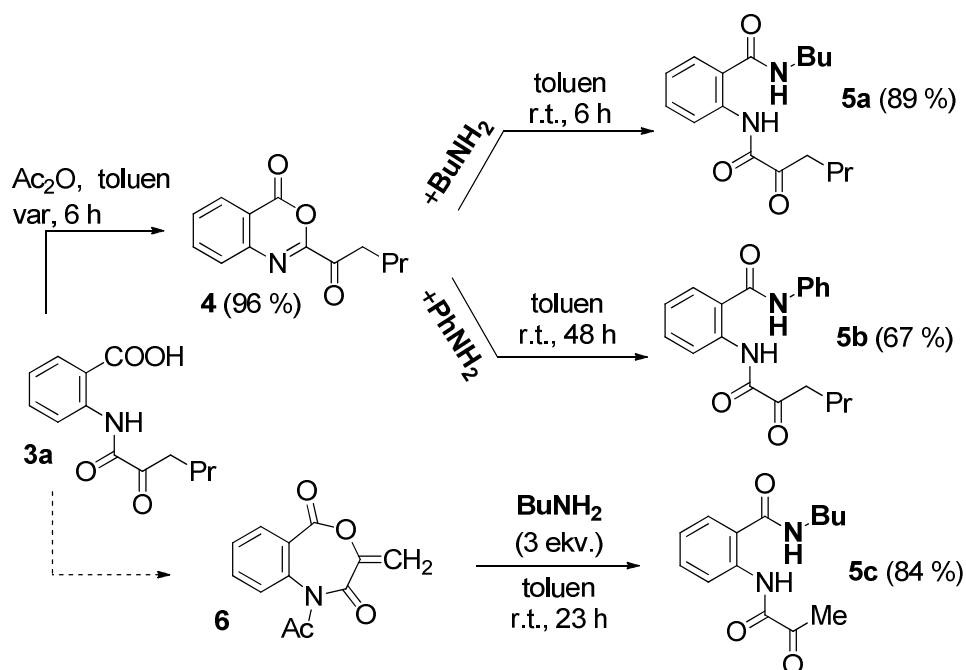


Schéma 14. Příprava amidů **5a** – **c**.

Amidy **5a** a **5b** byly připraveny aminolýzou benzoxazinonu **4**, získaného dehydratací kyseliny **3a** varem ve směsi toluenu a acetanhydridu. Reakce derivátu **4** s aminy při pokojové teplotě v toluenu poskytla hladce očekávané amidy v dobrých výtěžcích. Amid **5c** byl připraven obdobně aminolýzou benzoxazepindionu **6** získaného působením směsi acetanhydridu a pyridinu na sloučeninu **3a**. Sloučeniny **3a** a **6** jsem nepřipravovala, byly mi poskytnuty vedoucím práce.

### Pokusy o provedení Fischerovy indolové reakce u amidů **5**

V souladu s konceptem diplomové práce bylo dalším logickým krokem ověření možnosti provedení Fischerovy indolové reakce s připravenými amidy **5** za podmínek, které byly již ověřeny u kyselin **3**. Výsledky těchto experimentů však nesplnily očekávání, v případě reakce amidů **5a** a **5b** byla jako produkt získána kyselina **7a**. K formaci indolového uskupení tedy sice došlo, zároveň však došlo k rozštěpení amidového uskupení (Schéma 15).

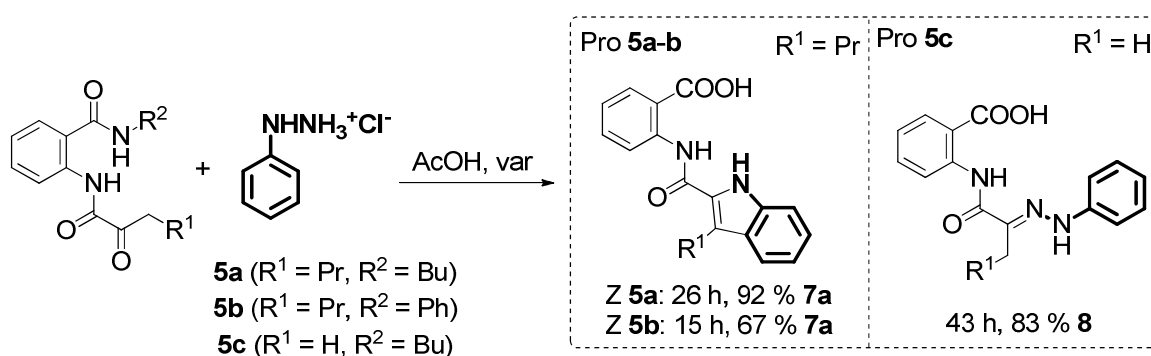


Schéma 15. Reakce amidů **5** s fenylhydrazinium-chloridem ve vroucí kyselině octové.

Vysvětlením tohoto jevu může být hydrolýza amidového uskupení během zpracování reakční směsi nebo jeho acidolýza v přebytku vroucí kyseliny octové za vzniku směsného anhydridu, který následně snadno hydrolyzuje (Schéma 16).

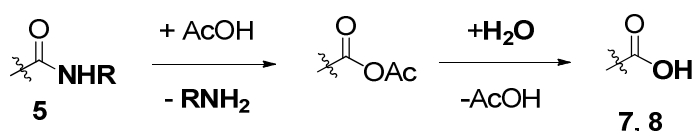


Schéma 16. Možné vysvětlení vzniku volné karboxylové funkce při reakci amidů **5** v kyselině octové.

Stejný jev byl pozorován také v případě reakce amidu **5c**, v tomto případě však nedošlo ani ke vzniku očekávaného indolového systému a izolovaným produktem byl hydrazon **8**. Zdá

se tedy, že předchozí úspěšné pokusy o vytvoření indolového jádra u kyselin **3** byly pravděpodobně umožněny přítomností delšího alkylového řetězce u acylového zbytku. Je známo, že provedení Fischerovy indolové reakce u karbonylových sloučenin, které mají jen methylovou skupinu je komplikované, protože nedochází ke stabilizaci intermediárního enamínového uskupení.

S dostupným množstvím spektrálních charakteristik nebylo obtížné potvrdit struktury připravených amidů **5**. Struktury amidů **5a** a **5c** byly potvrzeny především NMR spektroskopii, některé signály v protonovém spektru sloučenin **5** jsou znázorněny v Příloze 5.

Vzhledem k uvedeným výsledkům pokusů jsem první strategii syntézy 2-aminobenzamidů s indolovým jádrem opustila. Možným řešením by sice mohlo být provedení Fischerovy reakce amidů **5** v jiném rozpouštědle nebo tepelně z hydrazonů sloučenin **5**, avšak dřívější obdobné pokusy<sup>150</sup> se sloučeninami **3** poskytovaly nízké výtěžky odpovídajících derivátů indolu a byly zatíženy vznikem vedlejších produktů. Proto jsem se dále zaměřila na vyzkoušení druhé strategie syntézy amidů **10**, která vychází z reaktivních indolylbenzoxazinonů (str. 28, *Schéma 10*, strategie B).

### **Příprava indolylbenzoxazinonů**

V nedávné publikaci<sup>150</sup> byla popsána elegantní metoda transformace kyselin **3** na anthranilové kyseliny **7** nesoucí indolové uskupení (str. 29), které byly v některých případech doprovázeny malým množstvím benzoxazinonů **9**. Zároveň bylo naznačeno, že obměnou reakčních podmínek by bylo teoreticky možné selektivně připravit sloučeniny **9**. Benzoxazinony **9** jsou také snadno dostupné dehydratací kyselin **7**, proto jsem se rozhodla vyzkoušet oba zmíněné syntetické postupy u jedné ze sloučenin a porovnat jejich výtěžky.

Sloučeninu **9b** jsem připravila konvenčnějším postupem v celkovém výtěžku 41 %, přes sloučeninu **7b**, kterou jsem dehydratovala varem ve směsi toluenu a acetanhydridu (*Schéma 17*). Postupem navrženým v literatuře<sup>150</sup> jsem pak také převedla sloučeninu **3b** přímo na odpovídající benzoxazinon **9b** (*Schéma 17*). Pro přípravu dalších benzoxazinonů **9** jsem se použila druhý postup, protože se ukázal být výhodnější.

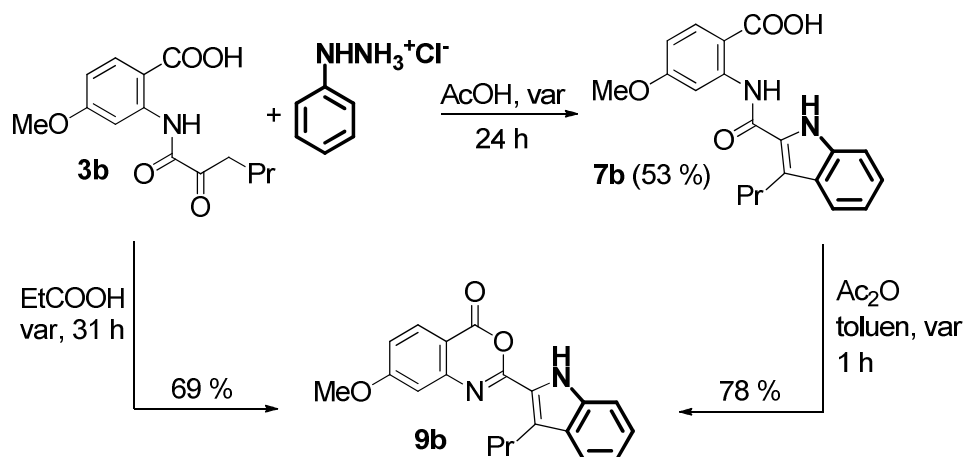


Schéma 17. Příprava benzoxazinonu **9b** dvěma možnými postupy.

Ověřila jsem tak myšlenku autorů původního sdělení, kteří předpokládali, že Fischerova indolová reakce kyselin **3** ve vroucí kyselině propionové může představovat jednoduchý postup k přípravě benzoxazinonů **9**, které pravděpodobně vznikají tepelnou dehydratací ze sloučenin **7**. Mechanismus této přeměny byl již naznačen v literatuře.

Následně jsem připravila sérii benzoxazinonů **9a – g**, které byly potřebné pro další experimenty (Schéma 19). Jako vedlejší produkty těchto reakcí byly izolovány příslušné kyseliny **7**, jejich vznik však vzhledem k velkému rozdílu v rozpustnosti nekomplikoval izolaci hlavních produktů **9**. Kromě sloučenin **7b**, **9b** a **9f** byly kyseliny **7** a benzoxazinony **9** připraveny již dříve jinými reakcemi a vzhledem k tomu, že jsem jejich IČ spektra měla k dispozici, potvrzení struktury mých preparátů bylo snadné.

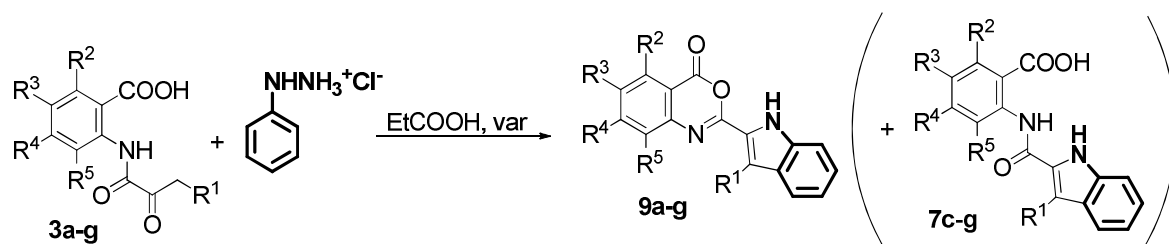


Schéma 18. Jednostupňová příprava benzoxazinonů **9** z výchozích kyselin **3**.

Tabulka 7. Experimentální data Fischerových indolových reakcí sloučenin **3** v kyselině propionové.

<b>3,7,9</b>	$R^1$	$R^2$	$R^3$	$R^4$	$R^5$	Navážka <b>3</b>	Doba reakce	Výtěžek <b>7</b>	Výtěžek <b>9</b>
<b>a</b>	Pr	H	H	H	H	1,996 g (8,01 mmol)	33 h	-	81 % (1,981 g)
<b>b</b>	Pr	H	H	MeO	H	1,109 g (3,97 mmol)	31 h	-	69 % (0,912 g)
<b>c</b>	Pr	H	H	-(CH=CH) <sub>2</sub> -		0,595 g (1,99 mmol)	13 h	5 % (0,039 g)	76 % (0,565 g)
<b>d</b>	Me	H	MeO	H	H	0,500 g (2,00 mmol)	17 h	9 % (0,063 g)	65 % (0,418 g)
<b>e</b>	Pr	H	MeO	H	MeO	0,621 g (2,01 mmol)	15 h	12 % (0,100 g)	72 % (0,551 g)
<b>f</b>	Me	H	Me	H	H	0,465 g (1,98 mmol)	24 h	12 % (0,071 g)	74 % (0,424 g)
<b>g</b>	Me	Cl	H	H	Me	0,531 g (1,97 mmol)	34 h	23 % (0,165 g)	56 % (0,377 g)

### Reakce indolyl-benzoxazinonů **9** s aminy

Ve snaze připravit deriváty chinazonu jsem na základě literární rešerše provedla několik reakcí benzoxazinonu **9a** s aminy ve vroucím pyridinu (*Schéma 19*). Reakce byly zkušeny s butylaminem, benzylaminem, 1,2-diaminoethanem a s 2-aminoethanolem. Ve třech případech však byly získány pouze produkty aminolýzy benzoxazinového kruhu, tj. příslušné 2-aminobenzamidy **10** (*Schéma 19*). Dlouhé reakční doby a vysoká teplota vedly také k částečnému rozkladu výchozích sloučenin a vzniku tmavých vedlejších produktů, což následně vyžadovalo náročnější čištění produktů. Původně navrhovaná cesta k chinazonům **11** byla úspěšná pouze v jednom případě, kdy byl reakcí benzoxazinonu **9a** s 2-aminoethanolem získán chinazon **11m** (*Schéma 19*). Zajímavé je, že k této reakci došlo v případě, kdy byl jako výchozí amin použit 2-aminoethanol a jiné podmínky reakce zůstaly nezměněny.

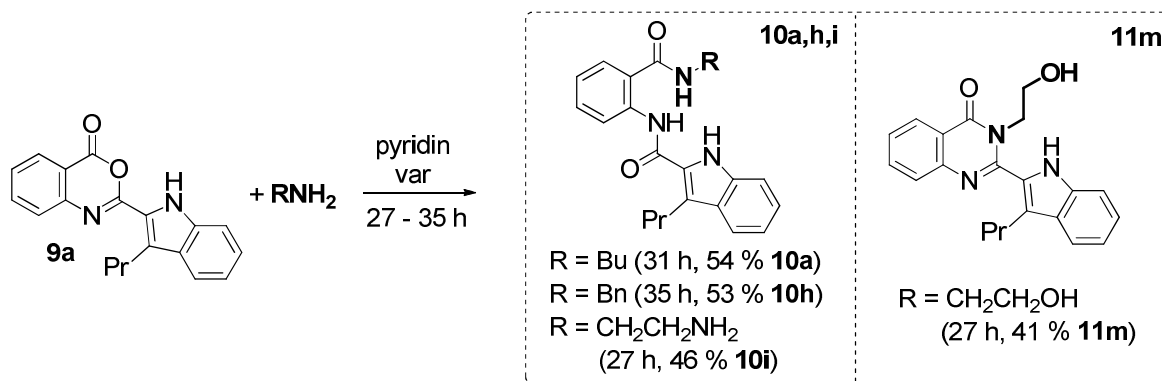


Schéma 19. Aminolýza benzoxazinonu **9a** ve vroucím pyridinu.

Vytvořením série substituovaných indolybenzoxazinonů se otevřela cesta k přípravě malé knihovny ústředních sloučenin této diplomové práce – amidů 2-(indol-2-karboxamido)benzoových kyselin **10**. Tyto sloučeniny jsou zajímavé především z hlediska možných biologických účinků. Jednou z možností jejich syntézy by bylo použít postup popsany v předchozí kapitole, ten však poskytoval nízké výtěžky produktů, které navíc musely být náročně čištěny. Aminolýza benzoxazinonů by navíc měla probíhat poměrně snadno, proto jsem hledala postup, který by umožnil vést reakci za mírných podmínek. Reakce benzoxazinonu s aminem při pokojové teplotě v dichlormethanu bez přítomnosti dalších látek neprobíhala, avšak zjistila jsem, že reakce probíhá, přidá-li se do reakční směsi triethylamin. Za těchto podmínek jsem pak připravila sérii 2-aminobenzamidů **10a-l** (Schéma 20, Tabulka 8).

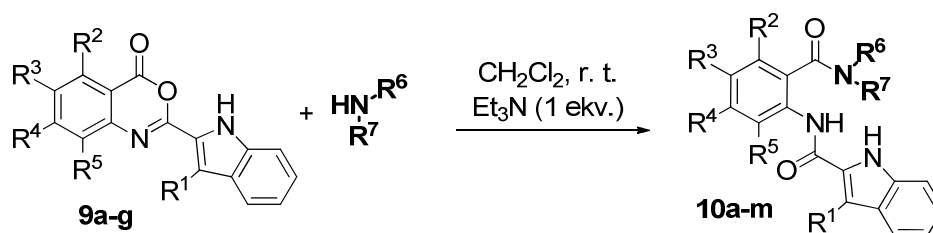


Schéma 20. Příprava 2-aminobenzamidů **10** aminolýzou benzoxazinonů **9**.

Tabulka 8. Reakční doby a výtěžky sloučenin **10** při reakcích sloučenin **9** s primárními a sekundárními aminy v dichlormethanu katalyzovaných triethylaminem.

<b>10</b>	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	R <sup>5</sup>	R <sup>6</sup>	R <sup>7</sup>	Doba reakce	Výtěžek
<b>a</b>	Pr	H	H	H	H	Bu	H	42 h	77 %
<b>b</b>	Pr	H	H	MeO	H	Bu	H	20 h	88 %
<b>c</b>	Pr	H	H	-(CH=CH) <sub>2</sub> -	H	Bu	H	51 h	95 %
<b>d</b>	Me	H	MeO	H	H	Bu	H	24 h	83 %
<b>e</b>	Pr	H	MeO	H	MeO	Bu	H	22 h	93 %
<b>f</b>	Me	H	Me	H	H	Bu	H	26 h	89 %
<b>g</b>	Me	Cl	H	H	Me	Bu	H	48 h	98 %
<b>h</b>	Pr	H	H	H	H	Bn	H	17 h	87 %
<b>i</b>	Pr	H	H	H	H	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	H	6 h	75 %
<b>j</b>	Pr	H	H	H	H	Bu	Bu	68 h	91 %
<b>l</b>	Pr	H	H	MeO	H	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	H	1 h	98 %
<b>m</b>	Pr	H	H	-(CH=CH) <sub>2</sub> -	H	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	H	1 h	92 %

Tento postup selhal v případě pokusu o přípravu anilidu **10k**, což svědčí o nedostatečně vysoké reaktivitě anilinové aminoskupiny při pokojové teplotě. Anilid **10k** byl připraven hladce provedením reakce v toluenu při teplotě varu (Schéma 21).

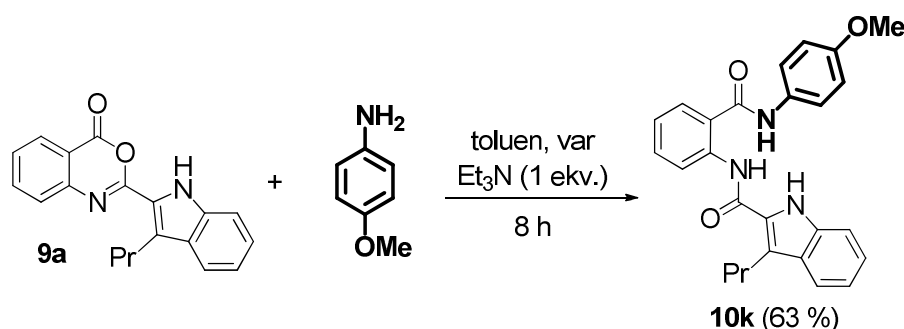
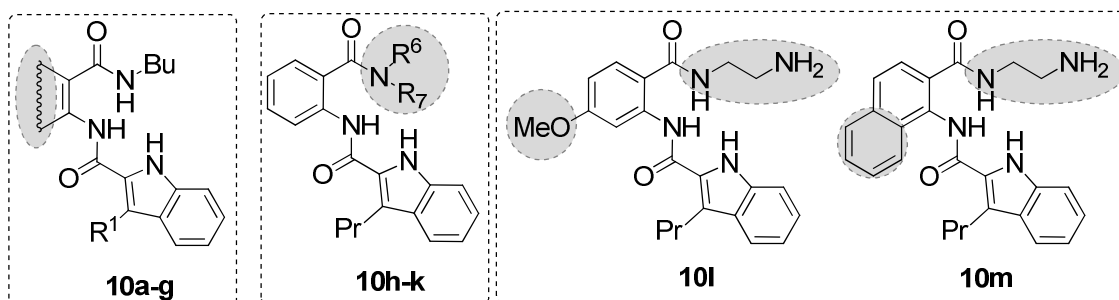


Schéma 21. Syntéza anilidu **10k** varem v toluenu.

Na tomto místě bych ráda okomentovala zvolené substituenty u této malé knihovny 2-aminobenzamidů (Obrázek 1). Byla připravena série sedmi amidů **10a – 10g**, které se od sebe liší substitucí aromatického kruhu 2-aminobenzamidového systému a v některých případech se liší také alkylem v poloze 3 indolového kruhu. Tyto sloučeniny mají na amidovém dusíku navázanou butylovou skupinou. Dále pak byla mezi tyto sloučeniny zahrnuta série čtyř aminobenzamidů **10h – 10k**, které byly nesubstituované na benzenovém kruhu a lišily se substitucí na benzamidovém atomu dusíku. Poslední dva amidy, **10l** a **10m**,

byly syntetizovány cíleně až se znalostí výsledků mikrobiologických testů ve snaze nalézt sloučeniny s vyšší antimikrobiální aktivitou.



Obrázek 1. Dvě hlavní skupiny aminobenzamidů **10a** – **10k** a cíleně připravené sloučeniny **10l** a **10m**.

Struktura všech připravených amidů **10** byla potvrzena NMR spektroskopií. V Příloze 5 jsou znázorněny některé signály, které byly identifikovány ve spektrech  $^{13}\text{C}$ -NMR a  $^1\text{H}$ -NMR.

### Pokusy o dehydrataci 2-aminobenzamidů **10**

Vzhledem ke skutečnosti, že původní experimenty s transformací benzoxazinonů na odpovídající chinazolinony nesplnily očekávání a pouze v jednom případě vedly k izolaci sloučeniny, která byla identifikována jako odpovídající chinazolon **11**, posledními syntézními pokusy byly snahy o dehydrataci připravených 2-aminobenzamidů. Úvodní experimenty, kdy byla sloučenina **10a** vařena v toluenu bez přítomnosti dalších reaktantů nebo v přítomnosti kyseliny 4-toluensulfonové nevedly k cíli, byla izolována výchozí sloučenina **10a**. Proto jsem se rozhodla provést reakci s vhodným dehydratačním činidlem. V literatuře<sup>133</sup> byly nalezeny obdobné dehydratace, které používaly jako dehydratační činidlo chlorid fosforitý. Jako dehydratační činidlo jsem zvolila dostupný thionylchlorid. Při pokojové teplotě reakce probíhala jen velmi pomalu, proto byla reakční směs vařena v inertní atmosféře. Za těchto podmínek proběhly reakce hladce během 15 minut.

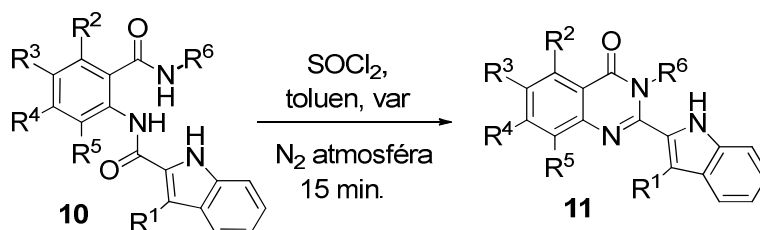


Schéma 22. Dehydratace amidů **10** thionylchloridem ve vřouícím toluenu.



Tabulka 9. Klíč k substituentům a výtěžky syntéz chinazonů **11**.

<b>10,11</b>	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	R <sup>5</sup>	R <sup>6</sup>	Výtěžek
<b>a</b>	Pr	H	H	H	H	Bu	57 %
<b>d</b>	Me	H	MeO	H	H	Bu	71 %
<b>e</b>	Pr	H	MeO	H	MeO	Bu	84 %
<b>f</b>	Me	H	Me	H	H	Bu	53 %

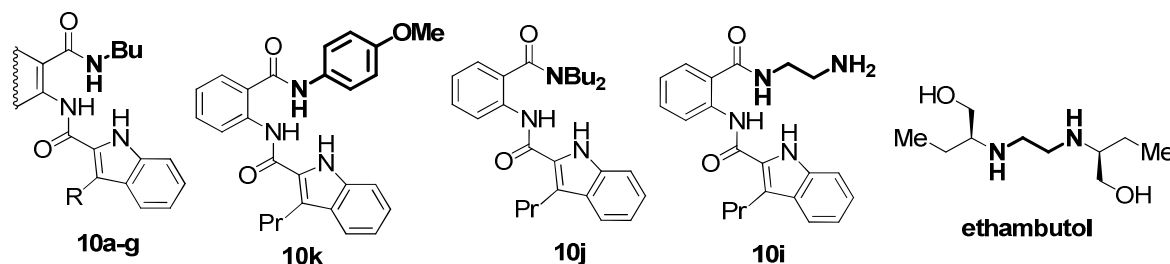
Tímto způsobem byla připravena série čtyř chinazonů **11** (Schéma 22, Tabulka 9).

## 2.2 Diskuse mikrobiologických testů

### Protimikrobní vlastnosti připravených sloučenin

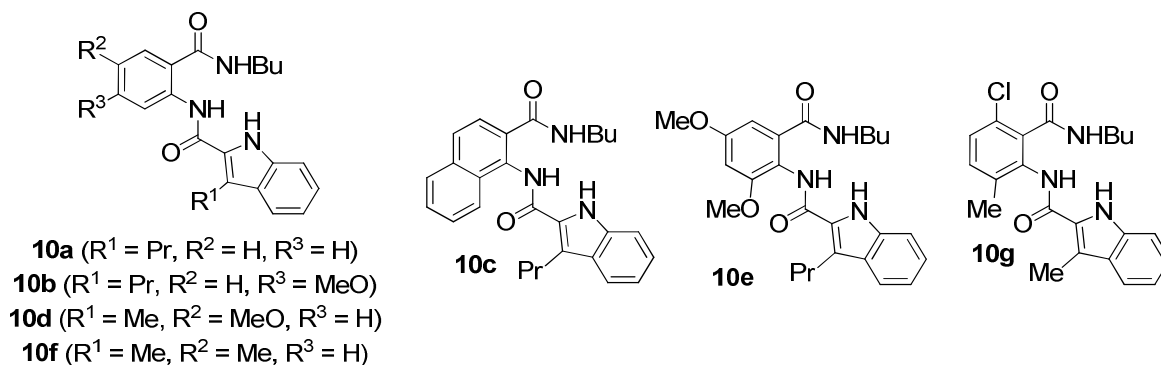
Po hlubším literárním průzkumu se zdá, že výzkum účinků některých sloučenin připravených v rámci této diplomové práce na mikroorganismy by mohl přinést zajímavé poznatky, využitelné při vývoji nových antibakteriálních látek. Zajímavá je především schopnost některých známých anthranilových kyselin inhibovat bakteriální enzym KAS III, který představuje nový molekulární cíl pro vývoj antibakteriálních sloučenin. Úvodem bych ráda okomentovala důvody, proč byly zvoleny některé substituenty u připravené série testovaných látek.

Ačkoliv vliv acylového uskupení na antimikrobiální účinky *N*-acylanthranilových kyselin byl již v odborné literatuře zkoumán, o vlivu substituentů na aromatickém jádře kyseliny anthranilové mnoho informací k dispozici není. Proto jsem zvolila více typů substitucí na aromatickém jádře, řada substituovaných prekurzorů již navíc byla na ÚCh FT UTB úspěšně připravena. Vzhledem k tomu, že dle literatury dosud známé antibakteriální anthranilové kyseliny ztrácí svou účinnost, pokud jsou převedeny na amidy, jsem chtěla tento jev více prozkoumat. Reakcí benzoxazinonů **9** s aminy bylo možné rozhodnout o přítomnosti dalšího substituentu na jednom z amidových dusíků. *N*-Butylamidy **10a** – **g** byly připraveny především z praktických důvodů a protože práce navazovala na nedávnou publikaci, kde byl jeden takový amid připraven.



Sloučenina **10k** byla navržena na základě poznatků z literatury, kdy některé anilidy anthranilových kyselin vykazovaly výrazné antimikrobiální účinky. *N,N*-Dibutylamid **10j** byl připraven za účelem prověření vlivu přítomnosti vodíkového atomu na tomto amidovém uskupení. 1,2-Diaminoethanové uskupení v případě sloučeniny **10i** bylo zvoleno z několika důvodů, jedním důvodem bylo, že volná aminoskupina může zvýšit rozpustnost zkoumaných sloučenin ve vodě, případně ovlivnit schopnost sloučenin pronikat přes buněčnou stěnu bakterií. Dalším důvodem byl fakt, že volná aminoskupina představuje reaktivní uskupení, které může být dále modifikováno, čímž je otevřena cesta k přípravě složitějších struktur. Motiv 1,2-diaminoethanu se již vyskytuje u některých známých sloučenin s antibakteriálními účinky, např. v molekule antibiotika ceftolozanu nebo tuberkulostatika ethambutolu. byl však pozorován i u některých sloučenin zmíněných v rešeršní části mé diplomové práce. Dosud známé anthranilové kyseliny s antimikrobním účinkem se vážou na sérový albumin, vzhledem k faktu, že na albumin se vážou sloučeniny kyselé a neutrální, amidy **10**, které nesou navíc aminoskupinu, by mohly vykazovat výhodnější vlastnosti.

První fází testování protimikrobních účinků připravených sloučenin bylo provedení orientačních testů agarovou difuzní metodou. K těmto pokusům byly vybrány amidy **10a** – **k**, kyseliny **3b**, **3c**, **7a** a **7b** a jeden benzoxazinon **9b**. Testy byly provedeny standardní metodikou a jsou podrobně popsány v experimentální části. Vznik inhibiční zóny indikoval protimikrobní účinek zkoušených sloučenin. K testování byla zvolena kvasinková kultura *Candida albicans* CCM 8275, gramnegativní bakterie *Escherichia coli* CCM 3954 a *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955, kultura grampozitivní bakterie *Staphylococcus aureus* CCM 3953 a zástupce plísně *Aspergillus niger* CCM 8155. Výsledky agarových difuzních testů pro sloučeniny **10a** – **g** jsou uvedeny v tabulce níže (Tabulka 10).

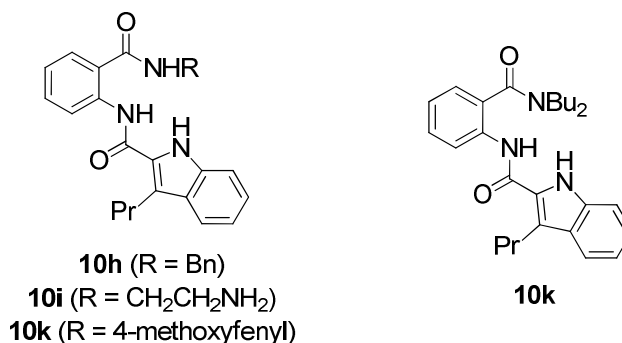


Tabulka 10. Inhibiční zóny v mm, agarová difuzní metoda, sloučeniny **10a** – **g**.

