

UNIVERZITA SV. CYRILA A METODA V TRNAVE
FAKULTA PRÍRODNÝCH VIED

**NOVÉ DERIVÁTY FURO[3,2-*b*]PYROLU: SYNTÉZA, ŠTÚDIUM
VLASTNOSTÍ A BIOLOGICKEJ AKTIVITY**

Dizertačná práca

2017

Mgr. Ivana Zemanová

UNIVERZITA SV. CYRILA A METODA V TRNAVE
FAKULTA PRÍRODNÝCH VIED

**NOVÉ DERIVÁTY FURO[3,2-*b*]PYROLU: SYNTÉZA, ŠTÚDIUM
VLASTNOSTÍ A BIOLOGICKEJ AKTIVITY**

Dizertačná práca

Študijný program: Aplikovaná analytická a bioanalytická chémia
Študijný odbor: 4.1.17 Analytická chémia
Školiace pracovisko: Fakulta prírodných vied, Katedra chémie
Školiteľ: doc. Mgr. Renata Gašparová, PhD.

2017

Mgr. Ivana Zemanová



UCM Trnava
Fakulta prírodných vied

ZADANIE ZÁVEREČNEJ PRÁCE

Meno a priezvisko študenta: Mgr. Ivana Zemanová
Študijný program: aplikovaná analytická a bioanalytická chémia
(Jednoodborové štúdium, doktorandský III. st., denná forma)
Študijný odbor: 4.1.17 analytická chémia
Typ záverečnej práce: Dizertačná práca
Jazyk záverečnej práce: slovenský
Sekundárny jazyk: anglický

Názov: Nové deriváty furo[3,2-b]pyrolu: Syntéza, štúdium vlastností a biologickej aktivity

Anotácia: Príprava východiskových metyl furo[3,2-b]pyrol-5-karboxylátov
Reakcie furo[3,2-b]pyrol-5-karboxylátov:
- reakcie na C-2, C-5, N-4 a esterovej skupine (alkylácia, acylácia, hydrolyza, formylácia, hydrazinolýza)
- syntéza furo[2',3':4,5]pyrolo[1,2-d][1,2,4]triazínov a iných derivátov s furo[3,2-b]pyrolovým skeletom
Analýza pripravených látok dostupnými metódami
-spektrálne štúdie syntetizovaných furo[3,2-b]pyrolových derivátov (^1H a ^{13}C NMR, IR)
- štúdium biologickej aktivity pripravených zlúčenín

Školiteľ: doc. Mgr. Renáta Gašparová, PhD.
Oponent: prof. Ing. Viktor Milata, DrSc.
Oponent: prof. RNDr. Jozef Čižmárik, PhD.
Katedra: KCHEM - Katedra chémie
Vedúci katedry: doc. Ing. Dušan Valigura, PhD.
Dátum zadania: 15.04.2013

Dátum schválenia: 16.06.2017

doc. Ing. Dušan Valigura, PhD.
vedúci katedry

Čestné prehlásenie

Čestné prehlasujem, že som svoju dizertačnú prácu na tému: „*Nové deriváty furo[3,2-b]pyrolu: Syntéza, štúdium vlastností a biologickej aktivity*“ vypracovala samostatne pod odborným vedením svojho školiťa a použitú odbornú literatúru uvádzam v zozname použitej literatúry.

Podpis študenta

*„Vo vede nie je až tak dôležité získať nové fakty,
dôležitejšie je objaviť nové spôsoby premýšľania o nich.“*

W. Bragg

*„Intelligentní ľudia vedia, že sa dá veriť len polovici toho,
čo počujú. Veľmi intelligentní vedia, ktorej polovici.“*

Friedrich Schiller

PodĎakovanie

V prvom rade chcem poďakovať mojej školiteľke doc. Mgr. Renate Gašparovej, PhD. za odborné vedenie počas celého doktorandského štúdia. Tiež za cenné rady, inšpirácie a pripomienky pri písaní a spracovaní dizertačnej práce. Moje poďakovanie patrí tiež doc. RNDr. Andrejovi Boháčovi, CSc. a Miroslave Matejovej za spoluprácu počas štúdia a za možnosť merania ^1H a ^{13}C NMR, IČ a MS spektier na Prírodovedeckej fakulte Univerzity Komenského. Touto cestou sa chcem poďakovať Ing. Dáše Kružlicovej, PhD, Ing. Márii Maliarovej, PhD., Ing. Jozefovi Miklovičovi, PhD. a doc. Ing. Tiborovi Maliarovi, PhD. za pomoc pri príprave záverečnej práce.

V neposlednom rade ďakujem celému kolektívu pracovníkov FPV UCM v Trnave za vytvorenie dobrých podmienok pre doktorandské štúdium.

Veľká vďaka patrí mojim rodičom a priateľovi, za ich podporu a lásku počas celého obdobia doktorandského štúdia.

