

# **Příprava 4-propargyl-3,4-dihydro-1*H*-benzo[e][1,4]diazepin-2,5-dionů a studium jejich možných isomerizací**

Bc. Adéla Lajdová

---

Diplomová práce  
2017



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav chemie

akademický rok: 2016/2017

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Adéla Lajdová**  
Osobní číslo: **T15317**  
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Chemie potravin a bioaktivních látek**  
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Příprava  
4-propargyl-3,4-dihydro-1H-benzo[e][1,4]diazepin-2,5-dionů  
a studium jejich možných isomerizací**

Zásady pro vypracování:

### I. Teoretická část

1. Zpracovat literární rešerši zaměřenou na přípravu benzodiazepinových sloučenin a na možnosti cyklizačních reakcí propargylem substituovaných sloučenin.

### II. Praktická část

1. Syntetizovat dostatečné množství 3-propargylaminochinolin-2,4-dionů jako výchozích látek pro následné reakce.
2. Vhodnou metodou připravit alespoň šest derivátů 4-propargylbenzo[e][1,4]diazepin-2,5-dionů.
3. Pokusit se zjistit vhodné reakční podmínky pro bazicky indukovanou cyklizaci propargylové skupiny.
4. V případě nalezení optimálních podmínek provést několik reakcí směřujících k benzo[e]pyrrolo[1,2-a][1,4]diazepin-5,11-dionům.
5. Izolované produkty charakterizovat dostupnými metodami instrumentální analýzy.
6. Vyhodnotit výsledky experimentů a sepsat diplomovou práci.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

**Dle provedení literární rešerše s využitím databáze Chemical Abstracts.**

Vedoucí diplomové práce:

**Ing. Roman Kimmel, Ph.D.**

Ústav chemie

Datum zadání diplomové práce:

**1. února 2017**

Termín odevzdání diplomové práce:

**12. května 2017**

Ve Zlíně dne 6. února 2017



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



Ing. Michal Rouchal, Ph.D.  
*ředitel ústavu*

## 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, považují 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 12. 5. 2017

  
.....

<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 přihlídně k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

## ABSTRAKT

V rámci předložené diplomové práce byla v teoretické části rozebrána problematika velice rozmanité biologické aktivity sloučenin obsahujících ve své molekule benzodiazepinový a pyrrolbenzodiazepinový motiv. V následující části jsou probírány nejen přístupy k syntéze dvou 3-benzyl-3-(propargylamino)chinolin-2,4(1*H*,3*H*)-dionům, ale také interakce jejich dalších analogů s 1,1,3,3-tetramethylguanidinem poskytující deriváty 4-propargyl-3,4-dihydro-1*H*-benzo[*e*][1,4]diazepin-2,5-dionu, jejichž struktura byla potvrzena běžnými metodami instrumentální analýzy, jako jsou nukleární magnetická resonance, hmotnostní spektrometrie a infračervená spektroskopie. Dále byly provedeny nepreparativní pokusy směřované k nalezení vhodných podmínek pro bazicky indukovanou cyklizaci alkynylové skupiny k atomu uhlíku v poloze 3 benzodiazepinového skeletu. Jejich aplikací byly získány zajímavé výsledky, které jsou v diskusní části hojně komentovány.

**Klíčová slova:** chinolindion, benzodiazepin, pyrrolbenzodiazepin, propargylová skupina, biologická aktivita, cyklizace, expanze kruhu

## ABSTRACT

The theoretical part of this thesis deals with issue of very heterogeneous biological activities of compounds containing benzodiazepine and pyrrolobenzodiazepine motifs in their structure. The following sections discuss not only the approaches of synthesis of the two 3-benzyl-3-(propargylamino)quinoline-2,4(1H, 3H)-dione but also the reaction of their other analogs with 1,1,3,3-tetramethylguanidine, 4-propargyl-3,4-dihydro-1H-benzo [e] [1,4] diazepine-2,5-dione, whose structure was confirmed by conventional methods of instrumental analysis such as nuclear magnetic resonance, mass spectrometry and infrared spectroscopy. Adverse attempts have also been made to find suitable conditions for the basically induced cyclization of the alkynyl group to the carbon atom at the 3-position of the benzodiazepine skeleton. Their applications have been gained with interesting results that are widely commented in the discussion part.

**Keywords:** quinolindione, benzodiazepine, pyrrolobenzodiazepine, propargyl group, biological activity, cyclization, expansion of cycle

Na tomto místě bych v první řadě ráda poděkovala především vedoucímu mé diplomové práce Ing. Romanu Kimmelovi, Ph.D za odborné vedení, cenné rady, obětavost, podporu, pomoc při realizaci této práce a hlavně za jeho nehynoucí optimismus, který byl po dobu realizace této práce přínosem.

Velké poděkování také patří Mgr. Robertu Víchovi, Ph.D za cenné rady, měření  $^1\text{H}$  NMR spekter deuterovaných sloučenin a velkou pomoc při preparaci vhodných monokrystalů pro měření rentgenové difrakce i při tvorbě ORTEP diagramů a Ing. Michalu Rouchalovi, Ph.D za obětavost a pomoc při měření i interpretaci ESI-MS spekter.

Dále děkuji také doc. Ing. Stanislavu Kafkovi, CSc., za konzultace, cenné rady a svědomitý přístup při realizaci práce v laboratoři.

V neposlední řadě také poděkování náleží prof. Dr. Janezi Košmrljovi z Univerzity v Ljubjaně za měření NMR spekter a Dr. Damijaně Urankar za měření hmotnostních spekter s vysokým rozlišením a Dr. Andreji Pevecovi za měření rentgenových difrakčních analýz.

Prohlašuji, že jsem na diplomové práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků, je-li to uvedeno na základě licenční smlouvy, budu uvedena jako spoluautorka.

Ve Zlíně

.....  
Podpis studenta



# OBSAH

ÚVOD.....	11
<b>I</b> <b>TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>12</b>
<b>1</b> <b>BENZODIAZEPINY</b> .....	<b>13</b>
1.1    BENZODIAZEPINOVÁ CHEMOTERAPEUTIKA .....	13
1.2    MECHANISMUS PŮSOBENÍ BENZODIAZEPINŮ.....	17
1.3    BENZODIAZEPINOVÉ ALKALOIDY .....	19
1.4    SYNTÉZA BENZODIAZEPINOVÝCH DERIVÁTŮ .....	22
1.4.1    Fotolýza azidochinolinu .....	22
1.4.2    Kondenzace <i>o</i> -diaminobenzenu s ketonem za účasti zeolitu .....	23
1.4.3    Syntéza katalyzovaná chloridem zirkoničitým.....	23
1.4.4    Příprava benzodiazepinu s využitím Ugiho reakce .....	24
1.4.5    Syntéza cyklopenolových analogů .....	25
1.4.6    Syntéza diazepamu .....	26
<b>2</b> <b>PYRROLOBENZODIAZEPINY</b> .....	<b>28</b>
2.1    PYRROLOBENZODIAZEPINY IZOLOVANÉ Z PŘÍRODY .....	28
2.2    PYRROLOBENZODIAZEPINY PŘIPRAVENÉ SYNTETICKOU CESTOU .....	30
2.3    SYNTÉZA PYRROLOBENZODIAZEPINŮ .....	33
2.3.1    Friedelova-Craftsova alkylace cyklopentenonu s pyrrolylanilinem .....	33
2.3.2    Reakce nitrobenzoové kyseliny s prolinolem následovaná reduktivní cyklizací .....	34
2.3.3    Reakce <i>o</i> -nitrobenzoylchloridu s esterem prolinu následovaná reduktivní cyklizací .....	35
<b>II</b> <b>PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>37</b>
<b>3</b> <b>DISKUSE A VÝSLEDKY</b> .....	<b>38</b>
3.1    SHRnutí VÝSLEDKŮ PŘEDEŠLÝCH KOLEGŮ .....	38
3.2    DISKUSE K ŘEŠENÍ ZADANÉ PROBLEMATIKY .....	39
3.3    KOMENTÁŘ PODPORUJÍCÍ STRUKTURU PŘIPRAVENÝCH SLOUČENIN .....	55
<b>4</b> <b>CHARAKTERISTIKA PŘÍSTROJOVÉHO VYBAVENÍ A INSTRUMENTÁLNÍCH METOD</b> .....	<b>61</b>
<b>5</b> <b>DETAILNÍ POPIS SYNTETICKÝCH POSTUPŮ A STRUKTURNÍ CHARAKTERISTIKY PŘIPRAVENÝCH SLOUČENIN</b> .....	<b>63</b>

5.1	PŘÍPRAVA 4-HYDROXYCHINOLIN-2(1 <i>H</i> )-ONŮ 1 .....	63
5.2	PŘÍPRAVA 3-CHLORCHINOLIN-2,4(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> )-DIONŮ 2 .....	64
5.3	PŘÍPRAVA 3-(PROPARGYLAMINO)CHINOLIN-2,4-(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> )-DIONŮ 3 .....	65
5.4	PŘÍPRAVA 4-PROPARGYLBENZODIAZEPIN-2,5-DIONŮ 4 .....	66
5.5	PŘÍPRAVA BENZO[ <i>E</i> ]PYRROLO[1,2- <i>A</i> ][1,4]DIAZEPIN-5,11-DIONU 5 .....	72
5.6	POKUS O DEUTERIZACI SLOUČENINY 4A USKUTEČNĚNÝ V DMSO .....	75
5.7	POKUS O DEUTERIZACI SLOUČENINY 4A USKUTEČNĚNÝ V MECN.....	75
<b>ZÁVĚR .....</b>		<b>77</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>		<b>79</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>		<b>80</b>

## ÚVOD

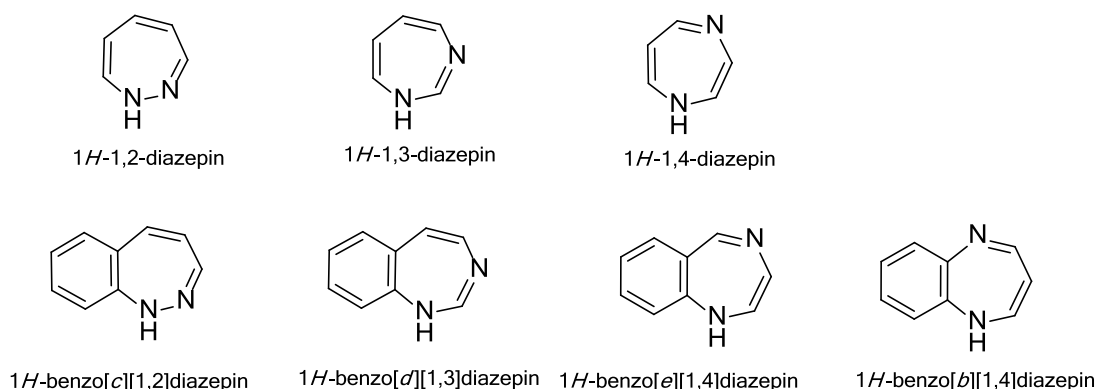
Na Fakultě technologické Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně jsou mnohými pracovníky Ústavu chemie, prakticky od jeho osamostatnění od jiných součástí, studovány syntetické přístupy k 4-hydroxychinolin-2(1*H*)-onům respektive k chinolin-2,4(1*H*,3*H*)-dionům a jejich interakce s různými reagenty. V posledních několika letech, bylo členy výzkumné skupiny doc. Kafky zjištěno, že účinkem středně silných bází na 3-(substituovanéamino)chinolin-2,4(1*H*,3*H*)-diony nastává, začleněním atomu dusíku aminové skupiny vázané v poloze 3, expanze šestičlenného heterocyklického kruhu. S využitím těchto znalostí a mírnou optimalizací dříve používaných metod bylo sedm 3-(propargylamino)chinolin-2,4(1*H*,3*H*)-dionů, z nichž jsem jeden připravila ze základních surovin sama a zbylé byly použity z laboratorních zásob, účinkem 1,1,3,3-tetramethylguanidinu v dimethylformamidu při laboratorní teplotě převedeny na odpovídající 4-propargyl-3,4-dihydro-1*H*-benzo[*e*][1,4]diazepin-2,5-diony, které je možné účinkem silné báze transformovat na řadu heterocyklických sloučenin s poměrně rozmanitou strukturou.

Syntéza benzodiazepinů, potažmo pyrrolobenzodiazepinů, pro jejich zajímavé vlastnosti, představuje atraktivní odvětví organické chemie. Postupy směřující k těmto derivátům často, dle prostudované literatury, zahrnují mnoho reakčních kroků s nepříliš vysokými výtěžky. Tato práce na několika vybraných derivátech prezentuje novou syntetickou strategii, kterou je možné využít k přípravě zmiňovaných heterocyklů poměrně snazší cestou poskytující, s výjimkou několika málo látek, téměř ve všech stupních vysokou konverzi vstupujícího materiálu.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 BENZODIAZEPINY

Benzodiazepiny jsou poměrně početná skupina sloučenin majících do své struktury zabudované dva atomy dusíku. Obecně jsou složeny ze dvou vzájemně kondenzovaných kruhů, benzenu a diazepinu. Samotný sedmičlenný kruh diazepinu, jak ukazuje horní polovina **Obrázku 1**, se vyskytuje, pomineme-li jeho tautomerní formy, ve třech modifikacích, a to 1*H*-1,2-diazepin, 1*H*-1,3-diazepin a 1*H*-1,4-diazepin. Různými syntetickými přístupy byly připraveny 4 typy benzodiazepinů, jak je uvedeno ve spodní polovině **Obrázku 1**, s různou polohou atomů dusíku. V odborných periodických zaměřených na biologickou účinnost jsou téměř výhradně popisovány 1*H*-benzo[e][1,4]diazepiny jejichž účinky jsou stručně popsány v následujících kapitolách.

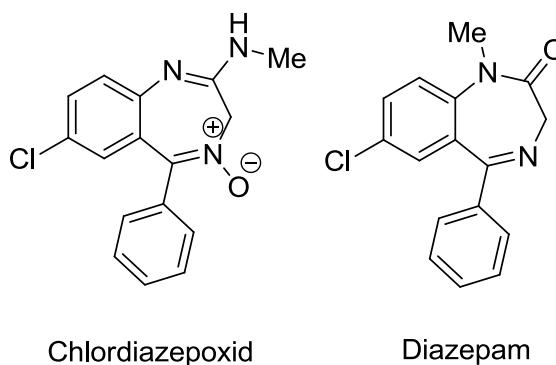


**Obrázek 1.** Struktura diazepinů a benzodiazepinů.

### 1.1 Benzodiazepinová chemoterapeutika

První benzodiazepinový medikament chlórdiazepoxid, jehož objev byla náhoda, byl veřejnosti představen v roce 1957 společností Hoffman-La Roche Company pod komerčním názvem Librium©. Toto léčivo je předepisováno především k úlevě od úzkostných stavů. Jelikož bylo považováno jako bezpečný analog vůči barbiturátům, v 80. letech 20. století se stalo jedním z nejvíce předepisovaných léků v Americe. Delším sledováním pacientů byly shledány méně optimistické zjištění podkládající fakt, že při užívání benzodiazepinových léčiv lze vypěstovat silnou závislost.<sup>1</sup>

Dalším anxiolytikem, které bylo v roce 1963 zavedeno na trh, byl diazepam, uváděný pod názvem Valium<sup>®</sup>.<sup>1</sup>



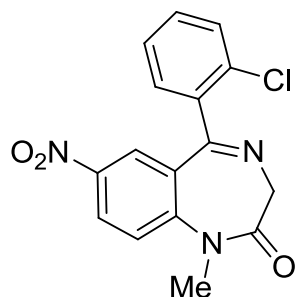
**Obrázek 2.** První benzodiazepinové terapeutika.

V následujících letech 20. století bylo vyvinuto mnoho úsilí pro přípravu strukturních analogů výše zmiňovaných sloučenin, které by měly stejný terapeutický účinek a nezpůsobovaly by fyziologickou i psychickou závislost. Takové deriváty benzodiazepinu nebo jiných sloučenin, které nevykazují žádné z nežádoucích účinků a nebo, které by jejich funkci nahradily, doposud bohužel nalezeny nebyly. Benzodiazepinové léčiva se hojně používají i přes rizika u starších pacientů, u kterých se projevila zvýšená citlivost v podobě vedlejších účinků.<sup>1</sup>

V současné době jsou benzodiazepiny nejen nejčastěji užívané, ale také zneužívané psychofarmaka. Obecně jsou považovány za stimulanty nebo psychostimulanty CNS. Jinými slovy, jsou to léky, které jsou schopné dočasně udržet odpovídající vnímání reality, což snižuje vnější podrážděnost, pocit únavy a povznášející tělesné i duševní schopnosti.

Benzodiazepinové stimulanty CNS se dle jejich účinků řadí do skupiny antiepileptik, anxiolytik, sedativ a hypnotik, antidepressiv a myorelaxancií.

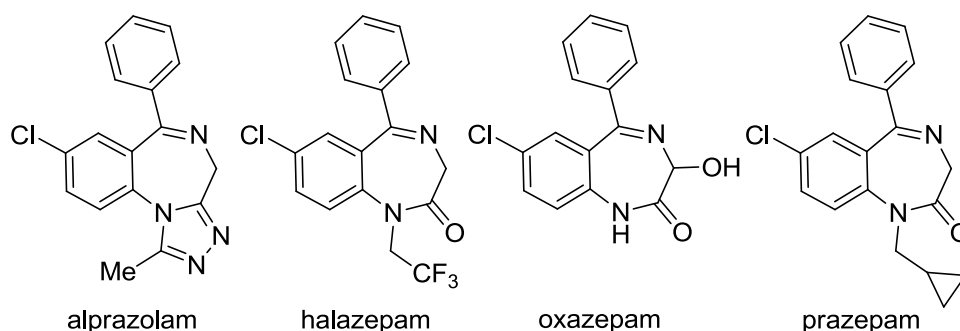
Antiepileptika disponují sedativním účinkem na CNS a při užití těchto léčiv dochází také k útlumu vzájemně propojených center, které se primárním podnětem kaskádovitě aktivují napříč celým mozkem. Do této skupiny léčiv patří klonazepam (**Obrázek 3**).<sup>2</sup>



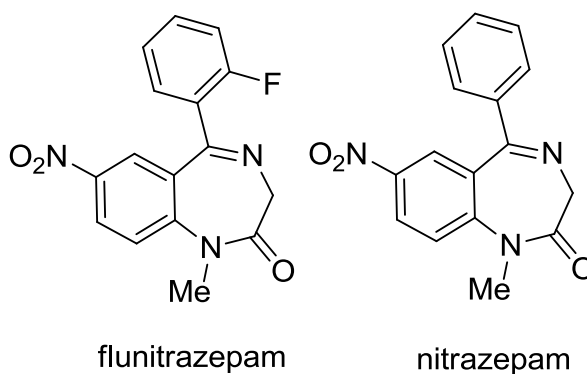
klonazepam

**Obrázek 3.** Zástupce antiepileptika.

Anxiolytika jsou využívány pro odstranění úzkosti, stresu, strachu a obav. Anxiolytika, která se v současné době používají v medicíně, jsou rozdělena do dvou skupin, do kterých jsou zahrnuty jak deriváty benzodiazepinu, jako je diazepam, chlordiazepoxid (**Obrázek 2**) chlorazepat, halazepam, oxazepam a prazepam (**Obrázek 4**), tak i sloučeniny s odlišným skeletem. Anxiolytický účinek benzodiazepinů je specifický a jedinečný, čímž se odlišují od analogů neobsahujících benzodiazepinový skelet. Primární účinky benzodiazepinových anxiolytických léčiv na CNS zahrnují zmírnění úzkosti a starosti, sedativní účinek, uvolnění kosterního svalstva a uspávací efekt.<sup>2</sup>

**Obrázek 4.** Zástupce anxiolytik.

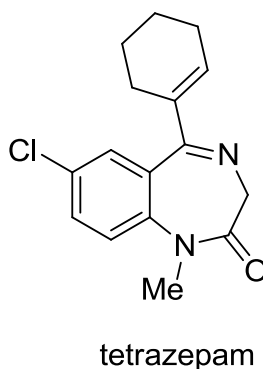
Sedativa a hypnotika mají za následek motorické či psychické zklidnění organismu. Sedativní účinek může navodit ospalost až spánek jedince. Při užití vysokých dávek těchto preparátů je ve stejné míře sedativní účinek doprovázen účinkem anxiolytickým. Jako sedativa jsou používány nitrazepam, flunitrazepam (**Obrázek 4**).<sup>2</sup>



**Obrázek 5.** Zástupce sedativ a hypnotik.

Antidepresiva jsou léčiva, která se vyznačují zmírněním příznaků spojených s depresí. Existuje několik tříd antidepresiv. Nejčastější a široce používané léky pro léčbu endogenní deprese jsou tricyklická antidepresiva, což jsou látky, které ovlivňují zpětné vstřebávání neurotransmiterů (noradrenalin, serotonin) a tím je zvýšen jejich účinek. Mechanismus účinku tricyklických látek není jednoznačně znám, a v současné době není možné ani jednou z navržených hypotéz plně vysvětlit jejich antidepresivní účinek. Negativní stranou užívání benzodiazepinových antidepresiv, jež jsou identická uvedeným anxiolitikům (**Obrázek 2**), je snížená pozornost při řízení. Tato skutečnost byla zkoumána skupinou autorů<sup>2</sup>, kdy bylo zjištěno, že během prvních týdnů užívání benzodiazepinových antidepresiv je zvýšené riziko dopravních nehod o 40 %. Tato skutečnost byla pozorována, bez ohledu na době účinnosti různých benzodiazepinových antidepresiv, při užívání jedné či více dávek během dne.<sup>2</sup>

Myorelaxancia, jako je tetrazepam (**Obrázek 6**), jsou látky uvolňující křeče, snižují svalové napětí a svými účinky vedou k relaxaci příčně pruhovaného svalstva.



**Obrázek 6.** Zástupce myorelaxancií.



Bylo prokázáno, že užíváním extraktu z kořene byliny Šišáku bajkalského (*Scutellaria Baicalensis* L.; **Obrázek 7**), rostlina z čeledi hluchavkovitých, který je bohatý na flavonoidy, se výrazně zvyšuje terapeutický účinek benzodiazepinů. Díky této vlastnosti, je-li podáván kombinovaně, je možné pacienty efektivně léčit benzodiazepinovými medikamenty se slabším terapeutickým indexem nebo v nižších koncentracích farmaceutické substance, čímž je snižována míra závislosti. Tato kombinace se používá při nervovém vyčerpání, poruše spánku, či stresu. V japonské medicíně se předepisuje na podporu obranyschopnosti při rakovině. V poslední době se rozmáhá nově vyšlechtěný druh Šišák vroubkovaný (*Scutellaria lateriflora*; **Obrázek 7**) aplikovatelný při akutních stavech.<sup>2,3,4,5</sup>

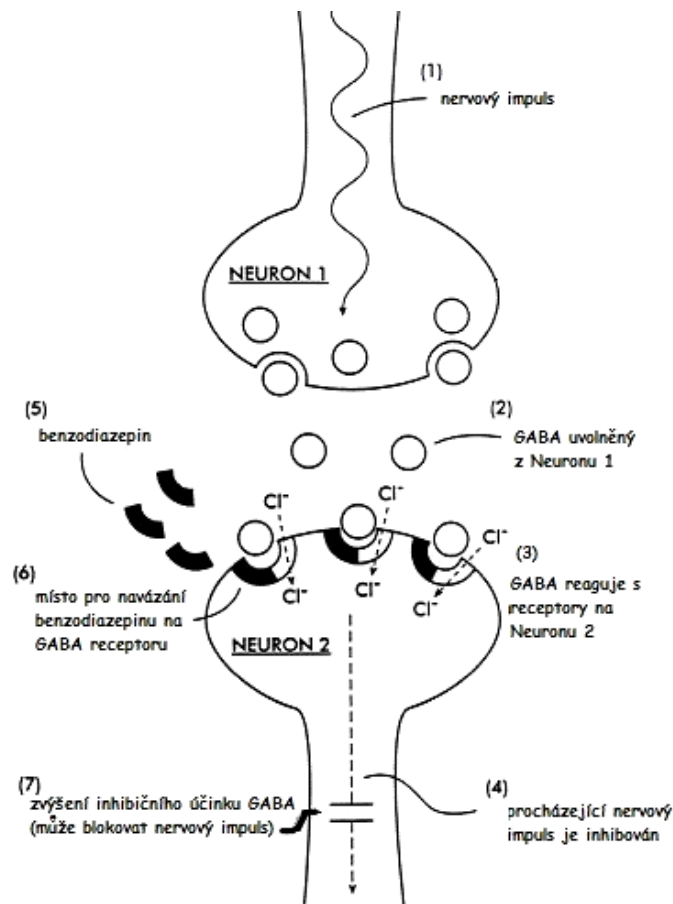


**Obrázek 7.** Šišáku bajkalský (vlevo) a Šišák vroubkovaný (vpravo).

## 1.2 Mechanismus působení benzodiazepinů

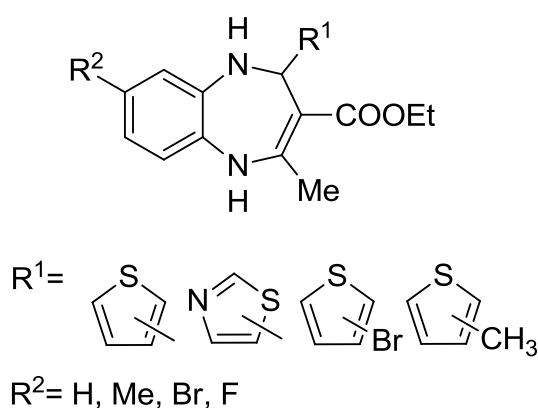
Vědeckým pracovníkům studujících účinky benzodiazepinových léčiv trvalo až 15 let, než dokázali objasnit jejich mechanismus účinku a biotransformaci. V dnešní době je jejich osud od podání až do vyloučení z organismu velice dobře znám. Benzodiazepiny jsou třídou léčiv, která v různých částech mozku selektivně působí na receptory  $\gamma$ -aminomáselné kyseliny A (GABA-A) a ovlivňují tak centrální nervovou soustavu (CNS). Tyto receptory se hojně vyskytují v kůře mozkové a limbickém systému. Mechanismus

účinku spočívá v navázání na definovanou oblast receptorového proteinu pro GABA, tím je projevna jeho alosterická modulace odpovědi komplexu na GABA. GABA zvyšuje transmembránový přenos chloridových iontů kanálkem receptorového proteinu do buňky. Tento zvýšený vstup iontů je způsoben větší frekvencí otevírání chloridového kanálku. GABA-A receptor je složen z pěti jednotek. U obratlovců se nejčastěji vyskytují podjednotky  $\alpha$ (typ 1-6),  $\beta$ (typ 1-3),  $\gamma$ (typ 1-3) s odlišnou citlivostí na benzodiazepiny. Benzodiazepiny jsou vázány na receptory, které se skládají z  $\alpha_1$  (především sedativní a hypnotické účinky),  $\alpha_2$  a  $\alpha_3$  (anxiolytické působení) a  $\alpha_5$  podjednotek. Při vzniku nervového impulsu nastává uvolňování GABA z, dle **Obrázku 8**, "neuronu 1" do synaptické štěrby, kde interaguje s receptory na "neuronu 2" a tím umožňuje vstup chloridových iontů do "neuronu 2". Tento proces je umocněn podáváním benzodiazepinových medikamentů. Tím se vyvolá inhibiční efekt pro nervový impuls, který může být potlačen či zcela blokován.<sup>6,7,8</sup>



**Obrázek 8.** Mechanismus účinku benzodiazepinů.

U značně početné skupiny syntetizovaných derivátů 1,5-benzodiazepinu, jejichž obecná struktura je uvedena na **Obrázku 9**, byla posuzována *in vitro* antimikrobiální aktivita vůči bakteriím *Cryptococcus neoformans*, *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus* a kvasince *Candida albicans*. Výsledky testů ukázaly, že většina derivátů vykazuje značnou aktivitu proti všem testovaným kmenům bakterií i vůči vybrané kvasince. Zejména sloučeniny mající  $R^1 = \text{thiazol-2-yl}$ ,  $R^2 = \text{H}$  a také ty, jež mají  $R^1 = \text{thiazol-2-yl}$ ,  $R^2 = \text{CH}_3$  (MIC = 2–6  $\mu\text{g/ml}$ ) vykazují vynikající antifungální aktivitu a současně také jsou na bakterii *Cryptococcus neoformans* mnohonásobně účinnější než referenční komerčně používaný lék flukonazol.