<b>10</b>	<i>C. albicans</i> CCM 8275	<i>P. aeruginosa</i> CCM 3955	<i>S. aureus</i> CCM 3953	<i>E. coli</i> CCM 3954	<i>A. niger</i> CCM 8155
<b>a</b>	2,7±0,3	-	2,3±0,3	-	-
<b>b</b>	-	5,0±1,3	3,7±0,6	2,5	-
<b>c</b>	2,7±0,3	3,3±0,6	-	-	-
<b>d</b>	-	4,3±0,8	3,6±0,3	0,2±0,3	-
<b>e</b>	-	-	-	-	-
<b>f</b>	2,3±0,6	-	-	-	-
<b>g</b>	-	4,2±0,6	-	-	-

Až na dimethoxyderivát **10e** všechny amidy **10a** – **g** vykazovaly určitou protimikrobní aktivitu, žádná ze sloučenin však nepůsobila na kulturu plísně *A. niger*. Zajímavé je, že sloučeniny **10b** – **d** a **10g** výrazně inhibovaly růst bakterie *P. aeruginosa*, která byla do testů zařazena z důvodu, že je obecně velmi odolná vůči antibakteriálním sloučeninám. Nejvýraznější inhibiční zóny v této sérii vyvolávala sloučenina **10b**.

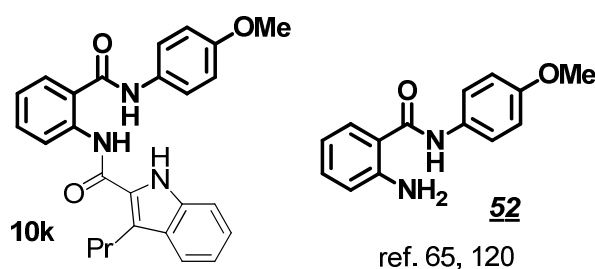
U sloučenin s obměněným amidovým uskupením **10h** – **k** (Tabulka 11) byla pozorována neobvykle výrazná antibakteriální aktivita u amidu **10i**. Sloučeniny **10h** a **10k** byly neúčinné, poměrně výrazná inhibiční zóna byla pozorována u dibutylamidu **10k**, ale pouze v případě grampozitivního stafylokoka. Sloučenina **10i** navíc vytvářela inhibiční zónu i v případě plísně *Aspergillus niger* CCM 8155.



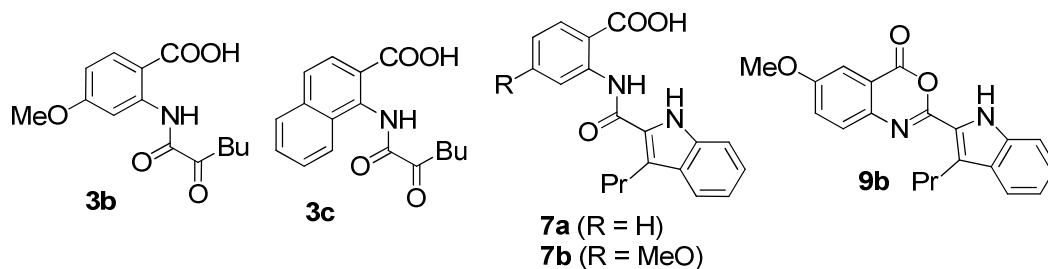
Tabulka 11. Inhibiční zóny v mm, agarová difuzní metoda, sloučeniny **10h** – **k**.

<b>10h – k</b>	<i>C. albicans</i> CCM 8275	<i>P. aeruginosa</i> CCM 3955	<i>S. aureus</i> CCM 3953	<i>E. coli</i> CCM 3954	<i>A. niger</i> CCM 8155
<b>h</b>	-	-	-	-	-
<b>i</b>	4,7±0,3	5,0±0,5	14,5±0,5	10,0±0,5	3,0
<b>j</b>	-	-	5,2±0,3	-	-
<b>k</b>	-	-	-	-	-

Kromě toho, že v těchto experimentech byla zachycena výrazná antibakteriální aktivita sloučeniny **10i**, je zajímavé, že anilid **10k** nevykazoval žádnou antimikrobiální aktivitu, přestože jeho struktura vycházela z účinných anilidů vůči bakteriím popsáných v literatuře. Tato skutečnost potvrzuje představy autorů původního sdělení o farmakoforu zmíněných anilidů a naznačuje, že sloučeniny popsané v mé diplomové práci představují odlišný farmakofor.



V orientačních plotnových testech byla posuzována i případná antimikrobiální aktivita několika ostatních připravených sloučenin. Benzoxazinon **9b** nevykazoval v těchto testech žádnou protimikrobiální aktivitu, nicméně u kyselin **3** a **7** byla antibakteriální aktivita zjištěna.



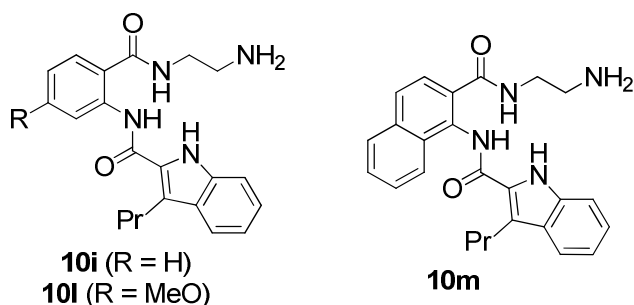
Tabulka 12. Inhibiční zóny v mm, agarová difuzní metoda, sloučeniny **3**, **7** a **9**.

	<i>C. albicans</i> CCM 8275	<i>P. aeruginosa</i> CCM 3955	<i>S. aureus</i> CCM 3953	<i>E. coli</i> CCM 3954	<i>A. niger</i> CCM 8155
<b>3b</b>	2,0±0,8	2,5	4,3±0,3	-	-
<b>3c</b>	-	-	5,2±0,3	-	-
<b>7a</b>	-	2,5	7,5	-	-
<b>7b</b>	-	-	6,3±0,3	-	-
<b>9b</b>	-	-	-	-	-

Lze si povšimnout, že indolový derivát **7b** způsoboval větší inhibiční zónu v případě kultury *Staphylococcus aureus* než příslušná ketoacylanthranilová kyselina **3b**, která inhibovala také růst testované kvasinky *C. albicans* a bakterie *P. aeruginosa*.

Zajímavé výsledky testů na agarových plotnách mne vedly nejen k provedení podrobnějších mikrobiologických pokusů se sloučeninou **10i**, ale také k dodatečné syntéze dalších dvou amidů, které ve své struktuře obsahují 1,2-diaminoethanový motiv. Jedná se o sloučeniny **10l** a **10m**, jejichž příprava je popsána výše.

Vzhledem k orientační povaze této metody jsem se rozhodla další mikrobiologické pokusy provést diluční metodou v mikrotitračních destičkách. Mezi kultury zkoušených mikroorganismů jsem po dohodě s doc. RNDr. Janem Růžičkou, Ph.D. zařadila ještě další kulturu grampozitivní bakterie *Enterococcus faecalis* CCM 4224, která je známa pro svou odolnost vůči antibakteriálním sloučeninám. Se sloučeninou **10i** jsem nejprve provedla experimenty s větším rozsahem testovaných koncentrací sloučeniny (0 – 5 g.L<sup>-1</sup>), vzhledem k zjištěným nízkým inhibičním koncentracím byly další experimenty provedeny i s užším koncentračním rozsahem. Získané hodnoty MIC syntetizovaných látek jsou uvedeny v tabulce níže (Tabulka 13).



Tabulka 13. Zjištěné hodnoty MIC pro sloučeniny **10i**, **10l** a **10m**.

Hodnoty MIC [mg.L <sup>-1</sup> ] ([μmol.mL <sup>-1</sup> ])					
<b>10</b>	<i>C. albicans</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>En. faecalis</i>
	CCM 8275	CCM 3955	CCM 3953	CCM 3954	CCM 4224
<b>i</b>	500 (1372)	500 (1372)	100 (274)	200 (549)	150 (412)
<b>l</b>	15 (38)	20 (51)	10 (25)	20 (51)	15 (38)
<b>m</b>	15 (36)	20 (48)	10 (24)	20 (48)	20 (48)

Z výsledků těchto pokusů je zřejmé, že navržené sloučeniny **10l** a **10m** vykazují mimořádnou schopnost inhibovat růst bakterií. Navržená změna struktury **10i** vedla v některých případech k desetinásobně větší antibakteriální aktivitě. Uvedené hodnoty MIC v rozsahu 10 – 20 mg.L<sup>-1</sup> jsou mnohem nižší než u řady přírodních i syntetických derivátů kyseliny anthranilové (Příloha 1 – 4) a řadí tyto sloučeniny mezi několik málo vysoce účinných antimikrobiálních derivátů kyseliny anthranilové, které byly popsány v mezinárodní literatuře. Jedná se také o první 2-aminobenzamidy tohoto typu, které navíc vykazují podstatně větší účinnost než původní volné anthranilové kyseliny. Překvapivá je i schopnost účinně inhibovat růst kultur odolných bakterií *Pseudomonas aeruginosa* a *Enterococcus faecalis*. V kultivačních experimentech v Petriho miskách byly následně zjištěny i hodnoty minimálních baktericidních koncentrací (MBC), které jsou uvedeny v tabulce níže (Tabulka 14).

Tabulka 14. Zjištěné hodnoty MBC pro sloučeniny **10i**, **10l** a **10m**.

Hodnoty MBC [mg.L <sup>-1</sup> ] ([μmol.mL <sup>-1</sup> ])				
<b>10</b>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. faecalis</i>
	CCM 3955	CCM 3953	CCM 3954	CCM 4224
<b>i</b>	2500 (6860)	200 (549)	1000 (2744)	500 (1372)
<b>l</b>	200 (507)	150 (380)	20 (51)	100 (254)
<b>m</b>	150 (362)	150 (362)	20 (48)	>150 (>362)

Zajímavé je, že baktericidní účinek sloučenin **10i** a **10m** se projevil zejména u gramnegativní *Escherichia coli* CCM 3954, u ostatních bakterií byla MBC vyšší. *Pseudomonas aeruginosa* je poměrně odolná gramnegativní bakterie, zajímavé jsou však vyšší hodnoty MBC u kultury grampozitivní bakterie *Staphylococcus aureus* CCM 3953. Tento výsledek by však byl vysvětlitelný, pokud by sloučeniny **10i** a **10m** opravdu inhibovaly bakteriální enzym KAS III, který se u bakterií podílí na biosyntéze lipidů. Biosyntéza lipidů je totiž esenciální pro bakterie gramnegativní. Výrazné inhibiční účinky vůči *P. aeruginosa* by se pak daly vysvětlit ovlivněním *quorum sensingu* inhibicí podobného homologního enzymu PqsD. Experimenty s inhibicí bakteriálních enzymů však z technických důvodů nebylo možné provést. Sloučeniny **10i** a **10m** by tedy mohly být předlohou pro vývoj antibakteriálních látek proti gramnegativním bakteriím. To je také zajímavý poznatek, protože v odborné literatuře byl často účinek derivátů kyseliny anthranilové zkoumán hlavně vůči bakterii *Staphylococcus aureus*.

U sloučenin **10i**, **10l** a **10m** byl zkoumán také jejich fungicidní účinek. Všechny tři sloučeniny byly podrobeny testům účinnosti na kulturu kvasinek *Candida albicans* CCM 8275. Proti *Aspergillus niger* CCM 8155 byly testovány látky **10i** a **10l**, kdy účinnost látky **10i** byla současně zkoušena také vůči plísni *Trichoderma viride* CCM F-486 metodou přidavku látky do agarového média. Byla zjišťována minimální fungistatická koncentrace vůči těmto vláknitým mikromycetám. Minimální fungicidní koncentrace sloučenin jsou uvedeny v tabulce níže (Tabulka 15).

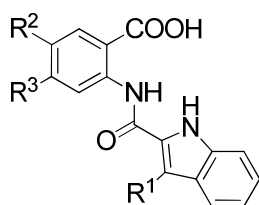
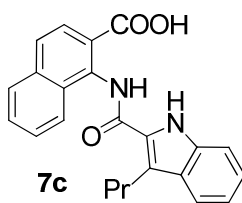
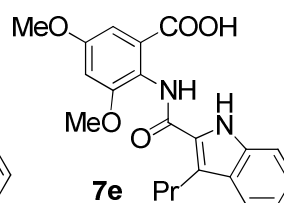
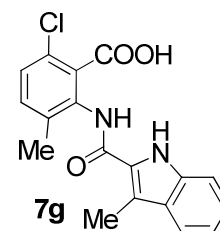
Tabulka 15. Zjištěné hodnoty MFC pro sloučeniny **10i**, **10l** a **10m**.

Hodnoty MFC [mg.L <sup>-1</sup> ] ([μmol.mL <sup>-1</sup> ])			
<b>10</b>	<i>C. albicans</i>	<i>A. niger</i>	<i>T. viride</i>
	CCM 8275	CCM 8155	CCM F-486
<b>i</b>	1000 (2744)	750 (2058)	350 (960)
<b>l</b>	75 (190)	375 (951)	-
<b>m</b>	100 (241)	-	-

Sloučeniny **10i** a **10l** působily při vyšších koncentracích také fungicidně, pozoruhodné bylo, že v nižších než fungicidních koncentracích sloučeniny **10i** a **10l** způsobovaly výrazně modifikovaný růst vláknité plísňe *A. niger*, kdy plíseň přestala sporulovat. Přesto lze konstatovat, že zkoumané sloučeniny **10** vykazují především výrazné antibakteriální účinky.

Jak bylo zmíněno v textu výše, v orientačních testech na agarových plotnách vykazovaly antibakteriální aktivitu také některé kyseliny **3** a **7**. Jelikož sloučeniny **7** vznikaly jako vedlejší produkty přípravy benzoxazinonů **9** a měla jsem tak k dispozici sérii těchto látek, rozhodla jsem je také otestovat diluční metodou v mikrotitračních destičkách. Zvolila jsem rozsah koncentrací od 8 mg.L<sup>-1</sup> do 512 mg.L<sup>-1</sup>. Zjištěné minimální inhibiční koncentrace jsou uvedeny v tabulce níže (

Tabulka 16). Sloučeninu **7h** jsem nepřipravovala, za účelem testování protimikrobní aktivity mi byla poskytnuta vedoucím práce.

**7a** (R<sup>1</sup> = Pr, R<sup>2</sup> = H, R<sup>3</sup> = H)**7b** (R<sup>1</sup> = Pr, R<sup>2</sup> = H, R<sup>3</sup> = MeO)**7d** (R<sup>1</sup> = Me, R<sup>2</sup> = MeO, R<sup>3</sup> = H)**7f** (R<sup>1</sup> = Me, R<sup>2</sup> = Me, R<sup>3</sup> = H)**7h** (R<sup>1</sup> = Pr, R<sup>2</sup> = H, R<sup>3</sup> = MeO)**7c****7e****7g**

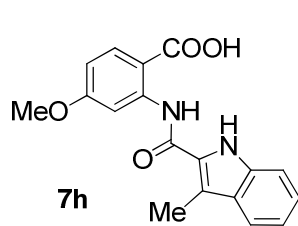


Tabulka 16. Zjištěné MIC pro kyseliny **7** vůči vybraným mikroorganismům.

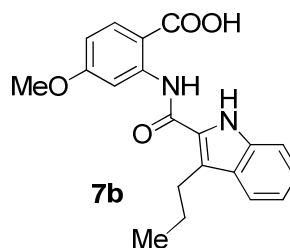
Hodnoty MIC [mg.L <sup>-1</sup> ] ([μmol.mL <sup>-1</sup> ])					
<b>7</b>	<i>C. albicans</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>En. faecalis</i>
	CCM 8275	CCM 3955	CCM 3953	CCM 3954	CCM 4224
<b>a</b>	512 (1588)	512 (1588)	>512 (>1588)	512 (1588)	>512 (>1588)
<b>b</b>	128 (363)	64 (182)	512 (1453)	128 (363)	256 (726)
<b>c</b>	64 (172)	128 (344)	512 (1375)	128 (344)	128 (344)
<b>d</b>	128 (395)	128 (395)	256 (789)	256 (789)	256 (789)
<b>e</b>	512 (1339)	512 (1339)	>512 (>1339)	>512 (>1339)	>512 (>1339)
<b>f</b>	128 (415)	256 (830)	512 (1661)	256 (830)	>512 (>1661)
<b>g</b>	256 (747)	256 (747)	512 (1494)	512 (1494)	512 (1494)
<b>h</b>	128 (395)	128 (395)	256 (789)	256 (789)	256 (789)

Z výsledků je zřejmé, že substituce na aromatickém kruhu anthranilových kyselin **7** výrazně ovlivňuje jejich případnou antibakteriální aktivitu. Nesubstituovaná sloučenina **7a** a kyseliny **7e** a **7g** vykazují jen nepatrné antibakteriální účinky. Výraznější schopnost inhibovat růst bakterií vykazují sloučeniny **7b-d** a **7h**. Shodnou antibakteriální aktivitu vykazují methoxyderiváty **7d** a **7h**, které se od sebe liší jen polohou methoxylové skupiny. U naftalenového derivátu **7c** byla pozorována i potenciálně zajímavá antifungální aktivita vůči kultuře kvasinky *Candida albicans*.

Ve své práci jsem sledovala substituce na aromatickém kruhu kyseliny anthranilové, ale substituentu v poloze 3 indolového kruhu byla věnována jen malá pozornost. O to více překvapivý byl rozdíl v minimálních inhibičních koncentracích mezi sloučeninami **7h** a **7b**, které se liší pouze délkou řetězce na indolovém kruhu.

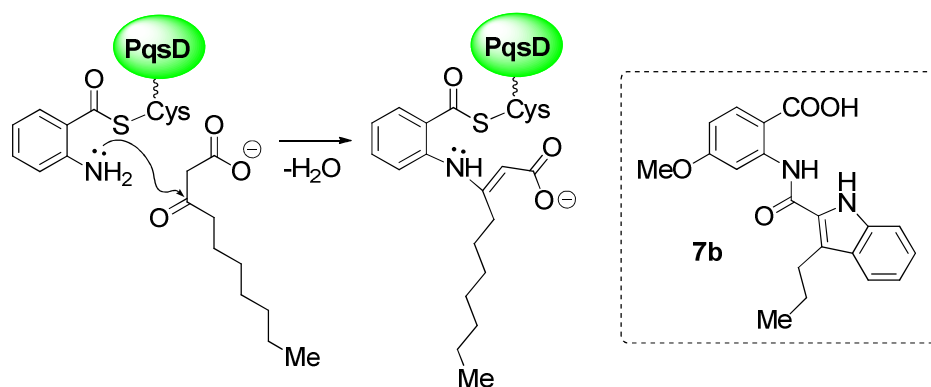


MIC *P. aeruginosa* = 128 mg/L  
MIC *E. coli* = 256 mg/L



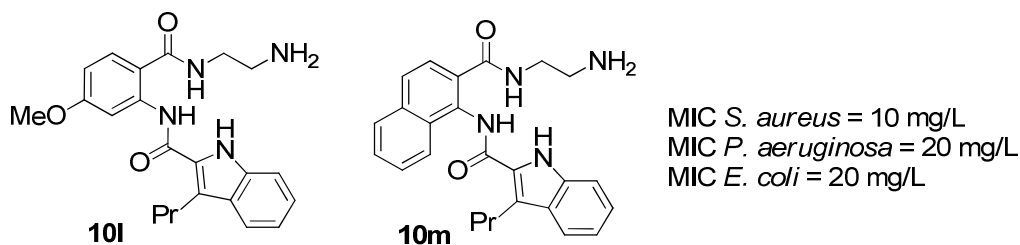
MIC *P. aeruginosa* = 64 mg/L  
MIC *E. coli* = 128 mg/L

Sloučenina **7b** vykazuje dvojnásobnou antibakteriální aktivitu vůči testovaným gramnegativním bakteriím, zároveň se proti sloučenině **7h** snížila její schopnost inhibovat růst grampozitivní bakterie *S. aureus*. Zdá se tedy, že další modifikace alifatického řetězce na indolovém systému by mohla vést k vývoji ještě účinnějších sloučenin. Zjištěná skutečnost je také teoreticky v souladu s možností, že sloučeniny ovlivňují bakteriální enzym KAS III a jeho homolog PqsD, vyskytující se u pseudomonád. Na obrázku níže (Obrázek 2) je ukázka jednoho z reakčních kroků biosyntézy signální molekuly pseudomonád, kterou katalyzuje enzym PqsD, pro porovnání je uveden také vzorec sloučeniny **7b**.



Obrázek 2. Jedna z reakcí katalyzovaná enzymem PqsD a sloučenina **7b**.

V provedených mikrobiologických testech jsem tedy dospěla k zajímavým poznatkům, které by mohly být využity k vývoji nových antibakteriálních sloučenin založených na derivátech kyseliny anthranilové. Byly připraveny dva amidy **10l** a **10m**, u kterých byla zjištěna výrazná antibakteriální aktivita. Bylo také pozorováno, že i drobné změny ve struktuře zkoumaných látek výrazně ovlivňovaly jejich antibakteriální aktivitu. Poznatky o vlivu substituentů na antibakteriální účinnost derivátů kyseliny anthranilové by při dalším výzkumu mohly vést k ještě účinnějším antibakteriálním sloučeninám.



## **II. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

### 3 CHEMICKÉ EXPERIMENTY

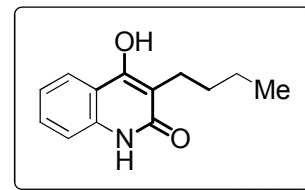
Stanovení bodů tání bylo provedeno pomocí mikroskopu s ohřívacím stolcem PolyTherm (Helmut Hund GmbH, Wetzlar), body tání nebyly korigovány. Chromatografie na tenké vrstvě (TLC) byla provedena na foliích ALUGRAM® SIL G/UV254 (0,2 mm silná vrstva silikagelu Kieselgel 60, fluorescenční indikátor pro UV 254 nm na hliníkové folii, MACHEREY-NAGEL & Co. KG Düren, Německo). Elementární analýzy byly provedeny na přístroji Flash EA 1112 Automatic Elemental Analyzer (Thermo Fisher Scientific Inc.). IČ spektra byla změřena na přístroji Thermo Scientific Nicolet iS10 FT-IR Spectrometer technikou KBr tablet. Absorpční pásy jsou označovány takto: s (silný), m (střední), w (slabý). Hmotnostní spektra s ionizací EI (EIMS) byla zaznamenána na přístroji GC-MS QP2010 (Shimadzu). Hmotnostní spektra s vysokým rozlišením byla změřena sestavou Agilent 6224 Accurate Mass TOF LC/MS s elektrosprejovou ionizací. Spektra NMR byla pořízena v DMSO- $d_6$  při 296 K na přístroji Bruker Avance III 500 MHz NMR při frekvencích 500 MHz ( $^1\text{H}$ ), 126 MHz ( $^{13}\text{C}$ ) a 51 MHz ( $^{15}\text{N}$ ).  $^1\text{H}$  chemické posuny byly vztaženy vůči signálu DMSO- $d_5$  (2,50 ppm) a  $^{13}\text{C}$  chemické posuny byly vztaženy vůči signálu DMSO- $d_6$  (39,5 ppm). Chemické posuny jsou uvedeny ve stupnici  $\delta$  (ppm). Interakční konstanty ( $J$ ) jsou uvedeny v Hz. Multiplicity jsou označeny takto: s (singlet), d (dublet), t (triplet), q (kvartet), m (multiplet), br (rozšířený).

#### 3.1 3-Butyl-4-hydroxychinolin-2(1H)-ony (1)

Reakční směs obsahující příslušný aminobenzen (100 mmol) a diethyl-butylmalonát (105 mmol) byla v destilační aparatuře na kovové lázni postupně zahřívána na 265–270 °C. Při reakci vznikal ethanol, který byl jímán v předloze a jeho hmotnost sloužila jako indikátor průběhu reakce. Při uvedené teplotě byla reakční směs udržována, dokud neustala destilace ethanolu (2–7 h). Následně byla horká reakční směs nalita do toluenu (50 mL). Po vychladnutí byla vyloučená pevná fáze odsáta na fritě a rozpuštěna v 0,5 M vodném roztoku hydroxidu sodného (500 mL). Tento roztok byl extrahován toluenem (2 x 15 mL) a následně okyselen 10% kyselinou chlorovodíkovou do slabě kyselé reakce na univerzální indikátorový papír. Okyselení roztoku vedlo k vyloučení 4-hydroxychinolonu **1** v podobě objemné bílé pevné fáze, která byla odsáta na fritě, důkladně promyta vodou (celkem 200 mL) a vysušena v sušárně při 50 °C.

**3-Butyl-4-hydroxychinolin-2(1H)-on (1a)**

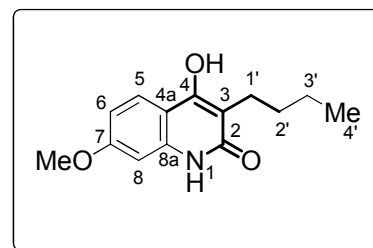
Doba reakce 7 h, výtěžek 19,816 g (90 %), bílý prášek, b.t. 197–203 °C,  $R_f = 0,42$  (5% ethanol v chloroformu), 0,66 (10% ethanol v chloroformu). V literatuře<sup>149</sup> je uveden b.t. 195–201 °C.



IČ (ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\tilde{\nu}$  2958(w), 1661(m), 1610(s), 1580(s), 1537(m), 1377(m), 1332(w), 1295(w), 1256(w), 1233(w), 1205(s), 1138(s), 1119(w), 1088(w), 1051(w), 1030(m), 971(w), 872(w), 841(w), 823(m), 789(w), 777(w), 758(w), 717(w), 672(w), 612(m), 423(m). Spektrum je shodné se spektrem<sup>149</sup> autentické sloučeniny.

**3-Butyl-4-hydroxy-7-methoxychinolin-2(1H)-on (1b)**

Doba reakce 2 h, výtěžek 21,430 g (82 %), bezbarvé krystaly, b.t. 203–210 °C (ethanol),  $R_f = 0,26$  (5% ethanol v chloroformu),  $R_f = 0,61$  (10% ethanol v chloroformu).



<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>; 500 MHz):  $\delta$  0,88 (t, 3H,  $J = 7,1$  Hz, H4'), 1,23-1,46 (m, 4H, H3' a H2'), 2,51-2,53 (m, 2H, H1'), 3,78 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 6,70-6,79 (m, 2H, H6 a H5), 7,79 (d, 1H,  $J = 8,7$  Hz, H8), 9,88 (s, 1H, OH), 11,10 (s, 1H, H1).

<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>; 126 MHz):  $\delta$  14,5 (C4'), 22,7 (C3'), 23,1 (C2'), 31,0 (C1'), 55,7 (OCH<sub>3</sub>), 98,2 (C4a), 109,7 (C5), 109,8 (C6), 110,0 (C8), 124,5 (C8a), 139,4 (C7), 157,6 (C3), 160,9 (C2), 164,4 (C4).

IČ (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\tilde{\nu}$  3456(w), 3135(m), 2960(m), 1637(s), 1560(s), 1597(s), 1508(m), 1479(m), 1442(m), 1425(w), 1390(w), 1376(w), 1349(w), 1266(m), 1226(s), 1182(m), 1154(m), 1113(w), 1032(w), 859(w), 484(w), 460(w).

MS (EI): 248(5, [M+1]<sup>+</sup>), 247(28, M<sup>+</sup>), 232(6, [M-15]<sup>+</sup>), 230(12), 218(26, [M-29]<sup>+</sup>), 206(13), 205(100), 204(61, [M-43]<sup>+</sup>), 191(29), 150(14), 55(15)  $m/z$ (%).

HRMS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  vypočteno pro C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>NO<sub>3</sub><sup>+</sup> [M + H]<sup>+</sup> 248,1281, nalezeno 248,1283.

Pro C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>3</sub> (247,29)

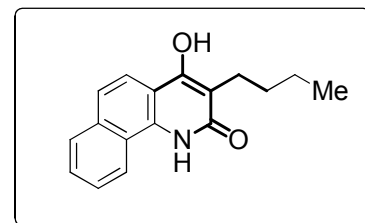
vypočteno: 68,00 % C, 6,93 % H, 5,66 % N;

nalezeno: 67,80 % C, 7,12 % H, 5,49 % N.

**3-Butyl-4-hydroxybenzo[*h*]chinolin-2(1*H*)-on (1c)**

Doba reakce 2,5 h, výtěžek 25,030 g (82 %), bezbarvé krystaly, b.t. 300–308 °C,  $R_f = 0,46$  (5% ethanol v chloroformu), 0,71 (10% ethanol v chloroformu). V literatuře<sup>149</sup> je uveden b.t. 309–313 °C (ethanol).

IČ (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\tilde{\nu}$  3145(w), 3048(w), 2956(w), 2931(w), 1621(s), 1591(s), 1565(s), 1435(w), 1387(w), 1319(m), 1202(w), 1160(w), 1144(w), 805(w). Spektrum je shodné se spektrem<sup>149</sup> autentické sloučeniny.

**3.2 3-Butyl-3-hydroxychinolin-2,4(1*H*,3*H*)-diony (2)**

Výchozí 4-hydroxychinolon **1** (40 mmol) byl rozpuštěn v 0,5M vodném roztoku NaOH (240 mL). Připravený roztok byl vychlazen v lázni se studenou vodou a z přikapávací nálevky k němu byl postupně (během 1 h) přikapán 35% roztok kyseliny peroxyoctové (20 mL). Reakční směs pak byla nechána v klidu v chladničce při 6,5 °C, načež byla vyloučená pevná fáze odsáta na fritě a důkladně promyta 5% vodným roztokem  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (5 x 30 mL) a pak vodou (100 mL). Pro další reakci nebylo nutné produkt čistit.

**3-Butyl-3-hydroxy-7-methoxychinolin-2,4(1*H*,3*H*)-dion (2b)**

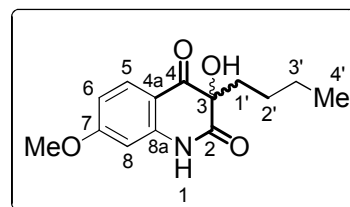
Výtěžek 6,977 g (66 %), nažloutlé krystalky, b.t. 168–171 °C (cyklohexan),  $R_f = 0,44$  (5% ethanol v chloroformu), 0,68 (10% ethanol v chloroformu).

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ ; 500 MHz):  $\delta$  0,76 (t, 3H,  $J = 6,9$  Hz, H4'), 1,14-1,22 (m, 4H, H3' a H2'), 1,60-1,75 (m, 2H, H1'), 3,81 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 5,60 (s, 1H, OH), 6,56 (d, 1H,  $J = 2,2$  Hz, H6), 6,68 (dd, 1H,  $J = 2,2$  Hz, H5), 7,67 (d, 1H,  $J = 8,7$  Hz, H8), 10,70 (s, 1H, H1).

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ ; 126 MHz):  $\delta$  14,2 (C4'), 22,5 (C3'), 25,2 (C2'), 39,5 (C1'), 56,1 ( $\text{OCH}_3$ ), 81,4 (C4a), 100,4 (C5), 110,2 (C6), 113,0 (C8), 129,5 (C7), 144,0 (C8a), 165,6 (C3), 173,7 (C2), 194,8 (C4).

IČ (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\tilde{\nu}$  3462(w), 3249(m), 2954(w), 2870(w), 1711(s), 1665(s), 1610(s), 1588(m), 1482(w), 1459(w), 1442(w), 1407(w), 1352(m), 1265(m), 1206(m), 1170(w), 1120(w), 1106(w), 1090(w).

HRMS (ESI+):  $m/z$  vypočteno pro  $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{NO}_4^+$   $[\text{M} + \text{H}]^+$  264,1230, nalezeno 264,1232.

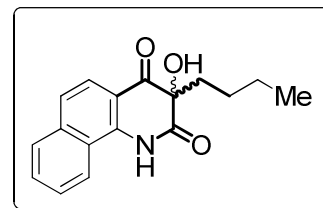


**3-Butyl-3-hydroxybenzo[*h*]chinolin-2,4(1*H*,3*H*)-dion (2c)**

Výtěžek 8,365 g (74 %), bílý prášek, b.t. 115–125 °C,  $R_f = 0,64$  (5% ethanol v chloroformu), 0,80 (10% ethanol v chloroformu).

V literatuře byl popsán<sup>149</sup> b.t. 117–121 °C (benzen).

IČ (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\tilde{\nu}$  3569(m), 3490(m), 3321(w), 3246(w), 2952(w), 1705(s), 1663(s), 1627(m), 1603(w), 1579(w), 1528(w), 1480(m), 1439(w), 1426(w), 1414(w), 1367(w), 1242(w), 1231(w), 1191(w), 1172(w), 818(w), 799(w), 568(w), 452(w). Spektrum je shodné<sup>149</sup> se spektrem autentické sloučeniny.