ABSTRAKT

Mgr. Ivana Zemanová: Nové deriváty furo[3,2-*b*]pyrolu: Syntéza, štúdium vlastností a biologickej aktivity [Dizertačná práca] – Univerzita sv. Cyrila a Metoda v Trnave, Fakulta prírodných vied, Katedra chémie – Školiteľ: doc. Mgr. Renata Gašparová, PhD. Stupeň odbornej kvalifikácie: PhD. – Trnava, 2017, p. 101.

Syntéza východiskových metyl furo[3,2-*b*]pyrol-5-karboxylátov **I** spočívala v kondenzácii substituovaného furán-2-karbaldehydu s azidoacetátom za vzniku zodpovedajúceho azidoakrylátu, ktorý následne cyklizoval na príslušné furo[3,2-*b*]pyrol-5-karboxyláty **I**. Z následných reakcií východiskových karboxylátov sme uskutočnili prípravu furo[3,2-*b*]pyrol-5-karboxylových kyselín **XIV**, furo[3,2-*b*]pyrol-5-karbaldehydov **XV**, 4-(2-hydrazino-2-oxoetyl)-4*H*-furo[3,2-*b*]pyrol-5-karbohydrazidov **XX** a syntézu 5-5-6 kondenzovaných systémov. Do tejto kategórie patria furo[2',3':4,5]pyrolo[1,2-*d*][1,2,4]triazínové **VIII-XII** a 7-amino-2-metylfuro[2',3':4,5]pyrolo[1,2-*a*]pyrazínové deriváty **XXI** a **XXII**.

Vybrané furo[3,2-*b*]pyrolové deriváty vykazujú dobrú antibakteriálnu aktivitu na *G*⁻ kmeň *Escherichia coli* a *G*⁺ kmeň *Micrococcus luteus*, pričom signifikantnou je aktivita kyseliny 2-tritylfuro[3,2-*b*]pyrol-5-karboxylovej **XIVc** (MIC = 0,16 mM). Najvyššiu mieru antioxidačnej aktivity metódou DPPH vykázal 4-(2-hydrazino-2-oxoetyl)-4*H*-furo[3,2-*b*]pyrol-5-karbohydrazid **XXa**. Táto látka vykazuje vyššiu antioxidačnú aktivitu aj metódami FRAP a ABTS. Testované zlúčeniny vykazovali miernu inhibičnú aktivitu na chymotrypsín, kolagenázu a trombín, nízku inhibičnú aktivitu na trypsín a pepsín.

Čistotu vybraných furo[3,2-*b*]pyrolových derivátov sme zisťovali pomocou HPLC. Čistota zlúčenín sa pohybovala v rozmedzí 99,7 – 94,15 %.

Kľúčové slová: furo[3,2-*b*]pyrol, biologická aktivita, nukleárna magnetická rezonancia, infračervená spektrometria, kvapalinová chromatografia

ABSTRACT

Mgr. Ivana Zemanová: New derivatives of furo[3,2-*b*]pyrrole: Synthesis, study of properties and biological activity [Dissertation Thesis] – University of Ss. Cyril and Methodius in Trnava, Faculty of Natural Sciences, Department of Chemistry – Supervisor: doc. Mgr. Renata Gašparová, PhD. Degree of professional qualification: Doctor – Trnava, 2017, p 101.

Synthesis of starting methyl furo[3,2-*b*]pyrrole-5-carboxylates **I** consists on the condensation of substituted furan-2-carbaldehyde with azidoacetate to afford corresponding azidoacrylate, which subsequently cyclised to furo[3,2-*b*]pyrrole-5-carboxylates **I**. Among the subsequent reactions of carboxylates we have realised the synthesis of furo[3,2-*b*]pyrrole-5-carboxylic acids **XIV**, furo[3,2-*b*]pyrrole-5-carbaldehydes **XV**, 4-(2-hydrazino-2-oxoethyl)-4*H*-furo[3,2-*b*]pyrrole-5-carbohydrazides **XX** and the synthesis of 5-5-6 condensed systems. Furo[2',3':4,5]pyrrolo[1,2-*d*][1,2,4]triazine **VIII-XII** and 7-amino-2-methylfuro[2',3':4,5]pyrrolo[1,2-*a*]pyrazine **XXI** a **XXII** derivatives belong to this category.

Selected furo[3,2-*b*]pyrrole derivatives showed good antibacterial activity on a G^- strain *Escherichia coli* and G^+ strain *Micrococcus luteus*, whereby the activity of 2-trithylfuro[3,2-*b*]pyrrole-5-carboxylic acid **XIVc** (MIC = 0,16 mM) is significant. The highest value of antioxidant activity by DPPH method was shown by 4-(2-hydrazino-2-oxoethyl)-4*H*-furo[3,2-*b*]pyrrole-5-carbohydrazid **XXa**. This compound shows higher antioxidant activity either by the FRAP and ABTS methods. Screened compounds showed mild inhibition activity on chymotrypsine, collagenase and thrombine and low inhibition activity on trypsin and pepsin.