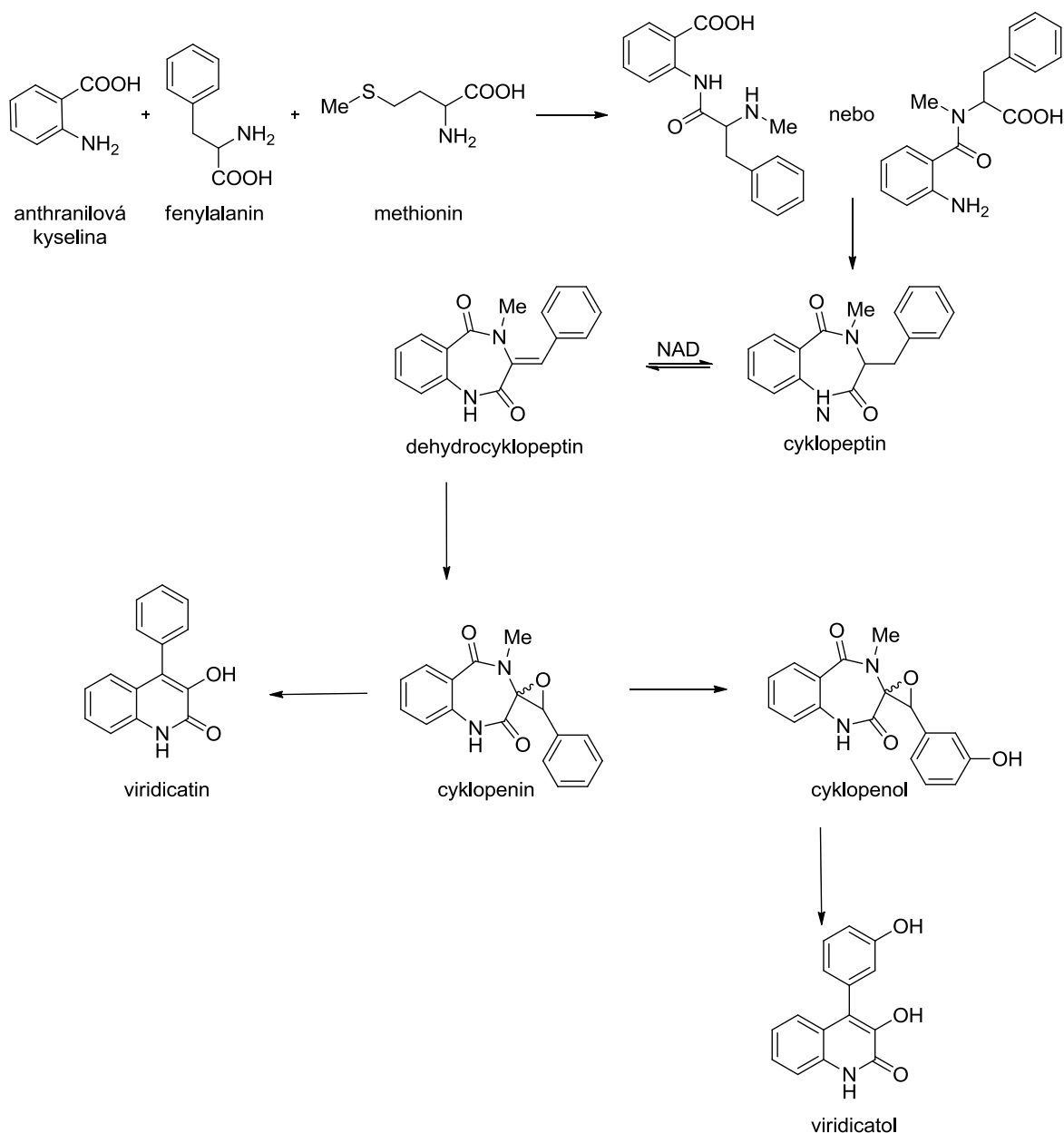


**Obrázek 9.** Testované 1,5-benzodiazepiny na antimikrobiální aktivitu.

### 1.3 Benzodiazepinové alkaloidy

Průzkumem literatury, za účelem nalezení benzodiazepinových derivátů izolovaných z živých organismů, bylo zjištěno, že prakticky jediným přírodním zdrojem jsou plísně rodu *Penicillium*. Z této četné rodiny plísni byly prvně z druhu *Penicillium cyclopium* Brackenem a ostatní<sup>9</sup> a Birkinshawem a ostatní<sup>10</sup> izolovány 1,4-benzodiazepin-2,5-diony s triviálními názvy cyklopeptin, dehydrocyklopeptin, cyklopenin a cyklopenol. Biosyntéza cyklopeninu spočívá, jak je naznačeno na **Schématu 1**, v kondenzaci kyseliny anthranilové s fenylalaninem za účasti methioninu, který je donorem methylové skupiny. Primárně se tvoří enzymově vázané acyklické dipeptidové intermediáty, které se po intramolekulární cyklizaci z enzymu uvolní. Z cyklopeptinu účinkem NAD, jakožto vodíkovým akceptorem, vzniká dehydrocyklopeptin, který oxidací dvojně vazby molekulárním

kyslíkem tvoří epoxidový kruh a následnou *m*-hydroxylací poskytuje cyklopenol.<sup>11</sup> Plísně druhu *Penicillium viridicantum* dále účinkem enzymu cyclopentázy benzodiazepinový systém cyklopeninu a cyklopenolu konvertují na deriváty chinolinu zvané viridicatin a viridicatul.<sup>12</sup>

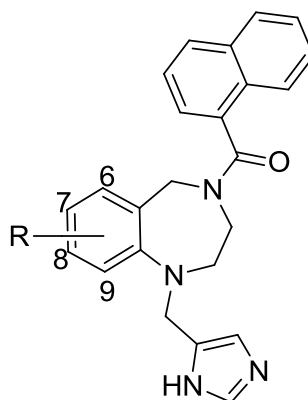


**Schéma 1.** Biosyntetická dráha 1,4-benzodiazepin-2,5-dionů plísni rodu *Penicillium*.

Cyklopenin a cyklopenol mají výrazné herbicidní účinky. Dále bylo u cyklopeninu zjištěno, že selektivně inhibuje reverzibilní acetylcholinesterázu. Acetylcholinesteráza je

enzym způsobující degradaci neurotransmiteru acetylcholinu, jehož nedostatek vyvolává Alzheimerovu chorobu, za vzniku cholinu a acetátu.<sup>13</sup> U cyklopenolu a viridicatinu bylo prokázáno, že je inhibitor replikace lidského viru HIV.<sup>14,15</sup>

U vybraných benzodiazepinových analogů uvedených v **Obrázku 10**, byla prokázána inhibice cytoplazmatického enzymu farnesyltransferázy, čímž nastává modulace aktivity nádorových proteinů a tím zabraňuje jejich růstu. Tuto protinádorovou aktivitu pozorovali Ding Ch. Z. a další na pokusných myších. Jejich studie ukázaly, že hydrofobní substituent navázaný na atomu dusíku v poloze 4, stejně jako v poloze 7 nebo 8 jsou důležité pro inhibici diskutovaného enzymu.<sup>16</sup>



R: 7: Ph, Br, cHex, pyridin-2-yl, pyridin-3-yl, pyridin-4-yl  
8: Cl, NH<sub>2</sub>, NHCOMe, NHCO-cHex, NHCO-Ph,  
NHCOONH-cHex, NHSO<sub>2</sub>-Ph

**Obrázek 10.** Vybrané analogy inhibující enzym farnesyltransferázu.

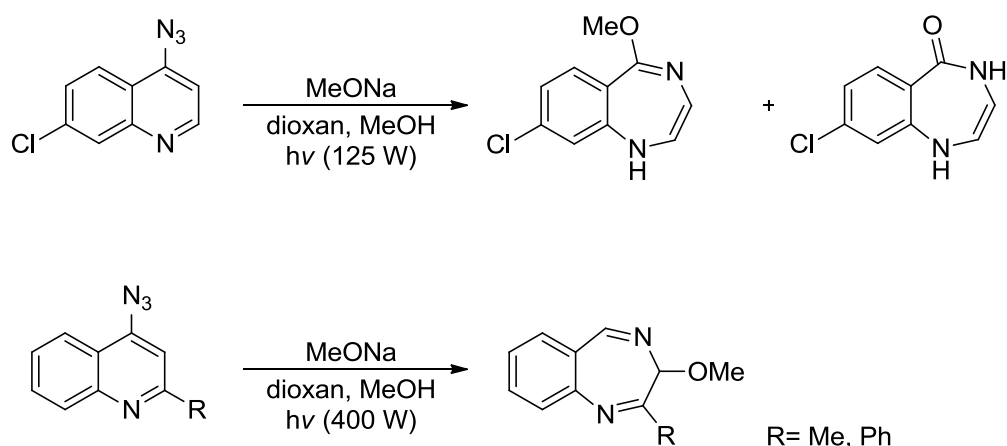
Kromě zmíněných vlastností hrají benzodiazepiny roli základního stavebního kamene při přípravě dalších sloučenin složitějších struktur, např. s novými kondenzovanými kruhy, jako jsou triazolo-, oxazino- nebo furano-benzodiazepiny. Výzkum je v této oblasti stále velmi aktivní a je zaměřen na syntézu sloučenin se zvýšenou farmakologickou aktivitou.<sup>17</sup>

## 1.4 Syntéza benzodiazepinových derivátů

Jelikož byly, a stále jsou, benzodiazepinové deriváty velmi studované sloučeniny, bylo do dnešní doby vyvinuto mnoho syntetických postupů vedoucích k nim. Z tohoto důvodu bylo usouzeno, že v rámci práce není nutný vyčerpávající přehled všech publikovaných metodik, a proto byly vybrány pouze některé zajímavé, uvedené níže.

### 1.4.1 Fotolýza azidochinolinu

Protože tato diplomová práce je polovinou svého obsahu věnována přípravě benzodiazepinů vycházející z chinolindionů, na první čestné místo jednoznačně patří fotolytické reakce uvedené ve **Schématu 2**.



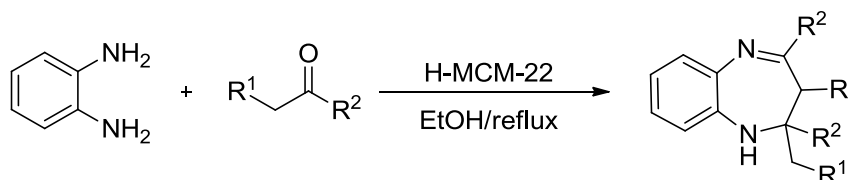
**Schéma 2.** Fotolytická konverze 4-azidopyridinu na benzodiazepin.

U obou znázorněných reakcí je substituovaný 4-azidochinolin ve směsi rozpouštědel methanolu a 1,4-dioxanu v bazickém prostředí methanolátu za ozařování rtuťovou výbojkou přeměněn na 1,4-benzodiazepiny. Jediný výrazný rozdíl, který pravděpodobně způsobil vznik rozdílných produktů, byla energie použitého záření. V prvním případě bylo na reakční směs 6 h svíceno středotlakou rtuťovou výbojkou (125 W), čímž došlo nejen k přesmyku, ale také k fotooxidaci snadno dostupné výchozí látky na směs dvou sloučenin, 8-chlor-5-methoxy-1H-benzo[e][1,4]diazepin a 8-chlor-1H-benzo[e][1,4]diazepin-5(4H)-on, získaných ve stejných množstvích 20 %.<sup>18</sup> V případě druhém, který byl publikován<sup>19</sup> o pět let později, byla pro fotolýzu použita vysokotlaká rtuťová výbojka (400 W). Za těchto podmínek byl izolován pouze jeden produkt s dvojnásobným výtěžkem (40 %).<sup>20,21</sup>

Další transformace derivátů chinolinu na 1,4-benzodiazepiny, pomineme-li článek z loňského roku publikovaný naší výzkumnou skupinou, v literatuře nalezeny nebyly.

#### 1.4.2 Kondenzace *o*-diaminobenzenu s ketonem za účasti zeolitu

Za přítomnosti katalytického množství zeolitu (H-MCM-22) lze během 3 hodin provést při pokojové teplotě účinnou kondenzaci *o*-fenylendiaminu a ketonů. Tato metoda, uvedená na **Schématu 3**, poskytuje s cyklickými i s acyklickými ketony 2,3-dihydro-1*H*-benzo[*b*][1,4]diazepiny ve vynikajících výtěžcích.



**Schéma 3.** Syntéza benzo[*b*][1,4]diazepinu s využitím zeolitu H-MCM-22.

Výhodou těchto reakcí je, že použitý katalyzátor lze snadno, prostým vypráním v ethyl-acetátu, oddělením na odstředivce a aktivací při teplotě 500 °C po dobu 3-4 hodin, regenerovat. U opakovaně regenerovaných a používaných zeolitů bylo po třech a více cyklech pozorováno malé snížení katalytické aktivity. Nové zeolity poskytovaly produkt ve výtěžku 87 % a po několikanásobném obnovení klesl na 75 %. Tato metoda je pro svou selektivitu, vysokou výtěžnost, jednoduchost zpracování a nízké náklady velmi oblíbená.<sup>22,23</sup>

#### 1.4.3 Syntéza katalyzovaná chloridem zirkoničitým

Analogií výše uvedeného postupu Reddy a ostatní<sup>24</sup> publikovali přípravu substituovaných benzo[*b*][1,4]diazepinů. Autoři pozorovali, že reakci 1,2-diaminobenzenu s ketony lze efektivně katalyzovat chloridem zirkoničitým, jakožto silnou Lewisovou kyselinou, a připravit tak deriváty benzodiazepinu s výtěžky pohybujícími se okolo 90 %.

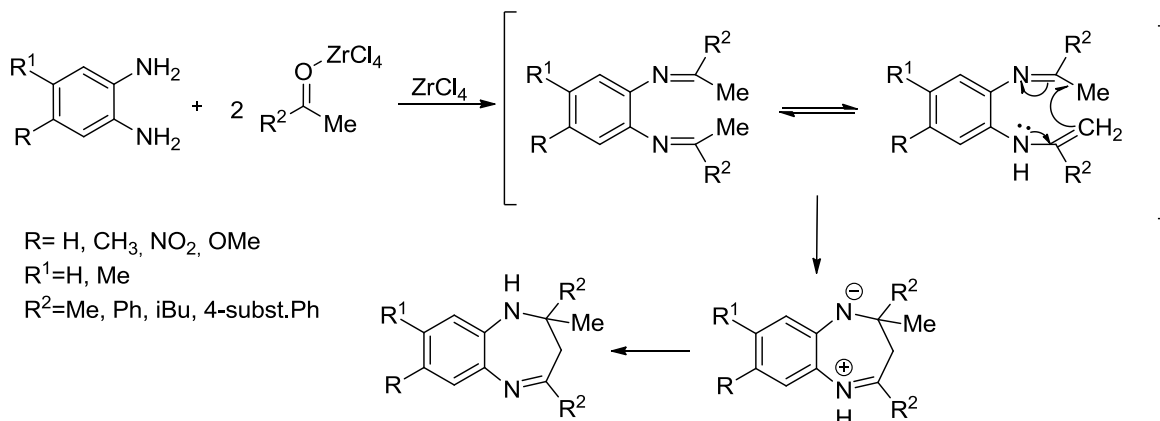


Schéma 4. Syntéza benzo[*b*][1,4]diazepinu za katalýzy chloridu zirkoničitého.

#### 1.4.4 Příprava benzodiazepinu s využitím Ugiho reakce

S využitím vícesložkové reakce, kterou prvně představil Ivar Karl Ugi,<sup>25</sup> bylo připraveno několik benzo[*e*][1,4]diazepin-2,5-dionů. Obecně jsou produktem Ugiho reakce bis-amidy vznikající z ketonu nebo aldehydu, aminu, isokyanidu a karboxylové kyseliny.

Syntéza znázorněná na Schématu 5 zahrnuje dva kroky. V prvním z nich dojde ke vzájemné kondenzaci výchozích látek a v druhém jsou izolované bis-amidy působením kyseliny chlorovodíkové nebo acetylchloridu cyklizovány na výsledné deriváty benzodiazepinu. Za identických podmínek byly benzodiazepiny připraveny bez izolace bis-amidového meziprojektu.<sup>26</sup>

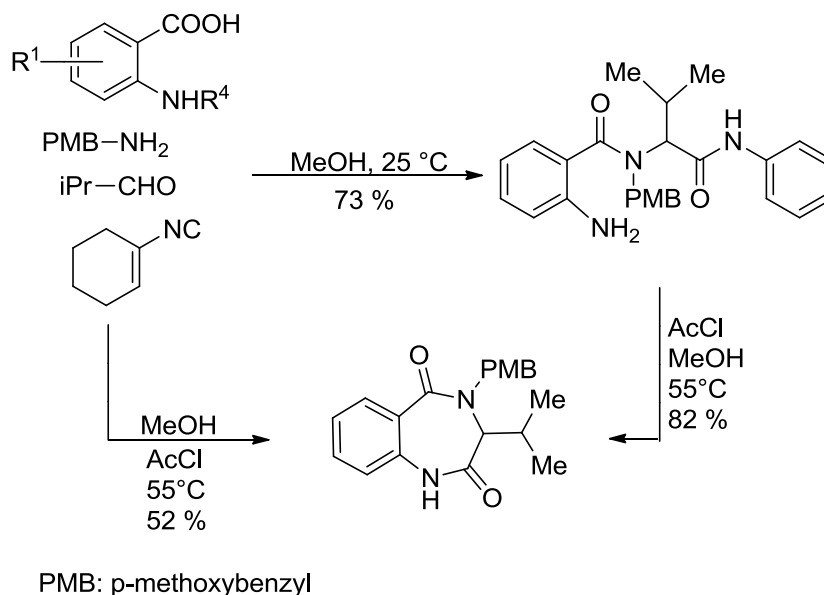


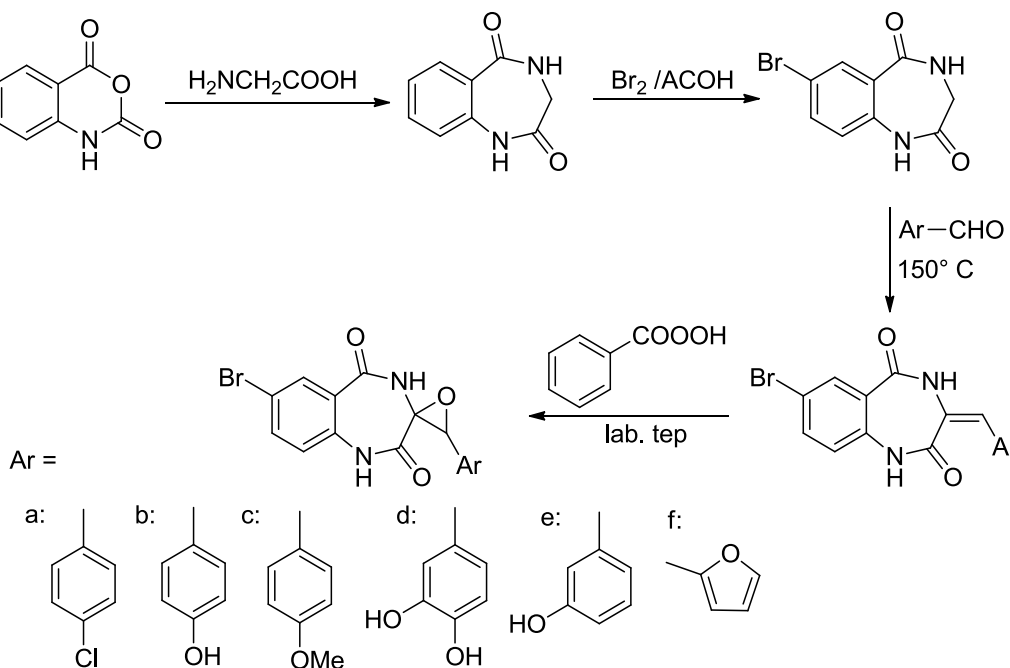
Schéma 5. Syntéza benzodiazepinů přes bis-amidový meziprojekt.



Při charakterizaci látek bylo zjištěno, že benzodiazepiny substituované methylovými skupinami v poloze 3 a 4 mohou zaujímat různé konformace diazepinového kruhu, což dovedlo autory ke zjištění, že základní struktura benzodiazepinů nemusí být tak tuhá, jak se dříve předpokládalo. Tato skutečnost byla pozorována s měnící se teplotou při měření NMR.<sup>26</sup>

#### 1.4.5 Syntéza cyklofenolových analogů

Skupina autorů byla inspirována sloučeninami izolovanými z plísní rodu *Penicillium*, které jsou mimo jiné uvedeny v kapitole "Benzodiazepinové alkaloidy", a v několika stupních připravili strukturální analoga dehydrocyklopeptinu a cyklofenolu. Z anhydridu kyseliny isatoové a glycinu, jakožto výchozích sloučenin, byl získán 3,4-dihydro-1*H*-benzo[*e*][1,4]diazepin-2,5-dion, který byl po bromaci kondenzován při teplotě 150 °C s aromatickými aldehydy v prostředí acetanhydridu. Získané 3-benzyliden-3,4-dihydro-1*H*-benzo[*e*][1,4]diazepin-2,5-diony byly peroxobenzoovou kyselinou v chloroformu při laboratorní teplotě oxidovány za vzniku sloučenin s epoxidovým kruhem.



**Schéma 6.** Syntetická cesta vedoucí k analogům cyklofenolu.

Připravené sloučeniny byly podrobeny testování *in vivo* a *in vitro*. Při *in vitro* testech bylo zjištěno, že vykazují silnou reverzibilní inhibici cholinesterázy na svalových tkáních izolovaných z hrudního svalstva žab, tenkého střeva morčat a mozkové tkáně potkanů se zvýšenou hladinou acetylcholinesterázy. Nejaktivnější se jevíly sloučeniny se substituenty (**Schéma 6**) označenými jako **a**, **b**, **c** a **f**. Letální dávka ( $LD_{50}$ ) byla 200 mg/kg. Sloučenina **b** byla shledána účinnější, díky svalové kontrakci až 92 %, než referenční fyzostigmin, který vykazoval kontrakci pouze 80 %.<sup>27,28</sup>

#### 1.4.6 Syntéza diazepamů

Diazepam je běžně získáván 2-amino-5-chlorbenzofenonu, u kterého je prvotně nutné, aby nedocházelo k násobné alkylaci, *p*-toluensulfonylchloridem částečně ochránit volnou aminovou skupinu. Na získaný tosylát je následně dimethylsulfátem selektivně na atom dusíku zavedena methylová skupina. Po kyselé hydrolýze je 2-methylamino-5-chlorbenzofenon cyklokondenzační reakcí s ethylesterem hydrochloridu glycinu převeden na diazepam.<sup>29</sup>

Jelikož se jedná o velmi užívané léčivo, jsou ovšem známy i další varianty syntézy, které obvykle zahrnují více reakčních kroků. Například reakcí 2-methylamino-5-chlorbenzofenonu s chloridem kyseliny chloroctové se připraví odpovídající *N*-acylderivát, který po reakci s hexamethyltetraaminem a po následné hydrolýze v ethanolickém roztoku kyseliny chlorovodíkové spojené s cyklokondenzační reakcí vytvoří diazepam.<sup>29</sup>

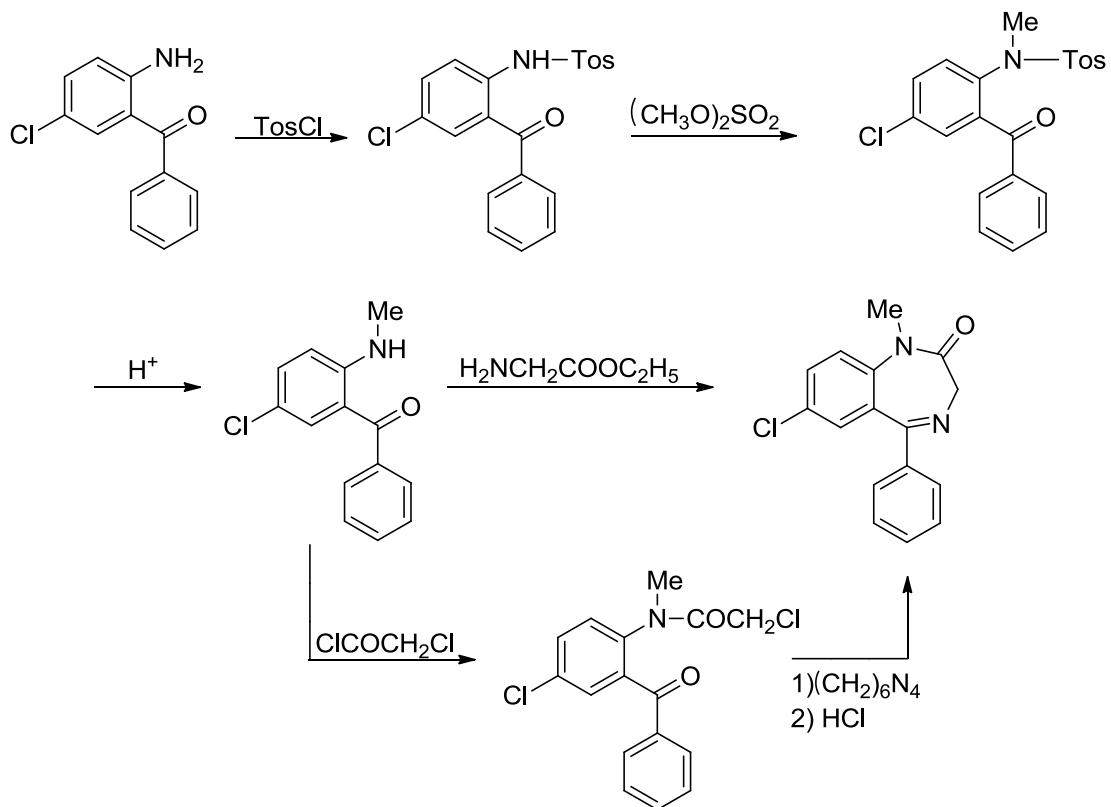
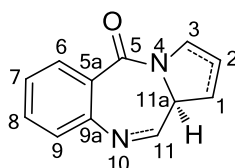


Schéma 7. Dvě metody syntézy diazepam.

## 2 PYRROLOBENZODIAZEPINY

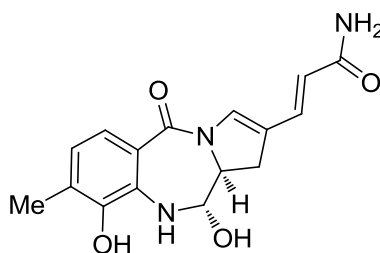
Pyrralobenzodiazepiny jsou tricyklické heterocyklické sloučeniny, které, jak název napovídá, ve své struktuře obsahují šestičlenný benzenový, sedmičlenný diazepinový a pětičlenný pyrrolový kruh. Pyrralobenzodiazepinů, a to jak synteticky připravených, tak i přírodních, je známo velmi mnoho. V podstatě se vzájemně liší polohou substituentů na jednotlivých kruzích a stupněm nasycení diazepinového nebo pyrrolového kruhu. Všechny známé přírodní produkty mají na chirálním atomu uhlíku C-11a absolutní konfiguraci *S*.<sup>32</sup>



Obrázek 10. Struktura známých pyrralobenzodiazepinu.

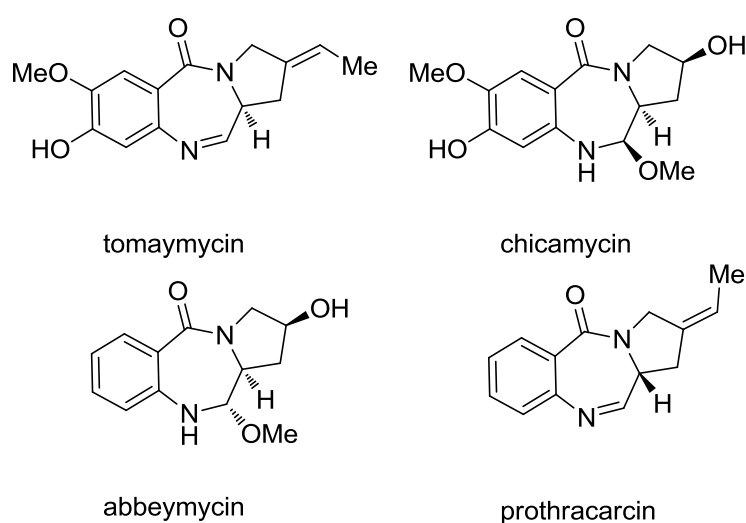
### 2.1 Pyrralobenzodiazepiny izolované z přírody

První sloučenina s pyrralobenzodiazepinovou strukturou, jež byla v roce 1965 Leimgruberem izolována z bakterií *Streptomyces refuineus thermotolerans*,<sup>32</sup> dostala název anthramycin. Později bylo prokázáno, že antibiotikum má bakteriocidní účinky na bakterie *Staphylococcus aureus* (0,1–5 µg/ml) a jiné gram pozitivní bakterie. Současně vykazuje protinádorovou aktivitu, jejíž mechanismus účinku spočívá v inhibici syntézy RNA a DNA karcinomu. Jeho použití bylo z velké části omezeno kvůli vysoké kardiotoxicitě.<sup>30</sup> V následujících letech byl prokázán chemosterilační účinek proti mouše domácí.<sup>31</sup> V medicíně je dnes spíše nahrazován za doxorubicin (nemá společné strukturní znaky s anthramycinem), protože vykazuje výraznější protinádorový účinek a mírnější vedlejší účinky.<sup>32,33,34</sup>



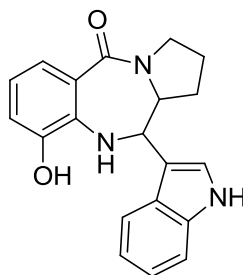
Obrázek 11. Struktura anthramycinu.<sup>35</sup>

Od objevu anthramycinu do dnešní doby byla izolována a charakterizována celá řada dalších, přirozeně se vyskytujících pyrrolobenzodiazepinových sloučenin více či méně složitých struktur. Na **Obrázku 12** je z této velmi početné skupiny uvedeno jen několik zástupců, které jsou nejhojněji citovány v odborných pracích. Tomaymycin, jež je produkován bakteriemi *Streptomyces achromogenes*, má antimikrobiální účinek na *Staphylococcus aureus*. Tomaymycin také působí na určité typy bakteriofágů.<sup>36</sup> Z bakterií rodu *Streptomyces* byly izolovány chicamycin a abbeymycin. Chicamycin má výrazné inhibiční účinky na *Micrococcus luteus* a *Streptococcus pyogenes*, zatímco abbeymycin je bakteriocidní vůči *Bacteroides fragilis*. Prothracarcin produkován *Streptomyces umbrinus raffinophilus* vykazuje antibakteriální účinky na *Escherichia coli* a jiné.<sup>32,33</sup> Obecně je možné o pyrrolobenzodiazepinech izolovaných z přírodních zdrojů říci, že jsou vesměs produkovány různými bakteriemi za účelem inhibice bakterií jiných.



**Obrázek 12.** Vybrané pyrrolobenzodiazepiny izolované z bakterií.

Lidská střevní mikroflóra je biocenóza mikroorganismů žijící v trávicí soustavě člověka, který jich má přibližně  $10^{13}$ – $10^{14}$ . Vyváženost společenstva je důležitá z hlediska zažívání, imunity a ochrany před patogeny. Je-li rovnováha narušena, může se to projevit průjem, zácpou, bolestí a přecitlivělostí na některé potraviny. Výzkumníci,<sup>37</sup> kteří studovali vliv produkce cytotoxinů bakteriemi na lidskou mikroflóru, zjistili, že gramnegativní bakterie *Klebsiella oxytoca* vyskytující se ve střevním traktu produkuje cytotoxin tilivallin, který je uveden na **Obrázku 13**.



**Obrázek 13.** Struktura cytotoxinu tilivallinu.

Tilivallin se řadí do skupiny protinádorových antibiotik jako anthramycin a kupříkladu je cytotoxinem pro tumorové buňky leukémie u myší avšak mechanismus účinku není stále zcela objasněn. Nežádoucím účinkem je, že pokud je jedinec léčen medikamentem na bázi *Penicillia*, nastává přímé poškození střevního epitelu pyrrolobenzodiazepinovým cytotoxinem a dochází k narušení ochranné funkce epitelu. To může mít za následek krvavé průjmy, tupé bolesti břicha a horečky.<sup>37</sup>

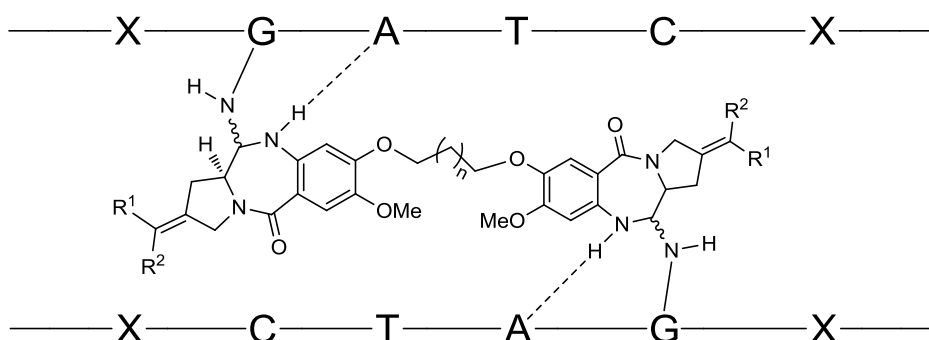
## 2.2 Pyrrolobenzodiazepiny připravené syntetickou cestou

Pyrrolobenzodiazepinové medikamenty hrají významnou roli při léčbě rakoviny. V uplynulých dvou desetiletí bylo vynaloženo velké úsilí směřované ke studiu syntézy a biologické aktivity pyrrolobenzodiazepinů. Tento výzkum se ubírá dvěma směry, z nichž jeden je nacházení nových pyrrolobenzodiazepinů a druhý je modifikace již objevených za účelem odstranění nebo snížení jejich negativních vlastností.