**3.3 2-[(2-Oxohexanoyl)amino]benzoové kyseliny (3)**

Výchozí 4-hydroxychinolin-2,4-dion **2** (25 mmol) byl rozpuštěn v ethanolu (100 mL) v 500 mL Erlenmayerově baňce, do roztoku bylo vloženo míchadlo a za intenzivního míchání na magnetické míchačce k němu byl postupně během 10 minut přidán roztok kyseliny pentahydrogenjodisté (75–100 mmol) ve vodě (100 mL). Reakční směs pak byla míchána při pokojové teplotě, dokud v ní byl přítomen dion **2** (TLC). Vyloučená pevná kyselina **3** byla odsáta na fritě, promyta vodou (200 mL) a vysušena při 50 °C. Takto byla získána surová 2-[(2-oxohexanoyl)amino]benzoová kyselina, která byla podle potřeby dále krystalizována.

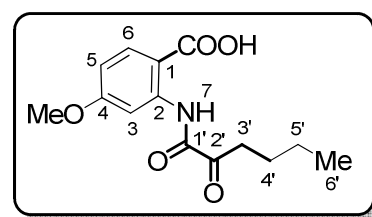
**4-Methoxy-2-[(2-oxohexanoyl)amino]benzoová kyselina (3b)**

Reakce probíhala 7 dní, výtěžek 6,523 g (93 %), bílá pevná látka, b.t. 148–155 °C,  $R_f = 0,43$  (5% ethanol v chloroformu), 0,65 (10% ethanol v chloroformu).

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ; 500 MHz):  $\delta$  0,89 (t, 3H,  $J = 7,3$  Hz, H6'), 1,27-1,37 (m, 2H, H5'), 1,48-1,57 (m, 2H, H4'), 2,92

(t, 2H,  $J = 7,3$  Hz, H3'), 3,83 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 6,79 (dd, 1H,  $J = 8,9, 2,5$  Hz, H3), 7,98 (d, 1H,  $J = 8,9$  Hz, H5), 8,29 (d, 1H,  $J = 2,5$  Hz, H7), 12,47 (s, 1H, COOH), 13,43 (s, 1H, H7).

$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ; 126 MHz):  $\delta$  14,2 (C6'), 22,1 (C5'), 25,3 (C4'), 35,9 (C3'), 39,5 (C3), 56,0 (OCH<sub>3</sub>), 105,1 (C5), 109,8 (C1), 133,8 (C6), 141,8 (C2), 159,3 (C4), 164,0 (C1'), 169,5 (C2'), 198,5 (COOH).

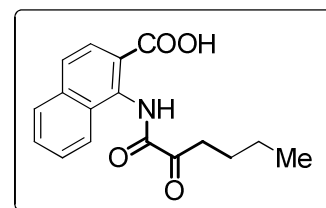


IČ (ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\tilde{\nu}$  1662(m), 1610(m), 1580(m), 1537(m), 1377(w), 1233(w), 1205(s), 1139(s), 1119(m), 1088(m), 1051(w), 1030(m), 971(w), 841(w), 823(m), 789(w), 777(w), 717(m), 672(w), 612(m), 548(w), 491(w), 423(w).

HRMS (ESI+):  $m/z$  vypočteno pro  $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{NO}_5^+$   $[\text{M} + \text{H}]^+$  280,1179, nalezeno 280,1182.

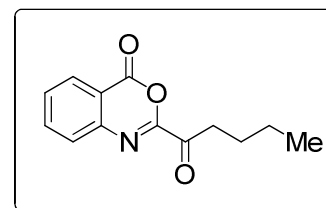
### 1-[(2-Oxohexanoyl)amino]naftalen-2-karboxylová kyselina (3c)

Reakce probíhala 5 dní, výtěžek překrystalizovaného produktu 5,448 g (73 %), bezbarvé jehlice, b.t. 107–112 °C (benzen),  $R_f = 0,18$  (5% ethanol v chloroformu), 0,40 (10% ethanol v chloroformu). V literatuře<sup>149</sup> je uveden b.t. 98–105 °C (cyklohexan).



IČ (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\tilde{\nu}$  3293(w), 3055(w), 2961(m), 2877(w), 1727(w), 1694(s), 1674(s), 1626(w), 1600(w), 1571(m), 1501(m), 1465(w), 1432(w), 1409(m), 1389(w), 1339(w), 1284(m), 1258(s), 1176(w), 1124(w), 765(m). Spektrum je shodné<sup>149</sup> se spektrem autentické sloučeniny. 2-Pentanoyl-4*H*-benzo[*d*][1,3]oxazin-4-on (4)

Ke směsi kyseliny **3a** (2,999 g; 12,029 mmol) a toluenu (20 mL) byl v kapkové baňce opatrně po částech během 5 minut přidán acetanhydrid (20 mL, 21,6 g, 0,21 mol) a suspenze byla vařena pod zpětným chladičem se sušící rourkou s náplní  $\text{CaCl}_2$  6



hodin. Po uvedené době nebyla ve směsi detegovatelná kyselina **3a** (TLC). Těkavé složky reakční směsi byly odpařeny ve vakuu. Tuhý zbytek byl suspendován ve studeném ethanolu (10mL), odsát a vysušen při 50 °C. Bylo získáno 2,671 g (96 %) sloučeniny **4**, bezbarvé krystalky, b.t. 231–234 °C (cyklohexan),  $R_f = 0,69$  (5% ethanol v chloroformu), 0,78 (10% ethanol v chloroformu), 0,41 (20% ethyl-acetát v benzenu).

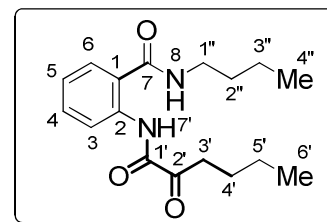
IČ (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\tilde{\nu}$  3012(w), 2957(m), 2860(m), 1770(s), 1662(s), 1612(m), 1578(m), 1500(m), 1467(w), 1434(m), 1370(m), 1327(w), 1263(w), 1199(s), 1179(s), 1137(s), 1099(m), 1055(m), 1035(w), 1004(w), 896(w), 858(w), 760(m), 706(w), 644(w).

## 3.4 Příprava 2-[(2-oxoalkanoyl)amino]benzamidů (5)

### *N*-Butyl-2-[(2-oxohexanoyl)amino]benzamid (5a)



K suspenzi benzoxazinonu **4** (2,661 g; 11,51 mmol) v toluenu (15 mL) byl přidán roztok butylaminu (932 mg; 12,6 mmol) v toluenu (15 mL). Vzniklý roztok byl ponechán v klidu 6 h. Po této době nebyla v roztoku detegovatelná (TLC) výchozí sloučenina **4**. Těkavé složky reakční směsi byly odpařeny ve



vakuu. Olejovitý zbytek (3,752 g) byl rozpuštěn v dichlormethanu (40 mL). Roztok byl extrahován nejprve 5% kyselinou chlorovodíkovou (3 x 10 mL) a pak vodou (3 x 10 mL) a poté byl sušen ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ). Po odfiltrování sušidla bylo rozpouštědlo odpařeno ve vakuu a krystalizací zbytku z cyklohexanu (250 mL) bylo získáno 3,112 g (89 %) sloučeniny **5a**, bílý prášek, b.t. 200–208 °C (cyklohexan),  $R_f = 0,73$  (5% ethanol v chloroformu), 0,94 (10% ethanol v chloroformu).

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ; 500 MHz):  $\delta$  0,85-0,95 (m, 6H, H6' a H4''), 1,28-1,37 (m, 4H, H5' a H3''), 1,47-1,57 (m, 4H, H4' a H2''), 2,91 (t, 2H,  $J = 7,2$  Hz, H3'), 3,27 (dd, 2H,  $J = 12,8, 6,8$  Hz, H1''), 7,22 (t, 1H,  $J = 7,4$  Hz, H3), 7,55 (t, 1H,  $J = 7,5$  Hz, H6), 7,78 (d, 1H,  $J = 7,3$  Hz, H4), 8,56 (d, 1H,  $J = 8,2$  Hz, H5), 8,78 (s, 1H, H8), 12,42 (s, 1H, H7').

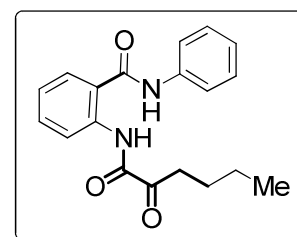
$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ; 126 MHz):  $\delta$  13,7 (C6'), 13,8 (C4''), 19,6 (C5'), 21,6 (C3''), 24,9 (C4'), 30,9 (C2''), 35,5 (C3'), 39,0 (C1''), 119,9 (C3), 121,6 (C1), 123,5 (C5), 128,2 (C6), 131,9 (C4), 137,5 (C2), 158,5 (C2'), 167,7 (C1'), 198,4 (C7).

IČ (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\tilde{\nu}$  3101(m), 2955(s), 2868(m), 1640(s), 1604(s), 1557(m), 1503(m), 1480(w), 1469(m), 1426(m), 1404(m), 1366(w), 1273(m), 1196(s), 1154(s), 1115(w), 1102(w), 1057(w), 880(w), 762(s), 716(w), 658(w).

HRMS (ESI+):  $m/z$  vypočteno pro  $\text{C}_{17}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_3^+$   $[\text{M} + \text{H}]^+$  305,1860, nalezeno 305,1857.

#### **N-Fenyl-2-[(2-oxohexanoyl)amino]benzamid (5b)**

K suspenzi benzoxazinonu **4** (2,699 g; 11,67 mmol) v toluenu (15 mL) byl přidán roztok benzenaminu (1,189 g; 12,77 mmol) v toluenu (15 mL). Vzniklý žlutý roztok byl ponechán v klidu 48 h. Po této době nebyla v roztoku detegovatelná (TLC) výchozí sloučenina **4**. Těkavé složky reakční směsi byly odpařeny ve



vakuu. Olejovitý zbytek (3,516 g) byl rozpuštěn v dichlormethanu (65 mL). Roztok byl extrahován nejprve 5% kyselinou chlorovodíkovou (3 x 10 mL), pak vodou (3 x 10 mL) a poté sušen ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ). Po odfiltrování sušidla bylo z roztoku odpařením rozpouštědla ve vakuu získáno 2,541 g; 67 % amidu **5b**, bílý prášek, b.t. 180–183 °C,  $R_f = 0,68$  (5% ethanol

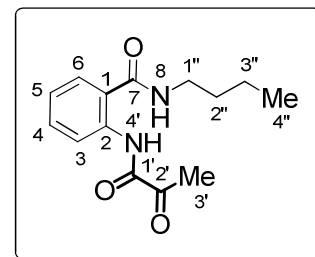
v chloroformu). 0,56 (10% ethanol v chloroformu). V literatuře<sup>155</sup> je uveden b.t. 179–182 °C (cyklohexan).

IČ (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\tilde{\nu}$  3285(m), 3143(w), 2962(w), 2932(w), 2859(w), 1777(s), 1718(w), 1697(m), 1644(s), 1619(w), 1599(m), 1584(m), 1518(s), 1500(s), 1449(m), 1438(s), 1396(w), 1372(w), 1330(s), 1307(m), 1262(m), 1241(w), 1177(s), 1152(w), 1067(m), 1012(w), 897(w), 756(s), 690(m), 586(w).

### **N-Butyl-2-(2-oxopropanamido)benzamid (5c)**

1-Acetyl-3-methylenbenzo[e][1,4]oxazepin-2,5(1*H*,3*H*)-dion<sup>156</sup>

**6** (3,471 g; 15,010 mmol) byl navážen do Erlenmayerovy baňky (100 mL) a postupně byl k němu přidáván toluen, dokud nevznikl čirý roztok (40 mL). Butylamin (3,316 g; 44,882 mmol) byl



rozpuštěn v toluenu (10 mL) a tento roztok přidán k roztoku sloučeniny **6**. Vznikl červeně zbarvený roztok, který byl míchán při laboratorní teplotě, dokud v něm byla detegovatelná (TLC) sloučenina **6** (23 h). Těkavé složky byly ze směsi odpařeny ve vakuu. Pevný odparek byl suspendován v 2% kyselině chlorovodíkové (100 mL), nerozpuštěná pevná fáze byla odsáta na fritě a promyta vodou (100 mL). Vysušením při 50 °C byl získán amid **5c** (3,308 g, 84 %), bílá pevná látka, b.t. 165–173 °C,  $R_f = 0,69$  (5% ethanol v chloroformu), 0,89 (10% ethanol v chloroformu).

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>; 500 MHz):  $\delta$  0,91 (t, 3H,  $J = 7,3$  Hz, H4''), 1,27-1,43 (m, 2H, H3''), 1,45-1,60 (m, 2H, H2''), 2,42 (s, 3H, H3'), 3,28 (dd, 2H,  $J = 12,8, 6,6$  Hz, H1''), 7,22 (t, 1H,  $J = 7,4$  Hz, H3), 7,55 (t, 1H,  $J = 7,5$  Hz, H6), 7,79 (d, 1H,  $J = 7,3$  Hz, H4), 8,56 (d, 1H,  $J = 8,2$  Hz, H5), 8,75 (s, 1H, H8), 12,39 (s, 1H, H4').

<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>; 126 MHz):  $\delta$  14,1 (C3'), 20,1 (C4''), 24,6 (C3''), 31,4 (C2''), 39,3 (C1''), 120,4 (C3), 122,1 (C1), 123,9 (C5), 128,7 (C6), 132,4 (C4), 138,0 (C2), 159,1 (C2'), 168,2 (C1'), 196,9 (C7).

IČ (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\tilde{\nu}$  3321(s), 2961(m), 2933(m), 2875(w), 1723(s), 1702(s), 1627(s), 1595(s), 1523(s), 1451(s), 1362(m), 1300(m), 1253(m), 1225(m), 1163(m), 1143(m), 1102(w), 906(w), 775(w), 754(s), 702(m), 667(w), 633(w), 552(w).

MS (EI): 262(0,1, M<sup>+</sup>), 220(12), 219(83, [M-43]<sup>+</sup>), 163(12), 147(10), 146(100), 43(19), 41(14)  $m/z$ (%).

HRMS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  vypočteno pro C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup> [M + H]<sup>+</sup> 263,1390, nalezeno 263,1396.

### 3.5 Fischerova indolová reakce 2-[(2-oxoalkanoyl)amino]benzamidů **5**

Žlutý roztok amidu **5** a fenylhydrazinium-chloridu (0,188 g, 1,30 mmol / 1 mmol **5**) v kyselině octové (4 mL / 1 mmol **5**) byl vařen pod zpětným chladičem opatřeným sušicí rourkou (CaCl<sub>2</sub>), dokud v něm byl přítomen amid **5** (TLC), a pak byl nalit na drcený led (30 g / 1 mmol **5**). Po roztání ledu byl vyloučený pevný produkt odsát na fritě, promyt postupně vodou (10 mL / 1 mmol **5**) a hexanem (4 mL / 1 mmol **5**), a po vyschnutí případně překrystalizován.

#### 2-(3-Propyl-1*H*-indol-2-karboxamido)benzoová kyselina (**7a**)

a) Z amidu **5a** (2,436 g, 8,00 mmol), doba reakce 26 h, výtěžek 2,362 g (92 %).

b) Z amidu **5b** (250 mg, 0,771 mmol), doba reakce 15 h, výtěžek 142 mg (57 %).

Drobné bezbarvé krystalky, b.t. 243–249 °C (cyklohexan),  $R_f = 0,60$  (5% ethanol v chloroformu), 0,86 (10% ethanol v chloroformu). V literatuře<sup>150</sup> je uveden b.t. 239–246 °C (ethanol).

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>; 500 MHz): δ 0,93 (t, 3H,  $J = 6,9$  Hz, H12'), 1,59-1,78 (m, 2H, H11'), 3,10 (t, 2H,  $J = 6,9$  Hz, H10'), 7,07 (t, 1H,  $J = 7,2$  Hz, H5'), 7,15-7,32 (m, 2H, H4 a H6'), 7,43 (d, 1H,  $J = 8,0$  Hz, H7'), 7,61-7,73 (m, 2H, H4' a H5), 8,06 (d, 1H,  $J = 7,5$  Hz, H3), 8,64 (d, 1H,  $J = 8,2$  Hz, H6), 11,52 (s, 1H, H1'), 11,64 (s, 1H, H9'), 13,77 (brs, 1H, COOH). Spektrum je shodné se spektrem<sup>150</sup> autentické sloučeniny.

<sup>13</sup>C-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>; 126 MHz): δ 14,0 (C12'), 24,1 (C11'), 25,7 (C10'), 112,3 (C7'), 116,5 (C2'), 119,4 (C6 a C5), 120,2 (C1), 120,6 (C5'), 122,8 (C4'), 124,3 (C4), 127,6 (C3), 127,8 (C6'), 131,2 (C3'a), 134,1 (C3'), 136,1 (C2), 140,9 (C7'a), 160,6 (C8'), 169,7 (COOH).

IČ (KBr, cm<sup>-1</sup>):  $\tilde{\nu}$  3343(w), 3310(s), 3059(w), 2956(m), 2931(w), 2870(w), 1672(s), 1655(s), 1604(w), 1581(m), 1540(m), 1522(m), 1511(m), 1474(w), 1465(w), 1449(m), 1408(m), 1323(w), 1299(w), 1263(s), 1166(m), 764(w), 753(m), 731(m), 679(w), 668(w). Spektrum je shodné se spektrem<sup>150</sup> autentické sloučeniny.

HRMS (ESI+):  $m/z$  vypočteno pro C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup> [M + H]<sup>+</sup> 323,1395, nalezeno 323,1387.

**2-[[2-(2-Fenylhydrazinyliden)propanoyl]amino]benzoová kyselina (8)**

Z amidu **5c** (2,099 g, 8,00 mmol), doba reakce 43 h, výtěžek 1,962 g (83 %), nažloutlý prášek, b.t. 245–253 °C (benzen),  $R_f = 0,49$  (5% ethanol v chloroformu), 0,72 (10% ethanol v chloroformu).

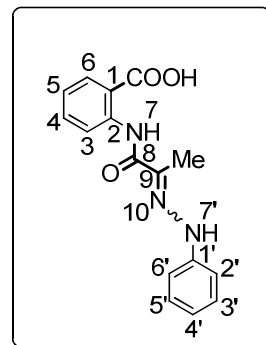
$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ; 500 MHz):  $\delta$  2,86–2,89 (m, 3H, CH<sub>3</sub>), 7,27 (t, 1H,  $J = 7,3$  Hz, H<sub>4</sub>), 7,48–7,53 (m, 1H, H<sub>5</sub>), 7,66 (t, 2H,  $J = 7,9$  Hz, H<sub>3'</sub> a H<sub>5'</sub>), 7,91 (d, 2H,  $J = 7,7$  Hz, H<sub>2'</sub> a H<sub>6'</sub>), 7,94–8,01 (m, 1H, H<sub>4'</sub>), 8,41 (dd, 1H,  $J = 7,9, 1,6$  Hz, H<sub>3</sub>), 9,14 (d, 1H,  $J = 8,0$  Hz, H<sub>6</sub>), 10,20 (s, 1H, H<sub>7'</sub>), 12,83 (s, 1H, H<sub>7</sub>), 13,97 (brs, 1H, COOH).

$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ; 126 MHz):  $\delta$  10,9 (CH<sub>3</sub>), 114,6 (C<sub>2'</sub> a C<sub>6'</sub>), 116,8 (C<sub>3</sub>), 120,1 (C<sub>5</sub>), 121,6 (C<sub>4</sub>), 122,9 (C<sub>4'</sub>), 130,0 (C<sub>3</sub> a C<sub>5'</sub>), 132,3 (C<sub>6</sub>), 135,1 (C<sub>1</sub>), 136,1 (C<sub>2</sub>), 142,1 (C<sub>9</sub>), 145,3 (C<sub>1'</sub>), 164,3 (C<sub>8</sub>), 170,4 (COOH).

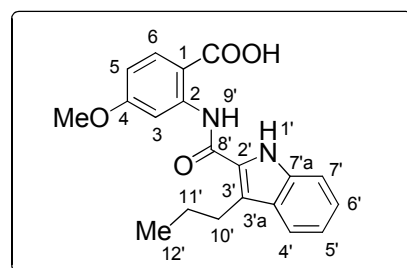
$^{15}\text{N-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ; 51 MHz):  $\delta$  116,0 (N<sub>7</sub>), 147,0 (N<sub>7'</sub>), 250,1 (N<sub>10</sub>).

IČ (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\tilde{\nu}$  3296(m), 3061(w), 2929(w), 1679(s), 1656(s), 1603(s), 1577(s), 1522(s), 1496(s), 1448(m), 1400(m), 1367(w), 1313(w), 1292(m), 1250(s), 1193(m), 1170(m), 1163(m), 1131(m), 906(w), 888(w), 747(s), 690(m), 664(w).

HRMS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  vypočteno pro C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub><sup>+</sup> [M + H]<sup>+</sup> 298,1186, nalezeno 298,1185.

**4-Methoxy-2-(3-propyl-1H-indol-2-karboxamido)benzoová kyselina 7b**

Výchozí 2-aminobenzoová kyselina **3b** (4,469 g; 16,00 mmol) byla spolu s fenylhydrazinium-chloridem (4,117 g; 28,460 mmol) rozpuštěna v kyselině octové (60 mL) a žlutý roztok byl vařen pod zpětným chladičem se sušící rourkou (CaCl<sub>2</sub>), dokud byla v roztoku přítomna kyselina **3b** (TLC, 24 h). Vychladlá reakční směs byla nalita do



ledové vody (200 mL), vyloučená pevná fáze byla odsáta na fritě a její krystalizací z ethanolu bylo získáno 3,002 g (53 %) kyseliny **7b**, nažloutlý prášek, b.t. 241–243 °C (ethanol),  $R_f = 0,33$  (5% ethanol v chloroformu), 0,63 (10% ethanol v chloroformu), 0,31 (20% ethylacetát v benzenu).

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ; 500 MHz):  $\delta$  0,93 (t, 3H,  $J = 7,3$  Hz, H<sub>12'</sub>), 1,60–1,77 (m, 2H, H<sub>11'</sub>), 3,01–3,19 (m, 2H, H<sub>10'</sub>), 3,87 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 6,79 (dd, 1H,  $J = 8,9, 2,6$  Hz, H<sub>5</sub>), 7,08 (t, 1H,  $J = 7,2$  Hz, H<sub>5'</sub>), 7,24 (dd, 1H,  $J = 11,2, 4,0$  Hz, H<sub>6'</sub>), 7,44 (d, 1H,  $J = 8,2$  Hz, H<sub>7'</sub>), 7,68 (d,

$^1\text{H}$ ,  $J = 8,0$  Hz,  $\text{H}4'$ ), 8,02 (d, 1H,  $J = 8,9$  Hz,  $\text{H}6$ ), 8,35 (d, 1H,  $J = 2,6$  Hz,  $\text{H}3$ ), 11,49 (s, 1H,  $\text{H}9'$ ), 11,86 (s, 1H,  $\text{H}1'$ ), 13,38 (brs, 1H,  $\text{COOH}$ ).

$^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ ; 126 MHz):  $\delta$  14,4 ( $\text{C}12'$ ), 24,5 ( $\text{C}11'$ ), 26,1 ( $\text{C}10'$ ), 56,0 ( $\text{OCH}_3$ ), 105,7 ( $\text{C}3$ ), 109,2 ( $\text{C}1$  a  $\text{C}5$ ), 112,8 ( $\text{C}7'$ ), 119,8 ( $\text{C}2'$ ), 119,9 ( $\text{C}5'$ ), 120,7 ( $\text{C}4'$ ), 124,8 ( $\text{C}6'$ ), 128,2 ( $\text{C}3'$ ), 128,3 ( $\text{C}3'\text{a}$ ), 133,6 ( $\text{C}6$ ), 136,6 ( $\text{C}7'\text{a}$ ), 143,4 ( $\text{C}2$ ), 161,3 ( $\text{C}8'$ ), 164,1 ( $\text{C}4$ ), 170,0 ( $\text{COOH}$ ).

$^{15}\text{N}$ -NMR (DMSO- $d_6$ ; 51 MHz):  $\delta$  126,7 ( $\text{N}9'$ ), 131,6 ( $\text{N}1'$ ).

$\text{I}\check{\text{C}}$  (ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\tilde{\nu}$  3335(m), 2956(w), 1660(s), 1613(m), 1570(m), 1514(m), 1447(w), 1431(w), 1401(m), 1343(m), 1326(m), 1268(s), 1246(s), 1209(s), 1182(m), 1158(m), 1125(w), 1110(m), 1089(m), 1036(m), 903(m), 878(m), 812(m), 770(s), 732(s), 684(m), 660(m), 638(m), 618(s), 598(m), 570(m), 535(w), 491(m), 458(m), 436(m).

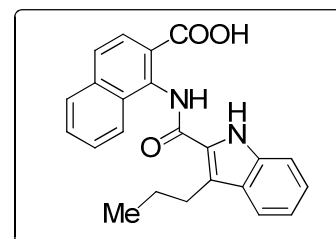
HRMS (ESI+):  $m/z$  vypočteno pro  $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_4^+$  [ $\text{M} + \text{H}$ ] $^+$  353,1496, nalezeno 353,1500.

### 3.6 Fischerova indolová reakce 2-[(2-oxohexanoyl)amino]benzoových kyselin **3** v kyselině propionové

Do 25 mL kapkové baňky byly naváženy kyselina **3**, chlorid fenylylhydrazinia (1,05 mmol / 1 mmol **3**), a kyselina propionová (5 mL / 1 mmol **3**). Baňka byla opatřena zpětným chladičem se sušicí rourkou ( $\text{CaCl}_2$ ) a vložena do olejové lázně. Reakční směs byla vařena, dokud v ní bylo možné detegovat kyselinu **3** (TLC). Po volném vychladnutí byla baňka uložena přes noc v chladničce při  $6,5$  °C a pak byla sonifikována v ultrazvukové vaně (5 minut). Odsátím pevné fáze reakční směsi na fritě a jejím opakovaným promytím hexanem (celkem 2,5 mL / 1 mmol **3**) byl získán příslušný benzoxazinon **9**. Filtrát reakční směsi byl nalit na led (20 g / 1 mmol **3**) a po roztání ledu byla odsátím vyloučené pevné látky, jejím promytím vodou, vysušením při  $50$  °C a případnou krystalizací získána odpovídající 2-(1*H*-indol-2-karboxamido)benzoová kyselina **7**.

#### 1-(3-Propyl-1*H*-indol-2-karboxamido)-2-naftoová kyselina (**7c**)

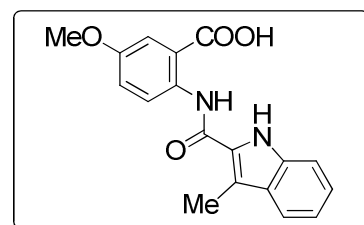
Bílý prášek, b.t. 220–227 °C,  $R_f = 0,44$  (5% ethanol v chloroformu), 0,66 (10% ethanol v chloroformu), 0,28 (20% ethyl-acetát v benzenu). V literatuře<sup>150</sup> je uveden b.t. 227–230 °C (ethanol).



IČ (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\tilde{\nu}$  3294(w), 3053(m), 2962(m), 2878(m), 1727(m), 1694(s), 1675(s), 1626(m), 1600(m), 1571(m), 1501(s), 1465(m), 1432(w), 1409(m), 1389(m), 1339(m), 1284(m), 1258(s), 1228(w), 1204(w), 1176(m), 1145(w), 1124(m), 1093(w), 864(w), 793(w), 764(m), 670(w). Spektrum je shodné se spektrem<sup>150</sup> autentické sloučeniny.

### 5-Methoxy-2-(3-methyl-1H-indol-2-karboxamido)benzoová kyselina (7d)

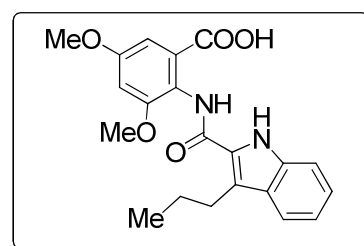
Nažloutlý prášek, b.t. 265–270 °C,  $R_f = 0,26$  (5% ethanol v chloroformu), 0,42 (10% ethanol v chloroformu), 0,14 (20% ethyl-acetát v benzenu). V literatuře<sup>150</sup> je uveden b.t. 265–269 °C (ethanol).



IČ (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\tilde{\nu}$  3321(s), 3045(w), 2993(w), 1662(m), 1638(s), 1599(m), 1522(s), 1467(m), 1422(m), 1406(m), 1338(s), 1289(m), 1244(s), 1218(s), 1188(m), 1146(m), 1072(w), 1036(m), 925(w), 891(w), 866(w), 836(w), 783(w), 769(w), 744(m), 716(w), 688(w), 669(w), 594(w), 556(w). Spektrum je shodné se spektrem<sup>150</sup> autentické sloučeniny.

### 3,5-Dimethoxy-2-(3-propyl-1H-indol-2-karboxamido)benzoová kyselina (7e)

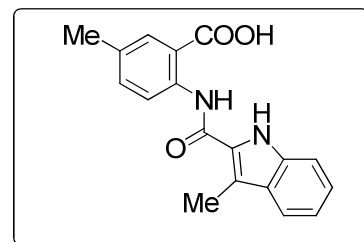
Nažloutlá krystalická látka, b.t. 225–229 °C,  $R_f = 0,20$  (5% ethanol v chloroformu), 0,44 (10% ethanol v chloroformu), 0,08 (20% ethyl-acetát v benzenu). V literatuře<sup>150</sup> je uveden b.t. 227–230 °C (ethanol).



IČ (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\tilde{\nu}$  3409(w), 3289(s), 3015(w), 2957(m), 2858(w), 1694(s), 1658(s), 1597(s), 1546(m), 1502(s), 1471(m), 1454(m), 1402(m), 1334(s), 1310(m), 1283(m), 1255(m), 1243(m), 1215(m), 1196(m), 1143(m), 1070(m), 1043(m), 952(w), 922(w), 830(m), 752(s). Spektrum je shodné se spektrem<sup>150</sup> autentické sloučeniny.

**5-Methyl-2-(3-methyl-1*H*-indol-2-karboxamido)benzoová kyselina (7f)**

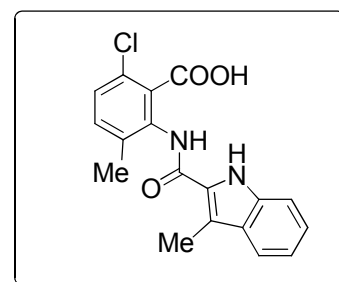
Nažloutlý prášek, b.t. 269–275 °C,  $R_f = 0,44$  (5% ethanol v chloroformu), 0,65 (10% ethanol v chloroformu), 0,24 (20% ethyl-acetát v benzenu). V literatuře<sup>150</sup> je uveden b.t. 268–274 °C (ethanol).



IČ (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\tilde{\nu}$  3316(s), 2920(w), 1672(s), 1649(s), 1615(w), 1586(m), 1539(m), 1520(s), 1418(m), 1398(m), 1336(m), 1323(m), 1296(m), 1259(s), 1217(m), 1181(w), 737(m), 671(w). Spektrum je shodné se spektrem<sup>150</sup> autentické sloučeniny.

**6-Chlor-3-methyl-2-(3-methyl-1*H*-indol-2-karboxamido)benzoová kyselina (7g)**

Bílý prášek, b.t. 253–260 °C,  $R_f = 0,08$  (5% ethanol v chloroformu), 0,20 (10% ethanol v chloroformu), 0,08 (20% ethyl-acetát v benzenu). V literatuře<sup>150</sup> je uveden b.t. 256–264 °C (ethanol).



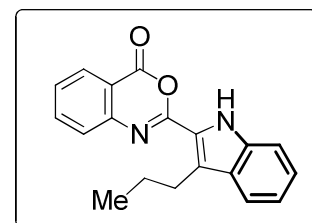
IČ (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\tilde{\nu}$  3820(w), 3413(s), 3205(m), 3055(w), 2975(w), 2929(w), 1688(s), 1605(m), 1579(m), 1553(s), 1463(m), 1433(m), 1399(w), 1383(m), 1325(m), 1294(s), 1263(m), 1242(m), 1176(s), 817(w), 734(m), 715(w). Spektrum je shodné se spektrem<sup>150</sup> autentické sloučeniny.