The purity of some furo[3,2-*b*]pyrrole derivatives was analysed by HPLC. The purity of analysed compounds was in 99.7 – 94.15 % range.

Key words: furo[3,2-*b*]pyrrole, biological activity, nuclear magnetic resonance, infrared spectrometry, liquid chromatography

OBSAH

ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK	3
ZOZNAM PRÍLOH.....	5
1.ÚVOD.....	6
2. SÚČASNÝ STAV PROBLEMATIKY.....	8
2.1 Termodynamická stabilita a aromaticita π -elektrónových systémov	9
2.2 Príprava furo[3,2- <i>b</i>]pyrol-5-karboxylátov	10
2.3 Reakcie furo[3,2- <i>b</i>]pyrol-5-karboxylátov	12
2.3.1 Reakcie furo[3,2- <i>b</i>]pyrolov na uhlíku C-2	12
2.3.1.1 Formylácie a následné reakcie 2-formylfuro[3,2- <i>b</i>]pyrol-5-karboxylátov ..	12
2.3.1.2 Nitrácia.....	14
2.3.1.3 Mannichova reakcia a chlorácia	15
2.3.2 Reakcie furo[3,2- <i>b</i>]pyrolov na uhlíku C-3	15
2.3.3 Reakcie furo[3,2- <i>b</i>]pyrolov na NH skupine	16
2.3.4 Reakcie furo[3,2- <i>b</i>]pyrolov na esterovej skupine.....	17
2.3.4.1 Hydrazinolýza a následné reakcie furo[3,2- <i>b</i>]pyrol-5-karbohydrazidov.....	17
2.3.4.2 Hydrolýza a následné reakcie	19
2.3.5 Reakcie furo[3,2- <i>b</i>]pyrolov na uhlíku C-6	20
2.3.5.1 Nitrácia a acylácia.....	20
2.3.6 Furo[3,2- <i>b</i>]pyrolové deriváty kondenzované s heterocyklickými kruhmi	21
2.4 Biologická aktivita zlúčenín s furopyrolovým skeletom	24
3. VÝVOJ KANDIDÁTOV LIEČIV A BIOANALYTICKÉ HODNOTENIE ZLÚČENÍN	27
3.1 Metódy CADD pri projektovaní liečiv	27
3.2 Lipinského pravidiel	28
3.2.1 Predikcia biologickej aktivity dostupnými softvérmi	29
3.3 Antibakteriálna aktivita.....	32
3.3.1 Heterocyklické látky s možnou príbuznosťou k β -laktámom.....	33
3.3.1.1 1,2,4-Triazíny.....	33
3.4 Antioxidačná aktivita.....	34
3.4.1 Metóda DPPH	35
3.4.2 Metóda ABTS	36
3.4.3 Metóda FRAP	37
3.5 Inhibítory proteínáz.....	37
4. CIELE DIZERTAČNEJ PRÁCE.....	38
5. METÓDY VYHODNOTENIA VLASTNOSTÍ LÁTOK.....	39
5.1 Infračervená spektrometria	39

5.1.1 Experimentálna technika.....	40
5.2 Nukleárna magnetická rezonancia (NMR)	41
5.2.1 Experimentálna technika.....	43
5.2.1.1 Chemický posun (δ).....	44
5.2.1.2 Spin-spinová interakcia.....	45
5.3 Hmotnostná spektrometria	45
5.3.1 Experimentálna technika.....	45
5.4 Kvapalinová chromatografia.....	46
5.4.1 Experimentálna technika.....	47
5.4.2 Hlavné charakteristiky chromatogramu	47
5.4.3 Chemicky viazané fázy	48
5.4.4 Detektory	49
5.5 Stanovenie antibakteriálnej, antioxidačnej a inhibičnej aktivity	49
5.5.1 Antioxidačná aktivita metódou DPPH.....	50
5.5.2 Antioxidačná aktivita metódou ABTS.....	50
5.5.3 Antioxidačná aktivita metódou FRAP	51
5.5.4 Inhiničná aktivita na proteínázy.....	51
6. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	53
6.1 Stanovenie antibakteriálnej aktivity.....	53
6.2 Stanovenie antioxidačnej aktivity	54
6.3 Analýza čistoty vybraných zlúčenín	54
6.4 Syntetická časť	55
6.4.1 Syntéza východiskových furo[3,2-b]pyrol-5-karboxylátov	55
6.4.2 Syntéza furo[2',3':4,5]pyrolo[1,2-d][1,2,4]triazinónov.....	56
6.4.3 Syntéza substituovaných furo[2',3':4,5]pyrolo[1,2-d][1,2,4]triazinov.....	59
6.4.4 Syntéza substituovaných 4H-furo[3,2-b]pyrole-5-karbaldehydov a 8-etoxy-2-metylfuro[2',3':4,5]pyrolo[1,2-d][1,2,4]triazínu	64
6.4.5 Syntéza furo[2',3':4,5]pyrolo[1,2-a]pyrazindiónu a dihydrofuro[2',3':4,5]pyrolo[1,2-a]pyrazin-7(8H)-yl]acetamidov	67
7. VÝSLEDKY A DISKUSIA	72
7.1 Syntetická časť	72
7.2. Spektrálna časť.....	74
7.3 Analýza čistoty zlúčenín metódou HPLC.....	81
7.4 Stanovenie antibakteriálnej, antioxidačnej a inhibičnej aktivity	89
8. ZÁVERY PRE PRAX A ROZVOJ VEDNEJ DISCIPLÍNY	94
9. SUMMARY	97
10. ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	100
11. ZOZNAM PUBLIKOVANÝCH VEDECKÝCH PRÁC	109

ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

ABTS	2,2'-azinobis(3-etyl-2,3-dihydrobenzotiazol)-6-sulfonát
Ac ₂ O	acetanhydrid
AcOH	kyselina octová
AcOK	octan draselný
AcONa	octan sodný
ADMET	absorpcia, distribúcia, metabolizmus, vylučovanie a toxicita
Bn	benzyl
Bz	benzoyl
CADD	metóda projektovania liečiv
CN	kyano
DAO	oxidáza D-aminokyseliny
DCC	<i>N,N'</i> -dicyklohexylkarbodiimid
DFT	metóda funkčnej hustoty
DIEA	<i>N,N</i> -diisopropyletylmín
DMF	<i>N,N</i> -dimetylformamid
DPPH	1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl
Et	etyl
Et ₂ O	dietyléter
EtOH	etanol
EtONa	etoxid sodný
FRAP	antioxidačná aktivita založená na schopnosti redukovať Fe ³⁺ ióny
HOBT	<i>N</i> -hydroxybenzotriazol
Lys-SBzn.2HCl	lyzín tiobenzyl ester
Me	metyl
MeOH	metanol
MIC	minimálna inhibičná aktivita
MOM	metoxymetyl
MW	mikrovlnné žiarenie
Ph	fenyl
PKM2	izoenzým pyruvát kinázy M2 formy
p-TsOH	kyselina 4-metylbenzénsulfónová

RHF	Hartree-Fockova metóda
TEA	trietylamín
TEAC	antioxidačná kapacita vyjadrená v troloxových ekvivalentoch
TEBA	trietylbenzylamónium chlorid
TFA	kyselina trifluóroctová
TTB	tiazolyl tetrazólium bromid
TPTZ	2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazín
Tris-HCl	2-amino-2-(hydroxymetyl)-1,3-propándiol hydrochlorid
ΔH_f	štandardná tvorná entalpia

ZOZNAM PRÍLOH

Príloha A - „*Synthesis of furo[2,3:4,5]pyrrolo[1,2-d][1,2,4]triazine derivatives and their antibacterial activity*“. Publikovaný v karentovanom časopise Arkivoc, 2017, part vi, 184-193.

Príloha B - „*Synthesis and antibacterial activity of furo[3,2-b]pyrrole derivatives*“. odoslaný do karentovaného časopisu Arkivoc.

Príloha C - „*NMR spectroscopic properties of furo[2',3':4,5]pyrrolo[1,2-d][1,2,4]triazine derivatives*. Akceptovaný článok v skopusovanom časopise Nova Biotechnologica et Chimica 2017 s akceptačným listom editora.

Príloha D – „*Synthesis and reactions of new derivatives of furo[3,2-b]pyrrole*“. Nova Biotechnologica et Chimica 2013, 12, 100-107.

1. ÚVOD

Súčasná moderná analytická chémia sa už nezameriava len na kvantitatívnu a kvalitatívnu analýzu, ale zaoberá sa aj otázkami riešenia rozmanitých chemických problémov. To umožňuje prienik do iných vedných disciplín, ako napr. organická a bioorganická chémia a aplikuje tu svoje teoretické a praktické základy.

Furo- a tieno[3,2-*b*]pyroly, ale aj ich [2,3-*b*]-izoméry, ako izostéry indolu sú v súčasnosti predmetom výskumu vedcov, kvôli širokej škále nimi vykazovanej biologickej aktivity. Významným prínosom môžu byť uvedené deriváty v oblasti boja proti infekčným chorobám vďaka ich antibakteriálnej alebo antivirotickej aktivite. Ako príklad možno uviesť antimikrobiálnu aktivitu niektorých furo[3,2-*b*]pyrolov na rezistentné kmene *M. tuberculosis*, alebo antibakteriálnu aktivitu na meticilín rezistentné kmene *Staphylococcus aureus*, prípadne možno spomenúť inhibičnú aktivitu niektorých tieno[3,2-*b*]pyrolov na vírus Chikungunya. V dnešnej dobe, keď sa bakteriálne kmene stávajú multirezistentnými, nadobúdajú značný význam štúdie nových biologicky účinných látok a hľadanie nových štruktúr s požadovanými terapeutickými vlastnosťami.