V současnosti je většina protinádorových léčiv schopna hydrofobními a elektrostatickými interakcemi nebo prostřednictvím vodíkových vazeb interagovat s částí nádorové DNA. V rámci vývoje byly připraveny polycyklické pyrrolobenzodiazepiny, které mají schopnost narušení funkce nádorové buněčné DNA, což může vést k mutagenезi, karcinogenезi buněk nebo přímo k apoptóze.<sup>38</sup>

Dalšími sloučeninami, které vykazují baktericidní aktivitu, jsou pyrrolobenzodiazepinové dimery propojené prostřednictvím propyldioxylové nebo pentyldioxylové spojky. Tyto sloučeniny jsou aktivní vůči celé řadě gram pozitivních bakterií díky schopnosti vytvoření příčných kovalentních vazeb mezi dvěma

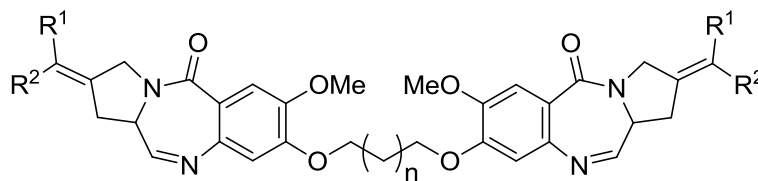
komplementárními řetězci DNA v určité sekvenci. Největší preference je ke třem bázím A-G-A. Další preference se již liší.<sup>38</sup> Jak je uvedeno na **Obrázku 14**, mezi aminoskupinou guaninu a atomem uhlíku C-11 pyrrolobenzodiazepinu vzniká kovalentní vazba a ke stabilizaci silně napomáhají vodíkové můstky. Tento stav způsobí nepatrnou strukturní změnu DNA, která je pro enzymy excizní opravy špatně detekovatelná, což vede ke vzniku mutované DNA a následně k nádorovému bujení.



**Obrázek 14.** Zabudování dimerů do komplementárních řetězců DNA.

(A – adenin; G – guanin; C – cytosin; T – thymin)

Dříve zkoumané deriváty s označením SJG-136, DRG-16 a ELB-21 (**Obrázek 15**), které mají pyrrolobenzodiazepinové jednotky spojené jednoduchým uhlovodíkovým řetězcem (3–5 uhlíků), vykazovaly výbornou baktericidní aktivitu proti grampozitivním patogenům, jako jsou *Staphylococcus aureus*, které jsou odolné vůči antibiotiku methicilinu, nebo *Enterococcus sp.*, jež jsou odolné vůči antibiotiku vankomycinu. Sloučenina ELB-21 se jevila jako nejvíce účinný testovaný zástupce. Výsledky klinických testů ukázaly, že ELB-21 je, ve srovnání s jinými doposud podávanými léčivy, u lidí lépe tolerován. Jelikož ELB-21 doposud neprošel veškerými testy a tudíž ho není možné běžně užívat, může být pouze potenciálně využitelný jako "lék posledního použití" při životu nebezpečných infekcích způsobených výše zmiňovanými methicillin rezistentními *Staphylococcus aureus* a vankomycin rezistentními *Enterococcus sp.*<sup>39</sup>



**SJG-136:**  $n=1$ ,  $R^1=R^2=H$

**DRG-16:**  $n=3$ ,  $R^1=R^2=H$

**ELB-21:**  $n=3$ ,  $R^1=Me$ ,  $R^2=H$

**Obrázek 15.** Struktury derivátů SJG-136, DRG-16 a ELB-21.

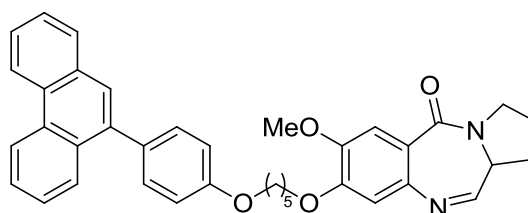
Byly taktéž provedeny syntézy analogů, které mají část molekuly spojující dvě pyrrolobenzodiazepinové jednotky delší než má ELB-21. Účinek jednotlivých typů závisí na délce spojujících řetězců a poloze obou guaninových bází, na které se analog váže. Ve zmiňované studii bylo prokázáno, že s prodlužujícím řetězcem dochází ke špatnému vázání pyrrolobenzodiazepinového derivátu do dvoušroubovice DNA.<sup>39</sup>

Skupina autorů Kamal a kolektiv<sup>39</sup> připravili nové sloučeniny pyrrolobenzodiazepinu obsahující fenantrylfenoxylovou jednotku za účelem srovnání antikarcinogenních účinků s výše uvedenými deriváty. Výzkum byl směřován na antiproliferativní účinek proti buňkám rakoviny prsu. Výsledky naznačují, že synteticky připravené sloučeniny fenantryfenoxy-pyrrolobenzodiazepinů (PP-PBD) jsou skutečně vhodnými kandidáty pro klinické testování. PP-PBD způsobují zastavení růstové fáze v buněčném cyklu, kdy probíhá sestavování nových organel, a apoptózu mitochondrií, ve kterých probíhá buněčné dýchání. Progrese růstové fáze je řízena cyklinem D1, což je protein, který je v průběhu fáze rychle syntetizován a hromaděn v jádře, kde následně degraduje a vstupuje do S fáze, kde dochází k replikaci DNA. Právě na tento protein má vliv PP-PBD. Tyto sloučeniny byly hodnoceny z hlediska cytotoxicity na 60-ti nádorových buňkách, kupříkladu buňkách leukémie, karcinomu plic, CNS, kůže, vaječníku, ledvin, prostaty a prsu, a dalších.

Jedna ze sloučenin této struktury, uvedená na **Obrázku 16**, byla hodnocena v rámci MTT a SRB testu. MTT test spočívá v kolorimetrickém hodnocení buněčné metabolické aktivity. SRB test spočívá v měření cytotoxicity a buněčné proliferace indukované testovanou látkou. Principem je schopnost proteinu obarvit se sulforhodaminem B a měnit pH v závislosti na obsahu aminokyselinových zbytků kyselin fixované trichloroctovou



kyselinou. Citlivost tohoto nedestruktivního testu je srovnatelná s jinými fluorescenčními testy a je lepší než Lowry a Bradford test, jež stanovuje koncentraci proteinu v roztoku, což je závislé na složení aminokyselin proteinu.<sup>40</sup> Výsledky obou testů ukázaly, že jedna ze sloučenin, jejíž struktura je uvedena na **Obrázku 16**, je výborný antiproliferační činitel na 57 lidských nádorových buněčných liniích a byla vyhodnocena jako aplikovatelná sloučenina proti karcinomu prsu na další klinické šetření.

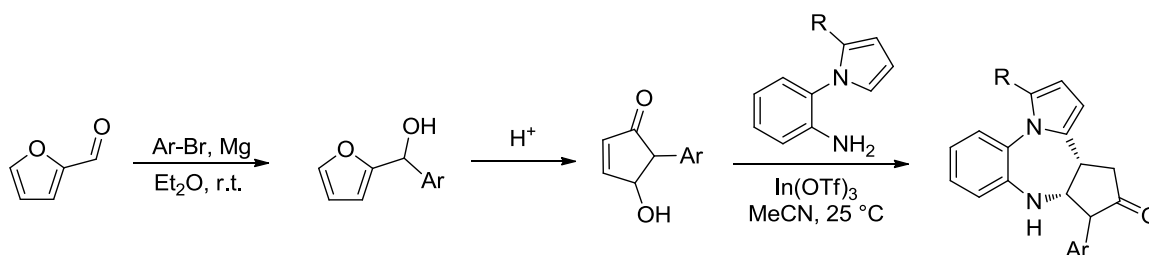


**Obrázek 16.** Analog pyrrolobenzodiazepinových dimerů.

## 2.3 Syntéza pyrrolobenzodiazepinů

### 2.3.1 Friedelova-Craftsova alkylace cyklopentenonu s pyrrolylanilinem

Jedna z možných metod přípravy pyrrolobenzodiazepinových sloučenin vychází z komerčně dostupného furfuralu, který reakcí s Grignardovým činidlem, arylmagnesiumbromidem, poskytuje aryl(furan-2-yl)methanol. Ten byl indickými autory v roce 2016 publikován jako výchozí sloučenina, ze které kyselé katalyzovaným Piancatelliho přesmykem získali aromatický derivát 4-hydroxycyklopent-2-enonu.<sup>41</sup>



**Schéma 7.** Příprava vycházející z furfuralu.

Následně provedli Friedelovu-Craftsovu alkylaci cyklopentenonu s bifunkčním substrátem, 2-(1*H*-pyrrol-1-yl)anilinem, za katalýzy trifluormethansulfonanem inditým v acetonitrilu při laboratorní teplotě, čímž došlo k uzavření 1,4-diazepinového kruhu. Objev této metody je pro studium pyrrolbenzodiazepinů z důvodu vysoké konverze látek, mírných reakčních podmínek, krátkých reakčních časů a vysoké selektivity přínosný.<sup>41</sup>

### 2.3.2 Reakce nitrobenzoové kyseliny s prolinolem následovaná reduktivní cyklizací

V odborném článku časopisu *Tetrahedron* v roce 1998 je uveden postup (Schéma 8),<sup>42</sup> ve kterém z 5-methoxy-2-nitrobenzoové kyseliny a pyrrolidin-2-ylmethanolu v dichlormethanu za přítomnosti *N*-methylmorpholinu (NMM), dicyklohexylkarbodiimid (DCC) a *N*-hydroxybenzotriazolu (BTOH) při 25 °C byl během 12 hodin připraven amid s téměř kvantitativním výtěžkem (94 %). Ten byl následně vystaven Dessově-Martinově oxidaci, čímž byla během půl hodiny hydroxymethylová skupina přeměněna na skupinu aldehydovou. Izolovaný meziprodukt byl podroben redukcí vodíkem za katalytického účinku Pd/C, kterou doprovázela spontánní kondenzace vznikající aminoskupiny s aldehydovou skupinou za tvorby pyrrolbenzodiazepinového uskupení.

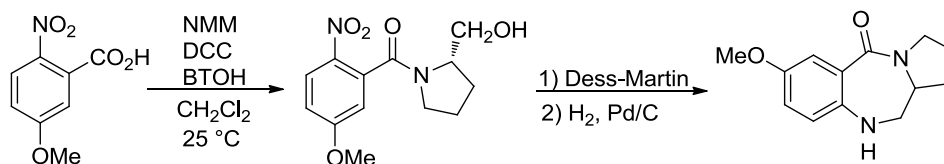
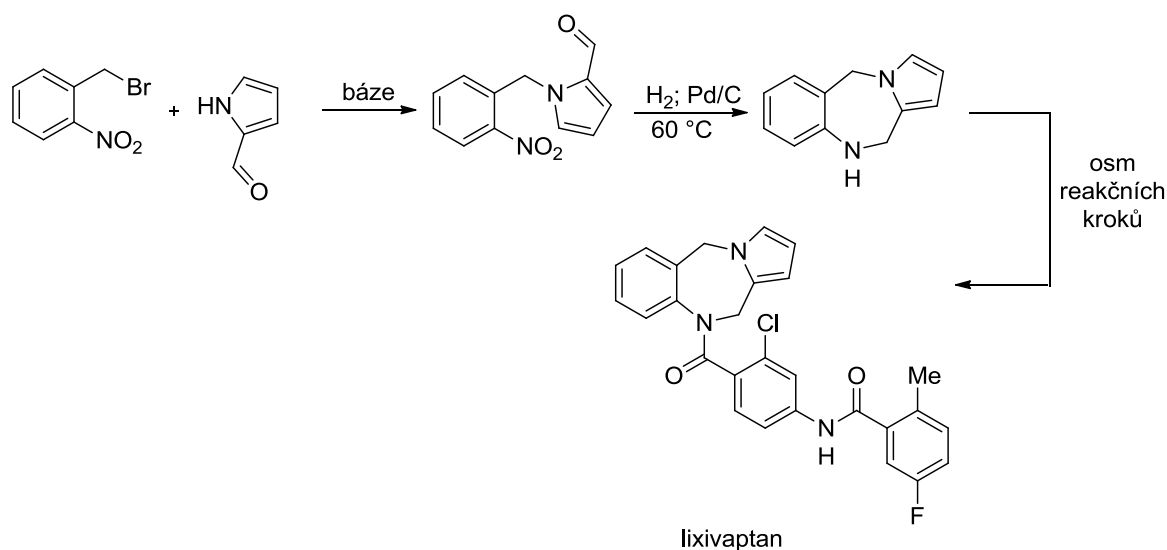


Schéma 8. Příprava vycházející z 2-nitrobenzoové kyseliny.

### 2.3.2 Reduktivní cyklizace 1-(2-nitrobenzyl)-1*H*-pyrrol-2-karbaldehydu

Činští autoři se zabývali přípravou lixivaptanu, což je chemoterapeutikum zaměřené na léčbu a prevenci kardiovaskulárních onemocnění. Od roku 2010 je toto syntetické léčivo podrobováno klinickým studiím. Pro přípravu pyrrolbenzodiazepinového skeletu ve struktuře lixivaptanu aplikovali analogickou strategii jako v předchozím případě. V prvním stupni nechali reagovat 1-(brommethyl)-2-nitrobenzen s 1*H*-pyrrol-2-karbaldehydem za přítomnosti báze (Schéma 9). Pokoušeli se taktéž nalézt vhodnou bázi, která bude poskytovat produkt s vysokým výtěžkem a bude selektivní. Z použitých bází, kterými byly NaH, KOH, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NaOH,

TEA, byla vyhodnocena potaš jako nejlepší. Izolovaný nitro aldehyd byl redukován při zvýšené teplotě a tlaku 0,1–0,2 MPa. Vznikající redukovaný meziprodukt samovolně cyklizoval.<sup>43</sup>

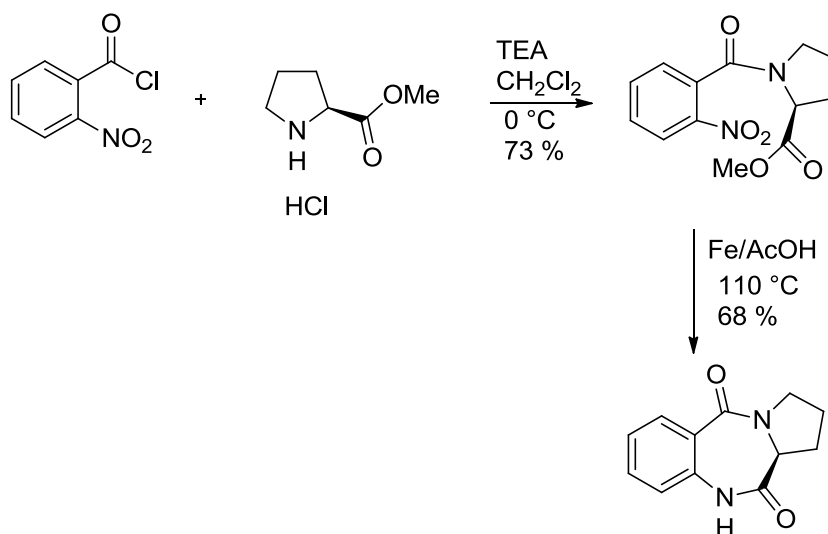


**Schéma 9.** Příprava vycházející z 1-(brommethyl)-2-nitrobenzenu.

Z izolovaného pyrolobenzodiazepinu dalšími 8 reakčními stupni připravili lixivaptan. Autoři prezentují, že touto metodou lze snadno a efektivně získat žádaný derivát.<sup>43</sup>

### 2.3.3 Reakce *o*-nitrobenzoylchloridu s esterem prolinu následovaná reductivní cyklizací

Posledním jednoduchým postupem je reakce *o*-nitrobenzoylchloridu s hydrochloridem L-methyl-prolinátu při 0 °C v dichlormethanu za bazického působení triethylaminu (TEA), která poskytuje nitroesterový meziprodukt s výtěžkem 73 %. Ten se následně varem v heterogenním prostředí železa v kyselině octové současně redukuje (nitroskupina), hydrolyzuje (esterová skupina) a cyklizuje.<sup>44</sup>



**Schéma 10.** Syntéza opticky čistého pyrrolobenzodiazepinu.

Jelikož je tato využívá snadno dostupné, levné chemikálie a nezahrnuje mnoho složitých kroků, může být užitečná pro syntézu chirálních tricyklických benzodiazepinových léčiv.

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

### 3 DISKUSE A VÝSLEDKY

#### 3.1 Shrnutí výsledků předešlých kolegů

Původním záměrem mé předchůdkyně Ing. Marianny Molnárové bylo, na sekundární aminovou skupinu připravených 3-(prop-2-yn-1-ylamino)chinolin-2,4(1*H*,3*H*)-dionů zavést druhý propargylový řetězec. Pro plánovanou elektrofilní substituci byl zvolen propargylbromid jako alkylační činidlo v prostředí dimethylformamidu (DMF). V prvotních pokusech, kdy byl heterocyklický atom dusíku obsazen arylovým nebo alkylovým substituentem, v nadbytku potaše k žádné reakci nedocházelo. V případě, že tato poloha obsazena nebyla, nastala pouze alkylace na atom dusíku v poloze 1. Tato zarážející rezistence sekundárního aminu vedla k použití silnějších bází, tetramethylguanidinu (TMG) a hydridu sodného. Obě zvolené báze u jednoho derivátu způsobily absolutní přeměnu substrátu, ovšem dle chromatografie na tenké vrstvě (TLC) vznikaly dva rozdílné produkty. Výsledek z hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením (HRMS) ukázal, že oba izolované produkty mají stejnou molekulovou hmotnost jako výchozí 3-(propargylamino)derivát, z čehož bylo usouzeno, že se jedná o tři isomerní látky. Tento předpoklad potvrdil i výsledek plynové chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS), z něhož bylo patrné, že oba izolované produkty a výchozí 3-(propargylamino)derivát mají stejný molekulový peak s hodnotou 366 *m/z*, ovšem mají jinou fragmentační dráhu.

Po objasnění struktury pomocí NMR bylo zjištěno, že propargylbromid se reakce neúčastní, a že účinkem TMG nastává expanze šestičlenného kruhu na sedmičlenný za vzniku benzo[*e*][1,4]diazepin-2,5-dionu. Vlivem NaH nastala nejen zmíněná expanze, ale současně došlo i k nukleofinímu ataku zřejmě acetylidového iontu na atom uhlíku v poloze 3 vzniklého benzodiazepinu za tvorby benzo[*e*]pyrrolo[1,2-*a*][1,4]diazepin-5,11-dionu (**Schéma 11**).

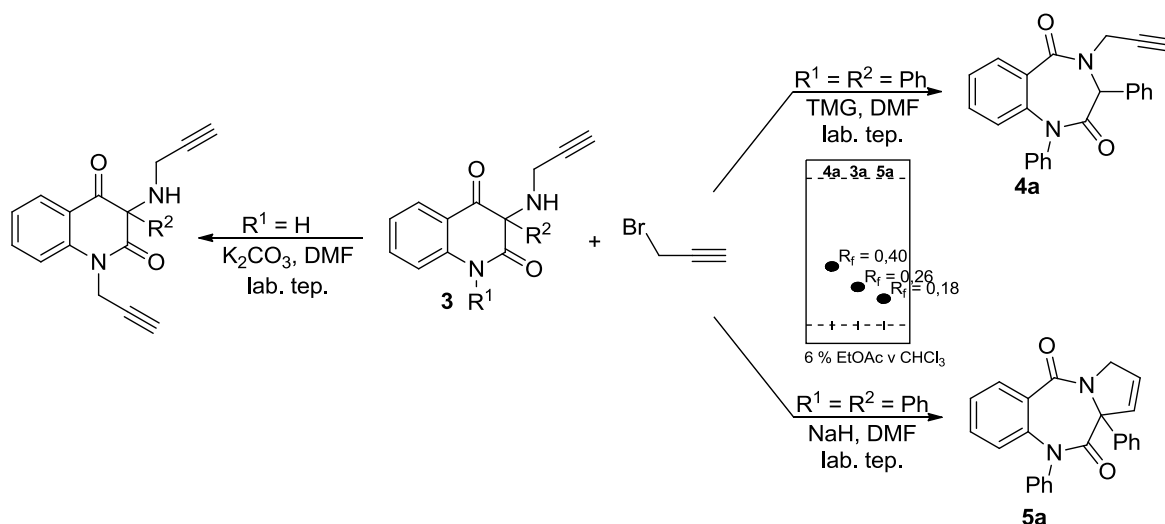


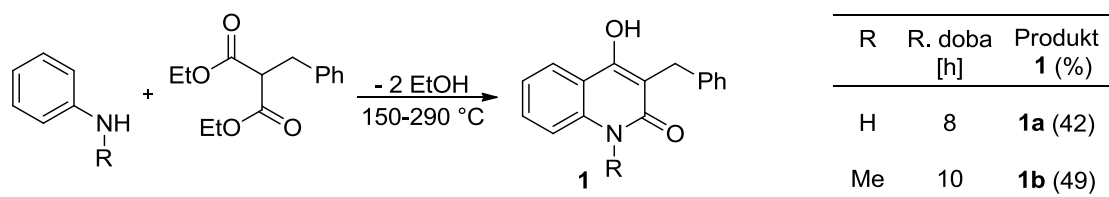
Schéma 11. Shrnutí dříve dosažených výsledků.

Po prostudování literatury bylo zjištěno, že deriváty benzodiazepinu a pyrrolobenzodiazepinu mají zajímavou biologickou aktivitu, pro kterou je řada vědců připravuje, ovšem ve většině případů značným počtem reakčních kroků. Tyto poznatky nás přiměly ke studiu jejich přípravy poněkud snazší syntetickou cestou.

### 3.2 Diskuse k řešení zadané problematiky

Jak plyne z výše uvedeného, má práce bezprostředně navazuje na diplomovou práci bývalé spolupracovnice, a proto byla řada výchozích sloučenin, 3-(propargylamino)chinolin-2,4(1*H*,3*H*)-dionů, použita ze zbylých, dříve připravených zásob. Z toho důvodu je drtivá většina látek, a to jak v diskusní části, tak i v popisech syntetických metod a strukturních charakteristik připravených sloučenin, presentovaná od druhé poloviny víceetapové syntézy, tj. od přípravy benzo[*e*][1,4]diazepin-2,5-dionů.

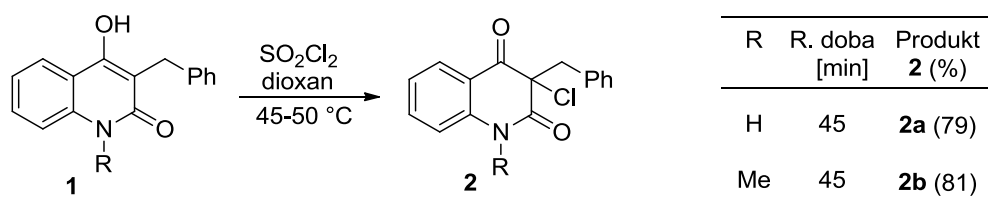
Z důvodu neočekávaných problémů při uzavírání pyrrolového kruhu, jak je diskutováno níže, bylo přistoupeno k přípravě dvou 3-benzyl-3-(propargylamino)chinolin-2,4(1*H*,3*H*)-dionů. Postup k nim směřující zaujímal stejnou strategii jako u ostatních analogů nesoucích v poloze 3 chinolindionového uskupení fenylový nebo metylový substituent. To znamená, že byla v první fázi provedena tepelně iniciovaná kondenzace anilinu popř. fenyl(methyl)aminu s diethyl-benzylmalonátem (Schéma 12).



**Schéma 12.** Příprava 4-hydroxychinolin-2(1*H*)-onů **1**.

Po osmihodinovém resp. desetihodinovém ohřevu reakční směsi, což je pro tento typ reakcí běžný časový interval, bylo izolováno pouze 42 % resp. 49 % žádaného produktu. Pro ty, jež se pohybují v chemii chinolonů, není tato nízká výtěžnost, obzvláště je-li ester malonové kyseliny substituován methylovou nebo benzylovou skupinou, zarážející, neboť konkurenčním produktem je substituovaný *N,N*-difenylmalonamid, který byl z reakční směsi částečně izolován.

Pro přípravu alkynylaminů bylo nutné do molekuly překrytalizovaných 4-hydroxychinolin-2(1*H*)-onů **1** zavést do polohy 3 atom halogenu. Jelikož bromace, často prováděná bromem v kyselině octové při běžné teplotě, není se substráty tohoto typu selektivní a mnohdy vzniká obtížně dělitelná směs žádaných 3-bromchinolindionů s 3,6-dibromderiváty,<sup>45</sup> byla zvolena chlorace sulfurylchloridem v dioxanu při mírně zvýšené teplotě (**Schéma 13**).



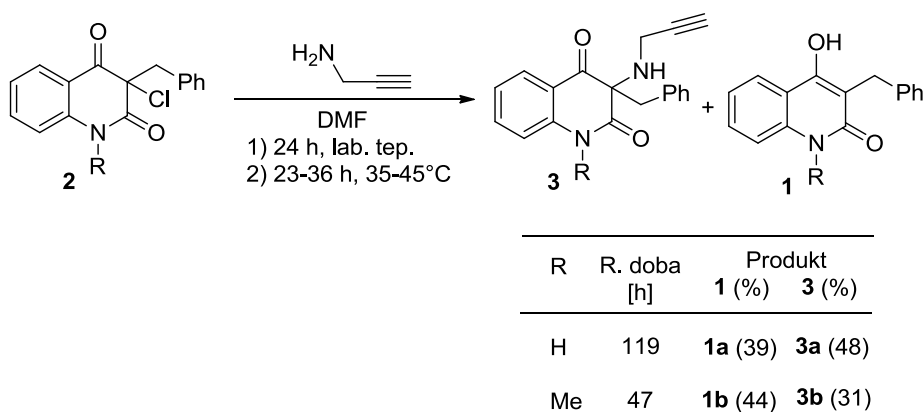
**Schéma 13.** Chlorace 4-hydroxychinolin-2(1*H*)-onů **1**.

Tato reakce, jež byla provedena podle již dlouho známého postupu,<sup>46</sup> poskytla během 45 min snadným zpracováním reakční směsi 3-chlorchinolin-2,4(1*H*,3*H*)-dionu **2** v dobré kvalitě a s vysokými výtěžky.



V odborné literatuře se vyskytuje velmi mnoho metod pro přípravu sekundárních aminoderivátů. V podstatě se nechá reagovat jakkoliv rozmanitá halogenovaná, nearomatická sloučenina s primárním aminem, často za přítomnosti anorganické či organické báze.

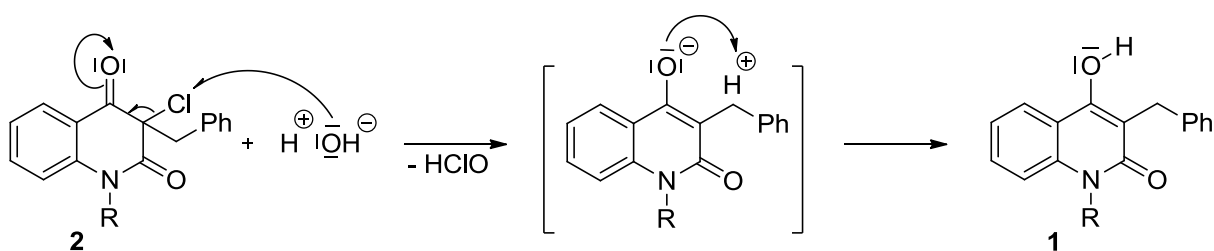
Jelikož je propargylamin poměrně drahý, bylo v dřívější době vyzkoušeno několik reakcí 3-chlorchinolin-2,4(1*H*,3*H*)-dionů s 1,5 ekvivalenty propargylaminu a potaše v DMF. Tyto experimenty sice vedly k žádanému produktu, ovšem jeho izolace z komplikované reakční směsi byla možná pouze opakovanou chromatografií na sloupci silikagelu. Proto byla taktéž mou koleginí prověřena analogie postupu publikovaného v roce 2002 prof. Kláskem a dalšími spoluautory,<sup>46</sup> která se pro řadu sloučenin ukázala vhodná, a proto byly výchozí sloučeniny **2** vystaveny stejným podmínkám. To znamená, že aminolýza halogenderivátů **2** byla, jak je patrné ze **Schématu 14**, provedena v DMF s 50% nadbytkem propargylaminu při laboratorní teplotě.



**Schéma 14.** Aminolýza 3-chlorchinolin-2,4(1*H*,3*H*)-dionů **2**. dopočítat výtěžky

3-Benzyl-3-chlorchinolin-2,4(1*H*,3*H*)-diony, znázorněné ve **Schématu 14**, poskytly značné množství redukováných 4-hydroxychinolin-2(1*H*)-onů **1**. Je zajímavé, že u šesti analogických derivátů uvedených v diplomové práci Ing. Marianny Molnárové, které byly vystavené identickým reakčním podmínkám a postupu zpracování, tyto nežádoucí, konkurenční reakce pozorovány nebyly, ale jak plyne z literatury, není tato skutečnost pozorována poprvé.<sup>46</sup>

Pro tuto skutečnost mne napadá jediné možné, ovšem nepodložené, vysvětlení. Jelikož je atom chloru mezi dvěma karbonyly, které obecně silně odčerpávají elektrony z jejich blízkého okolí, může mít parciální kladný náboj. V této polarizované molekule je pravděpodobně nukleofilním atakem vody pocházející z nesusušeného DMF hydrolyzována vazba C–Cl, čímž vzniká kyselina chlorná a intermediát naznačený ve **Schématu 15**, který následně po přesunu elektronů ve směru šipek a přijmutí protonu poskytne 4-hydroxychinolin-2(1*H*)-on **1**.