**2-(Propyl-1*H*-indol-2-yl)-4*H*-benzo[*d*][1,3]oxazin-4-on (9a)**

Nažloutlé krystalky, b.t. 161–165 °C,  $R_f = 0,83$  (5% ethanol v chloroformu), 0,89 (10% ethanol v chloroformu).

V literatuře<sup>150</sup> je uveden b.t. 160–165 °C (cyklohexan).

IČ (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\tilde{\nu}$  3371(s), 2957(m), 2929(w), 2867(m), 1755(s), 1702(w), 1662(s), 1621(s), 1603(s), 1572(m), 1543(m), 1500(m),



1472(m), 1446(m), 1370(w), 1350(m), 1328(m), 1296(w), 1261(s), 1241(m), 1223(m), 1198(m), 1180(m), 1154(m), 1137(w), 1098(w), 1055(s), 1016(m), 765(m) 741(m), 684(m), 603(w). Spektrum je shodné se spektrem<sup>150</sup> autentické sloučeniny.

**7-Methoxy-2-(3-propyl-1*H*-indol-2-yl)-4*H*-benzo[*d*][1,3]oxazin-4-on (9b)**

Bezbarvé krystaly, b.t. 166–168 °C (cyklohexan),  $R_f = 0,78$  (5% ethanol v chloroformu), 0,92 (10% ethanol v chloroformu), 0,69 (20% ethyl-acetát v benzenu).

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3-d_6$ ; 500 MHz):  $\delta$  1,02 (t, 3H,  $J = 7,4$  Hz, H10'), 1,74-1,84 (m, 2H, H9'), 3,25 (t, 2H,  $J = 7,5$  Hz, H8'),

3,93 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 6,94-7,00 (m, 2H, H6 a H8), 7,13 (t, 1H,  $J = 7,4$  Hz, H5'), 7,31 (t, 1H,  $J = 7,5$  Hz, H4'), 7,37 (d, 1H,  $J = 8,2$  Hz, H6'), 7,68 (d, 1H,  $J = 8,1$  Hz, H7'), 8,09 (d, 1H,  $J = 9,4$  Hz, H5), 8,99 (s, 1H, H1').

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3-d_6$ ; 126 MHz):  $\delta$  14,4 (C10'), 24,4 (C9'), 27,0 (C8'), 56,0 ( $\text{OCH}_3$ ), 108,6 (C8), 109,6 (C4a), 111,7 (C3'), 116,7 (C6), 120,3 (C5'), 121,0 (C7'), 123,3 (C2'), 125,8 (C4'), 126,0 (C6'), 129,1 (C5), 130,6 (C3'a), 136,8 (C7'a), 149,9 (C8a), 154,4 (C4), 158,9 (C2), 166,5 (C7).

$^{15}\text{N-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3-d_6$ ; 51 MHz):  $\delta$  120,7 (N1'), 221,7 (N1).

IČ (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\tilde{\nu}$  3361(s), 2955(m), 2926(w), 2865(w), 1750(s), 1600(s), 1566(s), 1542(m), 1491(s), 1457(m), 1441(m), 1349(m), 1280(s), 1244(w), 1228(m), 1204(m), 1178(w), 1151(m), 1126(w), 1109(m), 1093(w), 1055(m), 1022(w), 962(w), 849(m), 774(m), 748(m), 736(m), 687(m), 652(w), 634(m), 438(w).

HRMS (ESI+):  $m/z$  vypočteno pro  $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_3^+$   $[\text{M} + \text{H}]^+$  335,1390, nalezeno 335,1394.

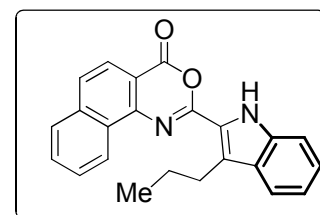
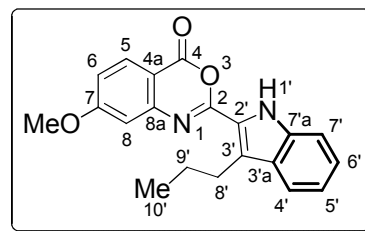
### 2-(3-Propyl-1H-indol-2-yl)-4H-nafto[1,2-d][1,3]oxazin-4-on (9c)

Žluté krystaly, b.t. 271–274 °C,  $R_f = 0,62$  (5% ethanol v chloroformu), 0,86 (10% ethanol v chloroformu), 0,64 (20% ethyl-acetát v benzenu). V literatuře<sup>150</sup> je uveden b.t. 273–274 °C (ethanol).

IČ (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\tilde{\nu}$  3360(s), 2951(w), 2926(w), 2867(w),

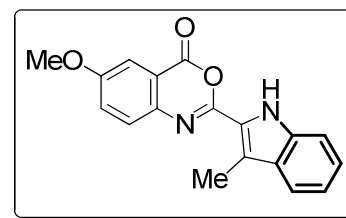
1745(s), 1603(s), 1565(s), 1543(m), 1509(m), 1454(m), 1444(m), 1394(m), 1350(w), 1323(m), 1273(s), 1241(w), 1227(m), 1214(w), 1153(w), 1093(w), 1050(w), 824(w), 800(m), 765(s), 737(s), 638(m), 627(m), 573(w). Spektrum je shodné se spektrem<sup>150</sup> autentické sloučeniny.

### 6-Methoxy-2-(3-methyl-1H-indol-2-yl)-4H-benzo[d][1,3]oxazin-4-on (9d)





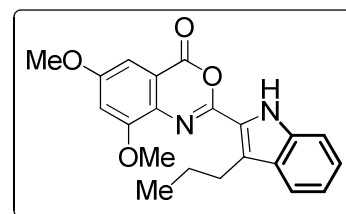
Bezbarvé krystalky, b.t. 224–227 °C,  $R_f = 0,76$  (5% ethanol v chloroformu), 0,86 (10% ethanol v chloroformu), 0,66 (20% ethyl-acetát v benzenu). V literatuře<sup>150</sup> je uveden b.t. 221–227 °C (benzen).



IČ (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\tilde{\nu}$  3399(s), 1747(s), 1624(s), 1603(s), 1578(w), 1492(s), 1451(m), 1382(w), 1354(s), 1335(s), 1327(s), 1275(m), 1240(s), 1149(w), 1079(w), 1035(s), 862(w), 838(m), 827(w), 776(w), 758(w), 743(m), 729(m), 637(w), 547(m). Spektrum je shodné se spektrem<sup>150</sup> autentické sloučeniny.

### 6,8-Dimethoxy-2-(3-propyl-1H-indol-2-yl)-4H-benzo[d][1,3]oxazin-4-on (9e)

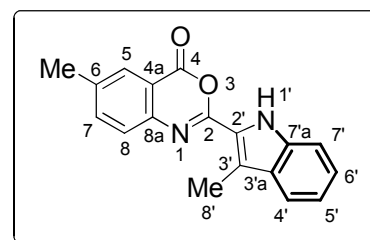
Nažloutlé krystalky, b.t. 196–202 °C,  $R_f = 0,76$  (5% ethanol v chloroformu), 0,86 (10% ethanol v chloroformu), 0,53 (20% ethyl-acetát v benzenu). V literatuře<sup>150</sup> je uveden b.t. 198–202 °C (benzen).



IČ (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\tilde{\nu}$  3392(s), 1749(s), 1613(s), 1581(s), 1490(m), 1479(m), 1453(m), 1435(m), 1368(s), 1338(m), 1328(s), 1296(m), 1253(m), 1246(m), 1218(s), 1177(w), 1160(m), 1130(w), 1070(w), 1054(w), 1031(s), 847(w), 787(m), 770(w). Spektrum je shodné se spektrem<sup>150</sup> autentické sloučeniny.

### 6-Methyl-2-(3-methyl-1H-indol-2-yl)-4H-benzo[d][1,3]oxazin-4-on (9f)

Nažloutlé jehlice, b.t. 247–249 °C,  $R_f = 0,80$  (5% ethanol v chloroformu), 0,84 (10% ethanol v chloroformu), 0,64 (20% ethyl-acetát v benzenu).



<sup>1</sup>H-NMR ( $\text{CDCl}_3-d_6$ ; 500 MHz):  $\delta$  2,48 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2,79 (s, 3H,  $\text{H}_{8'}$ ), 7,16 (t, 1H,  $J = 7,4$  Hz,  $\text{H}_{5'}$ ), 7,33 (t, 1H,  $J = 7,6$  Hz,  $\text{H}_{6'}$ ), 7,38 (d, 1H,  $J = 8,3$  Hz,  $\text{H}_7$ ), 7,51 (d, 1H,  $J = 8,2$  Hz,  $\text{H}_8$ ), 7,60 (d, 1H,  $J = 8,2$  Hz,  $\text{H}_5$ ), 7,67 (d, 1H,  $J = 8,1$  Hz,  $\text{H}_{4'}$ ), 8,00 (s, 1H,  $\text{H}_{7'}$ ), 8,96 (brs, 1H,  $\text{H}_{1'}$ ).

<sup>13</sup>C-NMR ( $\text{CDCl}_3-d_6$ ; 126 MHz):  $\delta$  10,5 ( $\text{CH}_3$ ), 21,3 ( $\text{C}_{8'}$ ), 111,4 ( $\text{C}_8$ ), 116,2 ( $\text{C}_{4a}$ ), 119,9 ( $\text{C}_{3'}$ ), 120,1 ( $\text{C}_6$ ), 120,5 ( $\text{C}_{5'}$ ), 123,3 ( $\text{C}_{7'}$ ), 125,7 ( $\text{C}_{2'}$ ), 126,4 ( $\text{C}_{4'}$ ), 128,3 ( $\text{C}_{6'}$ ), 129,2 ( $\text{C}_5$ ), 136,5 ( $\text{C}_{3'a}$ ), 137,9 ( $\text{C}_{7'a}$ ), 138,0 ( $\text{C}_{8a}$ ), 145,0 ( $\text{C}_4$ ), 152,9 ( $\text{C}_2$ ), 159,2 ( $\text{C}_7$ ).

<sup>15</sup>N-NMR ( $\text{CDCl}_3-d_6$ ; 51 MHz):  $\delta$  120,5 ( $\text{N}_{1'}$ ), 223,4 ( $\text{N}_1$ ).

IČ (ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\tilde{\nu}$  1744(m), 1623(w), 1599(s), 1539(w), 1487(m), 1381(w), 1334(m), 1322(m), 1265(m), 1232(s), 1153(m), 1121(m), 1077(m), 1034(s), 930(w), 885(w), 842(w),

824(s), 782(w), 757(w), 739(m), 728(s), 694(w), 649(m), 631(m), 612(m), 551(w), 529(m), 514(m), 502(w), 465(m), 439(s), 426(w).

HRMS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  vypočteno pro C<sub>18</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup> [M + H]<sup>+</sup> 291,1128, nalezeno 291,1133.

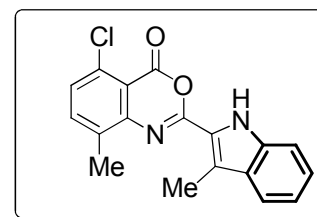
Pro C<sub>18</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (290,32)

vypočteno: 74,47 % C, 4,86 % H, 9,65 % N;

nalezeno: 74,85 % C, 4,96 % H, 9,61 % N.

### 5-Chlor-8-methyl-2-(3-methyl-1*H*-indol-2-yl)-4*H*-benzo[*d*][1,3]oxazin-4-on (9g)

Žlutý prášek, b.t. 249–256 °C,  $R_f = 0,76$  (5% ethanol v chloroformu), 0,84 (10% ethanol v chloroformu), 0,76 (20% ethyl-acetát v benzenu). V literatuře<sup>150</sup> je uveden b.t. 251–256 °C (cyklohexan).



IČ (KBr, cm<sup>-1</sup>):  $\bar{\nu}$  3384(m), 3352(m), 1740(s), 1629(s), 1578(s),

1546(w), 1448(w), 1379(w), 1328(m), 1302(w), 1263(m), 1233(w), 1182(w), 1029(w), 1010(w), 914(w), 744(m), 730(m). Spektrum je shodné se spektrem<sup>150</sup> autentické sloučeniny.

### Dehydratace kyseliny 7b

K suspenzi kyseliny **7b** (1,317 g; 3,741 mmol) v toluenu (10 mL) byl přidán acetanhydrid a směs byla vařena pod zpětným chladičem opatřeným sušící rourkou s CaCl<sub>2</sub> náplní 1 h. Po vychladnutí na pokojovou teplotu byly vyloučené krystaly odsáty na fritě a jejich promytím toluenem (5 mL) byl získán první podíl surového produktu. Z filtrátu byly ve vakuu odpařeny těkavé složky a promytím odparku hexanem (5 mL) byl získán druhý podíl surového produktu. Krystalizace spojených podílů surového produktu poskytla 997 mg (78 %) benzoxazinonu **9b** identifikovaného pomocí IČ spektra s preparátem připraveným Fischerovou reakcí sloučeniny **3b**.

## 3.7 Reakce indolylbenzoxazinonů 9 s aminy

### Reakce 2-(propyl-1*H*-indol-2-yl)-4*H*-benzo[*d*][1,3]oxazin-4-onu 9a s aminy v pyridinu (Metoda A).

Do kapkové baňky (25 mL) byl navážen výchozí benzoxazinon **9a** (0,304 g; 1,00 mmol), ke kterému byl přidán roztok příslušného aminu (2,00 mmol) v pyridinu (3 mL). Reakční směs pak byla vařena pod zpětným chladičem v inertní atmosféře (N<sub>2</sub>). Po spotřebování veškeré

výchozí látky (TLC) byl var zastaven, reakční směs byla ponechána zchladnout a následně nalita do ledové tříště (15 g). Vyloučená pevná fáze byla odsáta na fritě a promyta vodou (2 x 5 mL). Surový produkt byl následně čištěn krystalizací.

#### Reakce indolybenzoxazinonů **9** s aminy v dichlormethanu (Metoda B).

K roztoku benzoxazinonu **9** v dichlormethanu (3 mL / 1 mmol **9**) v kapkové baňce byl napipetován nejprve příslušný amin (2,00 mmol / 1 mmol **9**) a následně triethylamin (0,1 mL / 1 mmol **9**). Baňka byla uzavřena sušící rourkou (CaCl<sub>2</sub>) a umístěna na magnetickou míchačku, kde byla reakční směs míchána při laboratorní teplotě. Během reakce postupně docházelo k vylučování pevné fáze. Když byla spotřebována veškerá výchozí sloučenina (TLC), byla vzniklá suspenze zředěna dichlormethanem (15 – 115 mL / 1 mmol **9**) tak, aby vznikl čirý roztok, který byl následně extrahován 2% HCl (3 x 20 mL / 1 mmol **9**) a vodou (20 mL / 1 mmol **9**). Z organické fáze byla po vysušení (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) a odpaření ve vakuu do sucha získána sloučenina **10**, která byla pro analytické účely krystalizována z cyklohexanu.

#### Reakce 2-(propyl-1*H*-indol-2-yl)-4*H*-benzo[*d*][1,3]oxazin-4-onu **9a** s *p*-anisidinem v toluenu (Metoda C).

Benzoxazinon **9a** (301,2 mg; 0,9897 mmol) a 4-methoxyanilin (253,5 mg; 2,0173 mmol) byly naváženy do kapkové baňky (25 mL), z odměrného válce byl přidán toluen (5 mL) a nakonec byl napipetován triethylamin (0,1 mL). Reakční nádoba byla opatřena zpětným chladičem se sušící rourkou (CaCl<sub>2</sub>) a vařena, dokud bylo možné detegovat (TLC) výchozí benzoxazinon **9a** (8 h). Těkavé složky reakční směsi byly odpařeny *in vacuo* a získaný olej byl rozpuštěn v dichlormethanu (60 mL). Stejným postupem jako v metodě B bylo z roztoku získáno 0,266 g (63 %) sloučeniny **10k**.

Tabulka 17. Experimentální data reakcí sloučenin **9** s aminy.

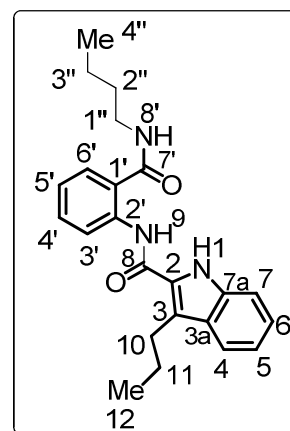
Metoda	Substrát	Amin	Reakční doba	Výtěžek	Produkt
A	0,306 g <b>9a</b> (1,006 mmol)	BuNH <sub>2</sub>	31 h	54 % (0,207 g)	<b>10a</b>
B	0,315 g <b>9a</b> (1,051 mmol)	BuNH <sub>2</sub>	42 h	77 % (0,305 g)	<b>10a</b>
B	0,600 g <b>9b</b> (1,794 mmol)	BuNH <sub>2</sub>	20 h	88 % (0,647 g)	<b>10b</b>

B	0,311 g <b>9c</b> (0,878 mmol)	BuNH <sub>2</sub>	51 h	95 % (0,356 g)	<b>10c</b>
B	0,287 g <b>9d</b> (0,937 mmol)	BuNH <sub>2</sub>	24 h	83 % (0,295 g)	<b>10d</b>
B	0,365 g <b>9e</b> (1,003 mmol)	BuNH <sub>2</sub>	22 h	93 % (0,410 g)	<b>10e</b>
B	0,275 g <b>9f</b> (0,948 mmol)	BuNH <sub>2</sub>	26 h	89 % (0,307 g)	<b>10f</b>
B	0,524 g <b>9g</b> (1,614 mmol)	BuNH <sub>2</sub>	48 h	98 % (0,629 g)	<b>10g</b>
A	0,300 g <b>9a</b> (0,987 mmol)	BnNH <sub>2</sub>	35 h	53 % (0,216 g)	<b>10h</b>
B	0,709 g <b>9a</b> (2,331 mmol)	BnNH <sub>2</sub>	17 h	87 % (0,834 g)	<b>10h</b>
A	0,300 g <b>9a</b> (0,986 mmol)	H <sub>2</sub> N(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	27 h	46 % (0,165 g)	<b>10i</b>
B	0,707 g <b>9a</b> (2,324 mmol)	H <sub>2</sub> N(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	6 h	75 % (0,631 g)	<b>10i</b>
B	0,710 g <b>9j</b> (2,333 mmol)	(Bu) <sub>2</sub> NH	68 h	91 % (0,800 g)	<b>10j</b>
C	0,301 g <b>9a</b> (0,990 mmol)	<i>p</i> -anisidin	8 h	63 % (0,266 g)	<b>10k</b>
B	0,200 g <b>9b</b> (0,254 mmol)	H <sub>2</sub> N(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	1 h	98 % (0,232 g)	<b>10l</b>
B	0,736 g <b>9c</b> (1,975 mmol)	H <sub>2</sub> N(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	1 h	92 % (0,789 g)	<b>10m</b>
A	0,302 g <b>9a</b> (0,993 mmol)	OH(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	27 h	41 % (0,141 g)	<b>11m</b>

### *N*-(2-(Butylkarbamoyl)fenyl)-3-propyl-1*H*-indol-2-karboxamid (10a)

Experimentální údaje v *Tabulka 17*. Bezbarvé krystalky, b.t. 180–184 °C (cyklohexan–benzen).  $R_f = 0,73$  (5% ethanol v chloroformu), 0,84 (10% ethanol v chloroformu). V literatuře<sup>150</sup> je uveden b.t. 187–188 °C (benzen).

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>; 500 MHz): δ 0,89 (t, 3H,  $J = 7,4$  Hz, H4''), 0,94 (t, 3H,  $J = 7,3$  Hz, H12), 1,29-1,38 (m, 2H, H3''), 1,48-1,56 (m, 2H, H2''), 1,63-1,72 (m, 2H, H11), 3,10 (t, 2H,  $J = 7,6$  Hz, H10), 3,28 (dt, 2H,  $J = 6,6, 6,6$  Hz, H1''), 7,06 (dd, 1H,  $J = 7,4, 7,4$  Hz, H5), 7,17-7,26 (m, 2H, H6 a H5'), 7,43 (d, 1H,  $J = 8,2$  Hz, H7), 7,55 (ddd, 1H,  $J = 7,8, 7,8, 1,0$  Hz, H4'), 7,66 (d, 1H,  $J = 8,0$  Hz, H4), 7,77 (dd, 1H,  $J = 7,8,$



1,0 Hz, H6'), 8,51 (d, 1H,  $J = 8,2$  Hz, H3'), 8,82 (t, 1H,  $J = 5,4$  Hz, H8'), 11,46 (s, 1H, H1), 11,69 (s, 1H, H9).

$^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ ; 126 MHz):  $\delta$  13,7 (C4''), 13,9 (C12), 19,7 (C3''), 24,2 (C11), 25,8 (C10), 31,0 (C2''), 38,9 (C1''), 112,3 (C7), 118,7 (C3), 119,4 (C5), 120,2 (C4), 121,3 (C3'), 121,6 (C1'), 122,8 (C5'), 124,1 (C6), 127,7 (C2), 127,8 (C3a), 128,1 (C6'), 131,7 (C4'), 136,0 (C7a), 138,7 (C2'), 160,4 (C8), 168,2 (C7').

$^{15}\text{N}$ -NMR (DMSO- $d_6$ ; 51 MHz):  $\delta$  119,7 (N8'), 124,5 (N9), 132,0 (N1).

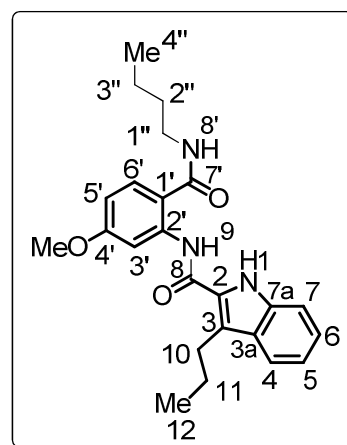
IČ (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\tilde{\nu}$  3321(s), 2956(m), 2932(m), 2870(m), 1653(s), 1626(s), 1595 (s), 1538(s), 1518(s), 1465(w), 1446(m), 1432(m), 1338(w), 1325(w), 1281(s), 1241(m), 762(w), 736(s), 678(m). Spektrum je shodné se spektrem<sup>150</sup> autentické sloučeniny.

HRMS (ESI+):  $m/z$  vypočteno pro  $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{N}_3\text{O}_2^+$   $[\text{M} + \text{H}]^+$  378,2176, nalezeno 378,2173.

#### ***N*-2-(Butylkarbamoyl)-5-methoxyfenyl)-3-propyl-1*H*-indol-2-karboxamid (10b)**

Experimentální údaje v *Tabulka 17*. Bezbarvé krystalky, b.t. 139–141 °C (hexan),  $R_f = 0,75$  (5% ethanol v chloroformu), 0,80 (10% ethanol v chloroformu), 0,58 (20% ethyl-acetát v benzenu).

$^1\text{H}$ -NMR (DMSO- $d_6$ ; 500 MHz):  $\delta$  0,89 (t, 3H,  $J = 7,4$  Hz, H4''), 0,93 (t, 3H,  $J = 7,3$  Hz, H12), 1,28-1,36 (m, 2H, H3''), 1,48-1,54 (m, 2H, H2''), 1,62-1,69 (m, 2H, H11), 3,10 (t, 2H,  $J = 7,6$  Hz, H10), 3,24-3,28 (m, 2H, H1''), 3,84 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 6,77 (dd, 1H,  $J = 8,8, 2,6$  Hz, H5'), 7,06 (dd, 1H,  $J = 7,5, 7,5$



Hz, H5), 7,23 (ddd, 1H,  $J = 8,0, 7,2, 0,7$  Hz, H6), 7,43 (d, 1H,  $J = 4,1$  Hz, H7), 7,66 (d, 1H,  $J = 4,0$  Hz, H4), 7,79 (d, 1H,  $J = 4,4$  Hz, H6'), 8,26 (d, 1H,  $J = 1,3$  Hz, H3'), 8,66 (t, 1H,  $J = 5,5$  Hz, H8'), 11,45 (s, 1H, H1), 12,69 (s, 1H, H9).

$^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ ; 126 MHz):  $\delta$  13,6 (C4''), 13,9 (C12), 19,6 (C3''), 24,2 (C11), 25,7 (C10), 31,0 (C2''), 38,8 (C1''), 55,4 (OCH<sub>3</sub>), 106,1 (C3'), 108,1 (C5'), 112,2 (C7), 113,1 (C1'), 118,7 (C3), 119,3 (C5), 120,1 (C4), 124,0 (C6), 127,8 (C2), 127,8 (C3a), 129,6 (C6'), 136,0 (7a), 141,0 (C2'), 160,6 (C8), 161,7 (C4'), 168,0 (C7').

$^{15}\text{N}$ -NMR (DMSO- $d_6$ ; 51 MHz):  $\delta$  116,9 (N8'), 125,7 (N9), 131,9 (N1).

IČ (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\tilde{\nu}$  3297(m), 2957(w), 2931(w), 2869(w), 1637(m), 1625(m), 1612(s), 1578(w), 1526(s), 1465(m), 1445(w), 1423(w), 1416(m), 1327(m), 1279(m), 1264(m), 1225(w), 1206(w), 737(m).

HRMS (ESI+):  $m/z$  vypočteno pro  $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{N}_3\text{O}_3^+ [\text{M} + \text{H}]^+$  408,2282, nalezeno 408,2281.

Pro  $\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_3$  (407,51)

vypočteno: 70,74 % C, 7,17 % H, 10,31 % N;

nalezeno: 70,55 % C, 7,33 % H, 10,14 % N.

### ***N*-(2-(Butylkarbamoyl)naftalen-1-yl)-3-propyl-1*H*-indol-2-karboxamid (10c)**

Experimentální údaje v *Tabulka 17*. Bezbarvé krystalky, b.t. 233–235 °C (cyklohexan),  $R_f = 0,70$  (5% ethanol v chloroformu), 0,88 (10% ethanol v chloroformu), 0,43 (20% ethylacetát v benzenu).

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 500 MHz).  $\delta$  0,73 (t, 3H,  $J = 7,3$  Hz, H4''), 0,93 (t, 3H,  $J = 7,3$  Hz, H12), 1,15-1,30 (m, 2H, H3''), 1,34-1,47 (m, 2H, H2''), 1,61-1,77 (m, 2H, H11), 3,04-3,15 (m, 2H, H10), 3,21 (dd, 2H,  $J = 12,8, 6,7$  Hz, H1''), 7,09 (t, 1H,  $J = 7,3$  Hz, H5), 7,27 (t, 1H,  $J = 7,3$  Hz, H5'), 7,48 (d, 1H,  $J = 8,2$  Hz, H7), 7,55-7,65 (m, 2H, H4' a H6), 7,68 (dd, 2H,  $J = 8,2, 3,6$  Hz, H4 a H6'), 7,96 (d, 1H,  $J = 8,6$  Hz, H7'), 8,01 (dd, 2H,  $J = 6,6, 2,8$  Hz, H3' a H8'), 8,42 (t, 1H,  $J = 5,6$  Hz, H10'), 10,23 (s, 1H, H1), 11,53 (s, 1H, H9).

$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 126 MHz).  $\delta$  14,0 (C4''), 14,5 (C12), 20,0 (C3''), 24,5 (C11), 26,6 (C10), 31,5 (C2''), 39,2 (C1''), 112,6 (C7), 119,8 (C3), 120,6 (C5), 121,5 (C4), 124,7 (C8'a), 125,2 (C2'), 125,5 (C6), 126,9 (C2), 127,0 (C3a a C6'), 127,6 (C4'), 128,2 (C8'), 128,4 (C3'), 130,0 (C4'a), 130,1 (C7'), 132,9 (C5'), 134,6 (C7a), 136,3 (C1'), 162,0 (C8), 168,0 (C9').

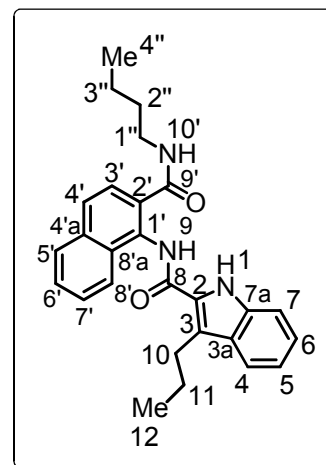
IČ (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\tilde{\nu}$  3289(s), 3059(w), 2958(m), 2930(m), 2870(m), 1646(s), 1613(s), 1586(m), 1555(s), 1528(m), 1496(m), 1450(w), 1380(w), 1321(m), 1289(s), 1226(w), 738(m).

HRMS (ESI+):  $m/z$  vypočteno pro  $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{N}_3\text{O}_2^+ [\text{M} + \text{H}]^+$  428,2333, nalezeno 428,2330.

Pro  $\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_2$  (427,54)

vypočteno: 75,85 % C, 6,84 % H, 9,83 % N;

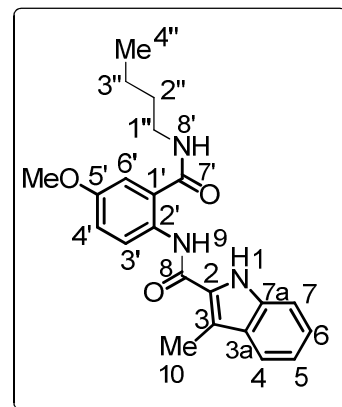
nalezeno: 75,80 % C, 6,98 % H, 9,77 % N.



***N*-(2-(Butylkarbamoyl)-4-methoxyfenyl)-3-methyl-1*H*-indol-2-karboxamid (10d)**

Experimentální údaje v *Tabulka 17*. Bezbarvé krystalky, b.t. 198–200 °C (cyklohexan),  $R_f = 0,70$  (5% ethanol v chloroformu), 0,81 (10% ethanol v chloroformu), 0,48 (20% ethyl-acetát v benzenu).

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ; 500 MHz):  $\delta$  0,88 (t, 3H,  $J = 7,3$  Hz, H4''), 1,26-1,38 (m, 2H, H3''), 1,47-1,56 (m, 2H, H2''), 2,62 (s, 3H, H10), 3,23-3,32 (m, 2H, H1''), 3,83 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 7,07 (ddd, 1H,  $J = 7,8, 7,1, 0,7$  Hz, H5), 7,16 (dd, 1H,  $J = 9,1, 2,9$



Hz, H4'), 7,23 (ddd, 1H,  $J = 8,0, 7,1, 0,9$  Hz, H6), 7,30 (d, 1H,  $J = 1,45$  Hz, H6'), 7,43 (d, 1H,  $J = 4,1$  Hz, H7), 7,66 (d, 1H,  $J = 4,0$  Hz, H4), 8,40 (d, 1H,  $J = 4,6$  Hz, H3'), 8,77 (t,  $J = 5,4$  Hz, H8'), 11,34 (s, 1H, H9), 11,41 (s, 1H, H1).

$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ; 126 MHz):  $\delta$  9,6 (C10), 13,6 (C4''), 19,6 (C3''), 30,9 (C2''), 38,9 (C1''), 55,5 (OCH<sub>3</sub>), 112,1 (C7), 112,5 (C3), 113,0 (C6'), 117,1 (C4'), 119,2 (C5), 119,9 (C4), 123,0 (C3'), 123,3 (C2 a C1'), 124,0 (C6), 128,2 (C3a), 131,7 (C2'), 135,8 (C7a), 154,5 (C5'), 160,0 (C8), 167,7 (C7').

$^{15}\text{N-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ; 51 MHz):  $\delta$  119,8 (N8'), 123,3 (N9), 131,9 (N1).

IČ (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\tilde{\nu}$  3251(s), 3088(w), 2959(m), 2932(m), 2873(w), 1642(s), 1603(s), 1562(s), 1511(s), 1475(m), 1416(m), 1354(w), 1313(m), 1286(m), 1257(m), 1240(w), 1221(m), 1200(w), 1120(w), 1040(m), 876(w), 741(s).

HRMS (ESI+):  $m/z$  vypočteno pro  $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}_3^+$   $[\text{M} + \text{H}]^+$  380,1969, nalezeno 380,1966.

Pro  $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_3$  (379,45)

vypočteno: 69,64 % C, 6,64 % H, 11,07 % N;

nalezeno: 69,59 % C, 6,78 % H, 10,98 % N.