Predmetom predkladanej dizertačnej práce sú nové zlúčeniny s furo[3,2-*b*]pyrolovým skeletom a to jednak furo[3,2-*b*]pyroly, substituované či už na furánovom, alebo pyrolovom kruhu, ale aj 5-5-6 kondenzované zlúčeniny, konkrétne triazíny a pyrazíny. Zámerom tejto práce je aj analyzovanie štruktúry pripravených látok dostupnými technikami analytickej chémie ako sú nukleárna magnetická rezonancia, infračervená a hmotnostná spektrometria a tiež prvková analýza.

Ďalším zámerom práce je štúdium antibakteriálnej aktivity na Gram-pozitívne aj Gram-negatívne bakteriálne kmene, štúdium antioxidačnej aktivity metódami DPPH, ABTS a FRAP a inhibičnej aktivity na vybrané proteínázy. Na základe výsledkov štúdií biologickej aktivity bude možné v budúcnosti vybrať perspektívne štruktúry pre ďalší výskum a pomocou vhodnej derivatizácie na základe CADD štúdií vylepšiť ich vlastnosti, čiže zvýšiť aktivitu, ale tiež redukovat' ich prípadnú toxicitu.

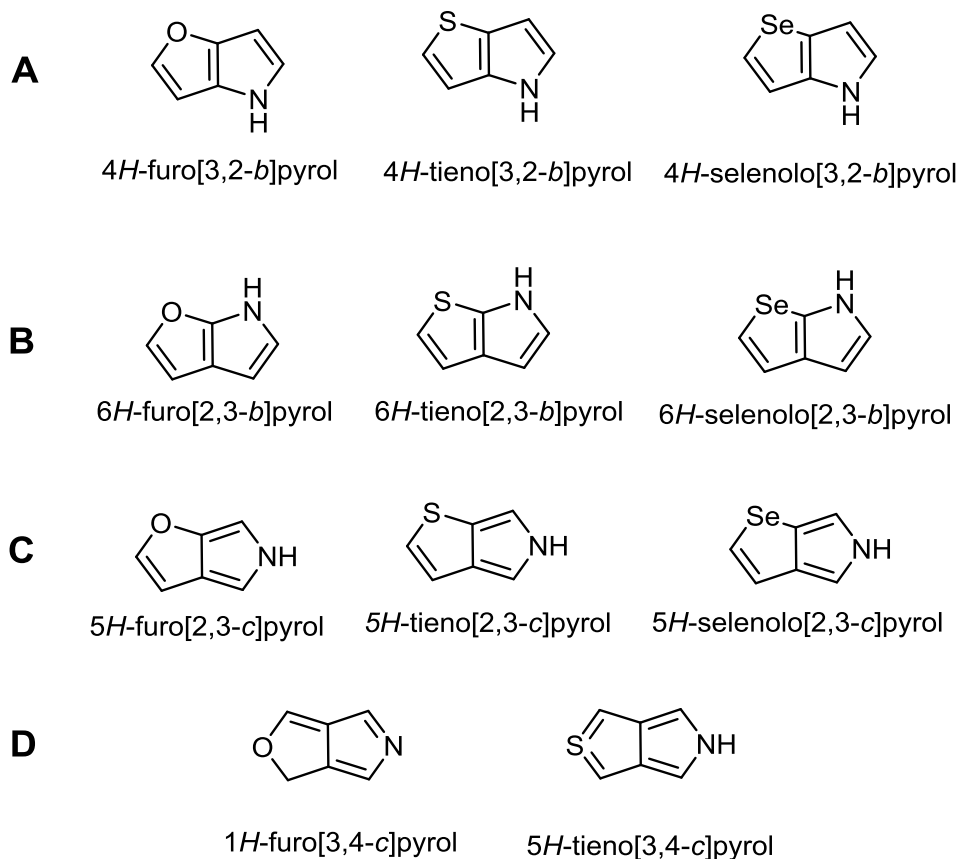
Vzhľadom na potenciál syntetizovaných látok ako antibakteriálnych je nevyhnutné analyzovanie ich čistoty. Ďalším zámerom práce je preto u vybraných látok stanoviť ich čistotu pomocou HPLC, vďaka čomu bude v budúcnosti možné odstrániť prípadné nedostatky v separácii a purifikácii zlúčenín.