**Schéma 15.** Navržený mechanismus hydrolyzy 3-chlorchinolin-2,4(1*H*,3*H*)-dionu **2**.

Primárním úkolem a cílem diplomové práce bylo připravit několik derivátů 4-(propargyl)-3,4-dihydro-1*H*-benzo[*e*][1,4]diazepin-2,5-dionu a dostupnými analytickými metodami strukturu izolovaných sloučenin jednoznačně potvrdit či vyvrátit.

Za tímto účelem bylo vybráno osm výchozích látek **3** lišících se substitucí v polohách 1 a 3 chinolindionového uskupení, z nichž dvě (**3g**, **3h**) jsem ze základních surovin připravila osobně a zbylých šest (**3a–3f**), jak bylo avizováno výše, jsem použila z laboratorních zásob. Atom dusíku v poloze 1 byl buď nesubstituovaný (**3c**, **3f**, **3g**) anebo nesl methylovou (**3b**, **3e**, **3h**) případně fenylovou (**3a**, **3d**) skupinu. V blízkosti reakčního místa, tj. k atomu uhlíku v poloze 3 chinolindionového derivátu byly vybrány fenylový substituent (**3a–3c**), jako zástupce elektronakceptové arylové skupiny, methylový substituent (**3d–3f**), jako představitel malé elektrondonorové alkylové skupiny a benzylový substituent (**3g**, **3h**), jenž je svou strukturou na rozmezí prvně zmíněných, a který se často v různých typech reakcí organických sloučenin chová anomálně.

V počátečním pokusu směřovaném k tvorbě benzodiazepinů byly aplikovány analogické reakční podmínky, díky nimž bylo prvně pozorováno začlenění atomu dusíku

aminové skupiny do šestičlenného heterocyklického kruhu chinolindionů **3**, který následně expandoval na sedmičlenný diazepinový kruh. V původním přístupu, jež byl uveden v diplomové práci Ing. Marianny Molnárové, bylo zjištěno, že reakce aminů **3** s trojnásobným nadbytkem TMG při laboratorní teplotě v DMF neprobíhá a pro úplnou konverzi výchozí látky na derivát benzodiazepinu s výtěžkem 87 % bylo nutné zahřívát reakční roztok na 70 °C po dobu 57 h.

Abychom přešli dlouhé reakční době, bylo rozhodnuto, že se zvýší teplota ohřevu na 90 °C. I když byl snížen přebytek TMG na dva ekvivalenty vůči výchozí látce **3a**, byla reakce po 17 h u konce. Chromatografie na tenké vrstvě ukázala, že vznikla směs, jejíž hlavní složky byly benzodiazepin **4a** a pyrrolbenzodiazepin **5a**. Separací surové směsi opakovanou sloupcovou chromatografií bylo překvapivě izolováno pouze 6 % látky **4a** a 45 % látky **5a** (Schéma 16).

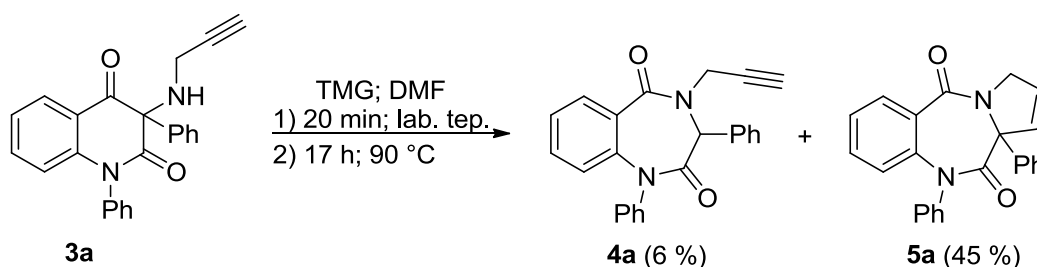
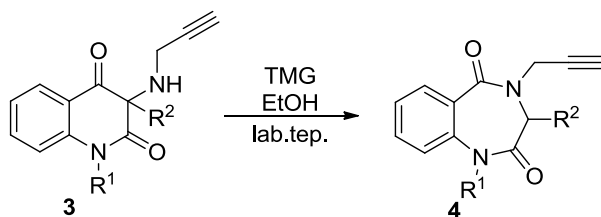


Schéma 16. Expanze chinolindionu **3a** následovaná cyklizací.

Po tomto "nezdaru" bylo, v návaznosti na připravovanou publikaci,<sup>47</sup> uvažováno o záměně rozpouštědla. V tomto kontextu byl proveden experiment se shodnou výchozí látkou, sloučeninou **3a**, na kterou bylo působeno dvoumolárním přebytkem TMG při laboratorní teplotě v prostředí ethanolu. Po 34 hodinovém míchání byla původní sloučenina **3a** absolutně spotřebována a krátkým roztíráním získaného žlutého roztoku obsahující pouze jeden produkt o stěnu baňky se spustila spontánní krystalizace. Oddělením vyloučených krystalů a následnou krystalizací zahuštěného matečného louhu byl získán žádaný produkt s výbornou kvalitou a vysokým výtěžkem 85 % (Schéma 17, v tabulce řádek 1).



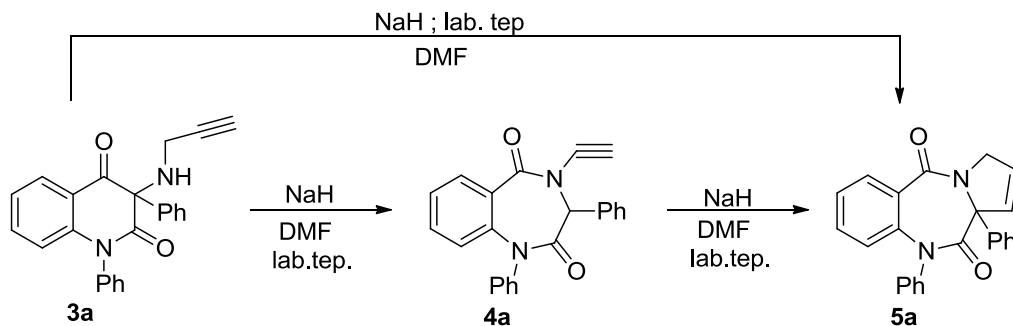
Vých. l. <b>3</b>	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R. doba <sup>a</sup> [h]	Produkt <b>4</b> (%)
<b>3a</b>	Ph	Ph	34	85
<b>3b</b>	Me	Ph	28	84
<b>3c</b>	H	Ph	26	90
<b>3d</b>	Ph	Me	21	80
<b>3e</b>	Me	Me	19	98
<b>3f</b>	H	Me	48	89
<b>3g</b>	H	Bn	117	63

<sup>a</sup> nebyla optimalizována

**Schéma 17.** Konverze chinolindionů **3** na benzodiazepindiony **4**.

Protože prostředí ethanolu i za běžné teploty vedlo snadnou izolací k touženému produktu **3a** s vysokým výtěžkem, byly i ostatní 3-(propargyl)chinolin-2,4(1*H*,3*H*)-diony **3b–3g** identickou metodou převedeny na 4-(propargylamino)-3,4-dihydro-1*H*-benzo[*e*][1,4]diazepin-2,5-diony **4b–4g**. Jak je možné vyčíst z tabulky, která je součástí **Schématu 17**, přípravy sloučenin **4a–4f** nečinily žádné výrazné potíže a byly získány s vysokou výtěžností. Jistý problém se vyskytl až u benzylového derivátu **3g**, který s jistou neochotou, což je jistě patrné z reakční doby, sice žádaný produkt poskytl, ale s výsledkem výrazně horším. Aby bylo dosaženo úplné konverze bylo nutné v průběhu reakce (po 22 h) dodat množství TMG, které se vyšplhalo na 3,3 ekvivalentů vůči původní sloučenině **3g**. Pokusy o expanzi heterocyklického kruhu derivátu **3h**, z důvodu nedostatku času, podniknuty nebyly.

První vznik pyrrolobenzodiazepinu **5a**, byl pozorovaný mou předchůdkyní v tandemové reakci 3-(propargyl)chinolindionu **3a** zahrnující expanzi kruhu a následnou spontánní cyklizaci propargylové skupiny, která byla zahájena vlivem třímolárního nadbytku hydridu sodného v DMF při laboratorní teplotě. Taktéž ověřila skutečnost, že z 4-(propargylamino)benzodiazepindionu **4a** je možné třemi ekvivalenty NaH získat sloučeninu **5a**, z čehož usoudila, že ve výše uvedené one-pot syntéze (ze sloučeniny **3a** na **5a**) je benzodiazepin **4a** meziproduktem (**Schéma 18**).



**Schéma 18.** Dříve pozorované přeměny sloučenin **3a** a **4a**.

Protože na obě zmiňované přeměny výchozích látek **3a** i **4a** bylo dostatečné stejné množství NaH, pokusila jsem se, před samotnými preparativními pokusy, provést orientační průzkum reaktivnosti látek **4**, z něhož mělo vyplynout vhodné rozpouštědlo, nezbytné množství a typ báze, které budou dále použity při syntéze derivátů **5**.

Tento screening, jehož výsledky jsou shrnuty v **Tabulce 1**, byl prováděn ve 2,5 ml vialkách, kde bylo na 0,025 mmol (cca 9 mg) 3-fenylového derivátu benzodiazepinu **4a** rozpuštěného v 0,5 ml rozpouštědla (Be, DMF, MeOH, MeCN, THF) působeno různými množstvími odlišných bází ( $\text{MeO}^-\text{Na}^+$ , NaH,  $\text{Et}_3\text{N}$ , DMAP) po různou dobu. Průběh byl monitorován pomocí TLC a GC-MS.

**Tabulka 1.** Průzkum reaktivity **4a** vůči různým bázím a prostředí.

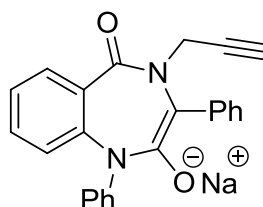
Řádek	Báze (ekv.) <sup>a</sup>	Rozp.	R. doba <sup>b</sup>	Produkt (%)	
				TLC <sup>c</sup>	GC-MS <sup>d</sup>
1	DMAP (20)	MeOH	1 týden	<b>4a</b> (100)	—
2	Et <sub>3</sub> N(20)	MeOH	1 týden	<b>4a</b> (100)	—
3	Et <sub>3</sub> N (3)	DMF	2 týdny	<b>4a</b> (100)	—
4	MeO <sup>⊖</sup> Na <sup>⊕</sup> (30)	MeOH	3 dny	sůl (100)	—
5	MeO <sup>⊖</sup> Na <sup>⊕</sup> (20)	MeOH	3 dny	sůl (100)	—
6	NaH (1)	THF	3 dny	<b>4a</b> (100)	—
7	NaH(1)	MeCN	3 dny	<b>4a</b> (25), <b>P1</b> (25), <b>P2</b> (25), <b>P3</b> (25)	<b>4a</b> (42), <b>P1</b> (13), <b>P2</b> (18), <b>P3</b> (21)
8	NaH (1)	Be	1 týden	<b>4a</b> (100)	—
9	NaH (1)	Be + 100 ekv. DMF	20 h	<b>4a</b> (50), <b>5a</b> (50)	<b>4a</b> (5), <b>5a</b> (84), iso (7)
10	NaH (1)	Be / DMF (1/1;v/v)	2 h	<b>5a</b> (100)	<b>5a</b> (95)

<sup>a</sup> vztaženo k výchozí látce<sup>b</sup> nebyla optimalizována<sup>c</sup> usouzeno dle intenzity skvrn<sup>d</sup> relativní zastoupení dle integrální plochy peaku

P1, P2, P3 - neidentifikovatelné produkty

iso - neidentifikovatelná isomerní sloučenina z vých. I.

Z **Tabulky 1** je patrné, že ani velmi vysoké množství 4-(dimethylamino)pyridinu (DMAP) v methanolu (**Tabulka 1**, řádek 1), ani triethylaminu v methanolu (**Tabulka 1**, řádek 2) nebo v DMF (**Tabulka 1**, řádek 3) není dostačující pro jakoukoli přeměnu substrátu. Stejná dávka methoxidu sodného (MeO<sup>⊖</sup>Na<sup>⊕</sup>) v methanolu (**Tabulka 1**, řádek 4 a 5) během 3 dní převedla výchozí látku výhradně na jeden produkt ulpívající i při použití polárních mobilních fází na TLC na startu. Po okyselení byla dle TLC v reakčním roztoku pouze výchozí sloučenina, z čehož bylo usouzeno, že účinkem MeO<sup>⊖</sup>Na<sup>⊕</sup> vzniká pouze její sodná sůl, jejíž nejvíce pravděpodobná (nepotvrzená) forma je na **Obrázku 17**.

**Obrázek 17.** Předpokládaná struktura vzniklé soli působením MeO<sup>⊖</sup>Na<sup>⊕</sup> na **4a**.

Benzodiazepin **4a** se stejným látkovým množstvím NaH v prostředí tetrahydrofuranu (THF) se během 3 dnů nezměnil (**Tabulka 1**, řádek 6). Pouhou změnou rozpouštědla za acetonitril (**Tabulka 1**, řádek 7) byl dle TLC za stejnou dobu roztok složen ze směsi čtyř látek, **4a** a další tři koprodukty mezi kterými se žádaný **5a** nevyskytoval. Přidání dalšího ekvivalentu NaH během dalších tří dní způsobilo spotřebování výchozího materiálu.

Ekvimolární množství NaH v benzenu (**Tabulka 1**, řádek 8) překvapivě nezpůsobuje u výchozí sloučeniny žádnou změnu. Ovšem, je-li přidáno do roztoku 100 ekvivalentů DMF (vztaženo na **4a**) nastane dle TLC během 20 h poloviční konverze směrem k žádanému produktu **5a** (**Tabulka 1**, řádek 9). Výsledek z GC-MS analýzy ukázal, že reakční roztok je směs tří látek, a to **4a**, **5a** a nějaký neidentifikovaný isomer s relativními zastoupeními 5 %, 83 % a 7 %. Zvýší-li se ve směsi množství DMF, např. je-li objem benzenu s objemem DMF rovnocenný, je reakce během 2 h u konce (**Tabulka 1**, řádek 10).

Z výsledků uvedených v **Tabulce 1** je zřejmé, že pozitivní vliv na konverzi 4-propargylbenzodiazepindionu **4a** na pyrrolbenzodiazepindion **5a** má NaH v prostředí DMF. V této kombinaci bylo dále hledáno nezbytné množství NaH způsobující úplné spotřebování výchozí látky. Výsledky ze zkumavkových pokusů jsou uvedeny v **Tabulce 2**.

**Tabulka 2.** Srovnání účinku různého množství NaH na látku **4a** rozpuštěnou v DMF.

Řádek	Báze (ekv.) <sup>a</sup>	Rozp.	R. doba <sup>b</sup>	Produkt (%)	
				TLC <sup>c</sup>	GC-MS <sup>d</sup>
1	NaH (1)	DMF	1 h	<b>5a</b> (100)	<b>5a</b> (100)
2	NaH(0,5)	DMF	2 h	<b>5a</b> (100)	<b>5a</b> (100)
3	NaH (0,25)	DMF	75 h	<b>4a</b> (50), <b>5a</b> (50)	<b>4a</b> (12), <b>5a</b> (83), iso (5)
4	NaH (0,10)	DMF	75 h	<b>4a</b> (100)	<b>4a</b> (98)

<sup>a</sup> vztaženo k výchozí látce

<sup>b</sup> nebyla optimalizována

<sup>c</sup> usouzenodle intenzity skvrn

<sup>d</sup> relativní zastoupení dle integrální plochy peaku

P1, P2, P3 - neidentifikovatelné produkty

iso - neidentifikovatelná isomerní sloučenina z vých. I.

To, že 1 ekvivalent NaH v DMF za krátký čas isomerizuje **4a** na sloučeninu **5a** (**Tabulka 2**, řádek 1), se dalo z předchozích zjištění očekávat. Nicméně zajímavé bylo, při

hledání nejnižšího, efektivního množství NaH, že polovina ekvivalentního množství NaH je pro absolutní konverzi dostačující a selektivně poskytuje pouze žádaný produkt **5a** (Tabulka 2, řádek 2). Tento fakt naznačuje, že NaH je při diskutované reakci pouze jakýmsi spouštěčem probíhajících dějů. Pokud by tomu tak bylo, není ovšem jasné, proč se s 0,25 ekvivalenty NaH (Tabulka 2, řádek 3) reakce zahájí, ale v určité fázi se zastaví. Na TLC po 75 h jsou v reakční směsi přítomny výchozí látka a produkt přibližně se stejnou intenzitou. Z GC-MS analýzy vyplynulo, že reakční roztok je směs tří látek, a to **4a**, **5a** a nějaký neidentifikovaný isomer s relativními zastoupeními 12 %, 82 % a 5 %. Nižší dávka NaH byla úplně neúčinná (Tabulka 2, řádek 4).

Z celé řady provedených preparativních pokusů se pro transformaci 4-(propargyl)benzodiazepindionu **4** na pyrrolbenzodiazepindion **5** jevil účinek NaH v DMF optimální. Proto byly v těchto podmínkách uskutečněny i experimenty preparativní. Konkrétně bylo na roztoky benzodiazepinů **4a–4c** v DMF při laboratorní teplotě působeno 50 % ekvivalentního množství NaH po dobu uvedenou v tabulce, jež je součástí Schématu 19.

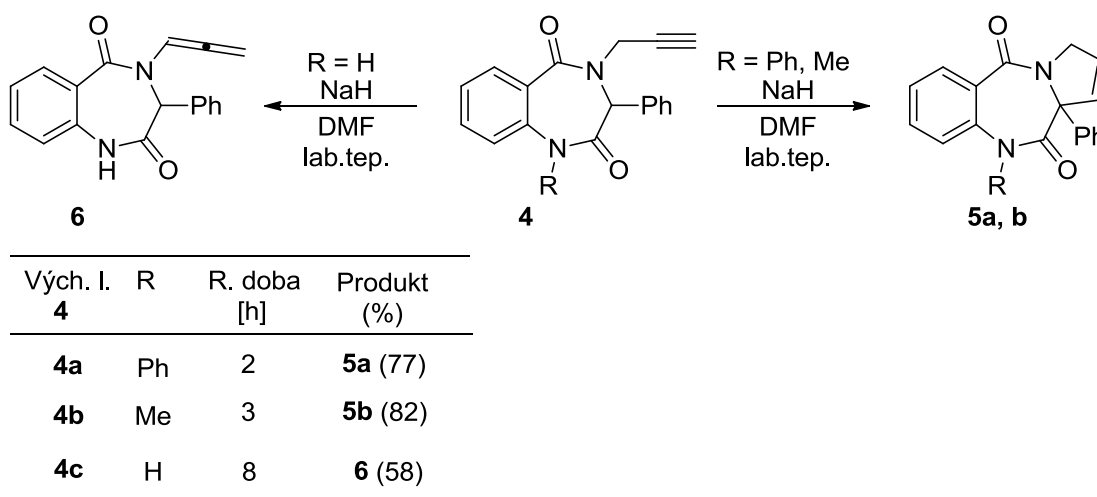


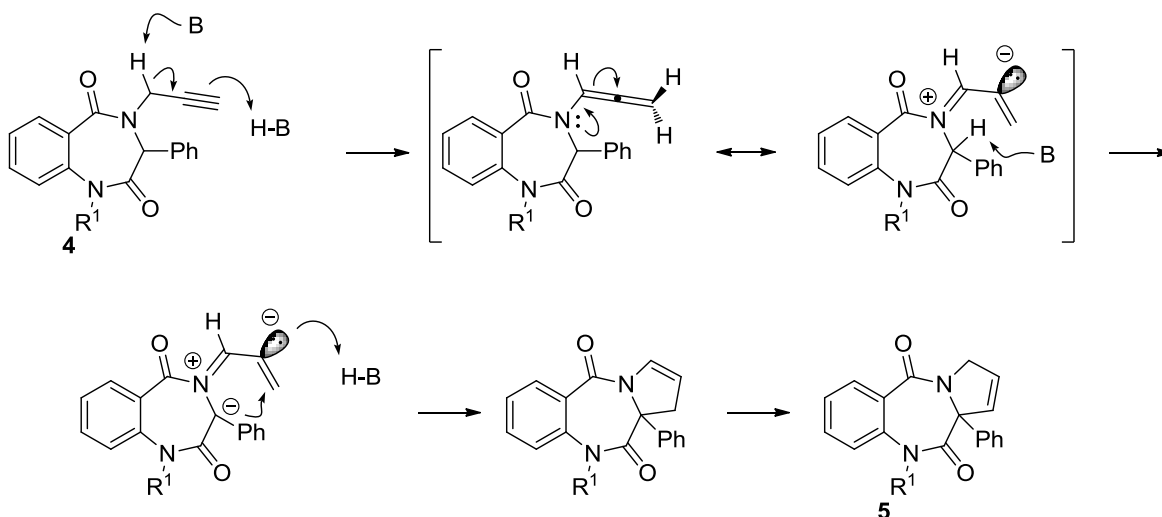
Schéma 19. Vliv NaH na 4-(propargylamino)benzodiazepindiony **4a–4c**.

Deriváty **4a–4b** mající v poloze 3 fenylovou skupinu interagovaly s NaH velmi rychle. Obvykle byly dle TLC i dle GC-MS během 1 h spotřebovány. V případech, kdy byl atom dusíku v poloze 1 benzodiazepindionového uskupení substituován fenylovou skupinou, sloučenina **4a**, nebo methylovou skupinou, sloučenina **4b**, byly získány žádané deriváty



pyrrolobenzodiazepindionu **5a,b** ve vysokých výtěžcích (**Schéma 19**). Stejná dávka NaH u výchozí látky **4**, která nebyla na atomu dusíku N-1 substituována, nezpůsobila žádnou změnu. Účinek 1,5 molárního přebytku NaH již látku **4c** donutil k její změně. Ovšem po interpretaci všech změřených spekter bylo zjištěno, že k uzavření pyrrolového kruhu nenastalo. Došlo "pouze" k isomerizaci propargylové skupiny na skupinu allenovou (**Schéma 19**).

Izolovaný produkt **6**, nás prozatím směřuje k myšlence, že cyklizační reakce 4-propargylbenzodiazepindionů **4** nastává přes allenový meziprodukt, jak je naznačeno ve **Schématu 20**.

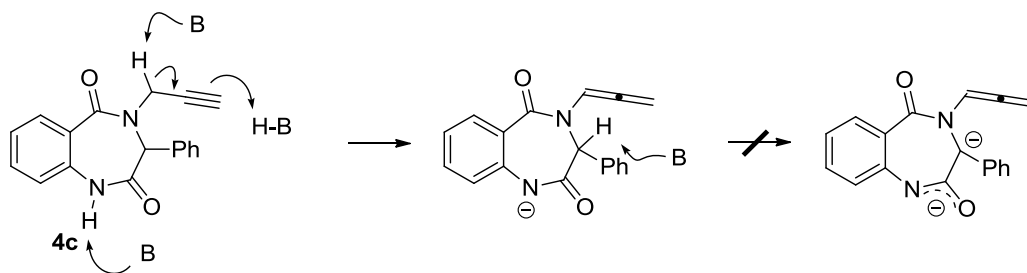


Pozn.: B = báze

rolí B-H může hrát druhá molekula výchozího benzodiazepinu **4**

### Schéma 20. Navržený mechanismus vzniku pyrrolobenzodiazepindionů **5a,b**.

Předpokládaný mechanismus taktéž podporuje skutečnost, že *N*-nesubstituovaný benzodiazepin **4c** poskytl výhradně allenový produkt **6**, a to z toho důvodu, že v konečné fázi cyklizační reakce, má-li být úspěšná, je nezbytné odštěpení protonu z atomu uhlíku C-3, což, jak je uvedeno ve **Schématu 21**, není možné.

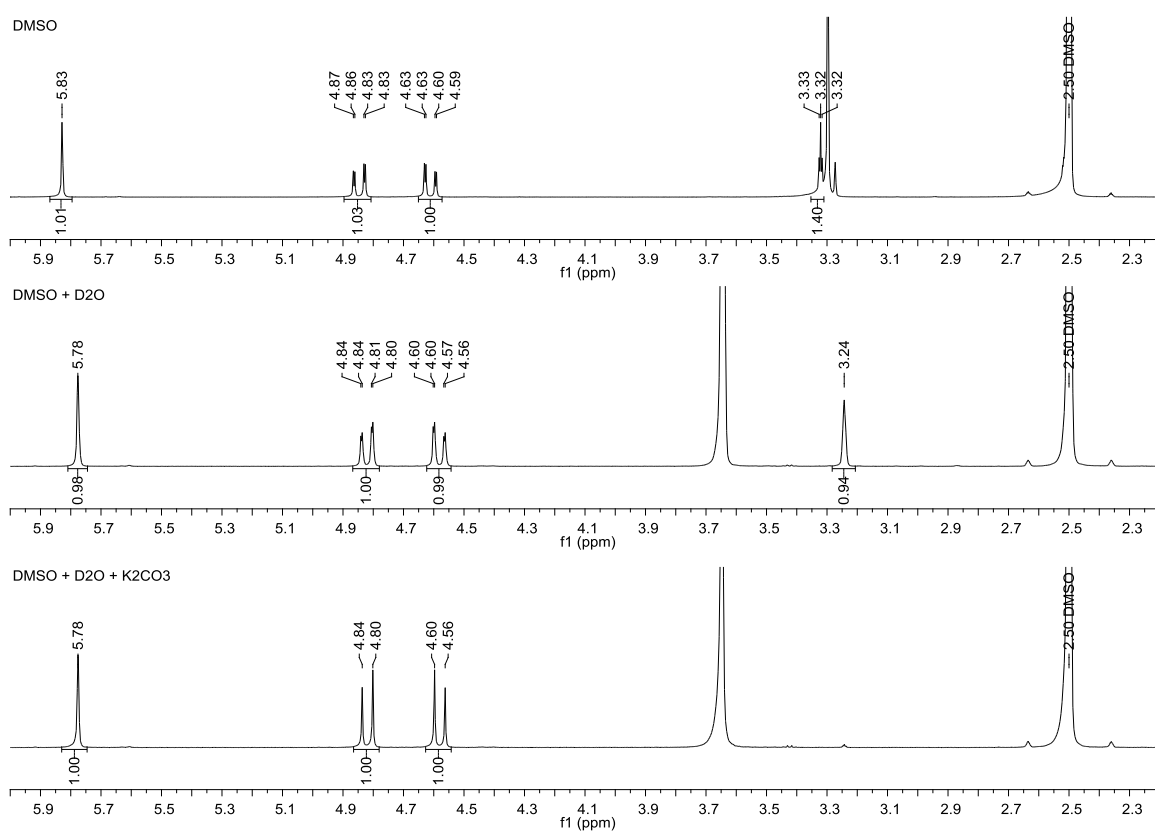


**Schéma 21.** Navržený mechanismus vzniku allenylbenzodiazepindionu **6**.

Za účelem většího porozumění průběhu studovaných reakcí, bylo provedeno několik pokusů o přípravu deuteriem značené molekuly **4a**, se kterou byly zamýšleny, ale z důvodu nedostatku času nebyly uskutečněny, identické cyklizační reakce. Postupů pro výměnu terminálního atomu vodíku za deuterium v propargylové skupině je v literatuře uvedeno mnoho, ovšem ne na derivátech benzodiazepinu. Z důvodu snadnosti provedení a dostupnosti výchozích surovin, byl vybrán pokus z literatury, kde byly během hodiny v roztoku 1-fenylprop-2-yn-1-olu a potaše v těžké vodě vyměněny oba kyselé protony ( $-\text{OH}$ ,  $\equiv\text{CH}$  za  $-\text{OD}$ ,  $\equiv\text{CD}$ ).<sup>48</sup> S dodržением stejných poměrů  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\text{K}_2\text{CO}_3$  a látky **4a** byla směs míchána přibližně desetkrát delší dobu při laboratorní teplotě. Po jejím zpracování běžným postupem a změření  $^1\text{H}$  NMR spektra bylo zjištěno, že k žádné výměně nedošlo. Tento fakt, byl přisuzován tomu, že ve směsi nebyla **4a** rozpuštěna.

Proto byla tendence k hledání vhodného organického rozpouštědla. Prvně byl sledován vliv, z důvodu značné mísitelnosti s vodou a vysoké rozpouštěcí schopnosti, přídavku DMSO. Elementární test byl proveden přímo v NMR kyvetě, na jehož počátku bylo změřeno  $^1\text{H}$  NMR spektrum roztoku 1,4 mg vzorku **4a** v 500  $\mu\text{l}$  DMSO- $d_6$  jako standardní (v **Obrázku 18** označeno jako DMSO). Poté bylo do kyvety přidáno 50  $\mu\text{l}$   $\text{D}_2\text{O}$ , vše 5 min intenzivně protřepáváno a opět změřeno  $^1\text{H}$  NMR spektrum (v **Obrázku 18** označeno jako DMSO +  $\text{D}_2\text{O}$ ), v němž se pouze více či méně účinkem  $\text{D}_2\text{O}$  posunuly signály k jiným hodnotám ppm, ale to není nic výjimečného. Na závěr bylo do slabě opalescentního roztoku přidáno 3 mg potaše. Po 5 min intenzivním protřepávání směsi bylo změřeno  $^1\text{H}$  NMR spektrum (v **Obrázku 18** označeno jako DMSO +  $\text{D}_2\text{O}$  +  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ), ve kterém chybí dublet dubletu při 3,32 ppm (s přídavkem  $\text{D}_2\text{O}$  je viditelný singlet při 3,24 ppm) připadající koncovému protonu propargylové skupiny ( $-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{CH}$ ). Plochy ostatních signálů v alifatické oblasti, dubletů dubletů při hodnotách přibližně 4,60 ppm a 4,83 ppm

připadající geminálním atomům vodíku propargylové skupiny ( $-\underline{\text{CH}}_2-\text{C}\equiv\text{CH}$ ) a ostrých singletů při 5,63 ppm popř. při 5,86 ppm charakteristických pro H-3 benzodiazepinu, zůstaly nezměněny. Z tohoto faktu jasně plyne, že u sledovaného derivátu **4a** nastala pouze selektivní záměna terminálního atomu vodíku za atom deuteria. Současně tohle tvrzení podporuje skutečnost, že ve spodním spektru na **Obrázku 18** jsou na místo dvou původních dubletů dubletů viditelné pouze dva dublety vzniklé vzájemným štěpením geminálních atomů vodíku.