***N*-(2-(Butylkarbamoyl)-4,6-dimethoxyfenyl)-3-propyl-1*H*-indol-2-karboxamid (10e)**

Experimentální údaje v *Tabulka 17*. Bezbarvé krystalky, b.t. 183–189 °C (cyklohexan),  $R_f = 0,65$  (5% ethanol v chloroformu), 0,79 (10% ethanol v chloroformu), 0,15 (20% ethyl-acetát v benzenu).

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ; 500 MHz):  $\delta$  0,69 (t, 3H,  $J = 7,3$  Hz, H4''), 0,93 (t, 3H,  $J = 7,3$  Hz, H12), 1,12-1,24 (m, 2H, H3''), 1,30-1,39 (m, 2H, H2''), 1,59-1,71 (m, 2H, H11), 3,02-3,13 (m, 4H, H10 a H1''), 3,79 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3,83 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 6,66 (d, 1H,  $J = 2,6$  Hz, H4'), 6,77 (d, 1H,  $J = 2,6$  Hz, H5), 7,05 (t, 1H,  $J = 7,1$  Hz, H6), 7,22 (dd, 1H,  $J = 11,2, 4,0$  Hz, H7), 7,42 (d, 1H,  $J = 8,2$  Hz, H4), 7,64 (d, 1H,  $J = 8,0$  Hz, H6'), 8,09 (t, 1H,  $J = 5,7$  Hz, H8'), 8,98 (s, 1H, H1), 11,35 (s, 1H, H9).

$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ; 126 MHz):  $\delta$  14,0 (C4''), 14,5 (C12), 20,0 (C3''), 24,3 (C11), 26,5 (C10), 31,5 (C2''), 39,1 (C1''), 56,0 (OCH<sub>3</sub>), 56,5 (OCH<sub>3</sub>), 101,1 (C3'), 104,4 (C5'), 112,4 (C7), 117,2 (C1' a C6'), 119,6 (C3), 120,4 (C5), 120,7 (C4), 124,4 (C6), 127,2 (C2), 128,1 (C3a), 136,0 (C7a), 156,2 (C2'), 158,6 (C8), 161,3 (C4'), 167,2 (C7').

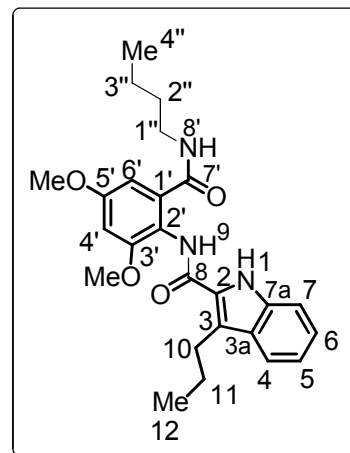
IČ (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\tilde{\nu}$  3304(s), 2959(m), 2933(m), 2870(w), 1645(s), 1594(s), 1555(s), 1522(m), 1496(m), 1460(m), 1340(m), 1315(m), 1272(m), 1216(m), 1194(w), 1154(m), 1096(w), 740(m).

HRMS (ESI+):  $m/z$  vypočteno pro  $\text{C}_{25}\text{H}_{32}\text{N}_3\text{O}_4^+ [\text{M} + \text{H}]^+$  438,2387, nalezeno 438,2386.

Pro  $\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_4$  (437,53)

vypočteno: 68,63 % C, 7,14 % H, 9,60 % N;

nalezeno: 68,46 % C, 7,32 % H, 9,45 % N.





***N*-(2-(Butylkarbamoyl)-4-methylfenyl)-3-methyl-1*H*-indol-2-karboxamid (10f)**

Experimentální údaje v *Tabulka 17*. Bezbarvé krystalky, b.t. 226–229 °C (cyklohexan),  $R_f = 0,76$  (5% ethanol v chloroformu), 0,83 (10% ethanol v chloroformu), 0,59 (20% ethyl-acetát v benzenu).

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ; 500 MHz):  $\delta$  0,89 (t, 3H,  $J = 7,3$  Hz, H4''), 1,24-1,42 (m, 2H, H3''), 1,44-1,59 (m, 2H, H2''), 2,34 (s, 3H, H10), 2,62 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3,27 (dd, 2H,  $J = 12,9, 6,9$  Hz, H1''), 7,07 (t, 1H,  $J = 7,3$  Hz, H5), 7,23 (t, 1H,  $J = 7,3$  Hz, H4'),

7,37 (d, 1H,  $J = 8,5$  Hz, H6), 7,42 (d, 1H,  $J = 8,2$  Hz, H6'), 7,59 (s, 1H, H7), 7,65 (d, 1H,  $J = 8,0$  Hz, H4), 8,39 (d, 1H,  $J = 8,4$  Hz, H3'), 8,73 (t, 1H,  $J = 5,3$  Hz, H8'), 11,42 (s, 1H, H9), 11,56 (s, 1H, H1).

$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ , 126 MHz):  $\delta$  10,1 (C10), 14,1 (C4''), 20,1 (C3''), 20,9 (CH<sub>3</sub>), 31,4 (C2''), 39,3 (C1''), 112,6 (C7), 113,2 (C3), 119,7 (C6'), 120,4 (C4'), 121,7 (C5), 122,1 (C4), 124,6 (C3'), 128,7 (C2 a C1'), 128,8 (C6), 132,4 (C3a), 132,5 (C2'), 136,4 (C7a), 136,6 (C5'), 160,6 (C8), 168,6 (C7').

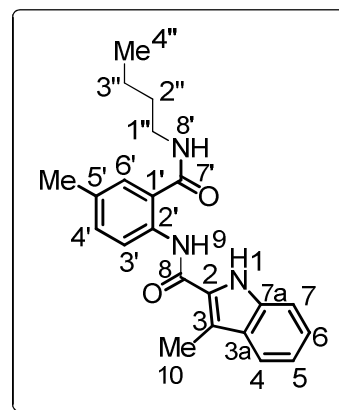
IČ (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\tilde{\nu}$  3307(s), 2962(w), 2934(w), 2870(w), 1651(s), 1632(m), 1589(s), 1519(s), 1471(w), 1446(m), 1334(m), 1297(m), 1281(w), 1263(w), 1240(m), 736(m), 684(w).

HRMS (ESI<sup>+</sup>):  $m/z$  vypočteno pro  $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}_2^+$   $[\text{M} + \text{H}]^+$  364,2020, nalezeno 364,2018.

Pro  $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_2$  (363,45)

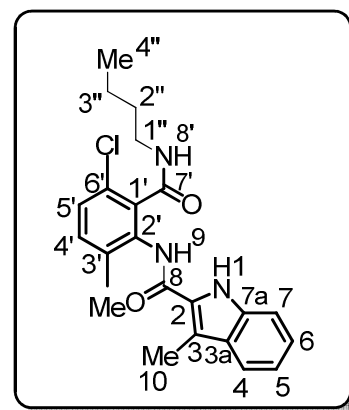
vypočteno: 72,70 % C, 6,93 % H, 11,56 % N;

nalezeno: 71,79 % C, 7,00 % H, 11,35 % N.

***N*-(2-(Butylkarbamoyl)-3-chlor-6-methylfenyl)-3-methyl-1*H*-indol-2-karboxamid****(10g)**

Experimentální údaje v *Tabulka 17*. Bezbarvé krystalky, b.t. 215–218 °C (cyklohexan),  $R_f = 0,73$  (5% ethanol v chloroformu), 0,80 (10% ethanol v chloroformu), 0,52 (20% ethyl-acetát v benzenu).

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ; 500 MHz):  $\delta$  0,54 (t, 3H,  $J = 7,3$  Hz, H4''), 1,02-1,20 (m, 2H, H3''), 1,20-1,34 (m, 2H, H2''), 2,22 (s, 3H, H10), 2,56 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3,05-3,19 (m, 2H, H1''), 7,02-



7,11 (m, 1H, H5), 7,19-7,29 (m, 1H, H4'), 7,32-7,46 (m, 3H, H5', H6 a H7), 7,63 (d, 1H,  $J = 8,0$  Hz, H4), 8,27 (t, 1H,  $J = 5,7$  Hz, H8'), 9,13 (s, 1H, H9), 11,35 (s, 1H, H1).

$^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 126 MHz):  $\delta$  10,2 (C10), 13,8 (C4''), 18,2 (CH<sub>3</sub>), 19,8 (C3''), 31,4 (C2''), 39,0 (C1''), 112,4 (C7), 115,3 (C3), 119,6 (C6'), 120,3 (C4'), 124,6 (C5), 127,2 (C4), 127,5 (C3'), 128,1 (C2), 128,5 (C1'), 131,6 (C6), 134,9 (C3a), 136,1 (C2'), 136,5 (C7a), 137,0 (C5'), 161,2 (C8), 165,0 (C7').

IČ (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\tilde{\nu}$  3322(m), 2960(m), 2930(m), 2860(w), 1650(s), 1629(s), 1586(m), 1559(s), 1527(m), 1495(m), 1460(m), 1372(w), 1336(w), 1314(m), 1296(s), 1239(w), 1226(w), 1198(w), 1184(w), 810(w), 744(m), 640(w).

HRMS (ESI+):  $m/z$  vypočteno pro  $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{ClN}_3\text{O}_2^+$   $[\text{M} + \text{H}]^+$  398,1630, nalezeno 398,1626.

Pro  $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{ClN}_3\text{O}_2$  (397,90)

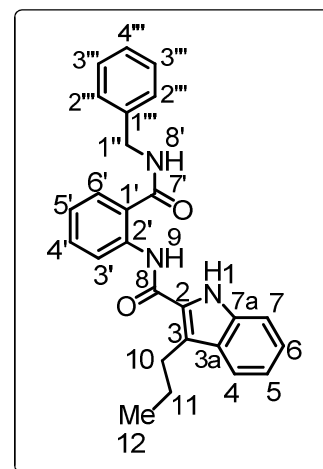
vypočteno: 66,41 % C, 6,08 % H, 10,56 % N;

nalezeno: 66,47 % C, 6,20 % H, 10,51 % N.

### ***N*-(2-(Benzylkarbamoyl)fenyl)-3-propyl-1*H*-indol-2-karboxamid (10h)**

Experimentální údaje v *Tabulka 17*. Bezbarvé krystalky, b.t. 188–192 °C (cyklohexan),  $R_f = 0,73$  (5% ethanol v chloroformu), 0,80 (10% ethanol v chloroformu), 0,57 (20% ethyl-acetát v benzenu).

$^1\text{H}$ -NMR (DMSO- $d_6$ ; 500 MHz):  $\delta$  0,90 (t, 3H,  $J = 7,1$  Hz, H12), 1,64 (dd, 2H,  $J = 14,3, 7,1$  Hz, H11), 3,08 (t, 2H,  $J = 7,2$  Hz, H10), 4,51 (d, 2H,  $J = 5,5$  Hz, H1''), 7,06 (t, 1H,  $J = 7,4$  Hz, H5), 7,17-7,27 (m, 3H, H6, H5' a H4'''), 7,32 (d, 4H,  $J = 6,7$  Hz, H2''' a H3'''), 7,43 (d, 1H,  $J = 8,1$  Hz, H7), 7,58 (t, 1H,  $J = 7,7$



Hz, H4'), 7,65 (d, 1H,  $J = 7,9$  Hz, H4), 7,87 (d, 1H,  $J = 7,6$  Hz, H6'), 8,54 (d, 1H,  $J = 8,3$  Hz, H3'), 9,38 (s, 1H, H8'), 11,44 (s, 1H, H9), 11,68 (s, 1H, H1).

$^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ ; 126 MHz):  $\delta$  14,4 (C12), 24,6 (C11), 26,2 (C10), 43,0 (C1''), 112,7 (C7), 119,3 (C3), 119,8 (C5), 120,6 (C4), 121,6 (C3'), 121,9 (C4'''), 123,3 (C1'), 124,6 (C6), 127,3 (C5'), 127,7 (C3'''), 128,1 (C2), 128,3 (C3a), 128,6 (C6'), 128,8 (C2'''), 132,4 (C1'''), 136,5 (C4'), 139,3 (C7a), 139,5 (C2'), 160,9 (C8), 168,7 (C7').

IČ (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\tilde{\nu}$  3322(s), 3291(m), 1647(s), 1626(s), 1596(m), 1585(m), 1541(m), 1519(s), 1447(w), 1433(w), 1325(w), 1292(w), 1271(m), 1241(w), 758(w), 735(m), 670(w).

HRMS (ESI+):  $m/z$  vypočteno pro  $\text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}_2^+$   $[\text{M} + \text{H}]^+$  412,2020, nalezeno 412,2014.

Pro  $C_{26}H_{25}N_3O_2$  (411,50)

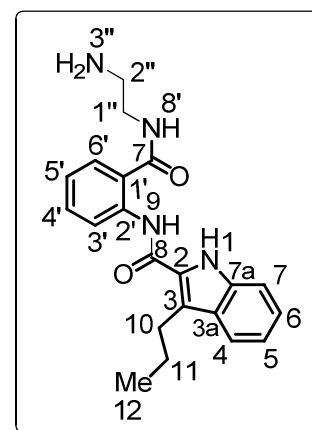
vypočteno: 75,89 % C, 6,12 % H, 10,21 % N;

nalezeno: 73,39 % C, 6,06 % H, 9,34 % N.

***N*-(2-((2-Aminoethyl)karbamoyl)fenyl)-3-propyl-1*H*-indol-2-karboxamid (10i)**

Experimentální údaje v *Tabulka 17*. Nažloutlé krystalky, b.t. 155–160 °C,  $R_f = 0,55$  (5% ethanol v chloroformu), 0,77 (10% ethanol v chloroformu), 0,30 (20% ethyl-acetát v benzenu).

$^1H$ -NMR (DMSO- $d_6$ ; 500 MHz):  $\delta$  0,93 (t, 3H,  $J = 7,3$  Hz, H12), 1,61-1,70 (m, 2H, H11), 2,71 (t, 2H,  $J = 6,5$  Hz, H2''), 3,07-3,14 (m, 2H, H10), 3,29 (t, 2H, H1''), 5,30 (s, 2H, H3''), 7,06 (dd, 1H,  $J = 11,1, 3,9$  Hz, H5), 7,16-7,25 (m, 2H, H6 a H4'), 7,43 (d, 1H,  $J = 8,2$  Hz, H7), 7,51-7,58 (m, 1H, H5'), 7,66 (d, 1H,  $J = 8,1$  Hz,



H4), 7,81 (dd, 1H,  $J = 7,9, 1,3$  Hz, H6'), 8,50 (m, 1H, H3'), 8,77 (s, 1H, H8'), 8,95 (s, 1H, H1), 11,65 (s, 1H, H9).

$^{13}C$ -NMR (DMSO- $d_6$ ; 126 MHz):  $\delta$  14,4 (C12), 24,6 (C11), 26,2 (C10), 41,4 (C2''), 43,4 (C1''), 112,7 (C3'), 119,3 (C5'), 119,8 (C7), 120,6 (C1'), 121,7 (C3), 122,1 (C5), 123,3 (C4), 124,6 (C6), 128,2 (C2), 128,3 (C3a), 128,7 (C6'), 132,2 (C7a), 136,5 (C2'), 139,1 (C4'), 160,9 (C8), 168,9 (C7').

$^{15}N$ -NMR (DMSO- $d_6$ ; 51 MHz):  $\delta$  19,3 (N3''), 48,1 (N8'), 71,2 (N9), 116,9 (N1).

IČ (KBr,  $cm^{-1}$ ):  $\tilde{\nu}$  3367(w), 3297(m), 2956(w), 2927(w), 2869(w), 1637(s), 1602(m), 1583(w), 1544(s), 1521(s), 1445(m), 1324(w), 1311(w), 1294(m), 1225(w), 749(s).

HRMS (ESI+):  $m/z$  vypočteno pro  $C_{21}H_{25}N_4O_2^+$   $[M + H]^+$  365,1972, nalezeno 365,1973.

Pro  $C_{21}H_{24}N_4O_2$  (364,44)

vypočteno: 69,21 % C, 6,64 % H, 15,37 % N;

nalezeno: 69,14 % C, 6,83 % H, 14,53 % N.

***N*-(2-(Dibutylkarbamoyl)fenyl)-3-propyl-1*H*-indol-2-karboxamid (10j)**

Experimentální údaje v *Tabulka 17*. Nažloutlé krystalky, b.t. 128–135 °C (cyklohexan),  $R_f = 0,80$  (5% ethanol v chloroformu), 0,83 (10% ethanol v chloroformu), 0,70 (20% ethyl-acetát v benzenu).

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ; 500 MHz):  $\delta$  0,65 (t, 3H,  $J = 7,3$  Hz, H4''), 0,71 (t, 3H,  $J = 7,3$  Hz, H4'''), 0,93 (t, 3H,  $J = 7,3$  Hz, H12), 0,98–1,04 (m, 2H, H3''), 1,16–1,24 (m, 2H, H3'''), 1,35–1,42 (m, 2H, H2''), 1,42–1,48 (m, 2H, H2'''), 1,59–1,67 (m, 2H, H11), 3,04 (t, 2H,  $J = 7,5$  Hz, H10), 3,16 (t, 2H,  $J = 7,3$  Hz, H1''), 3,39 (t, 2H,  $J = 7,2$  Hz, H1'''), 7,06 (ddd, 1H,  $J = 7,6, 7,3, 0,8$  Hz, H5'), 7,22–7,28 (m, 2H, H4' a H5), 7,33 (dd, 1H,  $J = 7,6, 1,3$  Hz, H4), 7,42 (d, 1H,  $J = 4,1$  Hz, H3'), 7,48 (ddd, 1H,  $J = 8,4, 7,1, 1,4$  Hz, H6), 7,65 (d, 1H,  $J = 4,0$  Hz, H6'), 7,86 (d, 1H,  $J = 4,0$  Hz, H7). 9,26 (s, 1H, H1), 11,46 (s, 1H, H9).

$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ; 126 MHz):  $\delta$  13,3 (C4''), 13,67 (C4'''), 13,9 (C12), 19,1 (C3''), 19,7 (C3'''), 24,0 (C11), 26,0 (C10), 29,0 (C2'''), 29,9 (C2''), 43,5 (C1'''), 48,0 (C1''), 112,1 (C3'), 119,3 (C5'), 120,1 (C3 a C6'), 124,2 (C4'), 124,6 (C5), 125,0 (C7), 126,4 (C2), 126,9 (C4), 127,7 (C1'), 129,4 (C6), 129,9 (C3a), 134,5 (C7a), 135,8 (C2'), 160,2 (C8), 168,8 (C7').

$^{15}\text{N-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ; 51 MHz):  $\delta$  122,3(N1), 130,3 (N9).

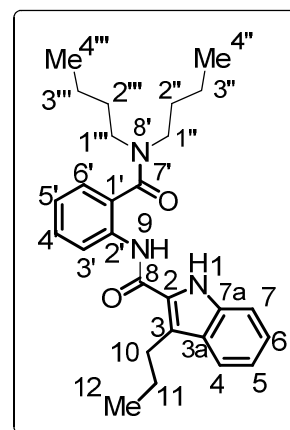
IČ (ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\tilde{\nu}$  2956(w), 2929(w), 2867(w), 1663(m), 1589(s), 1496(m), 1524(w), 1466(w), 1436(m), 1378(w), 1292(s), 1271(w), 1245(w), 1223(w), 1191(m), 1094(w), 762(w), 740(s), 673(m), 632(w), 612(w), 431(w).

HRMS (ESI+):  $m/z$  vypočteno pro  $\text{C}_{27}\text{H}_{36}\text{N}_3\text{O}_2^+$   $[\text{M} + \text{H}]^+$  434,2802, nalezeno 434,2806.

Pro  $\text{C}_{27}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_2$  (433,27)

vypočteno: 74,79 % C, 8,14 % H, 9,69 % N;

nalezeno: 74,68 % C, 8,20 % H, 9,62 % N.



***N*-(2-((4-Methoxyfenyl)karbamoyl)fenyl)-3-propyl-1*H*-indol-2-karboxamid (10k)**

Experimentální údaje v *Tabulka 17*. Světle modré krystalky, b.t. 210–215 °C (cyklohexan),  $R_f = 0,66$  (5% ethanol v chloroformu), 0,88 (10% ethanol v chloroformu).

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ; 500 MHz):  $\delta$  0,90 (t, 3H,  $J = 7,3$  Hz, H12), 1,63-1,68 (m, 2H, H11), 3,08 (t, 2H,  $J = 7,5$  Hz, H10), 3,74 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 6,93 (d, 2H,  $J = 4,5$  Hz, H5" a H3"), 7,06 (t, 1H,  $J = 7,5$  Hz, H5'), 7,23 (t, 1H,  $J = 7,5$  Hz, H6), 7,28 (t, 1H,  $J = 7,5$  Hz, H5'), 7,43 (d, 1H,  $J = 4,1$  Hz, H7), 7,61 (t, 1H,  $J = 8,0$  Hz, H4'), 7,64-7,67 (m, 3H, H4, H6" a H2"), 7,89 (d, 1H,  $J = 3,8$  Hz, H6'), 8,47 (d, 1H,  $J = 4,1$  Hz, H3'), 10,47 (s, 1H, H8'), 11,10 (s, 1H, H9), 11,49 (s, 1H, H1).

$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ; 126 MHz):  $\delta$  13,9 (C12), 24,2 (C11), 25,9 (C10), 55,2 (OCH<sub>3</sub>), 112,3 (C7), 113,8 (C3" a C5"), 119,0 (C3), 119,4 (C5), 120,2 (C4), 121,7 (C3'), 122,5 (C2" a C6"), 123,0 (C1'), 123,1 (C5'), 124,2 (C6), 127,4 (C2), 127,8 (C3a), 128,7 (C6'), 131,5 (C1"), 131,9 (C4'), 136,0 (C7a), 138,2 (C2'), 156,0 (C4"), 160,4 (C8), 166,8 (C7').

$^{15}\text{N-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ; 51 MHz):  $\delta$  123,7 (N9), 132,1 (N8'), 131,6 (N1).

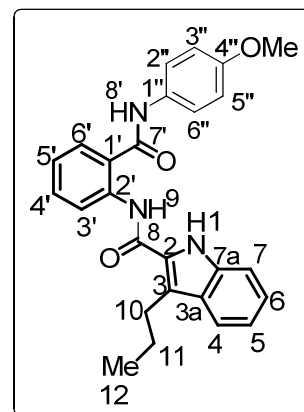
IČ (ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\tilde{\nu}$  3303(m), 2957(w), 2929(w), 2868(w), 1650(w), 1629(w), 1594(m), 1583(m), 1507(s), 1463(w), 1442(m), 1409(w), 1294(s), 1258(m), 1239(s), 1186(w), 1172(w), 823(m), 759(m), 740(s), 674(s), 613(w), 559(w), 516(w).

HRMS (ESI+):  $m/z$  vypočteno pro  $\text{C}_{26}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_3^+ [\text{M} + \text{H}]^+$  428,1955, nalezeno 428,1973.

Pro  $\text{C}_{26}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_3$  (427,50)

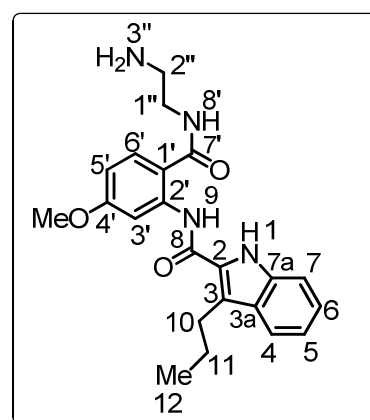
vypočteno: 73,05 % C, 5,89 % H, 9,83 % N;

nalezeno: 72,98 % C, 5,96 % H, 9,80 % N.

***N*-(2-((2-Aminoethyl)karbamoyl)-5-methoxyfenyl)-3-propyl-1*H*-indol-2-karboxamid (10l)**

Experimentální údaje v *Tabulka 17*. Bílý prášek, b.t. 158–163 °C,  $R_f = 0,75$  (5% ethanol v chloroformu), 0,81 (10% ethanol v chloroformu), 0,69 (20% ethyl-acetát v benzenu).

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ; 500 MHz):  $\delta$  0,93 (t, 3H,  $J = 7,3$  Hz, H12), 1,60-1,71 (m, 2H, H11), 2,69 (t, 2H,  $J = 6,5$  Hz, H2"), 3,05-3,14 (m, 2H, H10), 3,27 (s, 2H, H1"), 3,84 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 5,76 (s, 2H, H3"), 6,77 (dd, 1H,  $J = 8,8, 2,6$  Hz, H5'), 7,06 (dd, 1H,  $J = 11,1, 3,9$  Hz, H5), 7,20-7,26 (m, 1H, H6), 7,43



(d, 1H,  $J = 8,2$  Hz, H7), 7,66 (d, 1H,  $J = 8,1$  Hz, H4), 7,82 (d, 1H,  $J = 8,8$  Hz, H6'), 8,26 (d, 1H,  $J = 2,6$  Hz, H3'), 8,63 (s, 1H, H8'), 12,20 (s, 1H, H1), 15,22 (s, 1H, H9).

$^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ ; 126 MHz):  $\delta$  14,4 (C12), 24,7 (C11), 26,2 (C10), 41,6 (C2''), 43,4 (C1''), 55,9 (OCH<sub>3</sub>), 106,5 (C3'), 108,6 (C5'), 112,8 (C7), 113,6 (C1'), 119,3 (C3), 119,8 (C5), 120,6 (C4), 124,6 (C6), 128,3 (C2 a C3a), 130,3 (C6'), 136,5 (C7a), 141,5 (C2'), 161,1 (C8), 162,2 (C4'), 168,7 (C7').

$^{15}\text{N}$ -NMR (DMSO- $d_6$ ; 51 MHz):  $\delta$  18,7 (N3''), 114,0 (N8'), 125,8 (N9), 131,9 (N1).

IČ (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\tilde{\nu}$  3360(w), 3291(m), 3071(w), 2953(m), 2927(m), 2868(m), 1638(s), 1606(s), 1584(s), 1548(s), 1522(s), 1448(m), 1431(s), 1279(s), 1206(m), 1168(m), 1123(w), 1051(m), 967(w), 933(w), 884(w), 863(w), 768(m), 739(m), 681(w).

HRMS (ESI+):  $m/z$  vypočteno pro  $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{N}_4\text{O}_3^+$   $[\text{M} + \text{H}]^+$  395,2078, nalezeno 395,2076.

Pro  $\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_3$  (394,47)

vypočteno: 66,99 % C, 6,64 % H, 14,20 % N;

nalezeno: 66,10 % C, 6,78 % H, 13,90 % N.

### ***N*-(2-((2-Aminoethyl)karbamoyl)-naftalen-1-yl)-3-propyl-1*H*-indol-2-karboxamid (10m)**

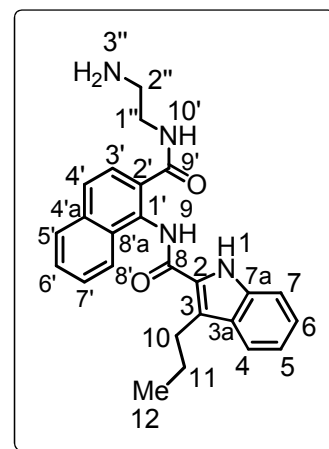
Experimentální údaje v *Tabulka 17*. Bílý prášek, b.t. 300–301 °C,  $R_f = 0,87$  (5% ethanol v chloroformu).

$^1\text{H}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 500 MHz):  $\delta$  0,93 (t, 3H,  $J = 7,3$  Hz, H12), 1,62-1,74 (m, 2H, H11), 2,63 (t, 2H,  $J = 6,4$  Hz, H2''), 3,03-3,14 (m, 2H, H10), 3,24 (t, 2H,  $J = 5,9$  Hz, H1''), 7,09 (t, 1H,  $J = 7,5$  Hz, H5), 7,27 (t, 1H,  $J = 7,6$  Hz, H5'), 7,48 (d, 1H,  $J = 8,2$  Hz, H7), 7,53-7,65 (m, 2H, H4' a H6), 7,69 (d, 1H,  $J = 8,1$  Hz, H4), 7,73 (d, 1H,  $J = 8,5$  Hz, H6'), 7,95 (d, 1H,  $J = 8,6$  Hz, H3'), 8,01 (d, 2H,  $J = 8,4$  Hz, H7'), 8,50 (s, 1H, H10').

$^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ , 126 MHz):  $\delta$  14,1 (C12), 24,0 (C11), 26,1 (C10), 41,0 (C2''), 42,7 (C1''), 112,2 (C7), 119,3 (C3), 120,1 (C5), 120,9 (C4), 124,2 (C8'a), 124,9 (C2'), 125,0 (C6), 126,3 (C2), 126,5 (C3a), 126,8 (C6'), 127,2 (C4'), 127,7 (C8'), 127,9 (C3'), 129,3 (C4'a), 129,5 (C7'), 132,6 (C5'), 134,2 (C7a), 135,8 (C1'), 161,6 (C8), 167,8 (C9').

$^{15}\text{N}$ -NMR (DMSO- $d_6$ ; 51 MHz): 19,3 (N3''), 118,4 (N8'), 130,4 (N9).

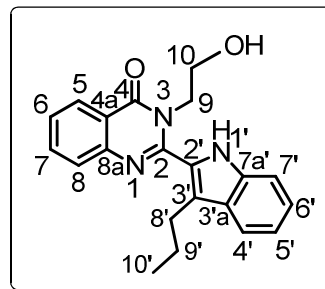
HRMS (ESI+):  $m/z$  vypočteno pro  $\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{N}_4\text{O}_2^+$   $[\text{M} + \text{H}]^+$  415,2129, nalezeno 415,2135.



**3-(2-Hydroxyethyl)-2-(3-propyl-1*H*-indol-2-yl)chinazolin-4(3*H*)-on (11m)**

Experimentální údaje v *Tabulka 17*. Nažloutlé krystalky, b.t. 70–78 °C (cyklohexan),  $R_f = 0,59$  (5% ethanol v chloroformu), 0,79 (10% ethanol v chloroformu).

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ; 500 MHz):  $\delta$  0,86 (t, 3H,  $J = 7,3$  Hz, H10'), 1,65 (tq, 2H,  $J = 7,5, 7,4$  Hz, H9'), 2,75 (t, 2H,  $J = 7,6$  Hz, H8'), 3,58 (dt, 2H,  $J = 5,6, 5,6$  Hz, H10), 4,11 (t, 2H,



$J = 6,0$  Hz, H9), 5,15 (t, 1H,  $J = 5,4$  Hz, OH), 7,09 (t, 1H,  $J = 7,5$  Hz, H5'), 7,21 (t, 1H,  $J = 7,4$  Hz, H6'), 7,43 (d, 1H,  $J = 4,1$  Hz, H7'), 7,60 (t, 1H,  $J = 7,5$  Hz, H6), 7,65 (d, 1H,  $J = 4,0$  Hz H4'), 7,70 (d, 1H,  $J = 4,0$  Hz, H8), 7,87 (ddd, 1H,  $J = 7,7, 7,6, 1,3$  Hz, H7), 8,23 (dd, 1H,  $J = 7,9, 0,8$  Hz, H5), 11,44 (s, 1H, H1').

$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ; 126 MHz):  $\delta$  14,2 (C10'), 23,4 (C9'), 26,2 (C8'), 47,6 (C9), 57,7 (C10), 111,8 (C7'), 116,9 (C3'), 119,2 (C5'), 119,7 (C4'), 120,5 (C4a), 122,8 (C6'), 126,3 (C5), 127,1 (C3'a), 127,3 (C6), 127,4 (C8), 127,6 (C2'), 134,7 (C7), 135,7 (C7'a), 147,0 (C8a), 149,9 (C2), 161,5 (C4).

$^{15}\text{N-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ; 51 MHz):  $\delta$  132,8 (N1'), 166,6 (N3), 250,1 (N1).

IČ (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\tilde{\nu}$  3181(w), 2954(w), 1686(s), 1653(s), 1618(w), 1608(m), 1581(m), 1561(s), 1499(w), 1472(m), 1439(m), 1432(m), 1388(m), 1337(m), 1261(s), 1232(m), 1165(w), 1147(w), 1105(m), 1064(m), 1054(s), 802(m), 782(m), 773(m), 750(m), 742(m), 698(m).

HRMS (ESI+):  $m/z$  vypočteno pro  $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_2^+ [\text{M} + \text{H}]^+$  348,1707, nalezeno 348,1703.