Problémy spracované v dizertačnej práci boli súčasťou dvoch výskumných projektov VEGA 1/0534/16 pod názvom *Nové zlúčeniny s aplikačným potenciálom* a VEGA

1/0233/12 pod názvom *Reaktivita a vlastnosti aromatických zlúčenín, vzťahy, štruktúra - vlastnosti - aktivita v komplexných systémoch*. Pri testovaní biologickej aktivity syntetizovaných zlúčenín sa využila spolupráca s doc. Ing. Tiborom Maliarom, PhD. z Katedry biotechnológií Fakulty prírodných vied UCM v Trnave. NMR a MS spektrá boli merané v spolupráci s doc. RNDr. Andrejom Boháčom, CSc. z Prírodovedeckej Fakulty UK v Bratislave.

2. SÚČASNÝ STAV PROBLEMATIKY

Furo-, tieno- a selenopyroly zaradujeme do skupiny bicyklických systémov, ktoré sa označujú aj ako heteropentalénové dianióny (Obr. 1). [1]



Obr. 1 **A** – 1,4-diheteropentalénové, **B** – 1,6-diheteropentalénové, **C** – 1,5-diheteropentalénové a **D** – 2,5-diheteropentalénové štruktúry

Bicyklický systém predstavuje spojenie dvoch päťčlánkových kruhov, kde každý kruh obsahuje jeden heteroatóm, bez prítomnosti mostíkového heteroatómu. Tento systém umožňuje vznik štyroch skupín heterocyklov, a to [2,3-*b*], [3,2-*b*], [3,4-*b*] a [3,4-*c*]. Tieto systémy majú obmedzenú rozpustnosť vo vode. [2]

Hlavným predmetom záujmu v posledných rokoch sú heterocyklické zlúčeniny, ktoré sú potenciálne biologicky účinné. [3] K takýmto látkam môžeme zaradiť aj 1,2,4-triazinové štruktúrne systémy, ktoré sa nachádzajú vo veľkom množstve v prírodných a syntetických aktívnych látkach so širokým biologickým účinkom, napr. protizápalovým [4], antimykotickým [5], protivírusovým [6], anti-HIV [7] alebo antikonvulzívnym. [8]

Z uvedených zlúčenín je predmetom nášho výskumu furo[3,2-*b*]pyrol a jeho deriváty, vrátane derivátov s kondenzovaným triazínovým kruhom. Furo[3,2-*b*]pyrol ako izostér

indolu predstavuje elektrónovo nasýtený systém s piatimi reakčnými centrami, ktoré umožňujú rôzne typy chemických reakcií. [1]

2.1 Termodynamická stabilita a aromaticita π -elektrónových systémov

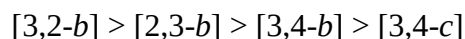
V modernej organickej chémii zohráva aromaticita významnú úlohu, zvlášť v chémii heterocyklických π -elektrónových systémov. Aromaticitu heterobicyklických systémov definujeme ako schopnosť vytvoriť a zachovať si indukovaný kruhový vodivý systém.

Subramanian a kol. [9] sa zaoberali vo svojej práci aromaticitou furofuránov, tienotiofénov, benzofuránov a benztiofénov, pričom dospeli k záveru, že medzi termodynamickou stabilitou heterobicyklických systémov a ich aromaticitou nemusí byť priamy vzťah. Podobné štúdie boli popísané Novakom [10] a Krutošíkovou [11], ktorí študovali štandardnú tvornú entalpiu a DFT výpočty na určenie poradia aromaticity heteropenatlénových systémov. Prišli k záveru, že aromaticita klesá od $[3,4-c] > [3,2-b] > [2,3-b] > [3,4-b]$ systému.

Cyraňski a kol. [12] pomocou röntgenovej difrakcie vyriešili kryštalovú a molekulovú štruktúru ôsmich známych a piatich nových derivátov furo[3,2-*b*]pyrolu, ktoré sa využili na štúdium aromatického charakteru. Aromatickosť kruhov týchto systémov prakticky nezávisí na type atómu v susednom kruhu, ale ukazuje silnú závislosť na efekte substituenta v porovnaní s benzénovými derivátmi. Táto štúdia bola založená na experimentálnom stanovení geometrie furopyrolových derivátov pomocou *ab initio* metód RHF a DFT.