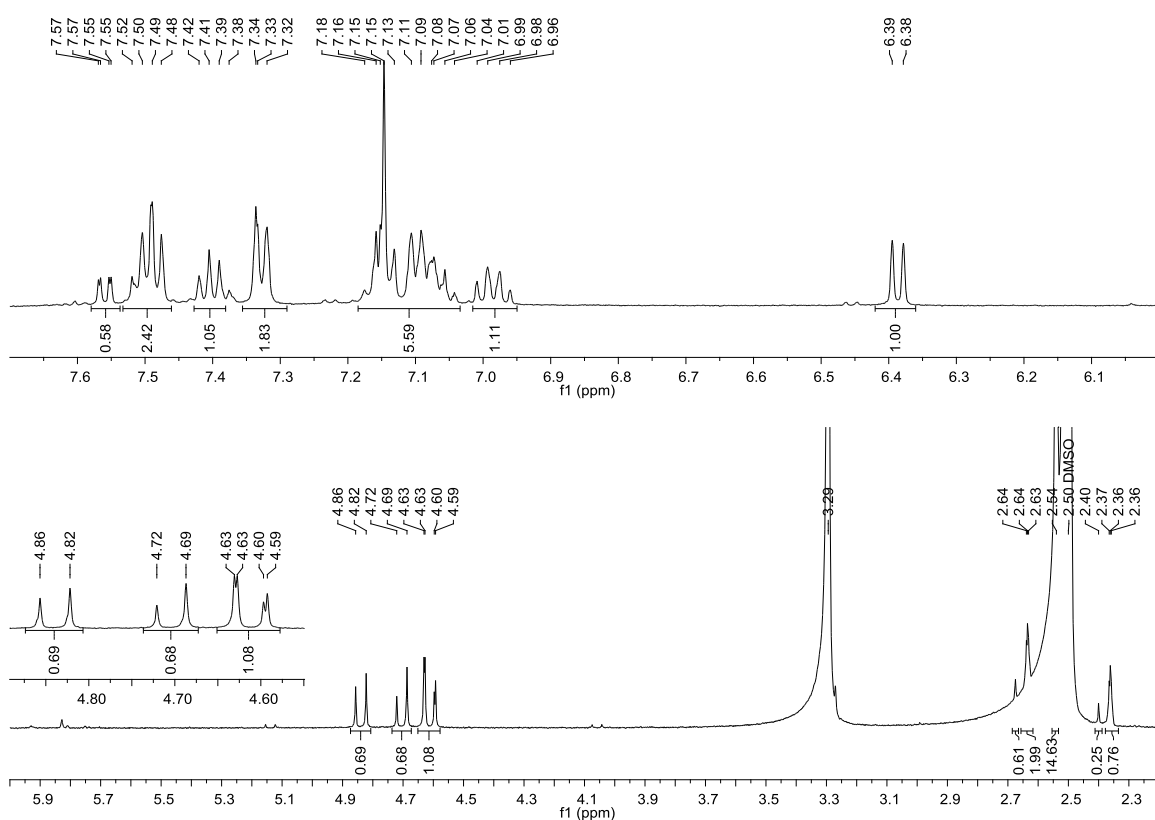


**Obrázek 18.** Výřez  $^1\text{H}$  NMR spektra **4a** v  $\text{DMSO}-d_6$  s přidavky  $\text{D}_2\text{O}$  a  $\text{K}_2\text{CO}_3$ .

Z údajů poskytnutých  $^1\text{H}$  NMR spekter bylo zkoušeno izotopově značenou sloučeninu **4a** připravit postupem uvedeným v odstavci 5.6. preparativně. Zarážející bylo, že změřené  $^1\text{H}$  NMR spektrum surové směsi (**Obrázek 19**) nebylo identické se spektrem na **Obrázku 18** (označené jako  $\text{DMSO} + \text{D}_2\text{O} + \text{K}_2\text{CO}_3$ ). Ve spektru na **Obrázku 19** nejsou patrné charakteristické signály terminálního protonu propargylové skupiny (obvykle se vyskytuje jako dublet dubletu při hodnotách okolo 3,3 ppm) a protonu H-3 benzodiazepinu (ostrý

singlet v oblasti 5,6–5,8 ppm), což značí, že nastala v obou polohách záměna protonu za deuterium. Taktéž nastala výrazná změna v oblasti 4,6–4,9 ppm, kde, oproti čtyřem viditelným dubletům, byly očekávány dublety pouze dva.

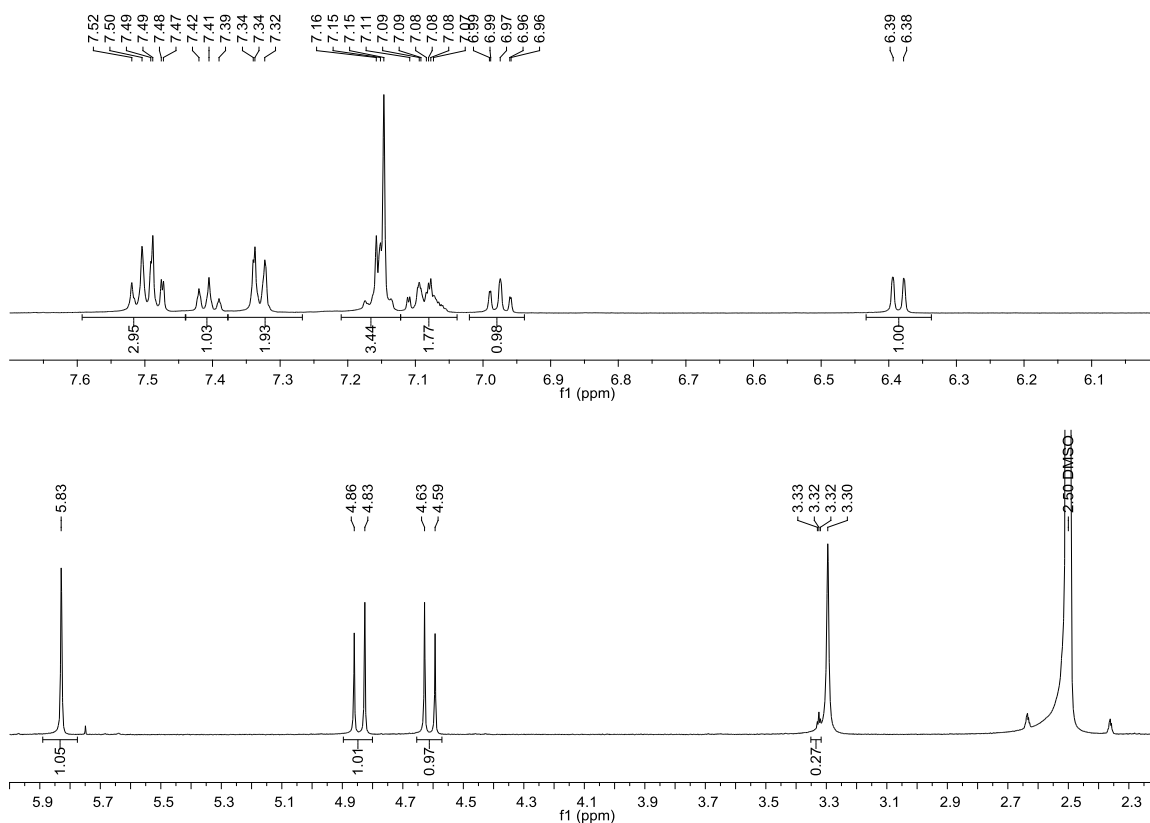
Nežádoucí změna sloučeniny **4a** oproti původním testům v NMR kyvetě mohla být způsobena příliš dlouhým reakčním časem anebo značně dlouhou dobou lyofilizace (4 h) uskutečněnou běžnou olejovou vývěvou, při které bylo nutné celou baňku ohřívat horkovzdušnou pistolí nastavenou na 120 °C.



**Obrázek 19.**  $^1\text{H}$  NMR spektrum látky **4a** 3 h míchané v DMSO s  $\text{D}_2\text{O}$  a  $\text{K}_2\text{CO}_3$ .

Pro neuspokojivý výsledek byla metoda inovována. DMSO bylo zaměněno za MeCN a upraveno množství těžké vody i potaše. Po 3 hodinovém míchání reakčního roztoku pod inertní atmosférou argonu při laboratorní teplotě byl izolován surový produkt, ve kterém je dle  $^1\text{H}$  NMR spektra uvedeného na **Obrázku 20** stále zbytkové množství nezaměněného protonu na terminálním atomu uhlíku propargylové skupiny. Z integrální plochy peaku při 3,32 ppm není možné, z důvodu částečného překryvu se signálem HOD (3,30 ppm),

zbývající množství nevyměněného protonu s jistou přesností zjistit. Účelné bude, při dalším zamýšleném opakování experimentu s větším přebytkem  $D_2O$  a  $K_2CO_3$ , při měření NMR zaměnit  $DMSO-d_6$  za  $CDCl_3$ .

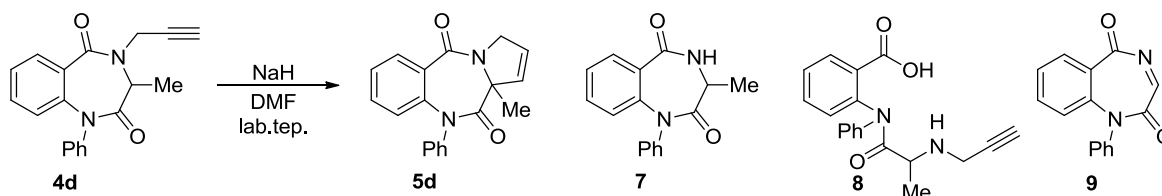


**Obrázek 20.**  $^1H$  NMR spektrum látky **4a** 3 h míchané v MeCN s  $D_2O$  a  $K_2CO_3$ .

Na poli bazicky indukovaných přesmyků 3-methyl-4-propargylbenzodiazepindionů **4** bylo uděláno několik pokusů, které doposud nevedly k uspokojivým výsledkům. Ke studiu chování 3-methylových derivátů v silně bazickém prostředí NaH byl vybrán 1-fenyl-3-methyl-4-propargyl-3,4-dihydro-1*H*-benzo[*e*][1,4]diazepin-2,5-dion (**4d**), protože se svou strukturou od sloučeniny **4a**, na níž byly cyklizační reakce optimalizovány, liší pouze v substituci v poloze 3 benzodiazepindionového skeletu.

Poměr reagentů a množství rozpouštědla byl v počátečním pokusu o bazicky indukovanou cyklizaci logicky zvolen shodný s osvědčenými podmínkami pro 3-fenylové analogy **4a,b**, to znamená, že bylo na sloučeninu **4d** působeno 50 % NaH v DMF při laboratorní teplotě. Po uplynutí 24 h, i za cenu, že byla na TLC stále přítomna výchozí

látky, byla reakční směs obvyklým způsobem zpracována. V surovém produktu dle intenzity skvrn na TLC nad ostatními koprodukty dominuje výchozí látka **4d**. Podobný výsledek potvrdila i GC-MS analýza, ze které bylo zřejmé, že, pomineme-li výchozí materiál **4d** mající relativní zastoupení 71 %, v surové směsi není přítomen žádaný pyrrolbenzodiazepin, nýbrž jsou v malých množstvích obsaženy pouze tři produkty rozpadu původní molekuly. V hmotnostních spektrech mají dva vedlejší produkty molekulový peak s hodnotou  $m/z$  rovnu 322 a jeden 266. Jelikož výchozí surovina má relativní molekulovou hmotnost 304 g/mol, u produktu s 266  $m/z$  s relativním zastoupením 3 % pravděpodobně došlo ke ztrátě propargylové skupiny (ve **Schématu 22** sloučenina **7**). Naopak dva produkty s 322  $m/z$ , jejichž relativní zastoupení 7 % a 14 %, mají hodnotu  $m/z$  oproti výchozí látce **4d** o 18 vyšší, z čehož je téměř jisté, že do původní molekuly vstoupila molekula vody. Je předpokládáno, že se ve výsledku rozštěpila vazba mezi atomem dusíku N-4 a karbonylovým uhlíkem C-5 a vznikly tak deriváty anthranilové kyseliny. Jedna z možných forem je uvedena ve **Schématu 22** pod číslem **8**. Opakovanou chromatografií na sloupci silikagelu bylo izolováno 59 % **4d** a 29 % nedělitelné směsi isomerů s hodnotou 322  $m/z$ .



**Schéma 22.** Struktura navržených produktů vznikajících při reakci **4d** s NaH.

Vyvolané neočekávané problémy s neochotou methylového derivátu s aplikovaným množstvím hydridu reagovat nás donutily sledovat vliv většího množství NaH. Byl pozorován jak účinek ekvivalentního množství NaH, tak i jeho 1,25, 1,5 a 2 molární přebytky. Všechny zmíněné dávky NaH, oproti poměru, uvedeném výše, vedly ke větší konverzi původní matrice, nicméně s rostoucí porcí aplikované báze se taktéž zvyšovala rozmanitost produktů v reakční směsi, ze které se mnohdy i trojnásobnou chromatografií na sloupci silikagelu nepodařilo izolovat žádné chemické individuum. Z tohoto důvodu nejsou znázorněné sloučeniny uvedené ve **Schématu 22** charakterizovány běžnými metodami

strukturní analýzy a jejich struktury jsou navrženy pouze na základě podrobného rozboru hmotnostních spekter, která byla získána z EI-GC-MS. V tomto ohledu je taktéž nezbytné zmínit, že v GC-MS spektru reakčního roztoku se vyskytuje celá řada sloučenin dalších, u kterých se zatím strukturu nepodařilo ani navrhnout.

### 3.3 Komentář podporující strukturu připravených sloučenin

Protože je diplomová práce zaměřena na problematiku bazicky indukovaných intramolekulárních přesmyků 3-(propargylamino)chinolin-2,4(1*H*,3*H*)-dionů **3** a 4-propargyl-3,4-dihydro-1*H*-benzo[*e*][1,4]diazepin-2,5-dionů **4** na 3*H*-benzo[*e*]pyrrolo[1,2-*a*][1,4]diazepin-5,11(10*H*,11*aH*)-diony **5**, nastává pouze přeuspořádání atomů a elektronů v rámci jedné molekuly. Z tohoto důvodu výsledky získané elementární analýzou (EA) nebo hmotnostní spektrometrií (HRMS, ESI-IT-MS, EI-GC-MS) neposkytují téměř žádné cenné informace o strukturních změnách.

Jednou z metod analýzy byla, již zmiňovaná, hmotnostní spektrometrie s iontovou pastí a elektrosprejovou ionizací (ESI-IT-MS). Po izolaci benzodiazepinových produktů **4a–4g** byly tyto sloučeniny charakterizovány ESI-MS spektry. Ve všech ESI-MS spektrech prvního řádu, získaných v pozitivním skenovacím módu, bylo u všech analyzovaných sloučenin pozorováno pět signálů. Vyjma jedenkrát nabitého iontu odpovídajícího protonované molekule  $[M+H]^+$ , který byl doprovázen dvěma signály určenými jako sodný  $[M+Na]^+$  a draselný  $[M+K]^+$  adukt, byly v +MS spektrech detekovány také signály s dvakrát vyšší hodnotou  $m/z$ , pro něž lze navrhnout strukturu  $[2 \times M+H]^+$ , respektive  $[2 \times M+Na]^+$ . Vznik dimerů je pravděpodobně zprostředkován intramolekulárními vodíkovými vazbami, což bylo v případě vybrané sloučeniny **4f** potvrzeno v pevné fázi pomocí rentgenové difrakční analýzy (**Příloha P1**). Tato difrakční analýza ukázala, že jsou molekuly spojené vodíkovou vazbou typu N–H $\cdots$ O a tvoří řetězce podél krystalografické osy *c*. Vodíkové atomy, kromě těch, které participují na mezimolekulových interakcích, nejsou pro větší přehlednost zobrazeny. Izolací a následnou fragmentací iontu  $[M+H]^+$  bylo studováno chování předmětných sloučenin v plynné fázi. V +MS/MS spektrech analyzovaných benzodiazepinových derivátů byly pozorovány dvě fragmentační dráhy. První fragmentační dráha byla zahájena neutrální ztrátou částice o  $m/z$  56 a následována neutrální ztrátou oxidu uhelnatého ( $m/z$  28), případně neutrální ztrátou benzenu ( $m/z$  78).

Ve druhé fragmentační dráze nejprve došlo k neutrální ztrátě CO ( $m/z$  28), a následně k neutrální ztrátě částice o  $m/z$  56, případně  $m/z$  43 či  $m/z$  78. To jak se daná molekula při této analýze chová nelze s jistotou tvrdit, jelikož nebyly provedeny výpočty pro podložení hypotetické fragmentace.

Jak tomu bylo u molekuly **4f**, tak i u jiných docházelo k intramolekulárním vodíkovým interakcím. Jako zástupce připravených pyrrolobenzodiazepinových sloučenin byl vybrán **5a** derivát. V **Příloze P2** lze na obrázku vidět, že struktura krystalu je stabilizovaná C—H $\cdots$  $\pi$  interakcemi, kdy tečkovaná čára představuje úsečky od vodíkového atomu ke středu příslušného aromatického kruhu. U izolovaného allenového meziprojektu **6**, jehož intramolekulární interakce jsou vyobrazeny v **Příloze P3**, jež byl také podroben rentgenové difrakci krystalu, lze vidět, že tvoří molekulové centrosymetrické dimery. Tyto dimery jsou spojeny párem vodíkových vazeb typu N—H $\cdots$ O, kdy tečkovaná čára představuje úsečky mezi vodíkovým atomem a kyslíkovým akceptorem.

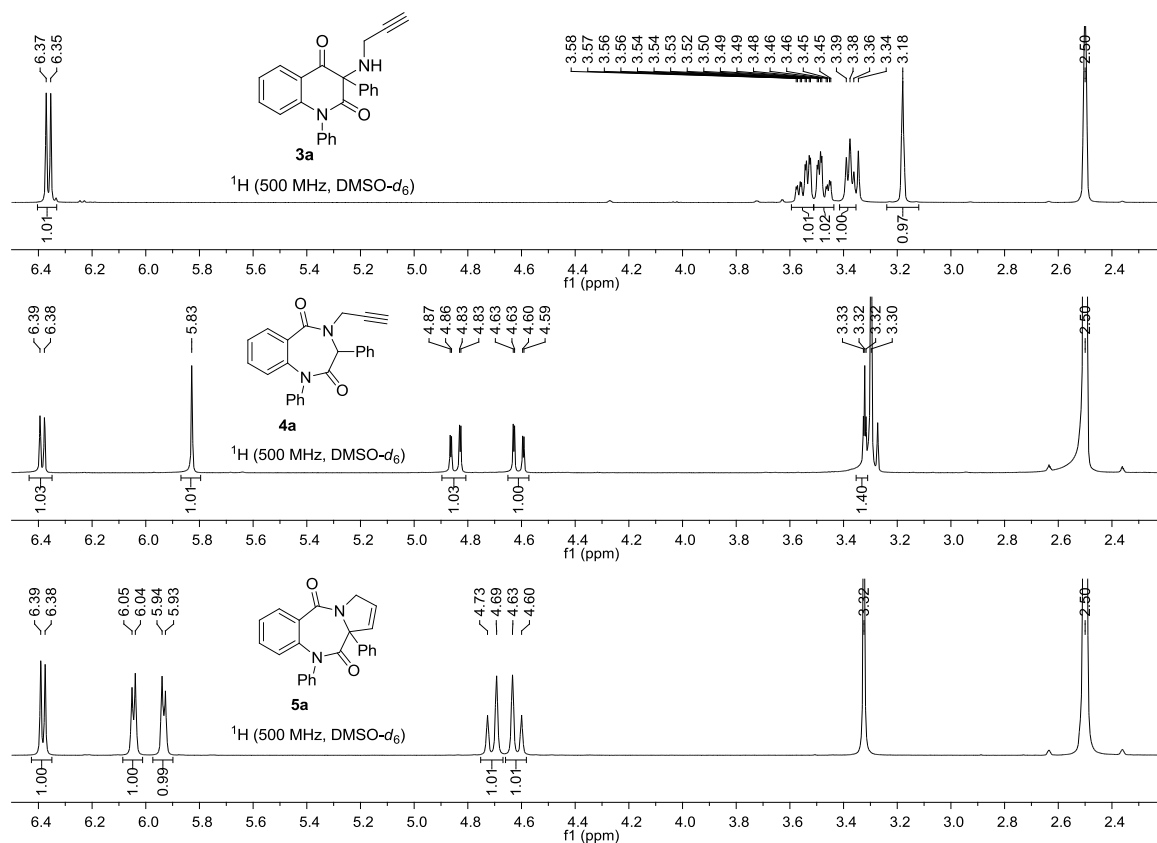
Nezvratné důkazy o probíhajících transformacích jedné sloučeniny v druhou poskytuje nukleární magnetická resonance (NMR) a rentgenová difrakční analýza (X-ray) monokrystalu, která byla provedena u sloučenin **4a**, **4d**, **4f**, **5a**, **5b** a **6** jejichž ORTEP diagramy jsou uvedeny v **Přílohách P4–P9**.

Nukleární magnetickou rezonancí byla měřena jednodimenziální ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) i dvoudimenziální COSY (interakce  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ), HSQC (přímá interakce  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) a HMBC (nepřímá interakce  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ ) spektra připravených sloučenin, jejichž interpretací byly přiřazeny atomy vodíku a atomy uhlíku k jednotlivým signálům.

Protože se diskutované, bazicky indukované intramolekulární přesmyky odehrávají na alifatických popř. na cykloalifatických částech molekul, bude dále ubírána pozornost pouze na tuto oblast, to je na rozmezí 2,2–6,5 ppm. Ostatně v částech spekter, v nichž se vyskytují signály z aromatických protonů, nebyly pozorovány žádné výrazné změny, pouze mírné posuny k vyšší či nižším hodnotám ppm.

Na ukázkou změn v NMR spektrech jednotlivých sloučenin účastnících se postupné transformace derivátů **3** na **5**, byly vybrány výřezy NMR spekter látek **3a**, **4a** a **5a**, která je možné vidět na **Obrázku 21**.





**Obrázek 21.** Alifatická oblast  $^1\text{H}$  NMR spekter sloučenin **3a**, **4a** a **5a**.

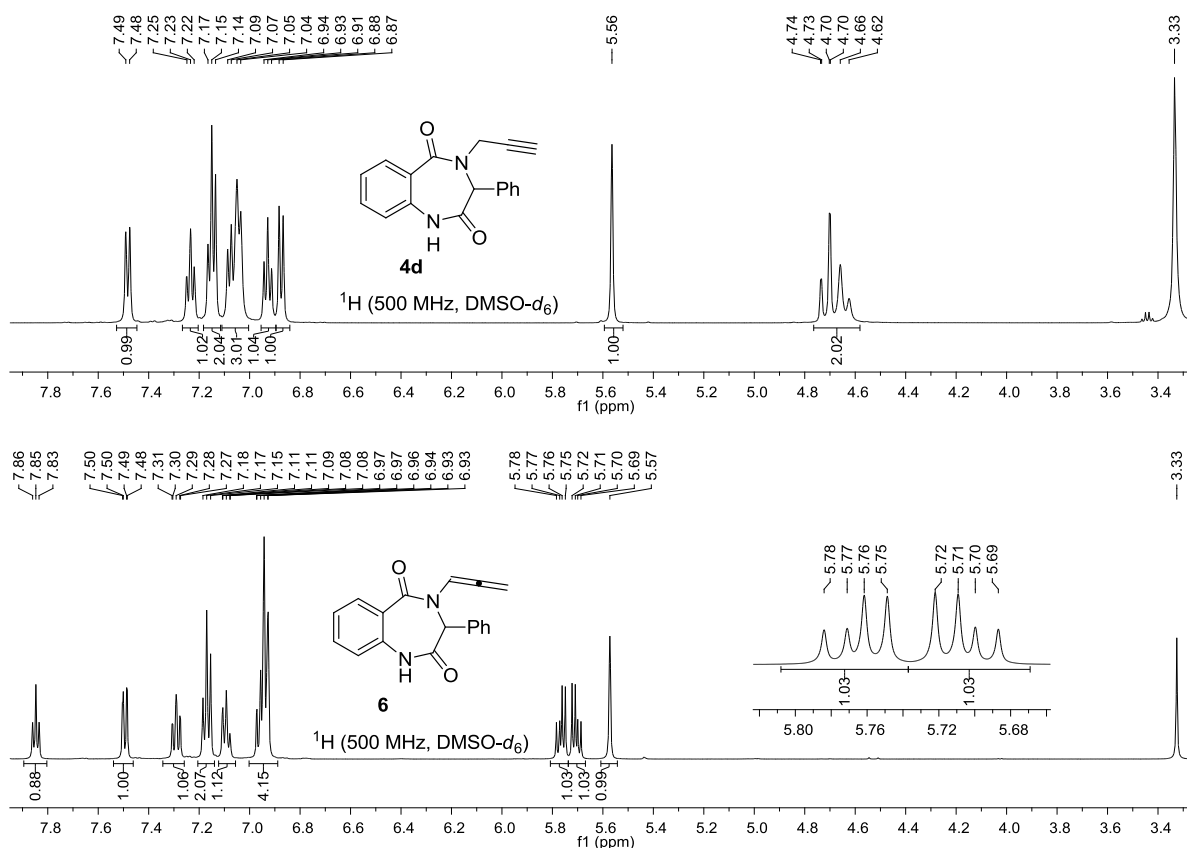
V alifatické části spektra sloučeniny **3a** jsou v podstatě viditelné pouze čtyři signály, a to špatně rozlišený dublet dubletu při 3,18 ppm náležící terminálnímu protonu propargylové skupiny, dublet dubletu při 3,38 ppm patřící protonu vázaného k atomu dusíku propargylaminové skupiny a dva multiplety tvaru dublet dubletu dubletu při 3,47 ppm a 3,55 ppm pocházející z geminálních protonů propargylové skupiny.

V prostředním spektru na **Obrázku 21**, kterým je charakterizovaný produkt vzniklý z působení TMG na látku **3a**, nastala oproti původnímu spektru výrazná změna zahrnující jednak vymizení signálu protonu sekundárního aminu, a jednak se objevil nový singlet při 5,83 ppm. Z výsledku HRMS, která jednoznačně potvrdila, že izolovaný produkt má stejnou molekulovou hmotnost a z indicií poskytnutých NMR bylo patrné, že se atom vodíku z aminové skupiny přemístil na jinou část molekuly, kde v blízkém okolí nesousedí s dalším protonem. Tato skutečnost je též podpořena změnou tvaru obou multipletů protonů z methylenové části propargylové skupiny, které díky štěpení terminálního, druhého geminálního a aminového protonu měly původně tvar dubletu dubletu dubletu.

Jelikož atom dusíku o svůj proton přišel, jsou ve spektru při hodnotách 4,61 ppm a 4,85 ppm viditelné dublety dubletu. Podrobným rozbořením 2D NMR spekter, bylo zjištěno, že se atom dusíku aminové skupiny včleňuje do kruhu, čímž původně šestičlenný heterocyklický kruh expanduje na kruh diazepinový.

V posledním NMR spektru na **Obrázku 21**, v němž již není viditelný signál koncového protonu propargylového zbytku, se vyskytují čtyři slabě rozlišené dublety dubletu, jejichž integrální plocha odpovídá jednomu protonu. Po komplikovaném rozboru 2D NMR spekter bylo zjištěno, že koncový atom uhlíku propargylové skupiny byl připojen k atomu uhlíku v poloze 3 benzodiazepinového skeletu, a že zmiňované multiplety charakterizují protony nově vzniklého pyrrolového kruhu. Ze změřených 2D NMR spekter nebyla zřejmá poloha dvojně vazby v pyrrolovém kruhu, protože všechny protony tohoto cyklu v HMBC spektrech v molekule korelují se stejnými atomy uhlíku. Přesvědčivý důkaz o poloze dvojně vazby poskytla, po vypěstování monokrystalu, rentgenová difrakční analýza (viz. **Příloha P7, P8**). Až poté bylo možné určit, které signály náležejí protonům H-1, H-2 a H-3.

Na **Obrázku 22** jsou uvedeny části dvou  $^1\text{H}$  NMR spekter získaných změřením sloučeniny **4d** (v horní části) a produktu její interakce s NaH (ve spodní části).



Obrázek 22. Výřezy  $^1\text{H}$  NMR spekter sloučeniny **4d** a produktu jejího přesmyku.

Při konfrontaci obou spekter je možné zpozorovat, že signály pocházející z benzodiazepindionové části molekuly jsou téměř shodné. Ovšem výrazný, na první pohled do očí bijící, rozdíl je u nerozlišeného multipletu při 4,76–4,58 ppm pocházející z methylenové části propargylové skupiny původní látky **4d**, který se po reakci **4d** s NaH přesune k vyšším hodnotám ppm a stanou se z něj dva rozlišené dublety dubletů při 5,70 ppm a 5,77 ppm, které v HSQC spektru korelují se stejným atomem uhlíku. Při pohledu pouze na  $^1\text{H}$  NMR spektra u pozorovatele navodí mylnou představu, že v horní části **Obrázku 22** chybí signál terminálního protonu propargylové skupiny a naopak, že ve spodní části přibyl dublet dubletu při 7,85 ppm charakterizující jeden proton v molekule. Ovšem z 2D NMR bylo patrné, že neviditelný signál z alkynylu se absolutně kryje se signálem HOD při 3,33 ppm. Z těchto faktů bylo jasné, že nastala pouze izomerizace propargylové skupiny na skupinu allenylovou.

Jelikož měření NMR je prováděno na spřátelené chemické a chemickotechnologické fakultě Univerzity v Ljublaně ve Slovinsku a mnohdy výsledky dorazí s časovou

prodlevou, doposud spektra derivátů **4e**, **4f** a **4g** nemáme k dispozici, ovšem o pravosti uvedených struktur nasvědčují v hmotnostních spektrech charakteristické fragmentační cesty.

## 4 CHARAKTERISTIKA PŘÍSTROJOVÉHO VYBAVENÍ A INSTRUMENTÁLNÍCH METOD

Reagenty a rozpouštědla byly zakoupené z komerčních zdrojů (Fluka, Sigma Aldrich). Retenční faktory při sledování průběhu reakcí byly detekovány pomocí chromatografie na tenké vrstvě (TLC), pro kterou byly použity komerční hliníkové destičky s nanesenou vrstvou silikagelu (Alugram® SIL G/UV 254; 220–240 mesh; Macherey-Nagel) s fluorescenčním indikátorem pro UV 254 nm. Sloupcová chromatografie byla provedena za použití silikagelu Fluka Silica gel 60, 220–240 mesh. Teploty tání byly měřeny na Koflerově bloku a nejsou korigovány.