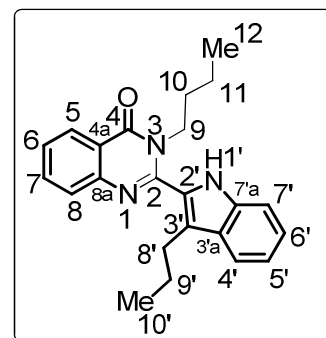
**3.8 Dehydratace amidů 10**

Výchozí amid **10** byl navážen do kapkové baňky (25 mL), následně byl přidán toluen (3 mL). K takto připravené suspenzi byl *per partes* přikapán thionylchlorid (1 ekvivalent **10**) v toluenu (2 mL). Nažloutlý roztok byl refluxován 15 minut, následně byl ponechán zchladnout na laboratorní teplotu a kontrola TLC potvrdila úplnou konverzi výchozí sloučeniny. Těkavé složky reakční směsi byly odpařeny ve vakuu a tmavý odparek byl rozpuštěn v dichlormethanu (20 mL). Roztok byl extrahován 0,1M vodným roztokem  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (2 x 2 mL) a vodou (2 x 5 mL). Organická fáze byla sušena ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) a odpařena ve vakuu do sucha. Krystalizací odparek z cyklohexanu byl získán příslušný čistý chinazolinon **11**.

**3-Butyl-2-(3-propyl-1H-indol-2-yl)chinazolin-4(3H)-on (11a)**

Připraven z amidu **10a** (99 mg; 0,26 mmol), výtěžek 54 mg (57 %), nažloutlé krystalky, b.t. 128–130 °C (benzen),  $R_f = 0,71$  (5% ethanol v chloroformu), 0,88 (10% ethanol v chloroformu), 0,57 (20% ethyl-acetát v benzenu).

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ; 500 MHz):  $\delta$  0,88 (t, 3H,  $J = 7,4$  Hz, H10'), 0,94 (t, 3H,  $J = 7,3$  Hz H12), 1,28-1,38 (m, 2H, H11), 1,48-1,57 (m, 2H, H9'), 1,62-1,72 (m, 2H, H8'), 3,06-3,14 (m,



2H, H10), 3,28 (dd, 2H,  $J = 12,9, 6,9$  Hz, H9), 7,06 (t, 1H,  $J = 7,4$  Hz, H5'), 7,16-7,26 (m, 2H, H6' a H7), 7,44 (d, 1H,  $J = 8,2$  Hz, H7'), 7,55 (m, 1H, H8), 7,66 (d, 1H,  $J = 8,0$  Hz, H4'), 7,77 (dd, 1H,  $J = 7,8, 1,1$  Hz, H6), 8,80 (t, 1H,  $J = 5,4$  Hz, H5), 11,69 (s, 1H, H1').

$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ; 126 MHz):  $\delta$  14,1 (C10'), 14,4 (C12), 20,1 (C9'), 24,7 (C11), 26,3 (C8'), 31,4 (C10), 39,3 (C9), 112,8 (C7'), 119,1 (C3'), 119,8 (C5'), 120,6 (C4'), 121,7 (C4a), 122,1 (C6'), 123,3 (C5), 124,6 (C3'a), 128,2 (C6), 128,3 (C8), 128,6 (C2'), 132,2 (C7), 136,5 (C7'a), 139,1 (C8a), 160,9 (C2), 168,6 (C4).

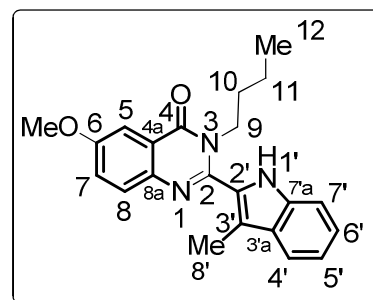
$^{15}\text{N-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ; 51 MHz):  $\delta$  119,2 (N3), 124,4 (N1), 131,1 (N1').

IČ (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\tilde{\nu}$  3320(s), 2956(m), 2932(m), 2869(m), 1653(s), 1627(s), 1595(s), 1518(s), 1465(m), 1445(s), 1337(m), 1325(m), 1281(s), 1240(m), 1172(W), 762(m), 736(s), 677(m), 629(w).

HRMS (ESI+):  $m/z$  vypočteno pro  $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}^+$   $[\text{M} + \text{H}]^+$  360,2031, nalezeno 360,2066.

**3-Butyl-6-methoxy-2-(3-methyl-1H-indol-2-yl)chinazolin-4(3H)-on (11d)**

Připraven z amidu **10d** (149 mg; 0,394 mmol), výtěžek 101 mg (71 %), nažloutlé krystalky, b.t. 109–113 °C (cyklohexan),  $R_f = 0,76$  (5% ethanol v chloroformu), 0,88 (10% ethanol v chloroformu), 0,61 (20% ethyl-acetát v benzenu).



$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ; 500 MHz):  $\delta$  0,94 (t, 3H,  $J = 7,4$  Hz, H12), 1,39-1,49 (m, 2H, H11), 1,59-1,68 (m, 2H, H10), 2,66 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3,61 (t, 2H,  $J = 7,1$  Hz, H9), 3,82 (s, 3H, H8'), 7,05 (t, 1H,  $J = 7,4$  Hz, H5'), 7,18-7,25 (m, 2H, H6' a H7), 7,38 (d, 1H,  $J = 8,7$  Hz, H5), 7,43 (d, 1H,  $J = 2,9$  Hz, H7'), 7,46 (d, 1H,  $J = 8,2$  Hz, H8), 7,62 (d, 1H,  $J = 7,9$  Hz, H4'), 11,34 (s, 1H, H1').



$^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ ; 126 MHz):  $\delta$  10,8 (C8'), 14,3 (C12), 20,7 (C11), 32,9 (C10), 39,5 (C9), 56,0 (OCH<sub>3</sub>), 108,0 (C7'), 112,6 (C3'), 116,5 (C5'), 119,7 (C4'), 120,2 (C4a), 121,3 (C6'), 124,9 (C5), 125,9 (C3'a), 127,8 (C6), 128,5 (C8), 128,8 (C2'), 136,0 (C7), 137,3 (C7'a), 141,3 (C8a), 150,8 (C2), 158,8 (C4).

$^{15}\text{N}$ -NMR (51 MHz, DMSO- $d_6$ ).  $\delta$  129,0 (N1'), 219,0 (N1), 230,8 (N3).

IČ (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\bar{\nu}$  3452(w), 3349(w), 2916(w), 2868(w), 1751(m), 1685(m), 1622(s), 1597(s), 1547(w), 1490(s), 1451(m), 1379(w), 1333(m), 1320(m), 1274(m), 1245(s), 1151(w), 1125(w), 1109(w), 1078(w), 1032(s), 864(w), 827(m), 755(m), 743(s), 721(w), 477(m).

HRMS (ESI+):  $m/z$  vypočteno pro  $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_2^+$   $[\text{M} + \text{H}]^+$  362,1863, nalezeno 362,1870.

### 3-Butyl-6,8-dimethoxy-2-(3-propyl-1H-indol-2-yl)chinazolin-4(3H)-on (11e) Přípraven

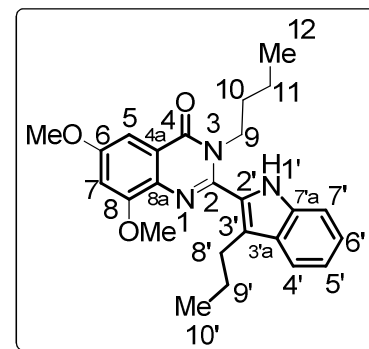
z amidu **10e** (104,5 mg; 0,2388 mmol), výtěžek 83,7 mg (84 %), nažloutlé krystalky, b.t. 121–126 °C (hexan),  $R_f = 0,87$  (5% ethanol v chloroformu), 0,90 (10% ethanol v chloroformu).

IČ (ATR,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\bar{\nu}$  2956(m), 2929(m), 2868(w), 1673(w), 1643(w), 1611(s), 1589(s), 1553(m), 1488(m), 1453(m), 1434(m), 1368(m), 1323(m), 1297(m), 1244(m), 1216(s), 1178(w), 1147(s), 1090(m), 1075(m), 1036(m), 937(w), 839(m), 767(m), 738(s), 685(w), 625(w), 571(w), 544(w), 490(m), 455(w), 432(m).

$^1\text{H}$ -NMR (DMSO- $d_6$ ; 500 MHz):  $\delta$  0,68 (t, 3H,  $J = 7,3$  Hz, H10'), 0,89-1,04 (m, 7H, H12, H11, H9'), 1,13-1,25 (m, 2H, H10), 1,42-1,51 (m, 2H, H9), 1,58-1,74 (m, 2H, H8'), 3,91 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3,96 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 6,65 (d, 1H,  $J = 2,6$  Hz, H5'), 6,76 (d, 1H,  $J = 2,6$  Hz, H6'), 6,84 (d, 1H,  $J = 2,6$  Hz, H7), 7,23 (m, 2H, H7' a H4'), 7,62-7,66 (m, 1H, H5), 11,15 (s, 1H, H1').

$^{13}\text{C}$ -NMR (DMSO- $d_6$ ; 126 MHz):  $\delta$  14,4 (C10'), 14,5 (C12), 20,0 (C9'), 20,1 (C11), 24,8 (C8'), 31,5 (C10), 33,1 (C9), 56,1 (OCH<sub>3</sub>), 56,6 (OCH<sub>3</sub>), 107,8 (C7'), 112,5 (C3'), 112,9 (C5'), 115,1 (C4'), 120,3 (C4a), 121,5 (C6'), 124,3 (C5), 124,6 (C3'a), 125,0 (C6), 137,3 (C8), 145,4 (C2'), 155,4 (C7), 155,8 (C7'a), 156,2 (C8a), 159,5 (C2), 167,2 (C4).

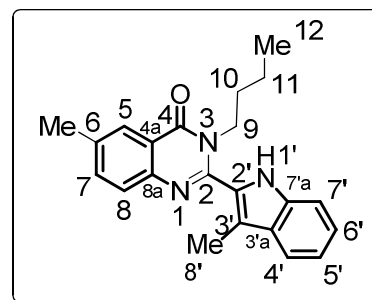
HRMS (ESI+):  $m/z$  vypočteno pro  $\text{C}_{29}\text{H}_{41}\text{N}_4\text{O}_3^+$   $[\text{M} + \text{H}]^+$  493,3173, nalezeno 493,3174.



**3-Butyl-6-methyl-2-(3-methyl-1*H*-indol-2-yl)chinazolin-4(3*H*)-on (11f)** Připraven

z amidu **10f** (104,7 mg; 0,2881 mmol), výtěžek 53,2 mg (53 %), nahnědlý prášek, b.t. 153–155 °C (cyklohexan),  $R_f = 0,96$  (5% ethanol v chloroformu), 0,84 (10% ethanol v chloroformu), 0,64 (20% ethyl-acetát v benzenu).

$^1\text{H-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ; 500 MHz):  $\delta$  0,88 (t, 3H,  $J = 7,4$  Hz, H12), 1,27-1,37 (m, 2H, H11), 1,46-1,55 (m, 2H, H10), 2,34 (s,



3H, H8'), 2,62 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3,26 (dd, 2H,  $J = 12,8, 6,9$  Hz, H1''), 7,07 (t, 1H,  $J = 7,5$  Hz, H5'), 7,22 (dd, 1H,  $J = 11,2, 4,0$  Hz, H7), 7,29-7,39 (m, 2H, H5 a H6'), 7,42 (d, 1H,  $J = 8,2$  Hz, H7'), 7,61 (d, 1H,  $J = 1,3$  Hz, H8), 8,38 (d, 1H,  $J = 8,4$  Hz, H4'), 11,57 (s, 1H, H1').

$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ; 126 MHz):  $\delta$  10,1 (C8'), 14,1 (C12), 20,1 (CH<sub>3</sub>), 20,9 (C11), 31,4 (C10), 39,3 (C9), 112,6 (C7'), 113,2 (C3'), 119,7 (C5'), 120,4 (C4'), 121,7 (C4a), 122,2 (C6'), 124,6 (C5), 128,7 (C3'a), 128,7 (C6), 128,8 (C8), 132,4 (C2'), 132,5 (C7), 136,4 (C7'a), 136,6 (C8a), 160,6 (C2), 168,6 (C4).

$^{15}\text{N-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ; 51 MHz):  $\delta$  119,2 (N3), 125,1 (N1), 131,8 (N1').

IČ (KBr,  $\text{cm}^{-1}$ ):  $\tilde{\nu}$  2954(m), 2870(w), 2801(w), 1672(s), 1599(s), 1570(m), 1542(w), 1500(m), 1466(w), 1444(m), 1335(m), 1304(w), 1263(w), 1237(m), 1208(w), 1173(w), 1137(w), 1106(w), 747(m).

HRMS (ESI+):  $m/z$  vypočteno pro C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>N<sub>3</sub>O<sup>+</sup> [M + H]<sup>+</sup> 346,1914, nalezeno 346,1917.

## 4 MIKROBIOLOGICKÉ EXPERIMENTY

### 4.1 Materiál

Kultivační média byla připravena z komerčních živných půd od výrobce HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Indie. Použité chemikálie v čistotě p.a. byly dodány firmou Lachema Neratovice, ČR. Při provádění biologických testů bylo pracováno s běžným laboratorním sklem a pomůckami. Ke sterilizaci tekutých médií byla použita mikrofiltrace. Agarové živné půdy byly sterilizovány při 115 °C po dobu 30 minut v autoklávu a po zchlazení na cca 45 °C za horka rozlity do Petriho misek (15 mL) a ponechány v laminárním boxu ztuhnout.

#### 4.1.1 Roztoky a živná média

U připravených sloučenin byly testovány antimikrobiální účinky vůči níže uvedeným bakteriálním, kvasinkovým a plísňovým kulturám. Roztoky zkoumaných sloučenin byly připraveny asepticky ve sterilních odměrných baňkách (5 mL) rozpuštěním navážky látky ve sterilním vodném 5% roztoku dimethylsulfoxidu (DMSO). Přítomnost DMSO ve vodě byla důležitá pro rozpuštění testovaných organických látek, použitá koncentrace DMSO však neovlivňovala růst testovaných mikroorganismů. Fyziologický roztok byl připraven rozpuštěním 8,5 g NaCl v 1000 mL destilované vody. Roztok byl důkladně promíchán a sterilizován.

#### **Živný bujón s glukosou (TSG)**

Byl připraven navážením 3,0 g tryptonu (HiMedia), 0,8 g soja-peptonu (HiMedia), 1,0 g NaCl, 0,5 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> a 2,8 g D-glukosy a rozpuštěním ve 100 mL destilované vody. Výsledný bujón byl sterilizován filtrací.

#### **Tryptonový agar s kvasničným extraktem (TYA)**

Tato univerzální agarová živná půda byla připravena navážením 2,1 g Tryptone Glucose Yeast Extract Agar (HiMedia) a rozpuštěním ve 100 mL destilované vody.

#### **Mueller Hinton agar (MH)**

Půda vhodná pro stanovení citlivosti mikroorganismů k antimikrobiálním látkám difuzní metodou. Pro přípravu 100 mL agaru bylo použito 2,1 g Mueller Hinton Broth (HiMedia), 1,6 g Ionagar No. 2 (Oxoid) a 100 mL destilované vody.

#### **Sabouraud agar (SAB)**

Živná půda používaná pro kultivaci kvasinek a plísní. Agarová živná půda byla připravena navážením 6,5 g Sabouraud Dextrose Agar (HiMedia) a rozpuštěním ve 100 mL destilované vody.

#### **Agar se sladovým extraktem (MEA)**

Komerční produkt z kategorie živných půd pro růst kvasinek a plísní. Médium bylo připraveno rozpuštěním navážky 2,0 g Malt Extract Broth Base (HiMedia) a 1,6 g Ionagar No. 2 (Oxoid) ve 100 mL destilované vody.

#### **GKCH agar**

Pevné médium s chloramfenikolem, glukosou a kvasničným extraktem pro růst kvasinek a plísní. Půda byla připravena z 4,1 g Chloramfenicol Yeast Glucose Agar (HiMedia) a 100 mL destilované vody.

#### **4.1.2 Použité kultury mikroorganismů**

*Aspergillus niger* CCM 8155, *Candida albicans* CCM 8275, *Enterococcus faecalis* CCM 4224, *Escherichia coli* CCM 3954, *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955, *Pseudomonas aeruginosa* FT 5 (ze sbírky ÚIOŽP, izolát z Dřevnice), *Staphylococcus aureus* CCM 3953, *Trichoderma viride* CCM F-486.

#### **4.1.3 Přístrojové vybavení**

Aseptický laminární box, typ Bio-II-A, výrobce Telstar (Španělsko); autokláv SANoclav, typ LaS-3-20-MCS-J, výrobce Dekra (Německo); biologický termostat, typ BT 120 (ČR); mikrodávkače, 1 - 5 mL, 100 - 1000  $\mu$ L, 20 - 200  $\mu$ L, výrobce Biohit (Finsko); mikroskop, typ CX41 RF, výrobce Olympus (Japonsko); minishaker, typ MS1, výrobce Ika (Brazílie); mrazicí box, typ Mybio, výrobce Dairei (Dánsko); váhy, typ SI-64 A, výrobce Denver Instrument (Německo).

### **4.2 Metodika**

#### **Příprava suspenzí mikroorganismů**

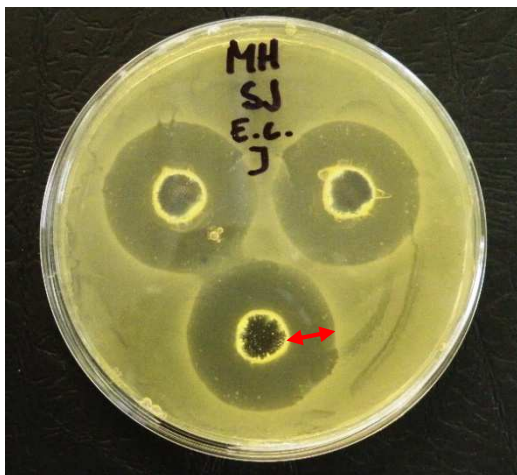
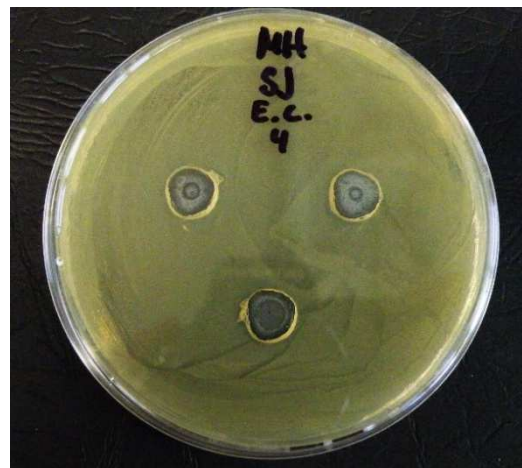
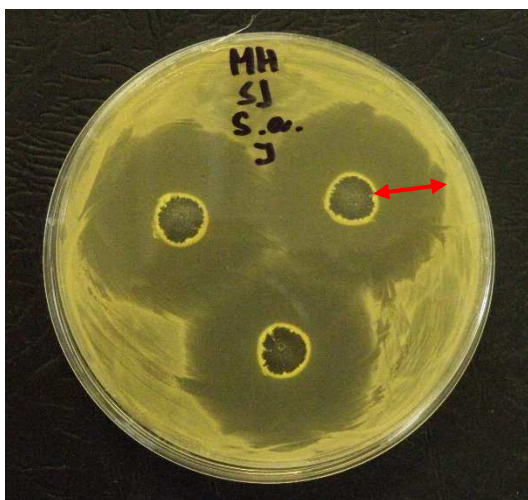
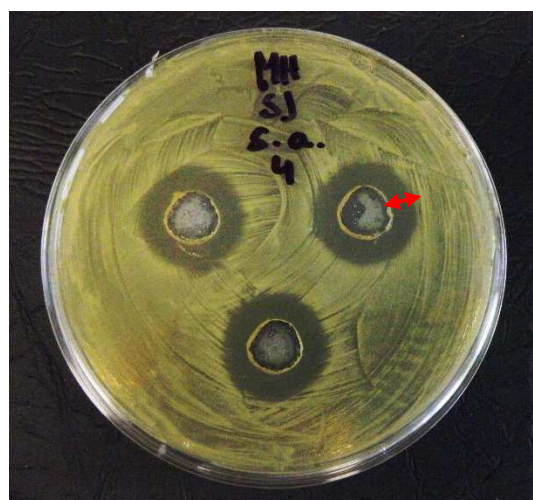
Prvním krokem pro zahájení testů bylo oživení mikrobiálních kultur, uložených při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  v mrazicím boxu v laboratoři ÚIOŽP. Po vyjmutí mikroskopavky s biomasou z mrazáku a ohřátí na laboratorní teplotu, byl proveden vyžíhanou a vychladlou kličkou křížový roztěr na TYA plotny v případě bakterií a na Petriho misky se SAB nebo GKCH agarem pro

vyočkování kvasinek či mikroskopických vláknitých hub. Inokulované misky s bakteriemi a kvasinkami byly kultivovány 24 – 48 hodin při 37 °C. Kultury plísni byly ponechány růst 2 – 5 dní při 30 °C. Z takto namnožených kolonií byly ve fyziologickém roztoku připraveny suspenze o standardní turbiditě 2. stupně McFarlandovy zákalové stupnice. Do sterilní zkumavky se sterilním fyziologickým roztokem byla vyžíhanou kličkou aplikována biomasa bakterií či kvasinek (v případě plísni byly odebrány jen spory), rozmíchána a zákal porovnáván se standardem (suspenze BaSO<sub>4</sub> ve vodě). Takto bylo dosaženo počtu přibližně 10<sup>6</sup> kolonie tvořících jednotek v 1 mL (CFU.mL<sup>-1</sup>) suspenze. Inokulum se poté dle typu zkoušky buď aplikovalo roztěrem na pevné živné médium, nebo se dávkovalo přímo do jamek mikrotitrační destičky.

#### 4.2.1 Orientační testy citlivosti mikroorganismů na vybrané látky

Pro prvotní orientační zkoušky syntetizovaných sloučenin byla zvolena agarová difuzní metoda, která je založena na difuzi sloučeniny agarem a případném vzniku inhibiční zóny bez růstu zkoumané kultury. Jelikož se jedná o nová chemická individua, nebylo možné porovnávat rozměry inhibičních zón se standardními hodnotami. Tento test sloužil k předběžnému odhalení případných antimikrobních účinků sloučenin. Celkem byly testovány účinky 16 sloučenin (amidy **10a-k**, kyseliny **3b**, **3c**, **7a** a **7b** a benzoxazinon **9b**) na vybranou grampozitivní bakterii *Staphylococcus aureus* CCM 3953, dvě kultury gramnegativních bakterií *Escherichia coli* CCM 3954 a *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955, kvasinkovou kulturu *Candida albicans* CCM 8275 a plíseň *Aspergillus niger* CCM 8155.

Na Mueller Hintonovu (bakterie) nebo Sabouraudovu (kvasinky, plísně) půdu bylo pipetováno 100 µL suspenze mikroba a pomocí sterilní hokejky byla rozetřena na celý povrch půdy. Pomocí sterilního kovového korkovrtu byly v každé plotně vytvořeny 3 jamky o průměru 9 mm, do kterých byl pipetován roztok dané látky (100 µL) o koncentraci 10 g.L<sup>-1</sup>. Takto připravené misky byly uloženy do termostatu (37 °C) po dobu 48 hodin. Následně byly odečítány velikosti inhibičních zón (v mm), které případně vznikly v okolí jamky. Nejvýraznější inhibiční zóny byly pozorovány u sloučeniny **10i**. Na obrázcích níže jsou ukázky různých inhibičních zón vzniklých působením látek **10i** a **3c** u bakterií *Escherichia coli* CCM 3954 a *Staphylococcus aureus* CCM 3953.

Obrázek 3. Inhibiční zóny u *E. coli*, **10i**Obrázek 4. Žádná inhibiční zóna, *E. coli*, **3c**Obrázek 5. Inhibiční zóny u *S. aureus*, **10i**Obrázek 6. Inhibiční zóny u *S. aureus*, **3c**

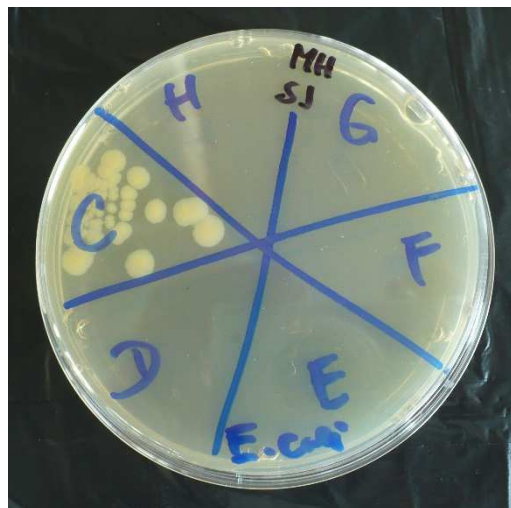
#### 4.2.2 Test citlivosti bakterií a kvasinek na látku 10i v mikrotitrační destičce

Test byl uskutečněn diluční metodou, kdy byl do jamek mikrotitrační destičky nejprve dávkován živný bujón TSG s 5 % DMSO, následně destilovaná voda s DMSO (5 %), poté roztok zkoušené sloučeniny **10i** o koncentraci 10 g.L<sup>-1</sup> v 5 % DMSO a jako poslední suspenze bakteriální či kvasinkové kultury ve fyziologickém roztoku. Konkrétní objemy asepticky pipetovaných kapalných složek jsou uvedeny v *Tabulka 18*. Účelem testu bylo zjištění potenciálních antimikrobních účinků sloučeniny v širokém rozsahu koncentrací (0 – 5 g.L<sup>-1</sup>). Pro každý mikroorganismus byl pokus proveden dvakrát. Do třetího odděleného sloupce se místo 20 μL suspenze buněk do každé jamky dávkoval stejný objem fyziologického roztoku pro kontrolu sterility použitých komponent. Pracovalo se s kulturami G+ bakterie *Staphylococcus aureus* CCM 3953, gramnegativních bakterií *Escherichia coli*

CCM 3954 a *Pseudomonas aeruginosa* FT 5 (izolát z řeky Dřevnice) a kvasinkovou kulturou *Candida albicans* CCM 8275. Tímto postupem nachystané destičky opatřené víčkem byly inkubovány při teplotě 37 °C po dobu 48 hodin. Po této době byly odečteny výsledky, kdy byl sledován mikrobiální nárůst v jamkách destičky. Koncentrace látky **10i**, při které již v jamkách nebyl viditelný zákal způsobený růstem bakterií či kvasinek, byla považována za minimální inhibiční koncentraci (MIC). Tato hodnota vypovídá o schopnosti látky v dané koncentraci inhibovat množení inokulovaného mikroba. MIC však není ukazatelem schopnosti sloučeniny účinně usmrtit buňky sledované mikrobiální kultury. Proto byla po zjištění MIC z jamek prostých zákalu přenesena sterilní mikrobiologickou kličkou inokula na připravené Petriho misky s agarem TYA (bakterie) či SAB (kvasinky). Naočkované misky byly ponechány inkubovat při 37 °C po dobu jednoho až dvou dnů. Pokud po inkubaci na místě inokulace nedošlo k nárůstu mikroorganismů, byla považována koncentrace sloučeniny **10i** v jamce, ze které bylo bráno inokulum, za koncentraci mikrobicidní.

Tabulka 18. Přidávky jednotlivých složek do jamek jednoho sloupce s jedním mikroorganismem

Výsledná koncentrace <b>10i</b> (mg.L <sup>-1</sup> )	Řádek	Bujón TSG (μL)	H <sub>2</sub> O (μL)	Roztok <b>10i</b> (μL)	Inokulum (μL)
0	A	80	100	0	20
200	B	80	96	4	20
500	C	80	90	10	20
1000	D	80	80	20	20
1750	E	80	65	35	20
2500	F	80	50	50	20
3750	G	80	25	75	20
5000	H	80	0	100	20



Obrázek 7. *E. coli*, MBC určena jako koncentrace látky **10i** v jamce D

#### 4.2.3 Stanovení MIC látky **10i** vůči vláknitým mikroskopickým houbám

Jelikož látka **10i** způsobila vznik viditelné inhibiční zóny na agarové plotně s naočkovanou plísní *Aspergillus niger* CCM 8155 při úvodních testech difuzní metodou a protože z praktických důvodů nebylo možné uskutečnit test zjištění MIC v mikrotitrační destičce, vlastní stanovení MIC bylo provedeno agarovou diluční metodou v Petriho miskách. Dále byla pro tuto zkoušku vybrána také kultura *Trichoderma viride* CCM F-486, jakožto druhého zástupce plísní. Bylo připraveno celkem 9 lahví Malt extract agaru po 100 mL. Do všech lahví se po přípravě, sterilizaci a ochlazení agarů na 50 °C k 85 mL teplého živného média asepticky přidalo 4,5 mL DMSO, dále vypočítané objemy roztoku látky **10i** v 5% DMSO a pro doplnění objemu sterilní destilovaná voda s 5 % DMSO (Tabulka 19). Ještě tekutá půda byla v laminárním boxu rozlita do Petriho misek. Tímto postupem byly tuhé agarové plotny s 9 koncentracemi látky **10i** připraveny k inokulaci kulturami vláknitých mikromycet. Z vysporulovaných kultur *Aspergillus niger* CCM 8155 a *Trichoderma viride* CCM F-486 byly připraveny suspenze ve fyziologickém roztoku. Samostatné kultury byly naočkovány (50 µL suspenze) vždy na dvě misky z každé koncentrace. Petriho misky s inokulovanými kulturami byly inkubovány při teplotě 25 °C po dobu 21 dní. Po uplynutí této doby byly zjištěny hodnoty minimálních fungistatických koncentrací a z agarových ploten bez nárůstu plísní byla odebrána sterilním tamponem inokula a přenesena na nové živné médium. Inokulované misky byly ponechány inkubovat opět 21 dní při teplotě 25 °C pro stanovení fungicidní koncentrace. Žádné odlišné hodnoty se však nezjistily, fungistatická koncentrace se rovnala fungicidní koncentraci látky **10i**.



Tabulka 19. Přídavky roztoku **10i** a destilované vody s 5 % DMSO přímo do agaru

Výsledná koncentrace <b>10i</b> (mg.L <sup>-1</sup> )	Roztok <b>10i</b> (mL)	H <sub>2</sub> O (mL)
0	0,0	10,5
50	0,5	9,5
100	1,0	9,0
150	1,5	8,5
250	2,5	7,5
375	3,75	6,25
500	5,0	5,0
750	7,5	2,5
1000	10,0	0,0

#### 4.2.4 Test citlivosti G+ bakterií na látku **10i** v mikrotitrační destičce

Experimenty s účinností zmiňované sloučeniny **10i** vůči patogenním mikroorganismům byly prováděny s kulturou *Staphylococcus aureus* CCM 3953 a navíc rozšířeny o další bakteriální kulturu *Enterococcus faecalis* CCM 4224. Test se prováděl diluční metodou obdobně jako v prvním pokusu v mikrotitračních destičkách, jen byly zvoleny nižší koncentrace látky **10i** na základě předchozích zajímavých výsledků. Nejprve byl do jamek destičky dávkován živný bujón TSG s 5 % DMSO, následně destilovaná voda s DMSO (5%), poté roztok sloučeniny **10i** o koncentraci 10 g.L<sup>-1</sup> v 5 % DMSO a jako poslední suspenze bakteriální či kvasinkové kultury ve fyziologickém roztoku. Objemy asepticky pipetovaných složek jsou uvedeny v Tabulka 20. Zkouška se prováděla pro zjištění účinků látky v 8 různých koncentracích (0 – 500 mg.L<sup>-1</sup>) na 1 mikroorganismus ve třech opakováních. Do čtvrtého odděleného sloupce se místo 20 µL suspenze buněk do každé jamky dávkoval stejný objem fyziologického roztoku pro kontrolu sterility použitých komponent. Inokulované destičky opatřené víčkem byly inkubovány při teplotě 37 °C. Po 48 hodinách byly odečteny výsledky minimálních inhibičních koncentrací. Opět byla z nezakalených jamek sterilní mikrobiologickou kličkou odebrána inokula na připravené Petriho misky s agarem TYA. Inkubace naočkovaných misek proběhla při teplotě 37 °C po dobu jednoho až dvou dnů. Absence viabilních bakteriálních buněk v jamkách mikrotitrační destičky byla ověřena

inokulací na agarové plotny a následnou kultivací. Nejnižší koncentrace látky **10i**, při které došlo k usmrcení bakteriálních buněk, byla minimální baktericidní koncentrací.