Pozorovaním stability systémov sa zistilo, že furo[3,2-*b*]pyrolové deriváty sú aromatickejšie v porovnaní s ich štruktúrne izomérnymi furo[2,3-*b*]pyrolmi. [11]

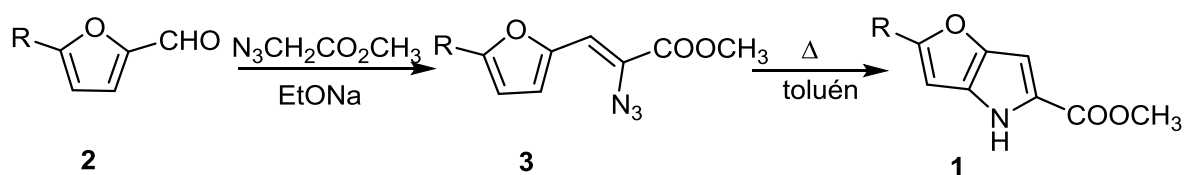
Termodynamická stabilita heterobicyklických systémov bola študovaná Grimarckom [13], ktorý určil poradie stability heteropentalénov:



2.2 Príprava furo[3,2-*b*]pyrol-5-karboxylátov

Na prípravu zlúčenín s furopyrolovým skeletom sa najčastejšie využívajú substituované furo[3,2-*b*]pyrol-5-karboxaláty **1**. Z literatúry sú známe tri metódy ich syntézy.

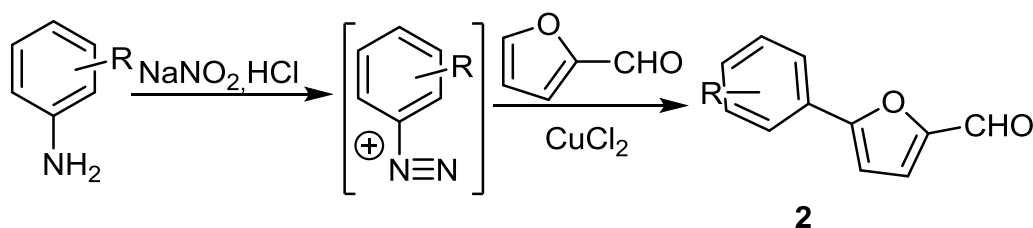
Najbežnejšou metódou prípravy **1** je kondenzácia substituovaného furán-2-karbaldehydu **2** s esterom kyseliny azidooctovej za vzniku zodpovedajúceho azidoakrylátu **3**, ktorý v nasledujúcom stupni Hemetsbergerovou indolovou syntézou cyklizuje na príslušný furo[3,2-*b*]pyrol-5-karboxylát **1** vo výťažku 58 % (Schéma 1). [14]



R = NO₂, Ph, Me, MeOPh

Schéma 1

Východiskový 5-arylfurán-2-karbaldehyd **2** možno pripraviť Meerweinovou aryláciou [15] z furán-2-karbaldehydu (Schéma 2).



R = 3-Me, 3-CF₃, 4-NO₂, 4-Cl

Schéma 2

Zhao a kol. [16] vyvinuli nový spôsob prípravy furo[3,2-*b*]pyrol-5-karboxylát **1** bez použitia azidových medziproduktov, ktoré sa používajú pri predchádzajúcom postupe. Vychádzali z 3-bromfurán-2-karbaldehydu **4**, ktorý reagoval s kyselinou hippurovou za podmienok Erlenmeyrovej reakcie za vzniku azlaktónu **5** (Schéma 3). Azlaktón **5** následne reagoval s etoxidom sodným za vzniku etyl-2-benzamidoakrylátu **6**. Jeho cyklizáciou vznikol príslušný 4-benzoylfuro[3,2-*b*]pyrol-5-karboxylát **7**. Na odstránenie chrániacej benzoylovej skupiny sa 4-benzoylfuro[3,2-*b*]pyrol-5-karboxylát **7** premiešal s etyléndiamínom za vzniku furo[3,2-*b*]pyrol-5-karboxylátu **1** vo výťažku 76 %.