NMR spektra byla měřena na přístroji Bruker Avance III při frekvenci 500 MHz ( $^1\text{H}$ ) a 126 MHz ( $^{13}\text{C}$ ) při 300 K. Chemické posuny jsou uvedeny ve stupnici  $\delta$  ppm. Interakční konstanty ( $J$ ) jsou uvedeny v Hz. Multiplicita je označena následovně: s (singlet), d (dublet), dd (dublet dubletu), ddd (dublet dubletu dubletů), t (triplet), m (multiplet), br (rozšířený). Objasnění struktur bylo provedeno pomocí 2D NMR spektrálních analýz ( $^1\text{H}$ – $^1\text{H}$  gs-COSY,  $^1\text{H}$ – $^{13}\text{C}$  gs-HSQC a gs-HMBC). Pro identifikaci signálu je číslování atomů následující: benzodiazepinový skelet, prostá čísla (př. 1, 2, ...); fenylový substituent v poloze 1 benzodiazepinového skeletu, čísla s písmenem A (př. A1, A2, ...), fenylový substituent v poloze 3 benzodiazepinového skeletu, čísla s písmenem B (př. B1, B2, ...); geminální protony na methylenové části propargylové skupiny jsou označeny řeckými písmeny ( $\alpha$ ,  $\beta$ ).

Infračervená spektra byla měřena na spektrometru iS 10, Smart omni technikou KBr tablet.

Hmotnostní spektra a hmotnostní spektra s vysokým rozlišením byla měřena na přístrojích VG-Analytical AutospecQ a Q-ToF Premier. Data jsou uvedeny jako  $m/z$  (relativní intenzita).

Elementární analýza (C, H, N) byla uskutečněna na přístroji Flash EA 1112 Automatic Elemental analyzer (Thermo Fischer Scientific). Dále byl použit plynový chromatograf Shimadzu QP-2010 s kvadrupólovým hmotnostním analyzátozem (GC-EI-MS), který je opatřen knihovnou spekter NIST 02 a s kolonou Supelco SLB-5ms (30 m; 0,25 mm). Nosným plynem bylo helium s konstantním průtokem  $38 \text{ cm}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ . Teplotní program byl nastaven:  $100 \text{ }^\circ\text{C}/7 \text{ min}$ ,  $25 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$  při zvýšení na teplotu  $250 \text{ }^\circ\text{C}$ , jež byla držena po celou dobu měření. Teplota nástřiku:  $250 \text{ }^\circ\text{C}$ . Iontový zdroj:  $200 \text{ }^\circ\text{C}$ . Při vypisování hmotnostních

spekter byly vybrány signály s relativním zastoupením alespoň 10 %. ESI-MS analýza bylo uskutečněna na hmotnostním spektrometru s iontovou pastí Esquire LC. Měření byla uskutečněna v pozitivním skenovacím módu.

Výsledky z rentgenostrukturní analýzy byly řešeny a graficky zpracovány v programu Mercury a Corel DRAW graphic Suite 12.

## 5 DETAILNÍ POPIS SYNTETICKÝCH POSTUPŮ A STRUKTURNÍ CHARAKTERISTIKY PŘIPRAVENÝCH SLOUČENIN

### 5.1 Příprava 4-hydroxychinolin-2(1H)-onů 1

Směs anilinů (100 mmol) a diethyl-benzylmalonátů (90 mmol) byla zahřívána v kapkovité baňce na kovové lázni, jejíž teplota byla postupně zvyšována, v závislosti na rychlosti destilace uvolňovaného ethanolu, od 150 °C do 290 °C po dobu uvedenou v tabulce ve **Schématu 12**, po které již nebyl pozorován nárůst hmoty oddestilovaného ethanolu.

Získaná reakční směs byla zpracována běžným způsobem, to znamená, že byla za horka vzniklá tavenina nalita do toluenu, kde došlo k vyloučení pevného podílu, který byl opakovaně macerován a dekantován ve vroucím toluenu. Získaný světlý práškový materiál byl rozpuštěn v minimálním množství 0,5M-NaOH. Ke vzniklému roztoku byly přidány 3 lžice aktivního uhlí a suspenze byla přefiltrována přes Büchnerovu nálevku. Surový produkt byl z roztoku vysrážen 10% HCl, přefiltrován přes fritu a promyt vodou do neutrálního pH. Takto získaný surový produkt **1** byl rozpuštěn v minimálním množství vroucím EtOH, za horka přefiltrován a ponechán samovolně krystalizovat.

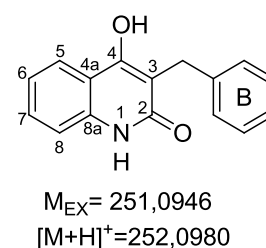
#### 3-Benzyl-4-hydroxychinolin-2(1H)-on (1a)

Bílá krystalická látka;  $t_f = 194\text{--}197\text{ }^\circ\text{C}$  (EtOH), lit.<sup>49</sup>: 218–219 °C (EtOH); výtěžek: 42 %,  $R_f = 0,65$  (10 % CHCl<sub>3</sub> v EtOH),  $R_f = 0,28$  (5 % EtOH v CHCl<sub>3</sub>).

IČ spektrum (tableta KBr), cm<sup>-1</sup>: 3157, 3026, 1639, 1603, 1554, 1501, 1452, 1395, 1270, 1182, 1107, 1029, 953, 753, 704, 672, 638, 531, 508, 462.

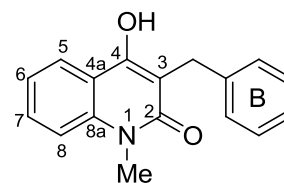
GC-EI-MS,  $m/z$ (%): 51(15), 65(25), 77(34), 90(11), 91(35), 92(25), 102(11), 103(21), 120(20), 131(29), 146(25), 234(33), 250(23), 251(100), 252(18).

Pro C <sub>16</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub> :	vypočítané:	76,48 % C	5,21 % H	5,57 % N
	stanovené:	76,27 % C	5,48 % H	5,58 % N



**3-Benzyl-4-hydroxy-1-methylchinolin-2(1H)-on (1b)**

Bílá krystalická látka;  $t_f = 220\text{--}226\text{ }^\circ\text{C}$  (EtOH),  
lit.<sup>50</sup>:  $226\text{--}228\text{ }^\circ\text{C}$  (MeOH); výtěžek: 49 %,  $R_f = 0,9$  (10 % EtOH v  
CHCl<sub>3</sub>),  $R_f = 0,59$  (5 % EtOH v CHCl<sub>3</sub>).



$M_{EX} = 265,1103$   
 $[M+H]^+ = 266,1136$

IČ spektrum (tableta KBr),  $\text{cm}^{-1}$ : 3057, 3020, 1634, 1607, 1563,  
1416, 1343, 1289, 1203, 1148, 1095, 757, 726, 696, 584, 526, 455.

GC-EI-MS,  $m/z(\%)$ : 51(11), 77(33), 91(30), 103(15), 104(12), 131(21), 132(14), 134(17),  
160(18), 248(29), 264(24), 265(100), 266(19).

Pro C <sub>17</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>2</sub> :	vypočítané:	76,96 % C	5,70 % H	5,28 % N
	stanovené:	76,77 % C	6,10 % H	5,31 % N

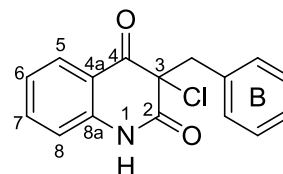
**5.2 Příprava 3-chlorchinolin-2,4(1H,3H)-dionů 2**

K míchané, vytemperované suspenzi na  $45\text{--}50\text{ }^\circ\text{C}$  4-hydroxychinolinonů **1** (40 mmol) ve 120 ml dioxanu bylo během 10 min přikapáno 100 mmol SO<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, čímž došlo k rozpuštění původní bezbarvé suspenze a vzniklý žlutý reakční roztok byl 45 min míchán při stejné teplotě.

Po spotřebování výchozí látky byl roztok ochlazen na laboratorní teplotu a následně nalit do 1 litru ledové vody, kde došlo k vyloučení značného množství pevné žluté látky. Po rozpuštění ledu byla vzniklá suspenze přefiltrována přes fritu a získaný surový produkt **2** byl promyt vodou do neutrálního pH, vysušen a překrytalizován z benzenu

**3-Benzyl-3-chlorchinolin-2,4(1H,3H)-dion (2a)**

Žlutá krystalická látka;  $t_f = 200\text{--}204\text{ }^\circ\text{C}$  (Be),  
lit.<sup>51</sup>:  $187\text{--}189\text{ }^\circ\text{C}$  (Be/Hex); výtěžek: 79 %,  $R_f = 0,5$  (30 % EtOAc  
v PE),  $R_f = 0,71$  (30 % EtOAc v CHCl<sub>3</sub>).



$M_{EX} = 285,0557$   
 $[M+H]^+ = 287,0527$

IČ spektrum (tableta KBr),  $\text{cm}^{-1}$ : 3200, 3084, 3003, 2938, 1705,  
1672, 1597, 1487, 1429, 1379, 1241, 1160, 952, 870, 745, 705, 628,  
568, 500.



GC-EI-MS,  $m/z$ (%): 51(11), 64(11), 65(20), 77(21). 90(13), 91(79), 92(25), 102(11), 103(20), 120(13), 131(14), 249(21), 250(100), 251(37), 285(3), 286(1).

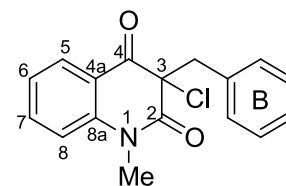
Pro C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> ClNO <sub>2</sub> :	vypočítané:	67,26 % C	4,23 % H	4,90 % N
	stanovené:	67,29 % C	4,42 % H	4,89 % N

### 1-Methyl-3-benzyl-3-chlorchinolin-2,4-(1*H*,3*H*)-dion (2b)

Žlutá krystalická látka;  $t_f = 140\text{--}145\text{ }^\circ\text{C}$  (Be);

výtěžek: 81 %;  $R_f = 0,53$  (30 % EtOAc v PE),  $R_f = 0,75$  (30 % EtOAc v CHCl<sub>3</sub>).

IČ spektrum (tableta KBr),  $\text{cm}^{-1}$ : 3065, 2954, 1702, 1672, 1601, 1475, 1424, 1361, 1300, 1175, 1097, 1003, 945, 764, 756, 701, 640, 628, 567, 516.



$M_{EX} = 299,0713$   
 $[M+H]^+ = 301,0684$

GC-EI-MS,  $m/z$  (%): 51(13), 65(13), 77(36), 78(12), 91(66), 103(19), 104(17), 131(25), 132(14), 134(26), 160(14), 248(27), 262(19), 263(22), 264(84), 265(100), 266(18), 299(2).

Pro C <sub>17</sub> H <sub>16</sub> ClNO <sub>2</sub> :	vypočítané:	67,66 % C	5,34 % H	4,64 % N
	stanovené:	67,76 % C	4,90 % H	4,63 % N

### 5.3 Příprava 3-(propargylamino)chinolin-2,4-(1*H*,3*H*)-dionů 3

Ke žlutému roztoku 3-chlorchinolindionu (15 mmol) ve 20 ml DMF byl za laboratorní teploty během 1 min přikapán roztok propargylaminu (45 mmol) v 5 ml DMF a získaný reakční roztok byl dále 24 h míchán při laboratorní teplotě. Během samotného přikapávání roztoku propargylaminu a při následném míchání docházelo ke změně barvy reakčního roztoku ze žluté na oranžovou až oranžovo-hnědou.

Jelikož během této doby míchání nenastala žádná významná konverze výchozí látky na žádaný produkt, byla reakční směs zahřívána na vodní lázni (35–40 °C) po dobu dalších 24 h, kdy už během první hodiny zahřívání se dle TLC výrazně zvýšil podíl produktu.

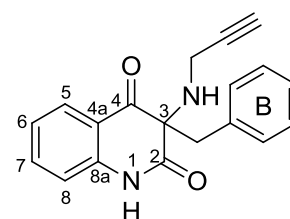
U derivátu **3a** se dále poměr výchozí látky ku produktu nijak výrazně nelišil, tak bylo přistoupeno ke zvýšení teploty vodní lázně na 40–45 °C, ve které se směs míchala dalších 12 h do vymizení výchozí látky. U obou experimentů došlo k vyloučení pevného podílu, který byl odfiltrován na fritě, promyt EtOAc, vysušen a identifikován jako

propargylamonium bromid, který byl zlikvidován. Dále byl tmavě hnědý filtrát odpařen na RVO do sucha za pomoci opakovaného odpařování s toluenem. Surový produkt byl opakovaně čistěn na sloupci silikagelu s využitím směsi  $\text{CHCl}_3/\text{EtOAc}$  v poměru 7/3 (v/v), čímž se úspěšně oddělil produkt **3** od 4-hydroxychinolin-2-onu.

### 3-Benzyl-3-(propargylamino)chinolin-2,4(1*H*,3*H*)-dion (3a)

Béžová krystalická látka;  $t_f = 178\text{--}182\text{ }^\circ\text{C}$  (EtOAc);  
výtěžek: 48 %,  $R_f = 0,24$  (30 %, EtOAc v Pe),  $R_f = 0,20$  (30 %  
EtOAc v  $\text{CHCl}_3$ ).

IČ spektrum (tableta KBr),  $\text{cm}^{-1}$ : 3257, 2117 ( $\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 1692,  
1667, 1613, 1492, 1466, 1446, 1432, 1383, 1338, 1292, 1239,  
1165, 1107, 940, 775, 734, 702, 670, 498.

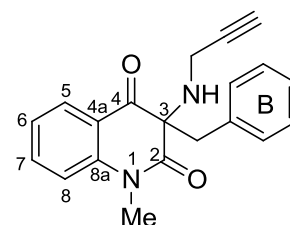


$M_{EX} = 304,1212$   
 $[M+H]^+ = 305,1245$

### 1-Methyl-3-benzyl-3-(propargylamino)chinolin-2,4(1*H*,3*H*)-dion (3b)

Béžová krystalická látka;  $t_f = 227\text{--}232\text{ }^\circ\text{C}$  (EtOAc);  
výtěžek: 31 %,  $R_f = 0,29$  (30 %, EtOAc v Pe),  $R_f = 0,25$  (30 %  
EtOAc v  $\text{CHCl}_3$ ).

IČ spektrum (tableta KBr),  $\text{cm}^{-1}$ : 3315, 3299, 2117 ( $\text{C}\equiv\text{CH}$ ),  
1689, 1648, 1471, 1366, 1305, 1246, 1100, 1011, 933, 841, 771,  
703, 650, 466.



$M_{EX} = 318,1368$   
 $[M+H]^+ = 319,1402$

GC-EI-MS,  $m/z(\%)$ : 50,95(10), 65(9), 91(31), 103(14), 104(11), 105(11), 106(8), 131(21),  
132(14), 134(18), 160(18), 248(28), 264(24), 265(100), 265(19).

## 5.4 Příprava 4-propargylbenzodiazepin-2,5-dionů 4

Smícháním výchozí látky 3-(propargylamino)chinolin-2,4-dionů (10 mmol) v 45 ml EtOH vznikla suspenze, která se během několika minut po přidání tetramethylguanidinu (20 mmol) v 5 ml EtOH změnila na roztok. Tento reakční roztok byl dále míchán při laboratorní teplotě po dobu uvedenou v tabulce ve **Schématu 17**. Po spotřebování výchozí látky byla reakční směs záměrně poškrábána špachtlí, kdy po několika desítkách minut

došlo k vyloučení pevné fáze. Pevný podíl byl přefiltrován přes fritu, promyt podchlazeným EtOH a vysušen. Filtrát byl zahuštěn na RVO a ponechán dále samovolně krystalizovat.

### 1,3-Difenyl-4-(propargyl)-3,4-dihydro-1H-benzo[e][1,4]diazepin-2,5-dion (4a)

Bílá krystalická látka;  $t_f = 171-175\text{ }^\circ\text{C}$  (EtOH);

výtěžek: 85 %,  $R_f = 0,5$  (30 % EtOAc v PE),  $R_f = 0,75$  (30 %

EtOAc v  $\text{CHCl}_3$ ),  $R_f = 0,65$  (6 % EtOAc v  $\text{CHCl}_3$ ).

IČ spektrum (tableta KBr),  $\text{cm}^{-1}$ : 3260, 3231, 2117 ( $\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 1678,

1639, 1602, 1493, 1464, 1424, 1345, 1256, 1238, 1152, 760, 709,

562, 516.

$^1\text{H}$  NMR spektrum (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), ppm:  $\delta$  2,32 (dd,

N-4- $\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$ ;  $J = 2,5$  Hz); 4,33 (dd; N-4- $\text{CH}_2\alpha\text{-C}\equiv\text{CH}$ ;  $J_{\text{-CH}_2\alpha\text{-},\text{-CH}_2\beta\text{-}} = 17,6$  Hz;

$J_{\text{-CH}_2\alpha\text{-},\text{-}\equiv\text{CH}} = 2,5$  Hz); 5,25 (dd; N-4- $\text{CH}_2\beta\text{-C}\equiv\text{CH}$ ;  $J_{\text{-CH}_2\beta\text{-},\text{-CH}_2\alpha\text{-}} = 17,6$  Hz;

$J_{\text{-CH}_2\beta\text{-},\text{-}\equiv\text{CH}} = 2,5$  Hz); 5,81 (s, H-3); 6,41 (dd; H-9  $J_{\text{H-9,H-8}} = 8,1$  Hz;  $J_{\text{H-9,H-7}} = 0,7$  Hz);

6,93 (ddd; H-7  $J_{\text{H-7,H-6}} = 7,6$  Hz;  $J_{\text{H-7,H-8}} = 7,6$  Hz;  $J_{\text{H-7,H-9}} = 1,1$  Hz);

6,98 (ddd; H-8  $J_{\text{H-8,H-7}} = 7,8$  Hz;  $J_{\text{H-8,H-9}} = 7,8$  Hz;  $J_{\text{H-8,H-6}} = 1,8$  Hz); 7,03–7,08 (m, H-B4);

7,11 (H-B3, dd;  $J_{\text{H-B3,H-B2}} = 7,6$  Hz;  $J_{\text{H-B3,H-B4}} = 7,6$  Hz); 7,11 (H-B5, dd;  $J_{\text{H-B5,H-B4}} = 7,6$

Hz;  $J_{\text{H-B5,H-B6}} = 7,6$  Hz); 7,16–7,21 (m, H-B2); 7,16–7,21 (m, H-B6); 7,28–7,33

(m, H-A2); 7,28–7,33 (m, H-A6); 7,33–7,38 (m, H-A4); 7,45 (dd; H-A3;  $J_{\text{H-A5,H-A4}} = 7,7$

Hz;  $J_{\text{H-A5,H-A6}} = 7,7$  Hz); 7,45 (dd; H-A5;  $J_{\text{H-A5,H-A4}} = 7,7$  Hz;  $J_{\text{H-A5,H-A6}} = 7,7$  Hz); 7,63 (dd;

H-6;  $J_{\text{H-6,H-7}} = 7,7$  Hz;  $J_{\text{H-6,H-8}} = 1,7$  Hz).

$^{13}\text{C}$  NMR spektrum (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), ppm:  $\delta$  39,02 (N-4- $\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$ ); 66,87 (C-3);

73,76 (N-4- $\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$ ); 77,47 (N-4- $\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$ ); 124,17 (C-9); 124,45 (C-B2 a

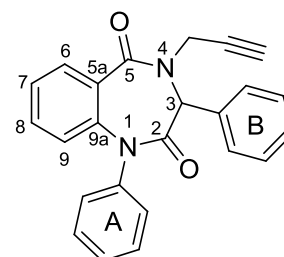
C-B6); 125,51 (C-7); 127,71 (C-B4); 127,96 (C-A4); 128,40 (C-A2 a C-A6); 128,46

(C-B3 a C-B5); 129,60 (C-A3 a C-A5); 129,95 (C-5a); 130,45 (C-6); 131,80 (C-8);

133,79 (C-B1); 139,44 (C-9a); 140,88 (C-A1); 166,62 (C-5); 168,46 (C-2).

GC-EI-MS,  $m/z$ (%): 51(11), 77(31), 92(14), 132(23), 166(15), 167(30), 195(100), 196(17),

223(34), 261(29), 327(19), 366(24).



$M_{EX} = 366, 1368$

$[M+H]^+ = 367, 1402$

HRMS (ESI+) pro  $C_{24}H_{19}N_2O_2^+$  ( $[M+H]^+$ ) vypočítané: 367,1441 ; nalezené: 367,1442.

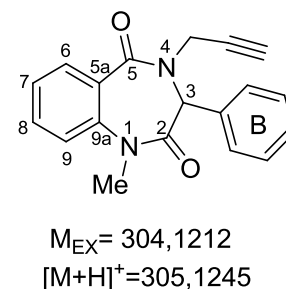
Pro $C_{24}H_{18}N_2O_2$ :	vypočítané:	78,24 % C	5,47 % H	7,60 % N
	stanovené:	78,26 % C	5,12 % H	7,66 % N

### 1-Methyl-3-fenyl-4-(propargyl)-3,4-dihydro-1H-benzo[e][1,4]diazepin-2,5-dion (4b)

Bílá krystalická látka;  $t_f = 170\text{--}174\text{ }^\circ\text{C}$  (EtOH);

výtěžek: 84 %.  $R_f = 0,31$  (30 % EtOAc v PE),  $R_f = 0,63$  (30 % EtOAc v  $CHCl_3$ ),  $R_f = 0,5$  (6 % EtOAc v  $CHCl_3$ ).

IČ spektrum (tableta KBr),  $cm^{-1}$ : 3239, 2122 ( $C\equiv CH$ ), 1678, 1631, 1601, 1469, 1371, 1267, 1245, 1157, 1137, 1048, 940, 763, 711, 612, 547.



$^1H$  NMR spektrum (500 MHz, DMSO), ppm:  $\delta$  3,35 (dd; N-4- $CH_2-C\equiv CH$ ;  $J_{CH-CH2\alpha} = 2,4$  Hz;  $J_{CH_2-CH2\beta} = 2,4$  Hz); 3,39 (s, N-1- $CH_3$ ); 4,58 (dd; N-4- $CH_2\alpha-C\equiv CH$   $J_{CH2\alpha-,CH2\beta} = 17,4$  Hz;  $J_{CH2\alpha-,CH} = 2,5$  Hz); 4,77 (dd; N-4- $CH_2\beta-C\equiv CH$   $J_{CH2\beta-,CH2\alpha} = 17,4$  Hz;  $J_{CH2\beta-,CH} = 2,5$  Hz); 5,71 (s, H-3); 6,89–6,94 (m, H-B2 a H-B6); 6,96–7,00 (m, H-7); 7,00–7,05 (m, H-B4); 7,05–7,13 (m, H-B3 a H-B5 a H-9); 7,25–7,31 (m, H-8); 7,39 (dd;  $J_{H-6,H-7} = 7,8$  Hz,  $J_{H-6,H-8} = 1,5$  Hz).

$^{13}C$  NMR spektrum (126 MHz, DMSO), ppm:  $\delta$  35,32 (N-1- $CH_3$ ); 38,74 (N-4- $CH_2-C\equiv CH$ ); 66,20 (C-3); 75,34 (N-4- $CH_2-C\equiv CH$ ); 78,75 (N-4- $CH_2-C\equiv CH$ ); 121,11 (C-9); 124,11 (C-B6 a C-B2); 124,86 (C-7); 127,24 (C-B4); 128,21 (C-B3 a C-B5); 128,53 (C-5a); 129,65 (C-6); 132,02 (C-8); 134,20 (C-B1); 139,33 (C-9a); 165,76 (C-5); 169,15 (C-2).

GC-EI-MS,  $m/z(\%)$ : 51(16), 63(13), 64(13), 77(50), 78(39), 90(19), 92(12), 104(100), 105(94), 106(10), 116(16), 116(11), 133(60), 142(17), 143(36), 144(94), 159(30), 161(55), 162(14), 199(28), 265(42), 304(42).

HRMS (ESI+) pro  $C_{19}H_{17}N_2O_2^+$  ( $[M+H]^+$ ) vypočítané: 305,1285; nalezené: 305,1282.

Pro $C_{19}H_{16}N_2O_2$ :	vypočítané:	74,49 % C	5,92 % H	9,14 % N
	stanovené:	74,77 % C	5,56 % H	9,20 % N

**3-Fenyl-4-(propargyl)-3,4-dihydro-1H-benzo[e][1,4]diazepin-2,5-dion (4c)**

Bílá krystalická látka;  $t_f = 265\text{--}268\text{ }^\circ\text{C}$  (EtOH);

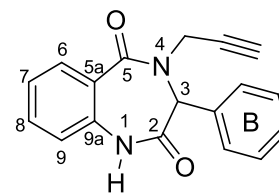
výtěžek: 90 %.  $R_f = 0,27$  (30 % EtOAc v PE),  $R_f = 0,40$

(30 % EtOAc v  $\text{CHCl}_3$ ),  $R_f = 0,19$  (6 % EtOAc v  $\text{CHCl}_3$ ).

IČ spektrum (tableta KBr),  $\text{cm}^{-1}$ : 3258, 3201, 3065, 2119

( $\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 1684, 1639, 1606, 1488, 1460, 1418, 1387, 1283, 1260,

1155, 798, 763, 734, 543, 489.



$M_{\text{EX}} = 290,1055$

$[M+H]^+ = 291,1089$

$^1\text{H}$  NMR spektrum (500 MHz, DMSO), ppm:  $\delta$  3,25–3,40 (m, N-4- $\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$ ); 4,58–4,76 (N-4- $\text{CH}_{2\alpha,\beta}\text{-C}\equiv\text{CH}$ ); 5,56 (s, H-3); 6,88 (d; H-9;  $J_{\text{H-9,H-8}} = 8,1$  Hz); 6,93 (dd; H-7;  $J_{\text{H-7,H-6}} = 7,5$  Hz;  $J_{\text{H-7,H-8}} = 7,5$  Hz); 7,00–7,11 (m, H-B2 a H-B4 a H-B6); 7,15 (dd; H-B3 a H-B5;  $J_{\text{H-B3,H-B2}} = 7,5$  Hz;  $J_{\text{H-B3,H-B4}} = 7,5$  Hz); 7,23 (dd; H-8;  $J_{\text{H-8,H-7}} = 7,6$  Hz;  $J_{\text{H-8,H-9}} = 7,6$  Hz); 7,48 (d; H-6;  $J_{\text{H-6,H-7}} = 7,6$  Hz); 10,74 (s; N-1-H).

$^{13}\text{C}$  NMR spektrum (126 MHz, DMSO), ppm:  $\delta$  39,02 (N-4- $\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$ ); 65,78 (C-3); 75,21 (N-4- $\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$ ); 78,96 (N-4- $\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$ ); 120,04 (C-9); 123,66 (C-7); 124,44 (C-B2 a C-B6); 126,22 (C-5a); 127,47 (C-B4); 128,33 (C-B3 a C-B5); 130,32 (C-6); 132,12 (C-8); 133,95 (C-B1); 135,36 (C-9a); 165,89 (C-5); 170,14 (C-2).  
GC-EI-MS,  $m/z$ (%): 51(11), 63(17), 64(30), 65(21), 76(11), 77(23), 89(12), 90(34), 91(24), 92(74), 104(20), 115(25), 116(12), 119(86), 120(20), 144(100), 145(12), 146(63), 147(12), 172(12), 185(75), 237(26), 251(44), 290(63), 291(13).

HRMS (ESI+) pro  $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_2^+$  ( $[M+H]^+$ ) vypočítané: 291,1128; nalezené: 291,1136.

Pro $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$ :	vypočítané:	73,95 % C	5,52 % H	9,58 % N
	stanovené:	74,04 % C	5,04 % H	9,62 % N

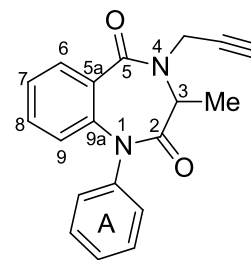
**1-Fenyl-3-methyl-4-(propargyl)-3,4-dihydro-1H-benzo[e][1,4]diazepin-2,5-dion (4d)**

Bílá krystalická látka;  $t_f = 175\text{--}179\text{ }^\circ\text{C}$  (EtOH);

výtěžek: 80 %.  $R_f = 0,33$  (30 % EtOAc v PE),  $R_f = 0,65$  (30 %

EtOAc v  $\text{CHCl}_3$ ),  $R_f = 0,5$  (6 % EtOAc v  $\text{CHCl}_3$ ).

IČ spektrum (tableta KBr),  $\text{cm}^{-1}$ : 3259, 2117 ( $\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 1688, 1652, 1601, 1453, 1407, 1369, 1331, 1305, 1260, 1240, 1164, 1061, 766, 713, 693, 674, 507.



$M_{EX} = 304,1212$

$[M+H]^+ = 305,1245$

$^1\text{H}$  NMR spektrum (500 MHz, DMSO), ppm:  $\delta$  1,53 (d; C-3- $\text{CH}_3$ ;

$J_{\text{CH}_3, \text{H-3}} = 6,9$  Hz); 3,11 (dd; N-4- $\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$ ;  $J_{\text{CH}_2, \text{CH}_2\alpha} = 2,4$  Hz;  $J_{\text{CH}_2, \text{CH}_2\beta} = 2,4$  Hz); 4,27 (dd; N-4- $\text{CH}_2\alpha\text{-C}\equiv\text{CH}$ ,  $J_{\text{CH}_2\alpha, \text{CH}_2\beta} = 17,8$  Hz,  $J_{\text{CH}_2\alpha, \text{CH}} = 2,4$  Hz); 4,37 (dd; N-4- $\text{CH}_2\beta\text{-C}\equiv\text{CH}$   $J_{\text{CH}_2\beta, \text{CH}_2\alpha} = 17,8$  Hz,  $J_{\text{CH}_2\beta, \text{CH}} = 2,4$  Hz); 4,48 (q; H-3,  $J_{\text{H-3}, \text{CH}_3} = 6,8$  Hz); 6,78 (d; H-9,  $J_{\text{H-9}, \text{H-8}} = 8,1$  Hz); 7,16–7,22 (m, H-A2 a H-A6); 7,29–7,39 (m, H-7 a H-A4); 7,42–7,49 (m, H-8 a H-A3 a H-A5); 7,77 (dd; H-6,  $J_{\text{H-6}, \text{H-7}} = 7,8$  Hz,  $J_{\text{H-6}, \text{H-8}} = 1,5$  Hz).

$^{13}\text{C}$  NMR spektrum (126 MHz, DMSO), ppm:  $\delta$  12,25 (C-3- $\text{CH}_3$ ); 30,56 (N-4- $\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$ ); 51,12 (C-3); 75,21 (N-4- $\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$ ); 73,51 (N-4- $\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$ ); 79,83 (N-4- $\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$ ); 124,11 (C-9); 125,39 (C-7); 127,45 (C-A4); 128,44 (C-A6 a C-A2); 128,81 (C-5a); 129,31 (C-A3 a C-A5); 129,99 (C-6); 12,02 (C-8); 140,27 (C-9a); 140,84 (C-A1); 168,61 (C-2).

GC-EI-MS,  $m/z(\%)$ : 51(14), 77(29), 92(15), 166(17), 167(29), 195(10), 196(20), 223(33), 261(50), 304(30).

HRMS (ESI+) pro  $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_2^+$  ( $[M+H]^+$ ) vypočítané: 305,1285; nalezené: 305,1290.