Tabulka 20. Přídavky jednotlivých složek do jamek jednoho sloupce s jedním mikroorganismem

Výsledná koncentrace <b>10i</b> (mg.L <sup>-1</sup> )	Řádek	Bujón TSG (μL)	H <sub>2</sub> O (μL)	Roztok <b>10i</b> (μL)	Inokulum (μL)
0	A	80	100,0	0,0	20
10	B	80	99,8	0,2	20
50	C	80	99,0	1,0	20
100	D	80	98,0	2,0	20
150	E	80	97,0	3,0	20
200	F	80	96,0	4,0	20
350	G	80	93,0	7,0	20
500	H	80	90,0	10,0	20

#### 4.2.5 Test citlivosti bakterií a kvasinek na látku **10i** v mikrotitrační destičce

V tomto experimentu byla testována sloučenina **10i** vůči kulturám *Staphylococcus aureus* CCM 3953, *Escherichia coli* CCM 3954, *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955, *Enterococcus faecalis* CCM 4224 a *Candida albicans* CCM 8275. Test byl proveden diluční metodou obdobně jako v předchozím pokusu v mikrotitračních destičkách, byly zvoleny vyšší hodnoty koncentrací vzhledem k tomu, že se jedná o první testování látky **10i**. Nejprve byl do jamek destičky dávkován živný bujón TSG s 5 % DMSO, následně destilovaná voda s 5 % DMSO, poté roztok zkoušené sloučeniny **10i** o koncentraci 10 g.L<sup>-1</sup> v 5 % DMSO a jako poslední suspenze bakteriální či kvasinkové kultury ve fyziologickém roztoku. Objemy asepticky pipetovaných složek jsou uvedeny v Tabulka 21. Zkouška se prováděla pro zjištění účinků látky ve 12 různých koncentracích (0 – 2500 mg.L<sup>-1</sup>) na 1 mikroorganismus ve třech opakováních. Do čtvrtého odděleného sloupce se místo 20 μL suspenze buněk do každé jamky dávkoval stejný objem fyziologického roztoku pro kontrolu sterility použitých komponent. Destičky s inokulovanými roztoky a suspenzemi kultur byly opatřeny víčkem a inkubovány při teplotě 37 °C. Po 48 hodinách byly odečteny výsledky minimálních

inhibičních koncentrací. Stejně jako v předešlých pokusech byly zjištěny minimální baktericidní a minimální fungicidní koncentrace látky **10I**.

Tabulka 21. Přídavky jednotlivých složek do jamek jednoho sloupce s jedním mikroorganismem

Výsledná koncentrace <b>10I</b> (mg.L <sup>-1</sup> )	Řádek	Bujón TSG (μL)	H <sub>2</sub> O (μL)	Roztok <b>10I</b> (μL)	Inokulum (μL)
0	1	80	100,0	0,0	20
20	2	80	99,6	0,4	20
50	3	80	99,0	1,0	20
100	4	80	98,0	2,0	20
150	5	80	97,0	3,0	20
200	6	80	96,0	4,0	20
350	7	80	93,0	7,0	20
500	8	80	90,0	10,0	20
750	9	80	86,5	13,5	20
1000	10	80	80,0	20,0	20
1750	11	80	65,0	35,0	20
2500	12	80	50,0	50,0	20

#### 4.2.6 Stanovení MIC látky **10I** vůči *Aspergillus niger* CCM 8155

Také sloučenina **10I** byla podrobena testům schopnosti inhibovat růst vláknité mikroskopické houby *Aspergillus niger* CCM 8155. Stanovení MIC bylo provedeno agarovou diluční metodou v malých Petriho miskách. Připravilo se celkem 6 lahví Malt extract agaru po 20 mL. Do všech lahví se po přípravě, sterilizaci a ochlazení agarů na 50 °C k 18 mL teplého živného média asepticky přidal 1 mL DMSO, dále roztok látky **10I** v 5% DMSO o koncentraci 10 g.L<sup>-1</sup> a pro doplnění objemu sterilní destilovaná voda s 5 % DMSO (Tabulka 22). Ještě tekutá půda byla v laminárním boxu rozlita do Petriho misek. Tuhé agarové plotny s 6 koncentracemi látky **10I** byly inokulovány suspenzí spor *A. niger* (20 μL, 2 misky od každé koncentrace) a po dostatečném zaschnutí povrchu agaru byly ponechány inkubovat při teplotě 25 °C po dobu 21 dní. Odlišnosti v růstu vláknité

mikromycety jsou zachyceny na fotografiích níže. Byl proveden také experiment, kdy ve dvou miskách bez přídavku látky **101** nebyl v agaru ani v destilované vodě přítomen DMSO. Tento faktor však neměl žádný vliv na růst plísně, mycelium i se sporami vypadalo shodně jako na miskách s DMSO s nulovou koncentrací látky **101**.

Tabulka 22. Přídavky roztoku **101** a destilované vody s 5 % DMSO přímo do agaru

Výsledná koncentrace <b>101</b> (mg.L <sup>-1</sup> )	Roztok <b>101</b> (mL)	H <sub>2</sub> O (mL)
0	0,0	1,0
50	0,1	0,9
100	0,2	0,8
250	0,5	0,5
375	0,75	0,25
500	1,0	0,0



Obrázek 8. Růst *A. niger*, 0 mg.L<sup>-1</sup>**101**



Obrázek 9. Růst *A. niger*, 50 mg.L<sup>-1</sup>**101**

Obrázek 10. Růst *A. niger*, 100 mg.L<sup>-1</sup>**101**Obrázek 11. Růst *A. niger*, 250 mg.L<sup>-1</sup>**101**Obrázek 12. MIC pro *A. niger*, 375 mg.L<sup>-1</sup>**101**

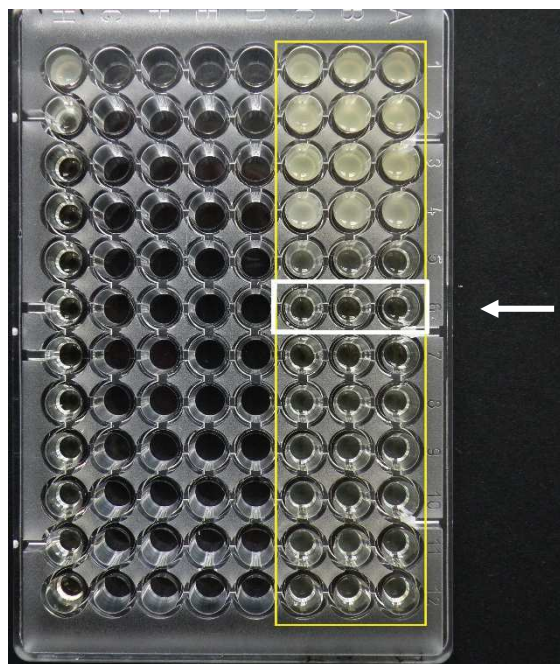
#### 4.2.7 Test citlivosti bakterií a kvasinek na látky **10l** a **10m** v mikrotitrační destičce

Druhá fáze testů v destičkách byla uskutečněna pro upřesnění zjištěných nízkých minimálních inhibičních koncentrací látky **10l** v předchozích experimentech a zároveň k testování citlivosti mikroorganismů na látku **10m**. Opět bylo nakládáno s kulturami *Staphylococcus aureus* CCM 3953, *Escherichia coli* CCM 3954, *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955, *Enterococcus faecalis* CCM 4224 a *Candida albicans* CCM 8275. Test se prováděl diluční metodou v destičkách, kdy se do jamek nejprve dávkoval živný bujón TSG s 5 % DMSO, následně destilovaná voda s 5 % DMSO, poté roztok zkoušené sloučeniny **10l** nebo **10m** o koncentraci 100 mg.L<sup>-1</sup> nebo 400 mg.L<sup>-1</sup> v 5 % DMSO a jako poslední suspenze

bakteriální či kvasinkové kultury ve fyziologickém roztoku. Zkouška se prováděla pro zjištění účinků látky ve 12 různých koncentracích ( $0 - 150 \text{ mg.L}^{-1}$ ) na 1 mikroorganismus ve třech opakováních. Do čtvrtého odděleného sloupce se místo  $20 \mu\text{L}$  suspenze buněk do každé jamky dávkovalo  $20 \mu\text{L}$  fyziologického roztoku pro kontrolu sterility použitých komponent. Kvůli pipetování malých objemů bylo nutné použít dva různě koncentrované roztoky každé sloučeniny z důvodu praktické proveditelnosti dávkovní. Objemy asepticky pipetovaných složek jsou uvedeny v *Tabulka 23*. Tímto postupem připravené destičky s víčkem byly ponechány inkubovat při teplotě  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . Po 48 hodinách byly odečteny výsledky minimálních inhibičních koncentrací. Vyočkováním obsahu nezakalených jamek na Petriho misky s TYA nebo SAB byly zjištěny minimální baktericidní a minimální fungicidní koncentrace sloučenin **10l a 10m**.

*Tabulka 23.* Přídavky jednotlivých složek do jamek jednoho sloupce s jedním mikroorganismem

Výsledná koncentrace látky ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	Řádek	Bujón TSG ( $\mu\text{L}$ )	$\text{H}_2\text{O}$ ( $\mu\text{L}$ )	Koncentrace roztoku látky ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	Roztok látky ( $\mu\text{L}$ )	Inokulum ( $\mu\text{L}$ )
0	1	80	100,0	100	0,0	20
1	2	80	98,0	100	2,0	20
5	3	80	90,0	100	10,0	20
10	4	80	80,0	100	20,0	20
15	5	80	70,0	100	30,0	20
20	6	80	60,0	100	40,0	20
35	7	80	30,0	100	70,0	20
50	8	80	75,0	400	25,0	20
75	9	80	62,5	400	37,5	20
100	10	80	50,0	400	50,0	20
125	11	80	37,5	400	62,5	20
150	12	80	25,0	400	75,0	20



Obrázek 13. Mikrotitrační destička, MIC pro *P. aeruginosa*, 20 mg.L<sup>-1</sup>10m

#### 4.2.8 Test citlivosti bakterií a kvasinek na 8 sloučenin mikrotitrační destičce

Test se provedl diluční metodou, kdy se do jamek mikrotitrační destičky nejprve dávkoval živný bujón TSG s 5 % DMSO, následně destilovaná voda s 5 % DMSO, poté roztok zkoušené sloučeniny (**7a-h**) o koncentraci 1,05 g.L<sup>-1</sup> v 5 % DMSO a jako poslední suspenze bakteriální či kvasinkové kultury ve fyziologickém roztoku. Konkrétní objemy asepticky pipetovaných kapalných složek jsou uvedeny v *Tabulka 24*. Zkouška se prováděla pro zjištění účinků jednotlivých syntetických sloučenin v 8 různých koncentracích (0 – 512 mg.L<sup>-1</sup>) na 1 mikroorganismus ve dvou opakováních. Do třetího odděleného sloupce se místo 20 µL suspenze buněk do každé jamky dávkoval stejný objem fyziologického roztoku pro kontrolu sterility použitých komponent. Pracovalo se s kulturami G+ bakterií *Staphylococcus aureus* CCM 3953 a *Enterococcus faecalis* CCM 4224, gramnegativních bakterií *Escherichia coli* CCM 3954 a *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955 a s kvasinkovou kulturou *Candida albicans* CCM 8275. Tímto postupem nachystané destičky opatřené víčkem byly inkubovány při teplotě 37 °C po dobu 48 hodin. Po této době byly odečteny výsledky minimálních inhibičních koncentrací osmi sloučenin vůči sledovaným mikrobům.

Tabulka 24. Přídavky jednotlivých složek do jamek jednoho sloupce s jedním mikroorganismem

Výsledná koncentrace látky (mg.L <sup>-1</sup> )	Řádek	Bujón TSG (μL)	H <sub>2</sub> O (μL)	Roztok látky (μL)	Inokulum (μL)
0	A	80	100,0	0,0	20
8	B	80	98,5	1,5	20
16	C	80	96,9	3,1	20
32	D	80	93,9	6,1	20
64	E	80	87,8	12,2	20
128	F	80	75,6	24,4	20
256	G	80	51,2	48,8	20
512	H	80	2,5	97,5	20



## ZÁVĚR

Deriváty kyseliny anthranilové jsou významné sloučeniny, které se vyskytují v přírodě, některé z nich jsou přítomny i v potravinách (např. avenanthramidy v ovsu) a jiné našly uplatnění jako farmaka v medicíně (diuretikum furosemid). Některé tyto sloučeniny také inhibují bakteriální enzymy KAS III a PqsD, vykazují antibakteriální účinky a mohly by představovat potenciální vzor pro vývoj antibakteriálních sloučenin s novým mechanismem účinku. V rámci mé diplomové práce jsem navázala na předchozí výzkum prováděný na ÚCh FT UTB a připravila jsem řadu nových derivátů kyseliny anthranilové. U těchto sloučenin jsem také zjišťovala případnou biologickou aktivitu. Připravené sloučeniny **10l** a **10m** vykazují výrazné antibakteriální účinky.

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

A.	<i>Aspergillus</i>
b.t.	Bod tání
C.	<i>Candida</i>
CCM	Česká sbírka mikroorganismů
CFU	Kolonie tvořící jednotka
E.	<i>Escherichia</i>
En.	<i>Enterococcus</i>
GKCH	Agar s chloramfenikolem, glukosou a kvasničným extraktem
KAS III	3-Ketoacyl-ACP-synthasa III
L.	Linné, Carl
LD <sub>50</sub>	Střední smrtelná dávka
MBC	Minimální baktericidní koncentrace
MEA	Agar se sladovým extraktem
MH	Mueller Hinton agar
MIC	Minimální inhibiční koncentrace
NAD	Nikotinadenindinukleotid
P.	<i>Pseudomonas</i>
p.a.	Pro analýzu
PqsD	<i>Pseudomonas quinolone signal biosynthetic enzyme</i>
R	Substituent
R <sub>f</sub>	Retenční faktor
S.	<i>Staphylococcus</i>
SAB	Sabouraud agar
sp.	Druh, <i>species</i>

---

str.	Strana
<i>T.</i>	<i>Trichoderma</i>
TLC	Tenkvrstvá kapalinová chromatografie
TSG	Živný bujón s glukosou
TYA	Tryptonový agar s kvasničným extraktem
ÚCh FT UTB	Ústav chemie, Fakulta technologická, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
ÚIOŽP	Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

## SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obrázek 1.</i> Dvě hlavní skupiny aminobenzamidů <b>10a</b> – <b>10k</b> a cíleně připravené sloučeniny <b>10l</b> a <b>10m</b> .	40
<i>Obrázek 2.</i> Jedna z reakcí katalyzovaná enzymem PqsD a sloučenina <b>7b</b> .	50
<i>Obrázek 3.</i> Inhibiční zóny u <i>E. coli</i> , <b>10i</b>	86
<i>Obrázek 3.</i> Inhibiční zóny u <i>E. coli</i> , <b>10i</b> <i>Obrázek 4.</i> Žádná inhibiční zóna, <i>E. coli</i> , <b>3c</b>	86
<i>Obrázek 5.</i> Inhibiční zóny u <i>S. aureus</i> , <b>10i</b> <i>Obrázek 6.</i> Inhibiční zóny u <i>S. aureus</i> , <b>3c</b>	86
<i>Obrázek 6.</i> Inhibiční zóny u <i>S. aureus</i> , <b>3c</b>	86
<i>Obrázek 7.</i> <i>E. coli</i> , MBC určena jako koncentrace látky <b>10i</b> v jamce D	88
<i>Obrázek 8.</i> Růst <i>A. niger</i> , 0 mg.L-110l <i>Obrázek 9.</i> Růst <i>A. niger</i> , 50 mg.L-110l	92
<i>Obrázek 9.</i> Růst <i>A. niger</i> , 50 mg.L <sup>-1</sup> <b>10l</b>	92
<i>Obrázek 10.</i> Růst <i>A. niger</i> , 100 mg.L-110l <i>Obrázek 11.</i> Růst <i>A. niger</i> , 250 mg.L-110l	93
<i>Obrázek 11.</i> Růst <i>A. niger</i> , 250 mg.L <sup>-1</sup> <b>10l</b>	93
<i>Obrázek 12.</i> MIC pro <i>A. niger</i> , 375 mg.L-110l	93

**SEZNAM TABULEK**

<i>Tabulka 1.</i> Deriváty anthranilových kyselin <b><u>1</u></b> – <b><u>9</u></b> a přírodní zdroje, ze kterých byly izolovány.	12
<i>Tabulka 2.</i> Sloučeniny <b><u>11</u></b> – <b><u>15</u></b> a přírodní zdroje, ze kterých byly izolovány.	13
<i>Tabulka 3.</i> Přehled avenanthramidů <b>A</b> – <b>E</b> a sloučenin <b><u>19</u></b> – <b><u>21</u></b> .	15
<i>Tabulka 4.</i> Přírodní 2-aminobenzamidy <b><u>23</u></b> – <b><u>28</u></b> a mikroorganismy, které je produkují.	17
<i>Tabulka 5.</i> Přírodní 2-aminobenzamidy odvozené od biogenních aminů.	18
<i>Tabulka 6.</i> Přírodní 2-aminobenzamidy obsahující dvě podjednotky kyseliny anthranilové.	18
<i>Tabulka 7.</i> Experimentální data Fischerových indolových reakcí sloučenin <b>3</b> v kyselině propionové.	37
<i>Tabulka 8.</i> Reakční doby a výtěžky sloučenin <b>10</b> při reakcích sloučenin <b>9</b> s primárními a sekundárními aminy v dichlormethanu katalyzovaných triethylaminem.	39
<i>Tabulka 9.</i> Klíč k substituentům a výtěžky syntéz chinazolonů <b>11</b> .	41
<i>Tabulka 10.</i> Inhibiční zóny v mm, agarová difuzní metoda, sloučeniny <b>10a</b> – <b>g</b> .	43
<i>Tabulka 11.</i> Inhibiční zóny v mm, agarová difuzní metoda, sloučeniny <b>10h</b> – <b>k</b> .	44
<i>Tabulka 12.</i> Inhibiční zóny v mm, agarová difuzní metoda, sloučeniny <b>3</b> , <b>7</b> a <b>9</b> .	45
<i>Tabulka 13.</i> Zjištěné hodnoty MIC pro sloučeniny <b>10i</b> , <b>10l</b> a <b>10m</b> .	46
<i>Tabulka 14.</i> Zjištěné hodnoty MBC pro sloučeniny <b>10i</b> , <b>10l</b> a <b>10m</b> .	47
<i>Tabulka 15.</i> Zjištěné hodnoty MFC pro sloučeniny <b>10i</b> , <b>10l</b> a <b>10m</b> .	48
<i>Tabulka 16.</i> Zjištěné MIC pro kyseliny <b>7</b> vůči vybraným mikroorganismům.	49
<i>Tabulka 17.</i> Experimentální data reakcí sloučenin <b>9</b> s aminy.	67
<i>Tabulka 18.</i> Přídavky jednotlivých složek do jamek jednoho sloupce s jedním mikroorganismem	87
<i>Tabulka 19.</i> Přídavky roztoku <b>10i</b> a destilované vody s 5 % DMSO přímo do agaru	89

---

<i>Tabulka 20.</i> Přidavky jednotlivých složek do jamek jednoho sloupce s jedním mikroorganismem	90
<i>Tabulka 21.</i> Přidavky jednotlivých složek do jamek jednoho sloupce s jedním mikroorganismem	91
<i>Tabulka 22.</i> Přidavky roztoku <b>101</b> a destilované vody s 5 % DMSO přímo do agaru	92
<i>Tabulka 23.</i> Přidavky jednotlivých složek do jamek jednoho sloupce s jedním mikroorganismem	94
<i>Tabulka 24.</i> Přidavky jednotlivých složek do jamek jednoho sloupce s jedním mikroorganismem	96

## SEZNAM PŘÍLOH

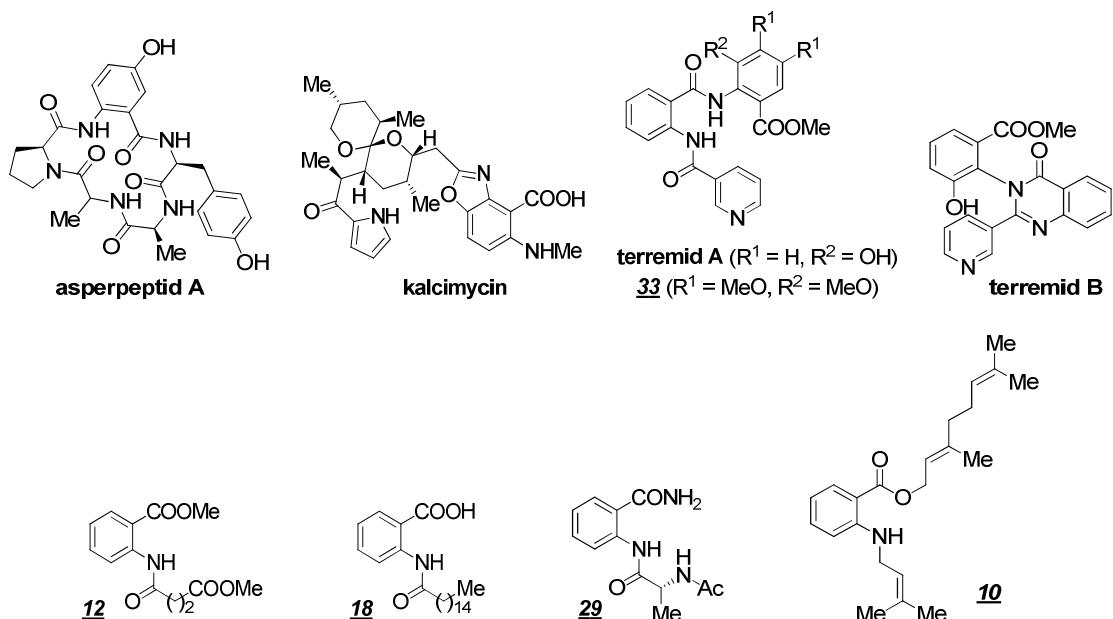
- Příloha 1* Tabulka hodnot MIC přírodních 2-aminobenzoových kyselin a 2-aminobenzamidů vykazujících antimikrobiální účinky.
- Příloha 2* Tabulka hodnot MIC pro syntetické 2-aminobenzoové kyseliny 35 – 40 a sloučeniny a – d vykazující antimikrobiální účinky.
- Příloha 3* Tabulka hodnot MIC pro syntetické 2-aminobenzoové kyseliny 41, 42, a a syntetické amidy 47, 48 vykazující antimikrobiální účinky.
- Příloha 4* Tabulka hodnot MIC pro syntetické 2-aminobenzoové kyseliny vykazující antimikrobiální účinky vůči grampozitivní bakterii *Staphylococcus aureus*.
- Příloha 5* Příklad některých charakteristických signálů v NMR spektrech připravených amidů 5 a 10.

## PŘÍLOHA

*Příloha 1 - Tabulka hodnot MIC přírodních 2-aminobenzoových kyselin a 2-aminobenzamidů vykazujících antimikrobiální účinky.*

Látka	<i>S.a.</i>	<i>E.c.</i>	<i>B.s.</i>	<i>P.a.</i>	<i>C.a.</i>	<i>E.a.</i>	<i>E.f.</i>	<i>S.e.</i>	<i>S.b.</i>	<i>M.a.</i>
asperp. A <sup>78</sup>	-	-	6,7	6,7	-	-	-	6,7	-	-
kalcimycin <sup>55</sup>	0,8	-	0,2	0,2	25,0	-	0,1	-	6,3	0,4
terremid A <sup>64</sup>	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-
terremid B <sup>64</sup>	-	-	-	-	-	90	-	-	-	-
<u>10</u> <sup>30</sup>	200	-	-	-	-	-	>1500	-	-	-
<u>12</u> <sup>31</sup>	95	75	-	-	-	-	-	-	70	-
<u>18</u> <sup>39</sup>	2,7	>190	-	-	-	-	-	0,7	-	-
<u>29</u> <sup>69</sup>	-	>1000	>1000	>1000	-	-	-	-	-	-
<u>33</u> <sup>75</sup>	24,2	-	-	-	>50	>50	-	-	-	-

Hodnoty minimálních inhibičních koncentrací jsou uvedeny v jednotkách mg.L<sup>-1</sup>. Zkratky jednotlivých mikroorganismů znamenají: *S.a.* *Staphylococcus aureus*, *E.c.* *Escherichia coli*, *B.s.* *Bacillus subtilis*, *P.a.* *Pseudomonas aeruginosa*, *C.a.* *Candida albicans*, *E.a.* *Enterobacter aerogenes*, *E.f.* *Enterococcus faecalis*, *S.e.* *Staphylococcus epidermidis*, *S.b.* *Shigella boydii*, *M.a.* *Mycobacterium avium*.

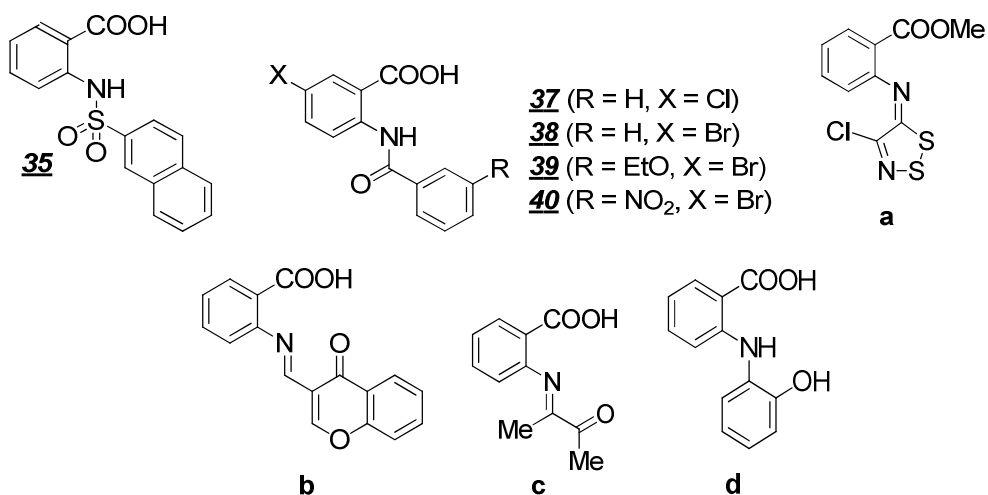




**Příloha 2 - Tabulka hodnot MIC pro syntetické 2-aminobenzoové kyseliny 35 – 40 a sloučeniny a – d vykazující antimikrobiální účinky.**

Látka	<i>S.a.</i>	<i>E.c.</i>	<i>B.s.</i>	<i>P.a.</i>	<i>C.a.</i>	<i>K.p.</i>	<i>E.f.</i>	<i>S.e.</i>
<u>35</u> <sup>94</sup>	>128	>128	>128	>128	-	-	128	-
<u>37</u> <sup>100</sup>	128	-	-	-	-	-	-	-
<u>38</u> <sup>100</sup>	32	-	-	-	-	-	-	-
<u>39</u> <sup>100</sup>	>128	>128	64	>128	>128	-	>128	8
<u>40</u> <sup>100</sup>	250	250	-	-	-	-	-	-
a <sup>95</sup>	32	-	-	-	16	-	32	-
b <sup>96</sup>	80	-	80	-	80	80	-	-
c <sup>97</sup>	-	149	-	-	-	-	-	-
d <sup>98,99</sup>	55	55	-	-	12,5	-	-	6,7

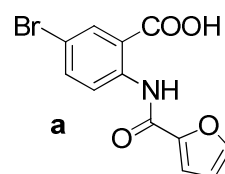
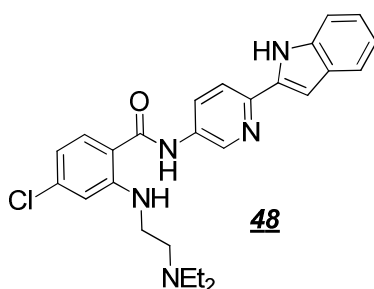
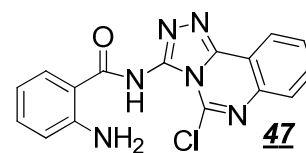
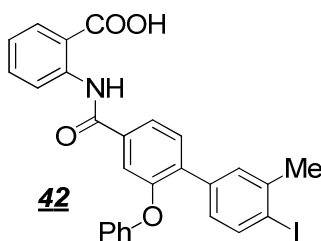
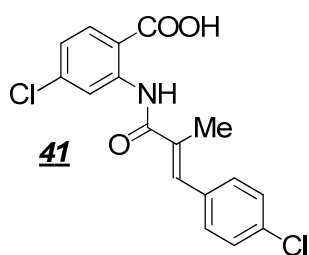
Hodnoty minimálních inhibičních koncentrací jsou uvedeny v jednotkách mg.L<sup>-1</sup>. Zkratky jednotlivých mikroorganismů znamenají: *S.a.* *Staphylococcus aureus*, *E.c.* *Escherichia coli*, *B.s.* *Bacillus subtilis*, *P.a.* *Pseudomonas aeruginosa*, *C.a.* *Candida albicans*, *K.p.* *Klebsiella pneumoniae*, *E.f.* *Enterococcus faecalis*, *S.e.* *Staphylococcus epidermidis*.



**Příloha 3 - Tabulka hodnot MIC pro syntetické 2-aminobenzoové kyseliny 41, 42, a a syntetické amidy 47, 48 vykazující antimikrobiální účinky.**

Látka	<i>S.a.</i>	<i>E.c.</i>	<i>B.s.</i>	<i>P.a.</i>	<i>K.p.</i>	<i>S.p.</i>	<i>E.f.</i>
<u>41</u> <sup>102</sup>	32	>128	32	-	>128	-	64
<u>42</u> <sup>103</sup>	5,6	-	-	-	-	0,7	2,8
<u>47</u> <sup>116</sup>	64	32	64	64	-	-	>128
<u>48</u> <sup>120</sup>	4	>32	-	-	32	4	4
a <sup>100</sup>	125	250	-	-	-	-	-

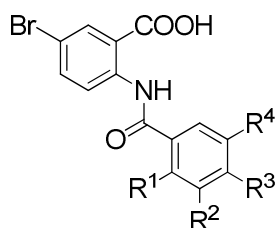
Hodnoty minimálních inhibičních koncentrací jsou uvedeny v jednotkách mg.L<sup>-1</sup>. Zkratky jednotlivých mikroorganismů znamenají: *S.a.* *Staphylococcus aureus*, *E.c.* *Escherichia coli*, *B.s.* *Bacillus subtilis*, *P.a.* *Pseudomonas aeruginosa*, *K.p.* *Klebsiella pneumoniae*, *S.p.* *Streptococcus pneumoniae*, *E.f.* *Enterococcus faecalis*, *S.e.* *Staphylococcus epidermidis*.