Pro $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$ :	vypočítané:	74,49 % C	5,52 % H	9,14 % N
	stanovené:	74,88 % C	5,57 % H	9,21 % N

**1,3-Dimethyl-4-(propargyl)-3,4-dihydro-1H-benzo[e][1,4]diazepin-2,5-dion (4e)**

Béžová pevná krystalická látka;  $t_f = 132\text{--}136\text{ }^\circ\text{C}$  (EtOH); výtěžek:

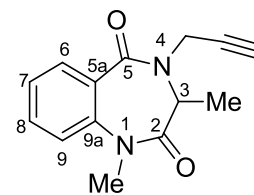
98 %.  $R_f = 0,18$  (30 % EtOAc v PE),  $R_f = 0,55$  (30 % EtOAc v  $\text{CHCl}_3$ ),

$R_f = 0,28$  (6 % EtOAc v  $\text{CHCl}_3$ ).

IČ spektrum (tableta KBr),  $\text{cm}^{-1}$ : 3251, 2117 ( $\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 1685, 1631,

1601, 1456, 1426, 1402, 1376, 1303, 1253, 1143, 1092, 1010, 766,

727, 663, 501.



$M_{EX} = 242,1055$

$[M+H]^+ = 243,1089$

GC-EI-MS,  $m/z$ (%): 51(12), 63(12), 64(13), 77(34), 78(28), 80(11), 81(18), 82(81), 90(12), 92(12), 104(76), 105(100), 106(10), 132(13), 133(75), 134(14), 161(66), 162(13), 199(17), 242(49).

Pro  $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$ : vypočítané: 69,41 % C 5,82 % H 11,56 % N

stanovené: 69,17 % C 6,15 % H 11,63 % N

**3-Methyl-4-(propargyl)-3,4-dihydro-1H-benzo[e][1,4]diazepin-2,5-dion (4f)**

Béžová pevná krystalická látka;  $t_f = 194\text{--}199\text{ }^\circ\text{C}$  (EtOH);

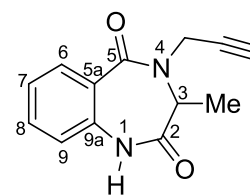
výtěžek: 89 %.  $R_f = 0,16$  (30 % EtOAc v PE),  $R_f = 0,46$

(30 % EtOAc v  $\text{CHCl}_3$ ),  $R_f = 0,22$  (6 % EtOAc v  $\text{CHCl}_3$ )

IČ spektrum (tableta KBr),  $\text{cm}^{-1}$ : 3257, 3222, 2117 ( $\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 1693,

1625, 1484, 1442, 1410, 1350, 1328, 1293, 1259, 1224, 1063, 1014,

934, 766, 711, 634, 524.



$M_{EX} = 228,0899$

$[M+H]^+ = 229,0932$

GC-EI-MS,  $m/z$ (%): 42(11), 63(14), 64(22), 65(14), 82(100), 90(16), 91(11), 92(46), 119(54), 120(11), 146(17), 185(27), 228(36).

HRMS (ESI+) pro  $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_2^+$  ( $[M+H]^+$ ) vypočítané: 229,0972; nalezené: 229,0969.

Pro  $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$ : vypočítané: 68,41 % C 5,30 % H 12,27 % N

stanovené: 68,23 % C 5,62 % H 12,21 % N

**3-Benzyl-4-(propargyl)-3,4-dihydro-1H-benzo[e][1,4]diazepin-2,5-dion (4g)**

Běžová pevná krystalická látka;  $t_f = 132\text{--}136\text{ }^\circ\text{C}$  (EtOH);

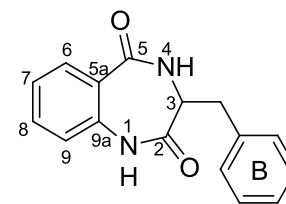
výtěžek: 63 %.  $R_f = 0,18$  (30 % EtOAc v PE),  $R_f = 0,55$  (30 %

EtOAc v  $\text{CHCl}_3$ ),  $R_f = 0,28$  (6 % EtOAc v  $\text{CHCl}_3$ ).

IČ spektrum (tableta KBr),  $\text{cm}^{-1}$ : 3251, 2117 ( $\text{C}\equiv\text{CH}$ ), 1685, 1631,

1601, 1456, 1426, 1402, 1376, 1303, 1253, 1143, 1092, 1010, 766,

727, 663, 501.



$M_{EX} = 266,1055$

$[M+H^+] = 267,1089$

GC-EI-MS,  $m/z$ (%): 51(12), 63(12), 64(13), 77(34), 78(28), 80(11), 81(18), 82(81), 90(12), 92(12), 104(76), 105(100), 106(10), 132(13), 133(75), 134(14), 161(66), 162(13), 199(17), 242(49).

Pro  $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$ : vypočítané: 69,41 % C 5,82 % H 11,56 % N

stanovené: 69,17 % C 6,15 % H 11,63 % N

**5.5 Příprava benzo[e]pyrrolo[1,2-a][1,4]diazepin-5,11-dionu 5**

K roztoku *N*-propargylbenzodiazepindionu **4** (1 mmol) v 5 ml DMF byl za laboratorní teploty přidán NaH (0,5 mmol) a získaná suspenze byla míchána po dobu uvedenou v tabulce ve **Schématu 19** při laboratorní teplotě. Následně byl reakční roztok zředěn 15 ml destilované vody a získaný opalescentní roztok byl v dělicí nálevce extrahován  $4 \times 15$  ml EtOAc. Veškeré organické podíly byly spojeny, vysušeny  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , přefiltrovány a odpařeny do sucha.

Zbýlý vodný podíl byl slabě okyselen HCl a opět extrahován  $2 \times 15$  ml EtOAc. Z takto získaných organických podílů nebylo v uvedených případech získáno žádné chemické individuum.

Získané surové produkty byly chromatograficky čištěny na sloupci silikagelu s využitím ethyl-acetátu v petroletheru jako mobilní fáze.

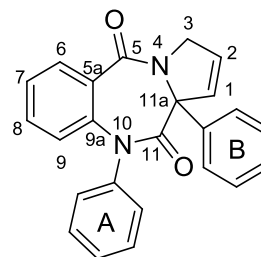


**10,11a-Difenyl-3H-benzo[e]pyrrolo[1,2-a][1,4]diazepin-5,11(10H,11aH)-dion (5a)**

Bílá pevná látka,  $t_f = 220\text{--}223\text{ }^\circ\text{C}$ ;  $R_f = 0,27$ , (30 % EtOAc v Pe);

$R_f = 0,39$  ( $\text{CHCl}_3$ ).

IČ spektrum (tableta KBr),  $\text{cm}^{-1}$ : 3112, 3053, 2869, 1693, 1644, 1623, 1490, 1457, 1410, 1328, 1259, 1166, 1128, 1090, 1002, 899, 752, 720, 697, 608.



$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO) ppm:  $\delta$  4,58–4,66 (m, H–3 $\alpha$ ) 4,67–4,75 (m, H–3 $\beta$ ); 5,90–5,97 (m, H–2), 6,01–6,09 (m, H–1); 6,38 (d, H–9,

$M_{\text{EX}} = 366,4119$   
 $[\text{M}+\text{H}^+] = 367,1402$

$J_{\text{H-9,H-8}} = 8,2$  Hz), 6,99 (dd, H–7,  $J_{\text{H-7,H-6}} = 7,4$  Hz,  $J_{\text{H-7,H-8}} = 7,4$  Hz), 7,03–7,12 (m, H–B2, H–B4, H–B6, H–8); 7,12–7,19 (m, H–B3, H–B5); 7,33 (dd, H–A2, H–A6,  $J_{\text{H-A2,H-A3}} = 7,5$  Hz); 7,39 (t, H–A4,  $J_{\text{H-A4,H-A3}} = 7,4$  Hz); 7,49 (dd, H–A3, H–A5,  $J_{\text{H-A3,H-A2}} = 7,7$  Hz,  $J_{\text{H-A3,H-A4}} = 7,7$  Hz); 7,56 (dd, H–6,  $J_{\text{H-6,H-7}} = 7,8$  Hz,  $J_{\text{H-6,H-8}} = 1,3$  Hz) .

$^{13}\text{C}$  NMR spektrum (126 MHz, DMSO), ppm:  $\delta$  55,43 (C–3); 76,68 (C–11a); 122,83 (C–1); 123,96 (C–B2; C–B6); 125,07 (C–7); 127,57 (C–B4); 127,73 (C–A4); 128,61 (C–B3 a C–B5); 128,65 (C–A6 a C–A2); 129,35 (C–6); 129,43 (C–5a); 129,47 (C–A5 a C–A3); 131,73 (C–8); 133,18 (C–2); 137,99 (C–B1); 138,93 (C–9a); 141,32 (C–A1); 164,05 (C–5); 169,38 (C–1).

GC-EI-MS,  $m/z$ (%): 51(13), 77(31), 92(15), 115(12), 128(13), 143(29), 166(17), 167(32), 195(100), 196(72), 223(34), 224(39), 366(13).

HRMS (ESI+) pro  $\text{C}_{24}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_2^+$  ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) vypočítané: 367,1441; nalezené: 367,1438.

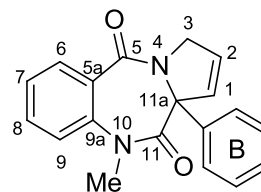
Pro $\text{C}_{24}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$ :	vypočítané:	78,67 % C	4,95 % H	76,65 % N
	stanovené:	78,37 % C	5,35 % H	7,58 % N

**10-Methyl-11a-fenyl-3H-benzo[e]pyrrolo[1,2-a][1,4]diazepin-5,11(10H,11aH)-dion (5b)**

Nažloutlé krystaly,  $t_f = 215\text{--}220\text{ }^\circ\text{C}$  (Be);  $R_f = 0,19$

(30 % EtOAc v PE);  $R_f = 0,35$  ( $\text{CHCl}_3$ );

IČ spektrum (tableta KBr),  $\text{cm}^{-1}$ : 2859, 1668, 1643, 1619, 1602, 1463, 1409, 1359, 1262, 1224, 1084, 1050, 1002, 972, 761, 732, 722, 704, 687, 532, 426.



$M_{\text{EX}} = 304,1212$   
 $[\text{M}+\text{H}^+] = 305,1245$

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO) ppm:  $\delta$  3,40 (s, N–10–H), 4,54

(ddd; H-3 $\alpha$ ,  $J_{H-3\alpha, H-3\beta} = 16,9$  Hz;  $J_{H-3\alpha, H-1} = 2,0$  Hz;  $J_{H-3\alpha, H-2} = 2,0$  Hz); 4,65 (ddd;  $J_{H-3\beta, H-3\alpha} = 16,9$  Hz;  $J_{H-3\beta, H-1} = 2,0$  Hz); 5,93 (ddd; H-1,  $J_{H-1, H-2} = 6,2$  Hz,  $J_{H-1, H-3\alpha} = 2,0$  Hz,  $J_{H-1, H-3\beta} = 2,0$  Hz); 6,01 (ddd; H-2,  $J_{H-2, H-1} = 6,2$  Hz,  $J_{H-2, H-3\alpha} = 1,8$  Hz,  $J_{H-2, H-3\beta} = 1,8$  Hz); 6,82–6,88 (m, H-B2, H-B6); 6,98–7,03 (m, H-7, H-B4); 7,04–7,09 (m, H-B3, H-B5); 7,11 (d; H-9;  $J_{H-9, H-8} = 7,8$  Hz); 7,28 (ddd; H-8,  $J_{H-8, H-7} = 8,8$  Hz,  $J_{H-8, H-9} = 7,4$  Hz,  $J_{H-8, H-6} = 1,7$  Hz); 7,46 (dd; H-6,  $J_{H-6, H-7} = 7,8$  Hz,  $J_{H-6, H-8} = 1,6$  Hz).

$^{13}\text{C}$  NMR spektrum (126 MHz, DMSO), ppm:  $\delta$  36,17 (N-10-CH<sub>3</sub>); 55,30 (C-3); 76,59 (C-11a); 121,70 (C-9); 122,31 (C-2); 123,91 (C-B2 a C-B6); 124,83 (C-7); 127,43 (C-B4); 128,42 (C-B3 a C-B5); 128,84 (C-5a); 129,03 (C-6); 131,93 (C-8); 133,53 (C-1); 138,29 (C-B1); 139,47 (C-9a); 164,20 (C-5), 170,62 (C-11). GC-EI-MS,  $m/z$ (%): 77(31), 78(26), 90(13), 104(57), 105(51), 115(19), 116(13), 128(30), 133(36), 134(68), 143(38), 144(100), 145(11), 161(19), 162(48), 304(16).

Pro C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :	vypočítané:	74,98 % C	5,30 % H	9,20 % N
	stanovené:	74,93 % C	5,71 % H	9,22 % N

### Příprava 3-fenyl-4-(propa-1,2-dien-1-yl)-3,4-dihydro-1H-benzo[e][1,4][1,4]diazepin-2,5-dion (6)

Vyjma rozdílného množství NaH, které v tomto případě bylo 1,5 ekvivalentu vůči výchozí látce, byl postup zpracování identický s postupem uvedeným v odstavci 5.5.

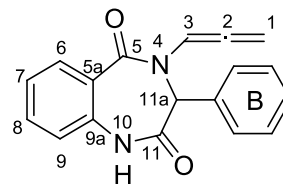
Bílá pevná látka,  $t_f = 194$ – $199$  °C; výtěžek: 58 %,  $R_f = 0,35$ , (6 % EtOAc v CHCl<sub>3</sub>);  $R_f = 0,35$  (30 % EtOAc v PE).

IČ spektrum (tableta KBr), cm<sup>-1</sup>: 3204, 3057, 1685, 1644, 1606, 1583, 1487, 1449, 1409, 1294, 1245, 1159, 1082, 894, 755, 736, 640, 541, 489.

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO) ppm:  $\delta$  5,57 (s, H-3), 5,70 (dd;

N-4-CH=C=CH<sub>2</sub> $\alpha$ ;  $J_{\text{CH}2\alpha, \text{CH}2\beta} = 11,2$  Hz;  $J_{\text{CH}2\alpha, \text{CH}} = 6,4$  Hz); 5,77 (dd;

N-4-CH=C=CH<sub>2</sub> $\beta$ ,  $J_{\text{CH}2\beta, \text{CH}2\alpha} = 11,2$  Hz;  $J_{\text{CH}2\beta, \text{CH}} = 6,4$  Hz); 6,89–7,00 (m, H-7, H-9, H-B2, H-B6); 7,06–7,12 (m, H-B4); 7,17 (dd;  $J_{H-B3, H-B2} = 7,6$  Hz;  $J_{H-B3, H-B4} = 7,6$  Hz a dd;  $J_{H-B5, H-B4} = 7,6$  Hz;  $J_{H-B5, H-B6} = 7,6$  Hz); 7,26–7,33 (m, H-8);



$M_{\text{EX}} = 278,1055$

$[M+H^+] = 279,1089$

7,49 (dd; H-6,  $J_{\text{H-6,H-7}} = 7,9$  Hz;  $J_{\text{H-6,H-8}} = 1,4$  Hz); 7,85 (dd; N-4-CH=C=CH<sub>2</sub>,  $J_{\text{-CH=,=CH}_2\alpha} = 6,4$  Hz,  $J_{\text{-CH=,=CH}_2\beta} = 6,4$  Hz); 10,97 (s, N-1-H).

<sup>13</sup>C NMR spektrum (126 MHz, DMSO), ppm:  $\delta$  62,93 (C-3); 90,55 (N-4-CH=C=CH<sub>2</sub>); 101,15 (N-4-CH=C=CH<sub>2</sub>); 120,26 (C-9); 123,93 (C-7); 123,97 (C-B2 a C-B6); 125,70 (C-5a); 1128,76 (C-B3 a C-B5); 127,74 (C-B4); 130,72 (C-6); 132,62 (C-8); 133,17 (C-B1); 135,24 (C-9a); 164,15 (C-5); 168,99 (C-2); 200,20 (N-4-CH=C=CH<sub>2</sub>). GC-EI-MS,  $m/z$ (%): 43(41), 44(27), 48(14), 51(31), 52(11), 57(14), 63(16), 64(46), 65(26), 66(15), 74(18), 75(26) 76(21), 77(38), 78(16), 89(26), 90(30), 91(16), 102(17), 103(11), 115(50), 116(20), 117(17), 118(13), 119(58), 120(52), 130(11), 143(100), 144(36), 145(11), 146(20), 147(15), 159(11), 168(13), 184(11), 185(31), 186(16), 194(11), 207(42), 209(11), 214(15), 221(11), 234(13), 261(12), 273(26), 280(10), 290(39), 291(14), 321(12).

Pro C <sub>18</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :	vypočítané:	74,47 % C	4,80 % H	9,65 % N
	stanovené:	74,04 % C	5,28 % H	9,57 % N

## 5.6 Pokus o deuterizaci sloučeniny 4a uskutečněný v DMSO

K roztoku *N*-propyrgylbenzodiazepinudionu (0,5 mmol) ve 30 ml DMSO byla přidána vyžíhaná potaš (0,525 mmol) a těžká voda (3 ml, 166 mmol). Reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě pod inertní atmosférou argonu po dobu 3 hodin. Po ukončení míchání byl reakční roztok pod inertní atmosférou extrahován 10 × 25 ml vysušeného Et<sub>2</sub>O. Veškeré organické podíly byly spojeny, vysušeny vyžíhaným Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> přefiltrovány pod argonem a na RVO byl odpařen Et<sub>2</sub>O. Zbýlý DMSO byl 10 hodin lyofilizován s využitím běžné olejové vývěvy. Z důvodu nesnadného odstranění DMSO byl obsah baňky zahříván horkovzdušnou pistolí, na níž byla nastavena teplota 120 °C. Takto získaný surový produkt byl měřen pomocí NMR.

## 5.7 Pokus o deuterizaci sloučeniny 4a uskutečněný v MeCN

K roztoku *N*-propyrgylbenzodiazepinudionu (0,25 mmol) ve 2 ml MeCN byla přidána vyžíhaná potaš (0,375 mmol) a těžká voda (454  $\mu$ l, 25 mmol). Reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě pod inertní atmosférou argonu po dobu 3 hodin. Po ukončení

míchání byl reakční roztok pod inertní atmosférou extrahován  $5 \times 25$  ml vysušeného dichlormethanu. Veškeré organické podíly byly spojeny, vysušeny vyžíhaným  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  přefiltrovány pod argonem a odpařeny na RVO do sucha. Takto získaný surový produkt byl měřen pomocí NMR.

## ZÁVĚR

Hlavním úkolem a cílem diplomové práce bylo již dříve připravené 3-(propargylamino)chinolin-2,4(1*H*,3*H*)-diony **3a–3f** vhodnou metodou převést na odpovídající 4-propargyl-3,4-dihydro-1*H*-benzo[*e*][1,4]diazepin-2,5-diony **4a–4f**. Za tímto účelem byl proveden jeden experiment s mírně modifikovanými podmínkami, při kterých byla expanze heterocyklického kruhu chinolindionu prvně pozorována. Tímto postupem, více jak půldenním zahříváním roztoku **3a** v DMF s dvoumolárním nadbytkem TMG, byly překvapivě izolovány pouze stopy benzodiazepinu **4a** a téměř polovina teoretického množství pyrrolobenzodiazepinu **5a**. Pouhá změna rozpouštědla (viz **Schéma 17**) vedla k tomu, že propargylaminochinolindiony **3a–3f** lze během jednoho dne při laboratorní teplotě téměř kvantitativně konvertovat na odpovídající benzodiazepiny **4a–4f**.

Před samotným podrobením látek **4** bazicky indukovaným intramolekulárním přesmykům byly ve vialkách provedeny screeningové reakce monitorované pomocí chromatografie na tenké vrstvě a plynové chromatografie s hmotnostní detekcí, které sloužily pouze k nalezení vhodné báze a rozpouštědla způsobující přeměnu původní látky **4a** na sloučeninu **5a**. Podmínkám, jež vyplynuly z nejlepšího dosaženého výsledku, byly vystaveny čtyři deriváty **4a–4d**, z nichž bez jakýchkoli závažných problémů poskytly toužené produkty pouze sloučeniny **4a** a **4b**. Aby bylo možné přimět *N*-nesubstituovaný analog **4c** k jakékoli přeměně, bylo nezbytné původní 50% množství NaH zvýšit na 1,5 ekvivalentu NaH vůči výchozí látce **4c**. Rozborem NMR spekter a z výsledku rentgenové difrakční analýzy bylo zjištěno, že dochází pouze k izomerizaci alkynylové skupiny za vzniku kumulovaných dvojných vazeb allenylu. 3-Methylový derivát benzodiazepinu **4d** je taktéž k neekvivalentnímu množství hydridu značně rezistentní, ovšem při plynulém zvyšování dávek NaH v rozmezí 1–2 ekvivalentů oproti výchozí látce vznikaly velmi komplikované směsi produktů, které nebylo možné pomocí několikanásobné chromatografie na sloupci silikagelu separovat. Z rozboru GC-MS spekter bylo dedukováno, že se molekula **4d** účinkem NaH v odlišných místech molekuly štěpí. Z provedených pokusů směřovaných k cyklizaci propargylové skupiny 3-methylových derivátů za vzniku pyrrolového kruhu je více než jasné, že v těchto případech není používání hydridu dobrá volba. V budoucnu bude nezbytné prověřit účinek jiných silných bází (Triton B, KHMDS, LiHMDS) nebo superbází, jako jsou fosfazeny (P<sub>2</sub>-*t*-Bu, P<sub>4</sub>-*t*-Bu, ...).

Pro neočekávaný rozdíl reaktivity 3-fenyl-4-propargylbenzodiazepindionů **4a–4c** a 3-methyl-4-propargylbenzodiazepindionu **4d** byly od základních surovin, anilinu a substituovaného esteru malonové kyseliny, připraveny dva 3-benzyl-4-hydroxychinolin-2(1*H*)-ony, které po chloraci sulfurylchloridem v dioxanu při mírně zvýšené teplotě a následné nukleofilní substituci atomu halogenu propargylaminem v DMF poskytly 3-benzyl-3-(propargylamino)chinolin-2,4(1*H*,3*H*)-diony, z nichž byl účinkem přebytku TMG v DMF připraven doposud pouze jeden 3-benzyl-4-propargylbenzodiazepindion **4g**. Benzylové analogy, protože jsou na pomezí mezi methylovým a fenylovým substituentem, jsou připravovány pro doplnění poznatků o cyklizaci propargylové skupiny zahájené účinkem NaH a výsledky z ní plynoucí budou nezbytnou součástí "skládanky".

## SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

CNS	centrální nervový systém
EtOAc	ethyl-acetát
GABA-A	$\gamma$ -aminomáslená kyselina A
NAD	nikotinamidadenindinukleotid
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti
cHex	cyklohexan
Ph	fenyl
ESI-IT-MS	hmotnostní spektrometrie s iontovou pastí a elektrosprejovou ionizací
HRMS	hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením
EA	elementární analýza
X-Ray	rentgenové záření
Et <sub>2</sub> O	diethyl ether
H-MCM-22	typ hydrotermálního vrstveného hlinitokřemičitanu
EtOH	ethanol
NMR	nukleární magnetická rezonance
LD <sub>50</sub>	letální dávka způsobující úhyn 50 % testovaných organismů do 24 hodin
in vivo	testování v přirozených podmínkách
in vitro	testování v umělých podmínkách
RNA	ribonukleová kyselina
DNA	deoxyribonukleová kyselina
PP-PBD	fenantrylfenoxy-pyrrolobenzodiazepiny
MTT test	tetrazoliový test mikrokultur
SRB test	sulfát redukující bakterie
NMM	<i>N</i> -methylnorpholin
DCC	dicyklohexylkarbodiimid
BTOH	<i>N</i> -hydroxybenzotriazol
TEA	triethylamin
Tos	top-methylfenyl
DMF	dimethylformamid
TMG	<i>N, N, N', N'</i> -tetramethylguanidin
GC-MS	plynová chromatografie s hmotnostní detekcí
Me	methyl
MeOH	methanol
Be	benzen
DMAP	4-(dimethylamino)pyridin
THF	tetrahydrofuran
MeO <sup>-</sup> Na <sup>+</sup>	methoxid sodný
DMSO	dimethylsulfoxid
MeCN	acetonitril

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- <sup>1</sup> Wick, JY. *Consult Pharm.* **2013**, 28, 538–548.
- <sup>2</sup> Dassanayake, T., Michie, P., a ostatní. *Drug-Safety.* **2011**. 34. 125.
- <sup>3</sup> Castleman, M. *The New Healing Herbs.* **2004**.
- <sup>4</sup> Chevallier, A. *Enc. Of Med. Plants.* **2007**.
- <sup>5</sup> Hui, M., K., Huen, M., S., a ostatní. *Bioch. Pharm.* **2002**, 64, 9, 1415–1424.
- <sup>6</sup> Griffin, Ch., E.; Kaye, A., M.; Bueno, F., R.; Kaye, A., D. *The Ochs.r Jour.* **2013**, 13, 214–223.
- <sup>7</sup> Rowlett, J., K., Lelas, S., Walter, T., Licata, S., C. *Psychopharm.;* **2006**, 184, 201–211.
- <sup>8</sup> Nováková, J.; Dostálek, M.; Juřica, J.; Tomandl, J.; Hadašová, V.; Šulcová, A.; *Adiktologie*, **2005**, 5, 382–391.
- <sup>9</sup> Bracken, A., Pocker, A., Raistrick, H., *Biochem. J.* **1954**, 57, 587–595.
- <sup>10</sup> Birkinshaw. J. H.. Luckner. M.. Mohamed. Y. S.. Mothes, K., and Stickings, C. E., *Biochem. J.* **1963**, 89, 196–202.
- <sup>11</sup> Nover, L., Luckner, M. *Eur. Biochem. J.*, **1969**, 10, 268–273.
- <sup>12</sup> Framm J., Nover L., Azzouny A. E., Richter H., Winter K., Werner S., Luckner M.: *Biochem. J.*; **1973**, 37, 78–85.
- <sup>13</sup> Mohamed, L., W., Mohamed, F., E-Y. *Arch. pharm. Res.* **2012**, 35, 1369–1377.
- <sup>14</sup> Mohammed, Y., S.; Luckner, M.; *T. Lett.* **1963**, 4, 1953–1958.
- <sup>15</sup> Helbig, F., Steighardt, J., Roos, W.; *Appl. Envir. Microb.* **2002**, 68, 1524–1533.
- <sup>16</sup> Ding, Ch., Z., Batorsky, R., a ostatní. *J.Med. Chem.* **1999**, 42, 5241–5253.
- <sup>17</sup> Rajesh, K., Joshi, Y., C.; *RSC Ad.* **2007**, 13, 142–149.
- <sup>18</sup> Hollywood, F., Hull, R., a ostatní. *Jour. Chem. Soc.*; **1982**, 431–433.
- <sup>19</sup> Sashida, H., Fujii, A., Tsuchiya, T. *Chem. and pharm. Bull.* **1987**, 35, 4110–4116.
- <sup>20</sup> Hollywood, F.; Hull, R.; a ostatní. *J. Chem. Soc., Perk. Trans.* **1982**, 431–433.
- <sup>21</sup> Sashida, H., Fujii, A., Tsuchiya, T. *Chem. and pharm. Bull.* **1987**, 35, 4110–4116.
- <sup>22</sup> Jung, D., I., Choi, T., W., a ostatní. *Synth. Comm.* **1999**, 29, 1941–1951.
- <sup>23</sup> Majid, S., A., Khanday, W., A., Tomar, R. *J. Biomed. and Biotech.* **2012**, 1–6.
- <sup>24</sup> Reddy, K., S., a ostatní. *Can. J. Chem.*, **2017**, 85.



- <sup>25</sup> Ugi, I.; Meyr, R.; Fetzer, U.; Steinbrückner, C. *Angew. Chem.* **1959**, *71*, 386.
- <sup>26</sup> Keating, T., A., Armstrong, R., W. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 8935–8939.
- <sup>27</sup> BROSSI, A.; *THE ALKALOIDS.* **1990**, *39*, 90–100.
- <sup>28</sup> Framm J., Nover L., Azzouny A. E., Richter H., Winter K., Werner S., Luckner M.: *J. Biochem.* **1973**, *37*, 78–85.
- <sup>29</sup> Vardanyan, R.; Hruby, V., J. *Synt. Ess. Drug*, **2006**, 70–131.
- <sup>30</sup> Cargill, C.; Bachmann, E.; Zbinden, G. *J. Nat. Cancer Inst.* **1974**, *53*, 481–486.
- <sup>31</sup> Hurley, L., H.; *The J. Antib.* **1977**, *30*, 349–370.
- <sup>32</sup> Thurston, D., E.; Bose, D., S.; *Chem. Rev.* **1994**. 433–465.
- <sup>33</sup> Sartorelli, A., C.; Johns, D., G.; *Sci. and Bus. Media.* **2016**, *1*, 647.
- <sup>34</sup> Kitamura, T.; Yoshihiro, S.; Miwako, M.; *T. Letters*; **2004**, *60*, 9649–9657.
- <sup>35</sup> Mostad, A.; Romming, Ch.; Storm, B.; *Acta Chem. Scand.* **1978**, *32*, 639–645.
- <sup>36</sup> Arima, K.; Kosaka, M.; Tamura, G.; Imanaka, H.; Sakai, H. *The J. Ant.* **1972**, *25*, 437–444.
- <sup>37</sup> Schneditz, G.; Rentner, J.; Roier, S.; Pletz, J.; Herzog, K., A., T.; Bucker, R.; Troeger, H.; Schild, S.; Weber, H.; Breinbauer, R.; Gorkiewicz, G.; Hogenauer, Ch.; Zechner, E., L.; *Geo. Schn.* **2014**, *111*, 13181–13186.
- <sup>38</sup> Pierce, J.; Nazimiec, M.; Tang, M.-S. *Biochemistry* **1993**, *32*, 7069–7078.
- <sup>39</sup> Rahman, K. M.; Rosado, H.; Moreira, J., B.; Feuerbaum, E., A.; Fox, K., R.; Stecher, E.; Howard, P., W.; Gregson, S., J.; James, C., H.; Fuente, M.; Waldron, D., E.; Thurston, D., E.; Taylor, P., W.; *J. Antimc. Chem.* **2012**, *67*, 1683–1696.
- <sup>40</sup> Voigt, W.; *Meth. Mol. Med.* **2005**, *110*, 39–48.
- <sup>41</sup> Reddy, B. V. S.; Reddy, Y. V.; Singarapu, K. K.; *Org. And Biom. Chem.* **2016**, *3*.
- <sup>42</sup> Kraus, G. A.; Melekhov, A.; *T. Letters.*; **1998**, *54*, 11749–11754.
- <sup>43</sup> Mu, S.; Niu, D.; Liu, Y.; Zhang, D.; Liu, D.; Liu, Ch.; *J. Heter. Chem.* **2015**, *52*, 1608–1613.
- <sup>44</sup> Tang, H.; Zhao, G.; Zhou, Z.; Zhou, Q.; Tang, Ch.; *T. Lett.*; **2006**, *47*, 5717–5721.
- <sup>45</sup> Klásek, A.; Polis, J.; Mrkvička, V.; Košmrlj, *J. Heter. Chem.* **2002**, *39*, 1315–1320.
- <sup>46</sup> Kafka, S.; Klásek, A.; Polis, J.; Košmrlj, *Heterocycles* **2002**, *57*, 1659–1682.
- <sup>47</sup> Křemen, F.; Gazvoda, M.; Kafka, S.; Proisl, K.; Sřholcová, A.; Klásek, A.; Urankar, D.; Košmrlj, J.; *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 715–722.