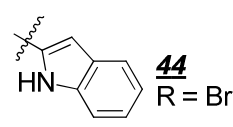
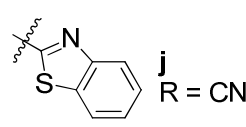
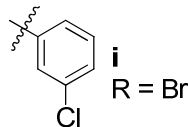
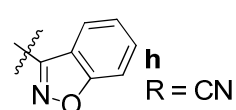
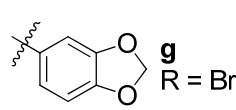
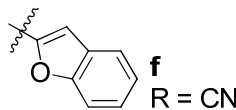
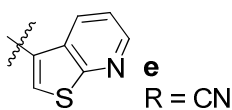
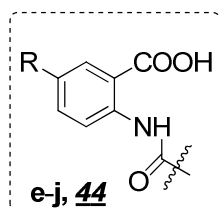
**Příloha 4 - Tabulka hodnot MIC pro syntetické 2-aminobenzoové kyseliny vykazující antimikrobiální účinky vůči grampozitivní bakterii *Staphylococcus aureus*.**

Látka	MIC pro <i>S.a.</i>	Látka	MIC pro <i>S.a.</i>
a <sup>105,106</sup>	125	h <sup>105,106</sup>	16
b <sup>105,106</sup>	125	i <sup>105,106</sup>	8
c <sup>105,106</sup>	64	j <sup>105,106</sup>	8
d <sup>105,106</sup>	32	<u>44</u> <sup>105,106</sup>	4
e <sup>105,106</sup>	32		
f <sup>105,106</sup>	32		
g <sup>105,106</sup>	16		

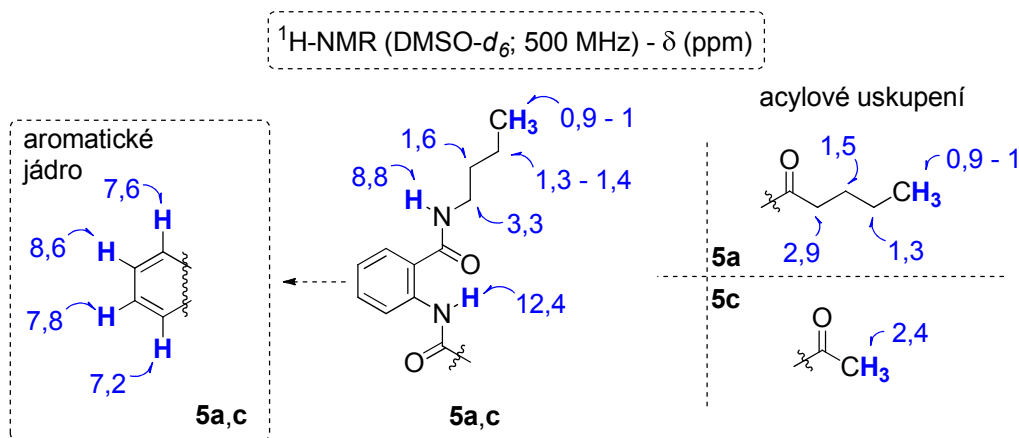
Hodnoty minimálních inhibičních koncentrací jsou uvedeny v jednotkách mg.L<sup>-1</sup>.



- a (R<sup>1</sup> = F, R<sup>2</sup> = H, R<sup>3</sup> = H, R<sup>4</sup> = H)
- b (R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = H, R<sup>3</sup> = H, R<sup>4</sup> = F)
- c (R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = H, R<sup>3</sup> = EtO, R<sup>4</sup> = H)
- d (R<sup>1,2</sup> = (HC=CH)<sub>2</sub>, R<sup>3</sup> = H, R<sup>4</sup> = H)

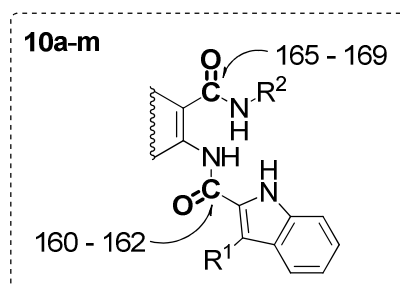


**Příloha 5 – Příklad některých charakteristických signálů v NMR spektrech připravených amidů 5 a 10.**

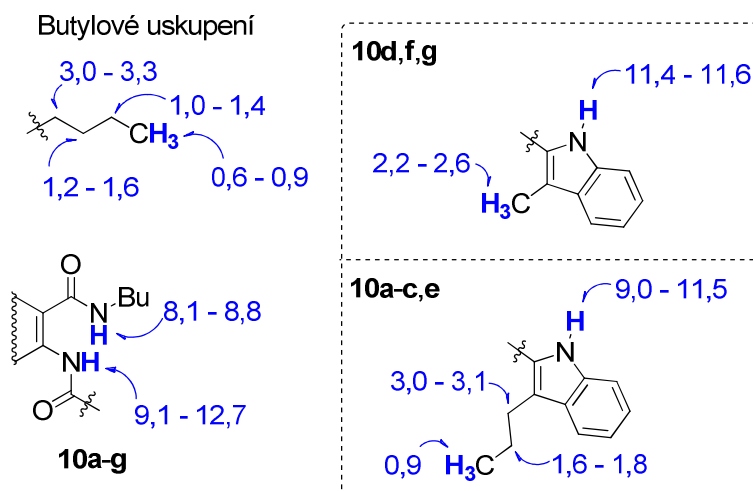


Vybrané  $^1\text{H-NMR}$  signály u amidů **5a** a **5c**.

$^{13}\text{C-NMR}$  (DMSO- $d_6$ ; 126 MHz) -  $\delta$  (ppm)



Vybrané  $^{13}\text{C-NMR}$  signály u amidů **10a – m**.



Vybrané  $^1\text{H-NMR}$  signály u amidů **10**.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Lebuhn, M.; Heulin, T.; Hartmann, A. *FEMS Microbiol. Ecol.* **1997**, *22*, 325 – 334.
2. Maskey, R. P.; Huth, F.; Gruen-Wollny, I.; Laatsch, H. *Z. Naturforsch. B* **2005**, *60*, 63 – 66.
3. Sekita, S.; Yoshihira, K.; Natori, S. *Chem. Pharm. Bull.* **1980**, *28*, 2428 – 2435.
4. Hartleb, I.; Seifert, K. *Planta Med.* **1994**, *60*, 678 – 579.
5. Waldbaum, H. *J. Prakt. Chem.* **1899**, *2*, 352.
6. Waldbaum, H. *J. Prakt. Chem.* **1900**, *2*, 137.
7. Pinheiro, M. M.; Radulović, N. S.; Mitojević, A. B.; Boylan, F.; Dias Fernandes, P. *Eur. J. Pharmacol.* **2014**, *727*, 106 – 114.
8. Shahinas, D.; Liang, M.; Datti, A.; Pillai, D. R. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 3552 – 3557.
9. Meek, A. R.; Simms, G. A.; Weaver, D. F. *Can. J. Chem.* **2012**, *90*, 865 – 873.
10. Williams, R. H.; Roose, P.; De Saegher, J. J. PCT Int. Appl. WO 2010/116263, 2010; *Chem. Abstr.* **2010**, *153*, 499203.
11. Steinman, L; Platten, M.; Ho, P. P.-K. PCT Int. Appl. WO 2006/076580, 2006; *Chem. Abstr.* **2006**, *145*, 159808.
12. Terness, P.; Bauer, T.; Opelz, G. Eur. Pat. Appl. EP 1369114, 2003; *Chem. Abstr.* **2004**, *140*, 13043.
13. Alvi, K. A.; Nair, B.; Gallo, C.; Baker, D. *J. Antibiot.* **1997**, *50*, 264 – 266.
14. Fabricant, J. D. U.S. Pat. Appl. Publ. US 2007/0099966, 2007; *Chem. Abstr.* **2008**, *148*, 394409.
15. Fotso, S.; Zabriskie, T. M.; Proteau, P. J.; Flatt, P. M.; Santosa, D. A.; Mahmud, S.; Mahmud T. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 690 – 695.
16. Li, J.; Lu, Y.; Su, X.; Li, F.; She, Z.; He, X.; Lin, Y. *Planta med.* **2008**, *74*, 287 – 289.
17. Radulović, N. S.; Miltojević, A. B.; McDermott, M.; Waldren, S.; Parnell, J. A.; Pinheiro, M. M.; Fernandes, P. D.; de Sousa Menezes, F. *J. Ethnopharmacol.* **2011**, *135*, 610 – 619.
18. Farooq, B.; Baake, M.; Lovisetto, B.; Laatsch, H.; Helmke, E.; Weyland, H. *J. Antibiot.* **1998**, *51*, 333 – 340.
19. Cheng, M. J.; Lin, C. F.; Wang, C. J.; Tsai, I. L.; Chen, I. S. *J. Chin. Chem. Soc.* **2007**, *54*, 779 – 783.
20. Esaki, H.; Onozaki, H.; Kawakishi, S.; Osawa, T. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 696 – 700.

21. Mohr, N.; Budzikiewicz, H.; Korth, H.; Pulverer, G. *Liebigs. Ann. Chem.* **1981**, *8*, 1515 – 1518.
22. Canonica, L.; Danieli, B.; Manitto, P.; Russo, G.; Ferrari, G. *Tetrahedron Lett.* **1968**, *9*, 4865 – 4866.
23. Salcher, O.; Lingens, F.; Fischer, P. *Tetrahedron Lett.* **1978**, *19*, 3097 – 3100.
24. Xie, P.; Ma, M.; Rateb, M. E.; Shaaban, A. K.; Yu, Z.; Huang, S. X.; Zhao, L. X.; Zhu, X.; Yan, Y.; Peterson, R. M.; Lohman, J. R.; Yang, D.; Yin, M.; Rudolf, J. D.; Jiang, Y.; Duan, Y.; Shen, B. *J. Nat. Prod.* **2014**, *77*, 377 – 387.
25. Malakov, P.; Papanov, G. Y.; Ziesche, J. *Phytochemistry*. **1982**, *21*, 2589 – 2590.
26. Tan, R. X.; Kong, L. D.; Wei, H. X. *Phytochemistry* **1998**, *47*, 1223 – 1226.
27. Xu, K.; Jiang, S.; Sun, H.; Zhou, Y.; Xu, X.; Peng, S.; Ding, L. *Nat. Product Res.* **2012**, *26*, 1898 – 1903.
28. Lingens, F.; Kern, S.; *Z. Physiol. Chem.* **1960**, *318*, 56 – 58.
29. Ijaz, A.; Sarfraz, A. N.; Nighat, A.; Abdul, M.; Itrat, F.; Sher, B.; Manzoor, A.; Muhammad, I. C. *Chem. Pharm. Bull.* **2005**, *53*, 907 – 910.
30. Aqilar-Guadarrama, A. B.; Rios, M. Y. *Planta Med.* **2004**, *70*, 85 – 86.
31. Atta-Ur-Rahman, Choudhary, M. I.; Majeed, A.; Shabbir, M.; Ghani, U.; Shameel, M. *Phytochemistry* **1997**, *46*, 1215 – 1218.
32. Kimura, Y.; Saito, M.; Inoue, T.; Tamura, S. *Agr. Biol. Chem.* **1974**, *38*, 1507 – 1510.
33. Shaheena, F.; Ahmada, M.; Khana, M. T. H.; Jalila, S.; Ejaza, A.; Sultankhodjaeva, M. N.; Arfanc, M.; Choudharya, Atta-Ur-Rahman. *Phytochemistry* **2005**, *66*, 935 – 940.
34. Usmanova, S. K.; Bessonova, I. A.; Milgrom E. G. *Chem. Nat. Compd.* **1996**, *32*, 198 – 200.
35. Kraut, L.; Klaus, T.; Mues, R.; Eichert, T.; Zinsmeister, H. D. *Phytochemistry* **1997**, *45*, 1621 – 1626.
36. Mohn, T.; Plitzko, I.; Hamburger, M. *Phytochemistry* **2009**, *70*, 924 – 934.
37. Li, J.; Chang, H.; Zhao, W.; Pi, H.; Ruan, H.; Zhang, P. *Helv. Chim. Acta* **2014**, *97*, 689 – 693.
38. Barrero, A. F.; Cabrera, E.; Rodriguez, I.; Fernández-Gallego, E. M. *Phytochemistry* **1994**, *36*, 189 – 194.
39. Shou, Q.; Banbury, L. K.; Maccarone, A. T.; Renshaw, D. E.; Mon, H.; Griesser, H. J.; Blanksby, S. J.; Smith, J. E.; Wohlmuth, H. *Fitoterapia* **2014**, *93*, 62 – 66.

40. Miyagawa, H.; Ishihara, A.; Kuwahara, Y.; Ueno, T.; Mayama, S. *Phytochemistry*, **1998**, *41*, 1473 – 1475.
41. Myagawa, H.; Ishihara, H.; Nishimoto, T.; Ueno, T.; Mayama, S. *Biosci. Biotech. Bioch.* **2014**, *59*, 2305 – 2306.
42. Chung, Y. M.; Lan, Y. H.; Hwang, T. L.; Leu, Y. L. *Molecules* **2011**, *16*, 1917 – 1927.
43. Ponchet, M.; Favre-Bonvin, J.; Hauteville, M.; Ricci, P. *Phytochemistry* **1988**, *27*, 726 – 730.
44. Ren, Y.; Yang, X.; Niu, X.; Liu, S.; Ren, G. *J. Agric. Food. Chem.* **2011**, *59*, 206 – 211.
45. Lee-Manion, A. M.; Price, R. K.; Strain, J. J.; Dimberg, L. H.; Sunerheim, K.; Welch, R. V. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 10619 – 10624.
46. Chen, C. Y. O.; Milbury, P. E.; Collins, F. W.; Blumberg, J. B. *J. Nutr.* **2007**, *137*, 1375 – 1382.
47. Koenig, R. T.; Dickamn, J. R.; Wise, M. L.; Ji, L. L. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 6438 – 6443.
48. Nie, L.; Wise, M. L.; Peterson, D. M.; Meydani, M. *Atherosclerosis* **2006**, *186*, 260 – 266.
49. Okazaki, Y.; Ishizuka, A.; Ishihara, A.; Nishioka, T.; Iwamura, H. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 3830 – 3839.
50. Niemann, G. J.; Liem, J.; Pureveen, J. B. M.; Boon, J. J. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 3923 – 3927.
51. Eldashan, O. A.; Ayoub, N. A.; Singab, A. N. B.; El-Azizi, M. M. *Molecules* **2002**, *7*, 501 – 506.
52. Döpke, W.; Fritsch, G. *Pharmazie* **1970**, *25*, 199 – 201.
53. Zhou, X.; Lin, X.; Ma, W.; Fang, W.; Chen, Z.; Yang, B.; Liu Y. *728*. **2014**, *7*, 35 – 37.
54. Spiteller, P.; Arnold, N.; Spiteller, M.; Steglich, W. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1402 – 1403.
55. Gale, R. M.; Higgins, C. E.; Hoehn, M. M. U.S. Pat. Appl. Publ. US 1975/3923823, 1975; *Chem. Abstr.* **1976**, *84*, 87964.
56. Nakamura, H.; Wakita, S.; Suganami, A.; Tamura, Y.; Hanada, K.; Murayama, T. *J. Lipid Res.* **2010**, *51*, 720 – 728.

57. Yu, M.; Jamieson, G. A.; Leikauf, G. D.; Nebert, D. F. *Biochem. Pharmacol.* **1998**, *55*, 193 – 200.
58. Shi, Y.; Feletou, M.; Ku, D. D.; Man, R. Y. K.; Vahnoutte, P. M. *Br. J. Pharmacol.* **2007**, *150*, 624 – 632.
59. Komiotis, D.; Wencel-Drake, J. D.; Dieter, J. P.; Lim, C. T.; Le Breton, G. C. *Biochem. Pharmacol.* **1996**, *52*, 763 – 770.
60. Li, Y. H.; He, J.; Li, Y.; Wu, X. D.; Peng, L. I.; Du, R. N.; Cheng, X.; Zhao, Q. S.; Li, R. T. *Helv. Chim. Acta* **2014**, *97*, 1481 – 1486.
61. Wu, P. L.; Hsu, Y. L.; Jao, C. W. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 1467 – 1470.
62. Se Graves, N. L.; Robinson, S. J.; Garcia, D.; Said, S. A.; Fu, X.; Schmitz, F. J.; Pietraszkiewicz, H.; Valeriote, F. A.; Crews, P. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 783 – 792.
63. Khokhar, S.; Feng, Y.; Campitelli, M. R.; Ekins, M. G.; Hooper, J. N. A.; Beattie, K. D.; Sadowski, M. C.; Nelson, C. C.; Davis, R. A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 3329 – 3332.
64. Wang, Y.; Zheng, J.; Liu, P.; Wang, W.; Zhu, W. *Mar. Drugs* **2011**, *9*, 1368 – 1378.
65. Mahwal, K.; Kumar, P.; Narasihman, B. *Med. Chem. Res.* **2012**, *21*, 293 – 307.
66. Chen, G.; Gao, H.; Tang, J. *Chem. Pharm. Bull.* **2011**, *59*, 447 – 451.
67. Nyunt, P.; Yada, H.; Higashiyama, T.; Yokota, A.; Ichihara, A.; Tomita, F. *J. Antibiot.* **1996**, *49*, 703 – 705.
68. Kimura, Y.; Inoue, T.; Tamura, S. *Agr. Biol. Chem.* **1973**, *37*, 2213 – 2214.
69. Hiroyuki, O.; Miyashige, H.; Hasegawa, H.; Yamashita, S. *J. Antibiot.* **1998**, *51*, 442 – 444.
70. Zhuang, P.; Tang, X. X.; Yi, Z. W.; Qiu, Y. K.; Wu, Z. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2012**, *14*, 197 – 203.
71. Chihiro, I.; Yuichi, K.; Nijisiri, R.; Hiroshi, F. *Chem. Pharm. Bull.* **1999**, *47*, 1491 – 1493.
72. Hofer, O.; Zechner, G.; Vajrodaya, S.; Lutz, G.; Greger, H. *Liebigs Ann.* **1995**, *1995*, 1789 – 1794.
73. Zhao, N.; Li, Z. L.; Li, D. H. *Phytochemistry* **2015**, *109*, 133 – 139.
74. Shim, S. H.; Kim, J. S.; Son, K. H.; Bae, K. H.; Kang, S. S. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 400 – 402.
75. Neff, S. A.; Lee, S. U.; Asami, Y.; Ahri, J. S.; Oh, H.; Baltraitis, J.; Gloer, J. B.; Wicklow, D. T. *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 464 – 472.



76. Zhou, Y.; Mándi, A.; Debbab, A.; Wray, V.; Schulz, B.; Müller, W. E. G.; Lin, W. H.; Proksch, P.; Kurtán, T.; Aly, A. H. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 2011, 6009 – 6019.
77. Arai, K.; Shimizu, S.; Yamamoto, Y. *Chem. Pharm. Bull.* **1981**, 29, 1005 – 1012.
78. Chen, M.; Shao, C. L.; Fu, X. M.; Kong, C. J.; She, Z. G.; Wang, C. Y. *J. Nat. Prod.* **2014**, 77, 1601 – 1606.
79. Cha, J. W.; Lee, S. I.; Kim, M. C.; Thida, M.; Lee, J. W.; Park, J. S.; Kwon, H. C. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, 25, 5083 – 5086.
80. Vogg, G. *Phytochemistry* **1999**, 51, 289 – 295.
81. Hampl, F.; Rádl, S.; Paleček, J. *Farmakochemie* (2. rozšířené vydání); Vydavatelství VŠChT Praha: Praha, 2007, s. 108.
82. Nugent, M. M.; Lee, K.; He, J. C. *Front. Physiol.* **2015**, 6.
83. Weyer, A. D.; Stucky, C. L. *Nat. Med.* **2015**, 21, 429 – 430.
84. Eriksson, B. I.; Quinian, D. J.; Weitz, J. I. *Clin. Pharmacokinet.* **2009**, 48, 1 – 22.
85. Ye, B.; Arnaiz, D. O.; Chou, Y. L.; Griedel, B. D.; Karanjawala, R.; Lee, W.; Morrissey, M. M.; Sacchi, K. L.; Sakata, S. T.; Shaw, K. J.; Wu, S. C.; Zhao, Z.; Adler, M.; Cheeseman, S.; Dole, W. P.; Ewing, J.; Fitch, R.; Lentz, D.; Liang, A.; Light, D.; Morser, J.; Post, J.; Rumennik, G.; Subramanyam, B.; Sullivan, M. E.; Vergona, R.; Walters, J.; Wang, X. Y.; White, K. A.; Whitlow, M.; Kochanny, M. J. *J. Med. Chem.* **2007**, 50, 2967 – 2980.
86. Robey, R. W.; Shukla, S.; Finley, E. M.; Oldham, R. K.; Barnett, D.; Ambudkar, S. V.; Fojo, T.; Bates, S. E. *Biochem. Pharmacol.* **2008**, 3, 1302 – 1312.
87. Wang, J.; Kim, T. H.; Ahn, M. Y.; Lee, J.; Jung, J. H.; Choi, W. S.; Lee, B. M.; Yoon, K. S.; Yoon, S.; Kim, H. S. *Int. J. Oncol.* **2012**, 41, 1101 – 1109.
88. Barraza, S. J.; Delekta, P. C.; Sindac, J. A.; Dobry, C. J.; Xiang, J.; Keep, R. F.; Miller, D. J.; Larsen, S. D. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, 23, 1569 – 1587.
89. Xiang, Y. F.; Qian, C. W.; Xing, G. W.; Hao, J.; Xia, M.; Wang, Y. F. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, 22, 4703 – 4706.
90. Pavan, M. V.; Lassiani, L.; Berti, F.; Stefancichi, G.; Ciogli, A.; Gasparini, F.; Mennuni, L.; Ferrari, F.; Escrieut, C.; Marco, E.; Makovec, F.; Fourmy, D.; Varnavas, A. *J. Med. Chem.* **2011**, 54, 5769 – 5785.
91. Munhoz, R. E. F.; Bignotto, T. S.; Pereira, N. C.; Saez, C. R. N.; Bepalhuk, R.; Fassina, V. A.; Pessini, G. P.; Baggio, M. P. D.; Ribeiro, L. F. C.; Brancalhão, R. M. C.; Mizuno, S.; Aita, W. S.; Fernandez, M. A. *Open J. Anim. Sci.* **2013**, 3, 343 – 353.

92. Jia, J.; Xu, Q. C.; Li, R. C.; Tang, X.; He, Y. F.; Zhang, M. Y.; Zhang, Y.; Xing, G. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10*, 6279 – 6286.
93. Moro, W. B.; Yang, Z.; Kane, T. A.; Brouillete, C. G.; Brouillete, W. J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 2001 – 2005.
94. Sosič, I.; Turk, S.; Sinreih, M.; Trošt, N.; Verlaine, O.; Amoroso, A.; Zervosen, A.; Luxen, A.; Joris, B.; Gobec, S. *Acta Chim. Slov.* **2012**, *59*, 380 – 388.
95. Thiery, V.; Beneteau, V.; Guillard, J.; Lamazzi, C.; Besson, T.; Cottenceau, G.; Pons, A. M. *Pharm. Pharmacol. Commun.* **1998**, *4*, 39 – 42.
96. Kavitha, P.; Santha, M.; Reddy, L. K. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2013**, *102*, 159 – 168.
97. Li, C. S.; Li, X. M.; Gao, S. S.; Lu, Y. H.; Wang, B. G. *Mar. Drugs* **2013**, *11*, 3068 – 3076.
98. Sharma, R. C.; Giri, P. P.; Kumar, D. *J. Indian Chem. Soc.* **2011**, *88*, 421 – 424.
99. Oberoi, M.; Khanna, S.; Chaturvedi, R.; Chaturvedi, G. K. *J. Indian Chem. Soc.* **1984**, *61*, 411 – 415.
100. Thorarensen, A.; Ruble, C. J.; Romero, D. L. PCT Int. Appl. WO2004/018414, 2004; *Chem. Abstr.* **2004**, *140*, 235497.
101. Dolzhenko, A. V.; Korkodinova, L. M.; Kotegov, V. P.; Novikova, V. *Pharm. Chem. J.* **2006**, *40*, 418 – 420.
102. McCarthy, D. J.; Parris, K.; Huang, A.; Failli, A.; Quagliato, D.; Dushin, E. G.; Novikova, E.; Severina, E.; Tuckman, M.; Petersen, P. J.; Dean, C.; Fritz, C. C.; Meshulam, T.; DeCenzo, M.; Dick, L.; McFadyen, I. J.; Somers, W. S.; Lovering, F.; Gilbert, A. M. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 7960 – 7969.
103. Nie, Z.; Perretta, C.; Lu, J.; Su, Y.; Margosiak, S.; Gajiwala, K. S.; Cortez, J.; Nikulin, V.; Yager, K. M.; Appelt, K.; Chu, S. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 1596 – 1609.
104. Weidel, E.; Jong, J. C.; Brengel, C.; Storz, M. P.; Braunshausen, A.; Negri, M.; Plaza, A.; Steinbach, A.; Müller, R.; Hartmann, R. W. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 6146 – 6155.
105. Li, J.; Wakefield, B. D.; Craig, J. R.; Thorarensen, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 2347 – 2350.
106. Ruble, J. C.; Wakefield, B. D.; Kamilar, G. M.; Marotti, K. R.; Melchior, E.; Sweeney, M. T.; Zurenko, G. E.; Romero, D. L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 4040 – 4043.

107. Bitzer, J.; Streibel, M.; Langer, H. J.; Grond, S. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 444 – 450.
108. Mackerell, A. Jr.; Zhang, H.; Osterman, A.; Kolhatkar, R. PCT Int. Appl. WO 2011/006158, 2011; *Chem. Abstr.* **2011**, *154*, 157977.
109. Saeed-Ur-Rehman; Ikram, M.; Rehman, S. *Front. Chem. China* **2010**, *5*, 348 – 356.
110. Raju, V.; Balasubramanian, K.; Jayabalakrishnan, C.; Chinnusamy, V. *J. Indian Chem. Soc.* **2010**, *87*, 1305 – 1311.
111. Mohareb, R. M.; Ho, J. Z.; Alfarouk, F. O. *J. Chin. Chem. Soc.* **2007**, *54*, 1053 – 1066.
112. Mruthyunjayaswamy, B. H. M.; Shanthaveerappa, B. K.; Basavarajaiah, S. M. *J. Indian Chem. Soc.* **2010**, *87*, 1109 – 1115.
113. Yusof, E. N. M.; Ravoof, T. B. S. A.; Tiekink, E. R. T.; Veerakumarasivam, A.; Crouse, K. A.; Tahir, M. I. M.; Ahmad, H. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 11034 – 11054.
114. Min, J.; Lin, D.; Zhang, Q.; Ziniu, Y. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *53*, 150 – 158.
115. Gineinah, M.; Mohamed M. *Med. Chem. Res.* **2001**, *10*, 596 – 604.
116. Cheng, T. J.; Wu, Y. T.; Yang, S. T.; Lo, K. H.; Chen, S. K.; Chen, Y. H.; Huang, W. I.; Chen, K. T.; Shih, H. W.; Cheng, Y. S.; Cheng, W. C.; Wong, C. H. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *18*, 8512 – 8529.
117. Hoffman, P. S.; Guerrant, R. L.; Macdonald, T. L.; Ballard, T. E. Jr. PCT Int. Appl. WO 2010/107736, 2010; *Chem. Abstr.* **2010**, *153*, 431344.
118. Kaloyanov, N.; Stoyanova, R. *Arzneimittel-forsch.* **2000**, *50*, 652 – 655.
119. Burlu, R. W.; Baird, E. E.; Kaizerman, J. A.; McMinn, D. L. PCT Int. Appl. WO 2004/012736, 2004; *Chem. Abstr.* **2004**, *140*, 163697.
120. Mabkhot, Y. N.; Al-Majid, A. M.; Barakat, A.; Al-Showiman, S. S.; Al-Har, S. M.; Radi, S.; Naseer, M. M.; Hadda, T. B. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, *15*, 5115 – 5127.
121. Mhaske, S. B.; Argade, N. P. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 9787 – 9826.
122. Dyakonov, A. L.; Telezhenetskaya, M. V. *Chem. Nat. Compd.* **1997**, *33*, 221 – 267.
123. Khan, I.; Ibrar A.; Abbas, N.; Saeed, A. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *76*, 193 – 244.
124. Moon, T. C.; Murakami, M.; Kudo, I.; Son, K. H.; Kim, H. P.; Kang, S. S.; Chang, H. W. *Inflamm. Res.* **1999**, *48*, 621 – 625.
125. Yamashita, H. *Cell Cycle* **2014**, *13*, 2801 – 2802.
126. McLaughlin, N. P.; Evans, P. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 518 – 521.
127. Keller, T. L.; Zocco, D.; Sundrud, M. S.; Hendrick, M.; Edenius, M.; Yum, J.; Kim, Y. J.; Lee, H. K.; Cortese, J. F.; Wirth, D. F.; Dignam, J. D.; Rao,

- A.; Yeo, C. Y.; Mazitschek, R.; Whitman, M. *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 311 – 317.
128. Joshi, B. K.; Gloer, J. B.; Wicklow, D. T.; Dowd, P. F. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 650 – 6
129. Malhotra, S.; Koul, S. K.; Sharma, R. L.; Anand, K. K.; Gupta, O. P.; Dhar, K. L. *Indian J. Chem. B* **1988**, *27*, 937 – 940.
130. Liu, W.; Shi, X.; Yang, Y.; Cheng, X.; Liu, Q.; Han, H.; Yang, B.; He, C.; Wang, Y.; Jiang, B.; Wang, Z.; Wang, C. *PloS One* **2015**, *10*, e0129759.
131. Vithal, S. B.; Campanella L. A.; Hays E. U.S. Pat. Appl. Publ. US 1964/3135659, 1964; *Chem. Abstr.* **1964**, *61*, 4372b.
132. Baas, P.; Ardizzoni, A.; Grossi, F.; Nackaerts, K.; Numico, G.; Van Marck, E.; Van de Vijver, M.; Monetti, F.; Smidt, Geirnaerd, M. J.; Van Zandwijk, N.; Debruyne, C.; Legrand, C.; Giaccone, G. *Eur. J. Cancer* **2003**, *39*, 353 – 357.
133. Ng, K. H.; Ng, F. N.; Yu, W. Y. *Chem. Commun (Camb.)* **2012**, *48*, 11680 – 11682.
134. Slintáková, L. *Diplomová práce*, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Zlín **2011**.
135. Moriyama, K.; Ishida, K.; Togo, H. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 946 – 949.
136. Wolf, C.; Liu, S.; Mei, X.; August, A. T.; Casimir, M. D. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 3270 – 3273.
137. Raffa, D.; Maggio, B.; Plescia, F.; Cascioferro, S.; Raimondi, M. V.; Cancemi, G.; D'Anneo, A.; Lauricella, M.; Cusimano, M. G.; Bai, R.; Hamel, E.; Daidone, G. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 6305 – 6316.
138. Engelhardt, H.; Reiser, U.; Zahn, S. K.; Hauptmann, R.; Steegmaier, M.; Guertler, U.; Hoffmann, M.; Grauert, M.; Stadtmueller, H. Eur. Pat. Appl. EP 1598343, 2005; *Chem. Abstr.* **2006**, *144*, 6801.
139. Yoo, E. J.; Ma, S.; Mei, T. S.; Chan, K. S. L.; Yu, Q. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 7652 – 7655.
140. Zhao, H.; Fu, H.; Qiao, R. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 3311 – 3316.
141. Yoshida, H.; Morishita, T.; Ohshita, J. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 3845 – 3847.
142. Coyne, W. E.; Cusic, J. W. *J. Med. Chem.* **1968**, *11*, 1208 – 1213.
143. Venuti, M. C. *Synthesis* **1982**, 1982, 266 – 268.
144. Shinde, B. R.; Shenoy, S. J.; Pai, N. R. *Indian J. Chem. B* **1990**, *29*, 711 – 720.
145. Bonne, D.; Dekhane, M.; Zhu, J. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 5285 – 5288.
146. Culf, A. S.; Čuperlović-Culf, M.; Ouellette, R. J.; Decken, A. *Org. Lett.* **2015**, *17*, 2744 – 2747.

147. Matsubara, T.; Asako, S.; Iies, L.; Nakamura, E. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 646 – 649.
148. Podesva, C.; Solomon, C.; Vagi, K.; *Can. J. Chem.* **1968**, *46*, 435 – 439.
149. Kafka, S.; Proisl, K.; Kašpárková, V.; Urankar, D.; Kimmel, R.; Košmrlj, J. *Tetrahedron* **2013**, *69*, 10826 – 10835.
150. Proisl, K.; Kafka, S.; Urankar, D.; Gazvoda, M.; Kimmel, R.; Košmrlj, J. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 9650 – 9664.
151. Kumar, D.; Jadhavar, P. S.; Nutiyal, M.; Sharma, H.; Meena, P. K.; Adane, L.; Pancholia, S.; Chakraborti, A. K. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 30819 – 30825.
152. Mohebat, R.; Raja, M.; Mohammadian, G. *Russ. J. Gen. Chem.* **2015**, *85*, 2395 – 2398.
153. Wang, Z. Z.; Tang, Y. *Tetrahedron* **2016**, *72*, 1330 – 1336.
154. Wang, X. C.; Xiao, F.; Liu, S.; Deng, G. J. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 4900 – 4903.
155. Srholecová, A. *Diplomová práce*, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Zlín **2014**.
156. Lingens, F.; Sproessler, B. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1967**, *702*, 169-179.