<sup>48</sup> Liu, Y.; Xu, W.; Wang, X.; *Org. T. Letters*. **2010**, *12*, 1448–1451.

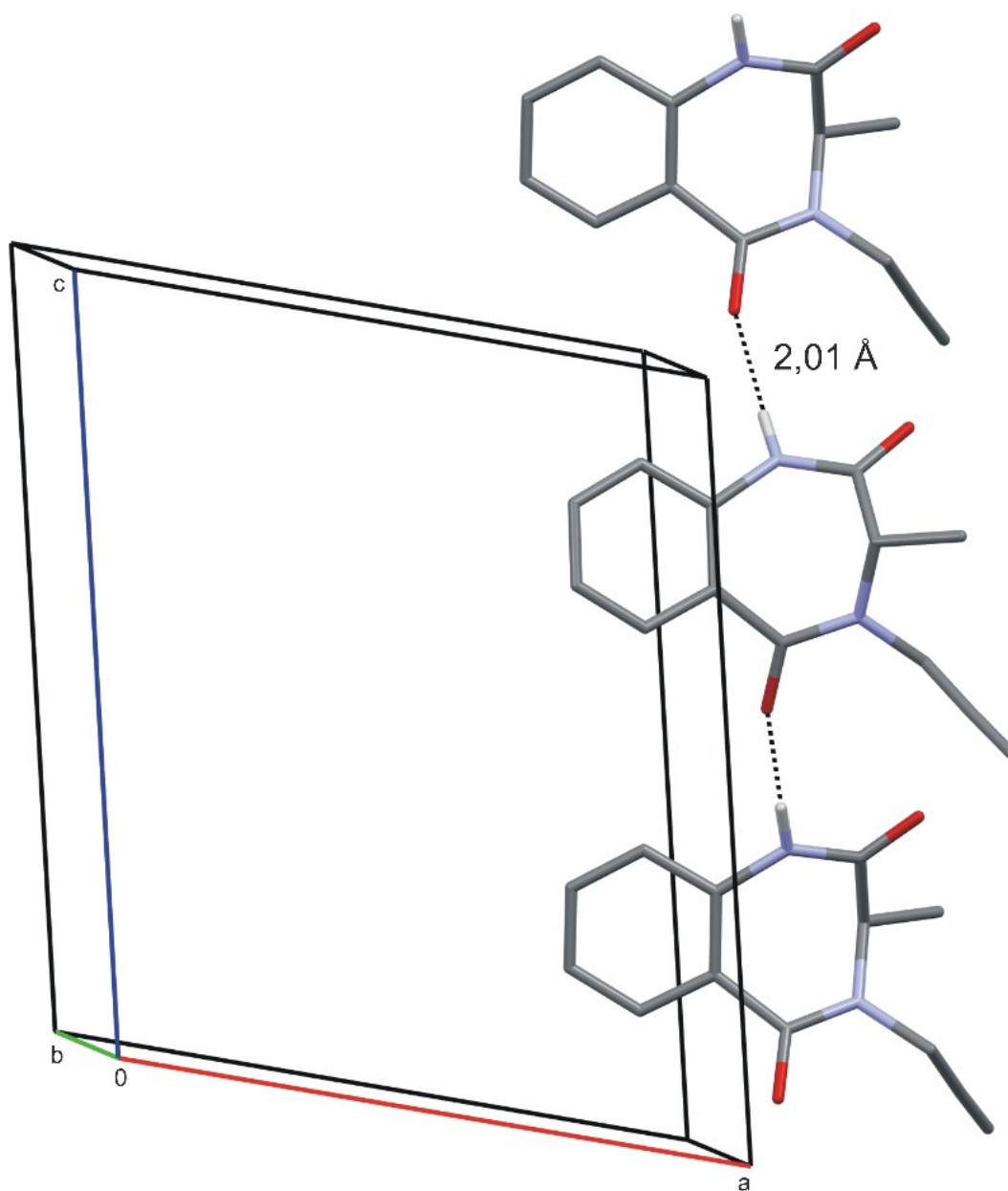
<sup>49</sup> Bezuglyi, P., A.; Ukrainets, I., V.; Treskach, V., I.; Turov, A., V.; *Chem. Heter. Comp.* **1991**, *27*, 1237–1238.

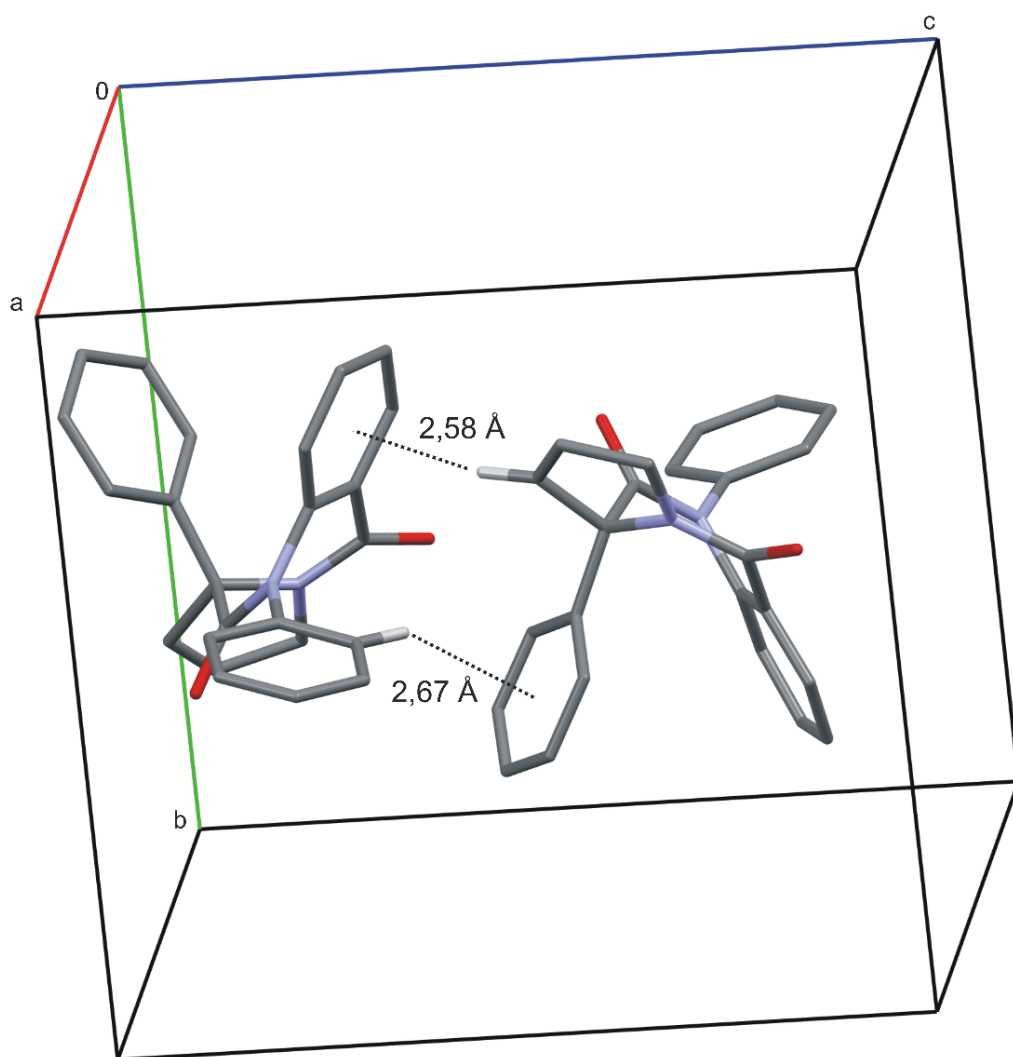
<sup>50</sup> Grigg, R.; Whitney, S.; Sridharan, V.; Keep, A.; Derrick, A.; *T. Letters*; **2009**, *65*, 7468–7473.

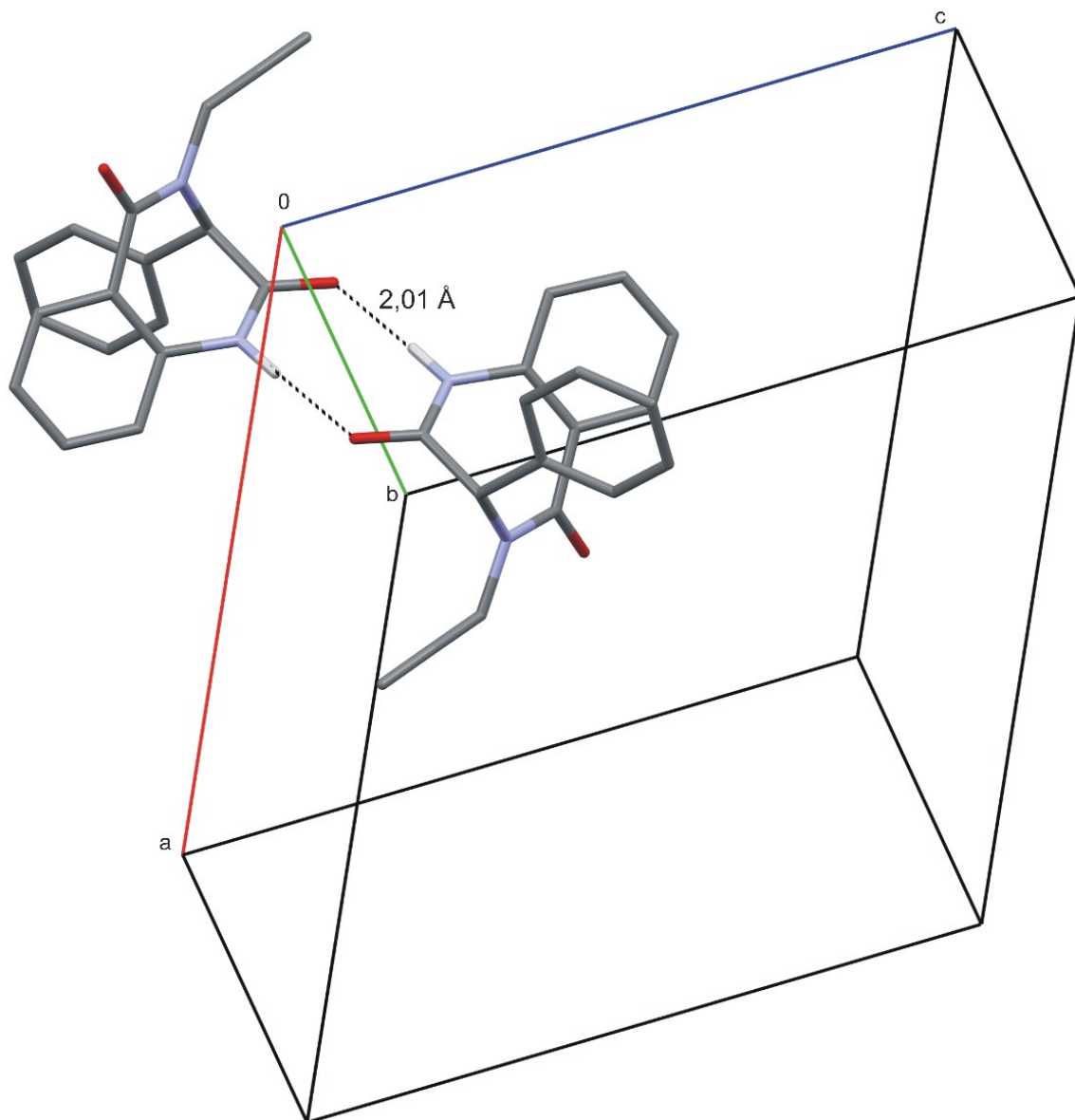
<sup>51</sup> Stadlbauer, W.; Laschober, R.; Lutschounig, H.; Schindler, G.; Kappe, T.; *Monat. Für Chem.* **1992**, *123*, 617–636.

## PŘÍLOHY

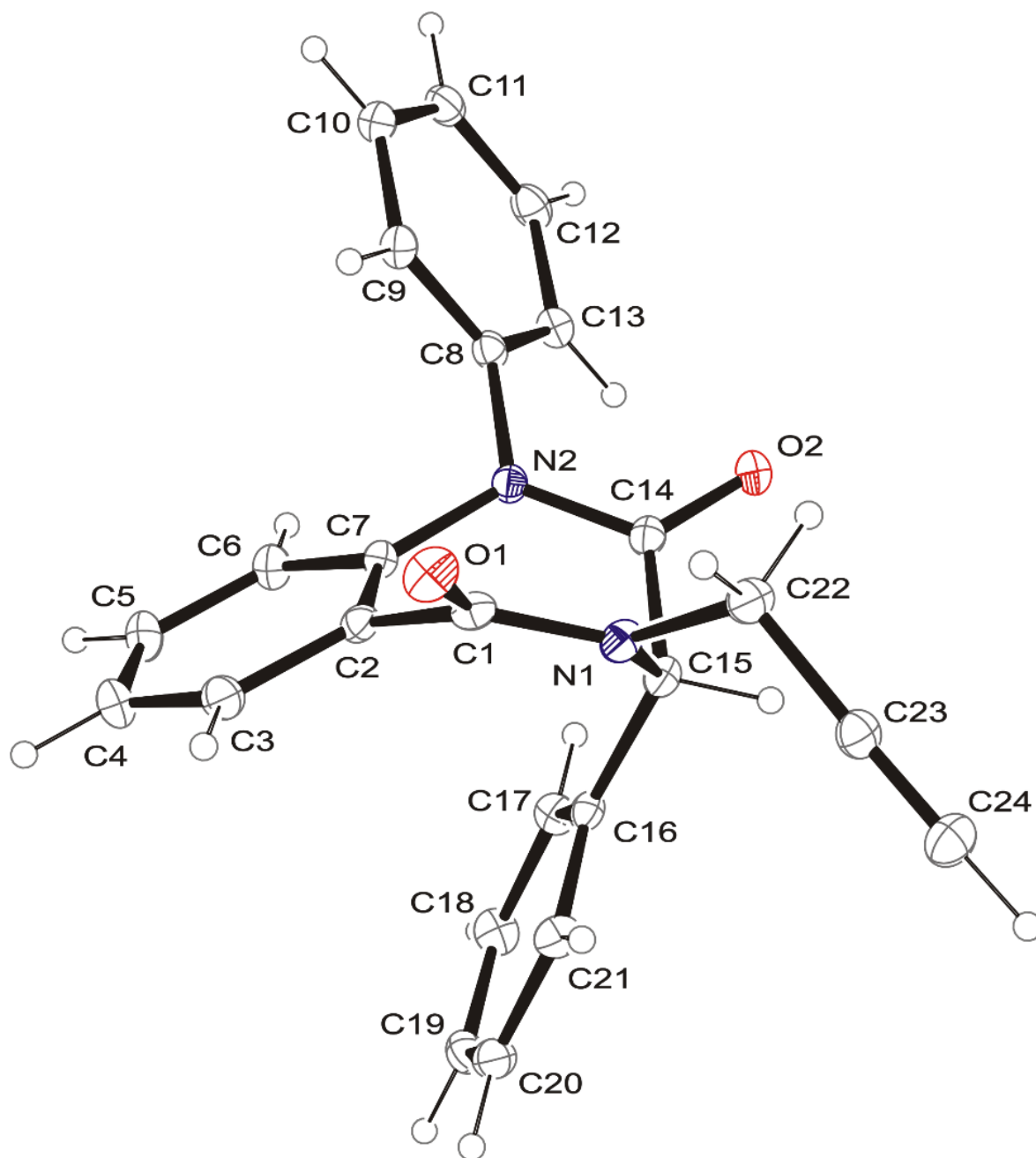
### P1: Vodíkové interakce zprostředkované mezi sloučeninami 4f



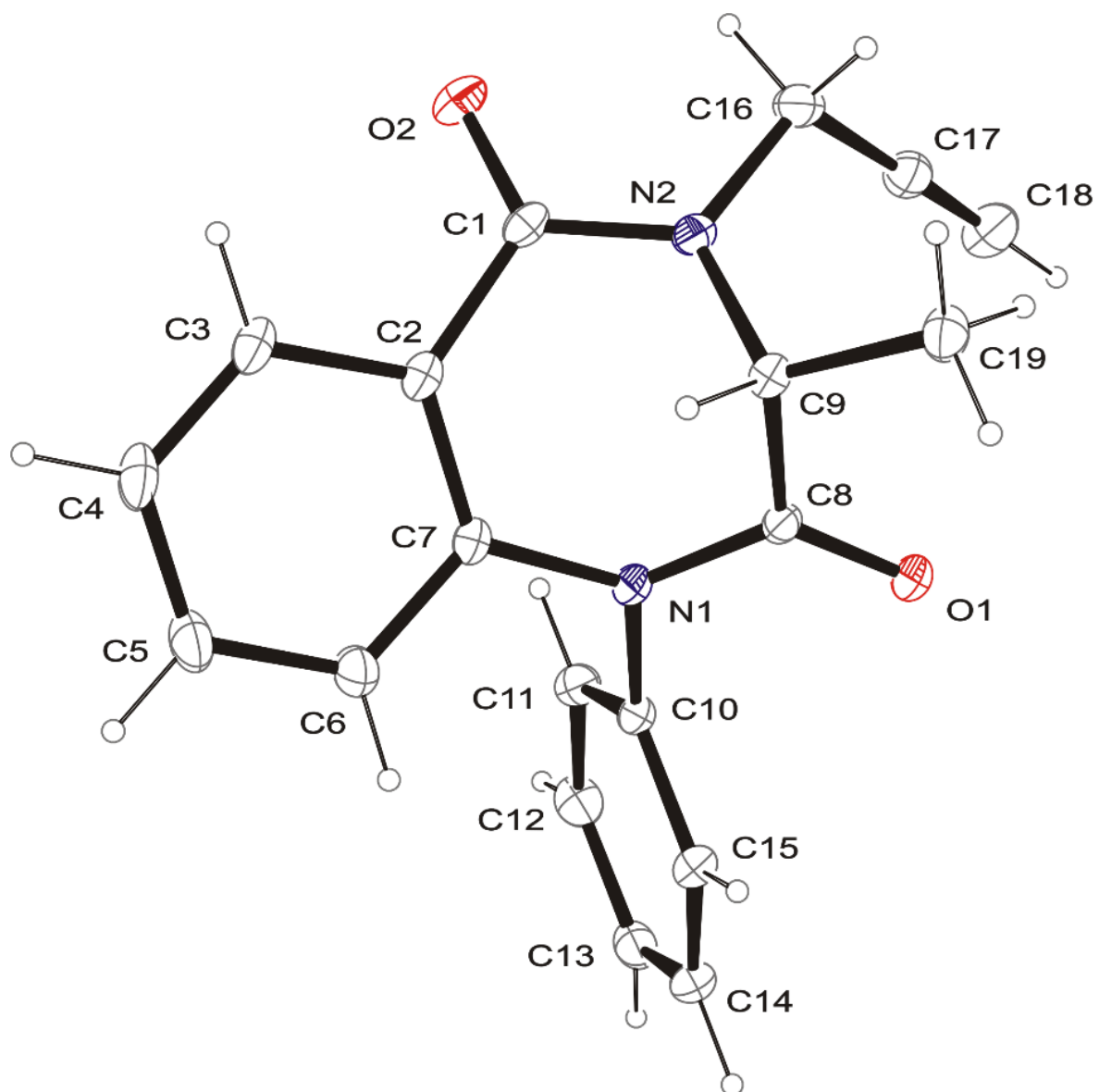
**P2: Vodíkové interakce zprostředkované mezi sloučeninami 5a**

**P3: Vodíkové interakce zprostředkované mezi sloučeninami 6**

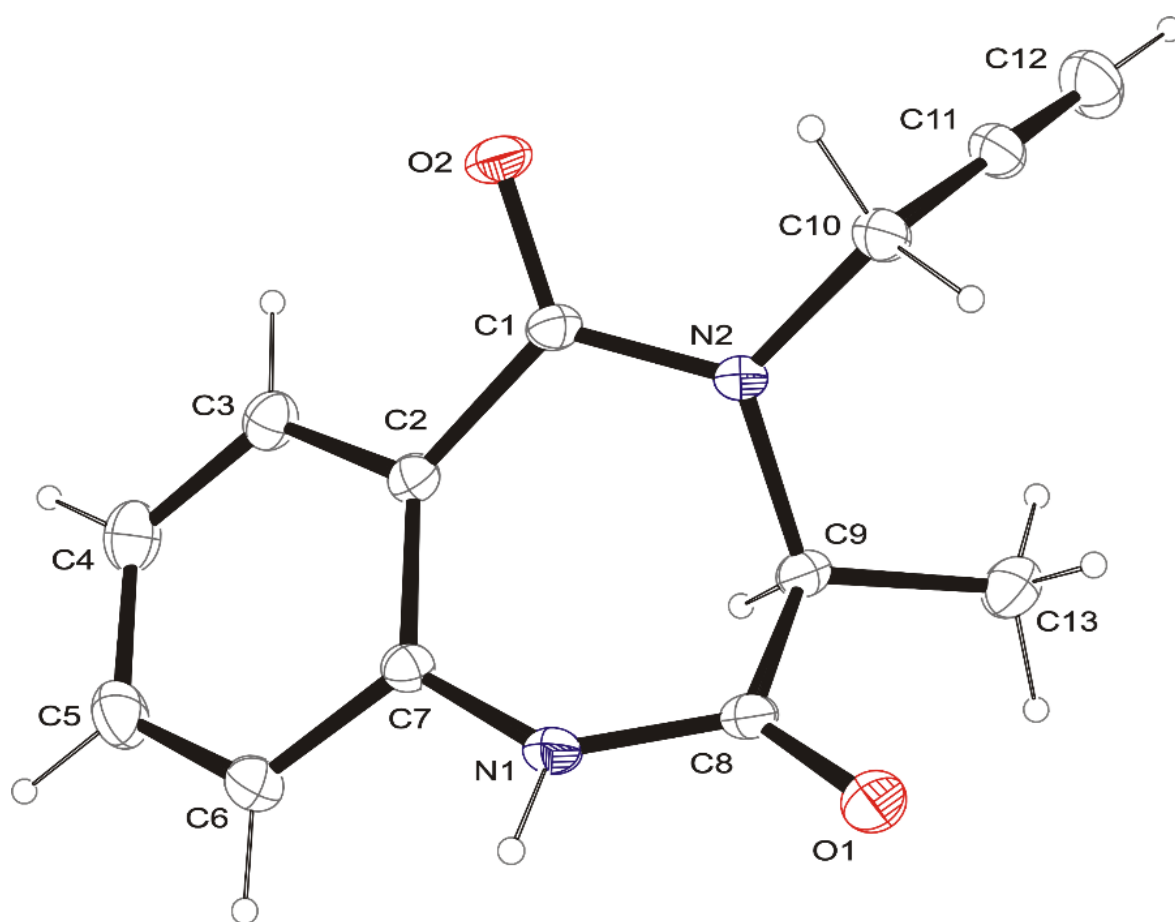
## P4: ORTEP diagram sloučeniny 4a



## P5: ORTEP diagram sloučeniny 4d

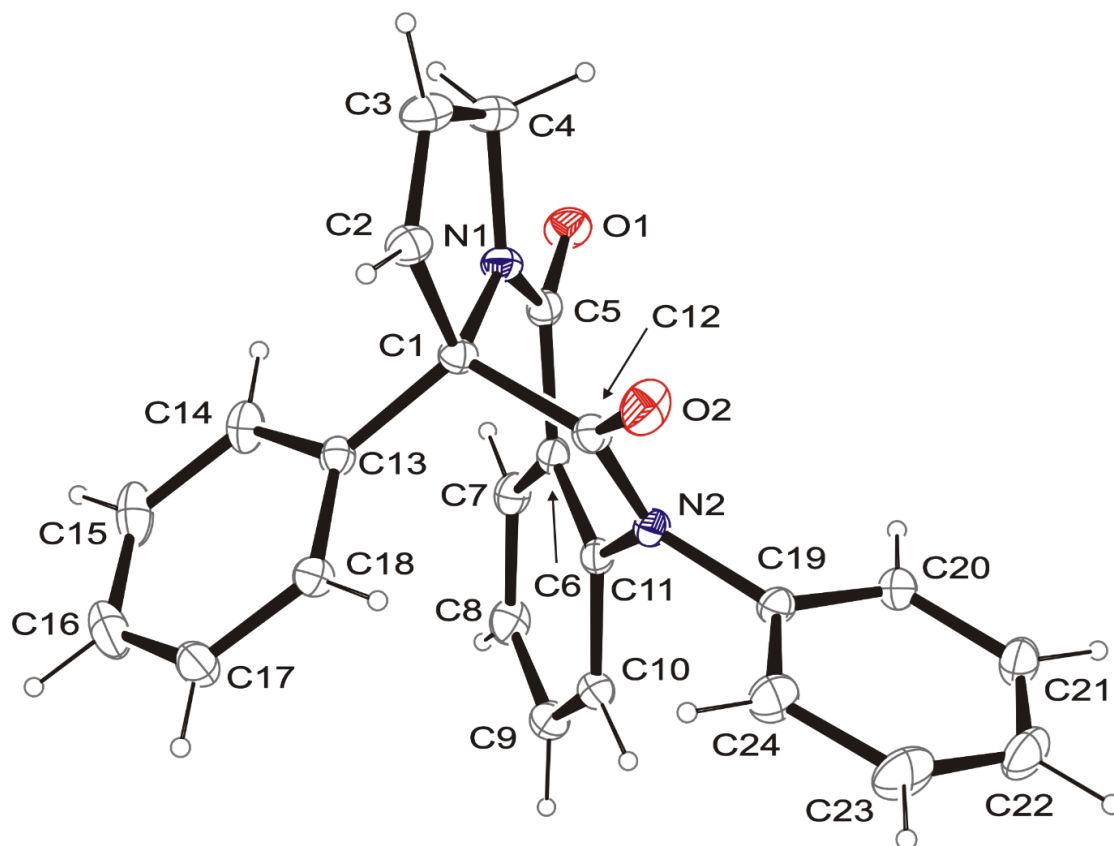


## P6: ORTEP diagram sloučeniny 4f

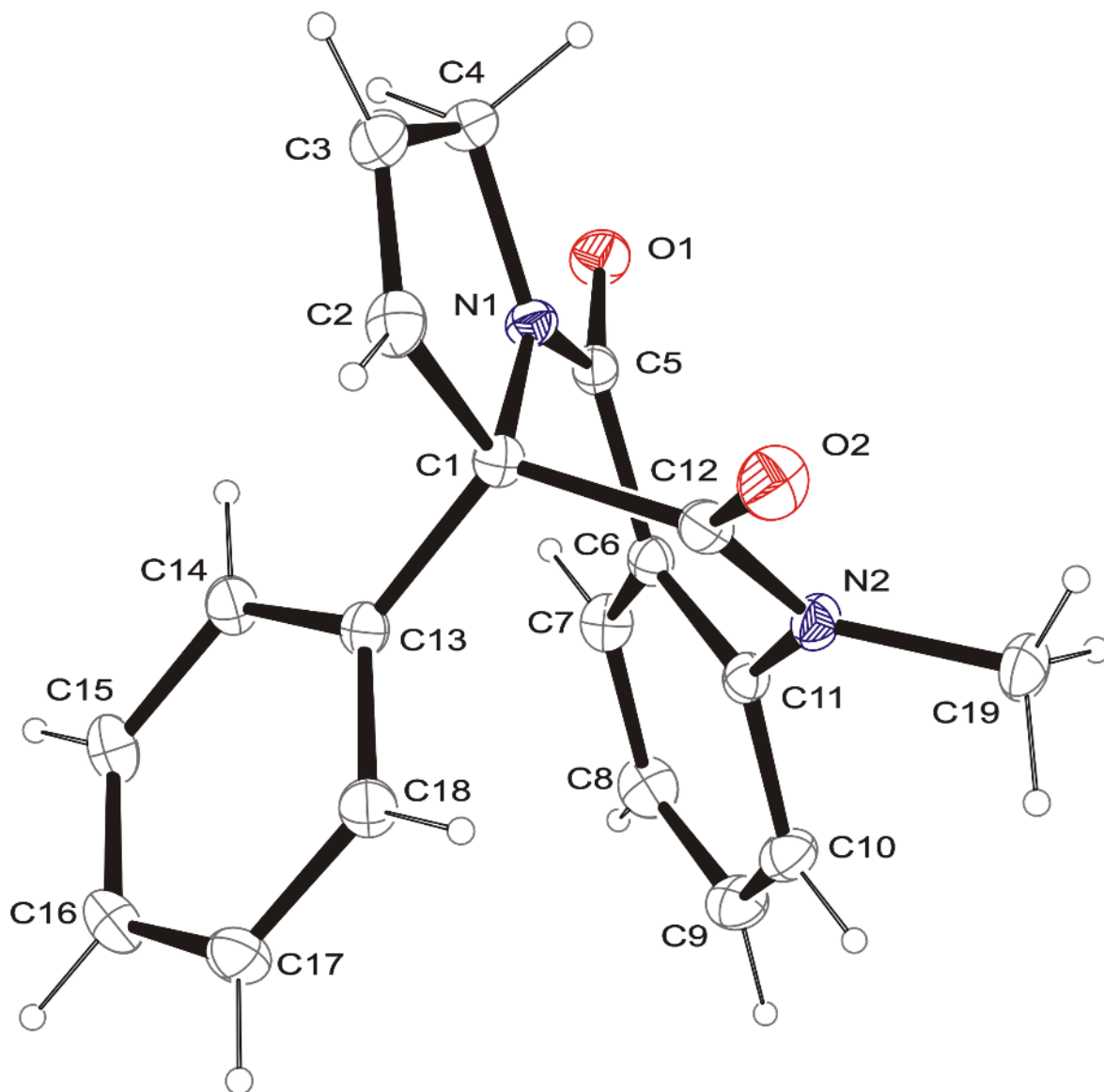




## P7: ORTEP diagram sloučeniny 5a



## P8: ORTEP diagram sloučeniny 5b



## P9: ORTEP diagram sloučeniny 6