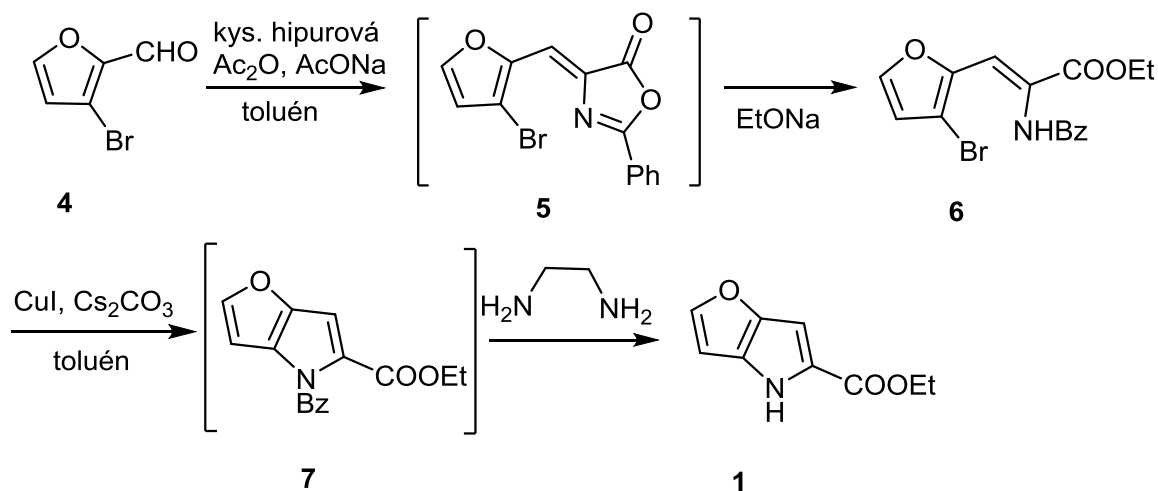


Schéma 3

Najstarší spôsob prípravy furo[3,2-*b*]pyrrol-5-karboxylátov **1** publikoval Gronowitz a kol. [17] Aldolovou kondenzáciou 3-azidofurán-2-karbaldehydu **8** s acetónom vznikol metyl-4-(3-azidofurán-2-yl)akrylát **9**, ktorý následne cyklizoval na metyl furo[3,2-*b*]pyrrol-5-karboxylát **1** vo výťažku 69 % (Schéma 4).

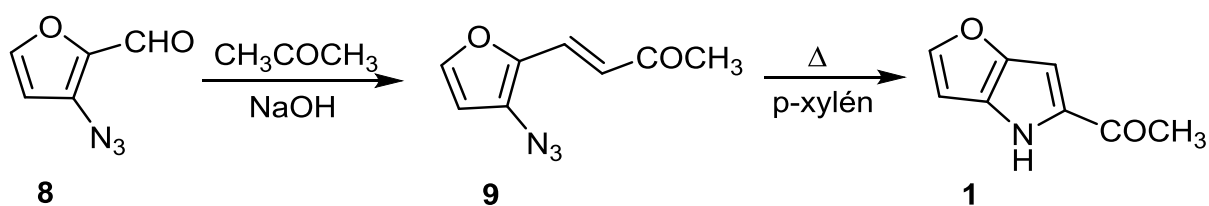
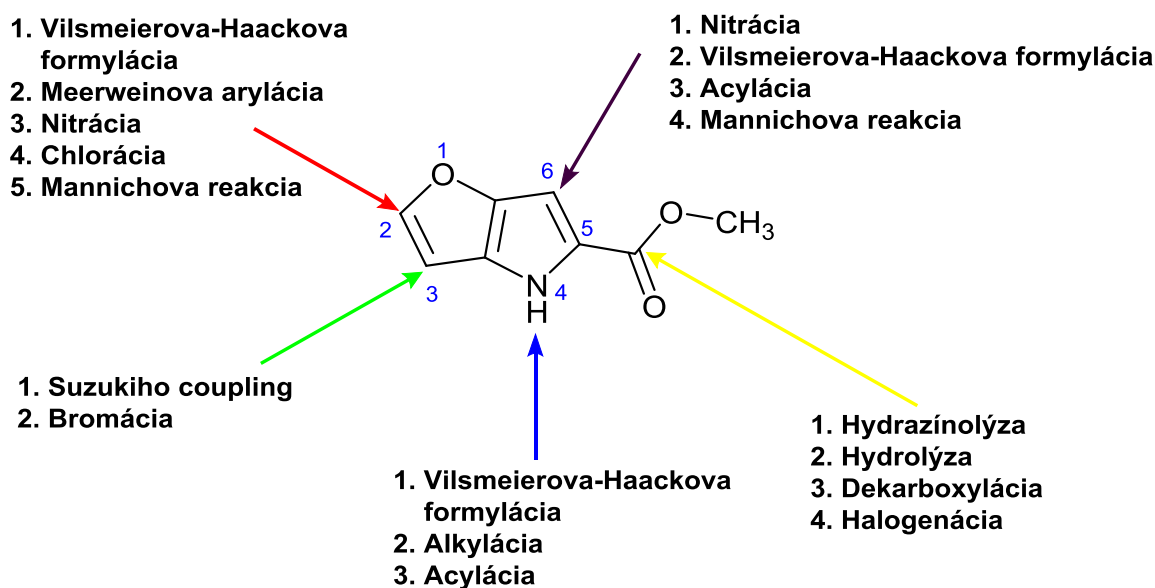


Schéma 4

Príprava metyl furo[3,2-*b*]pyrrol-5-karboxylátov **1** publikovaná Gronowitzom je z hľadiska syntézy efektívna pri použití 2 % roztoku hydroxidu sodného, pri vyšších koncentráciách roztoku hydroxidu sodného dochádza k zníženiu tvorby azidoakrylátu.

2.3 Reakcie furo[3,2-*b*]pyrol-5-karboxylátov

Pripravené furo[3,2-*b*]pyrol-5-karboxyláty **1** majú vo svojej štruktúre 5 reakčných centier (NH skupinu, esterovú skupinu a uhlíky C-2, C-3 a C-6), čo im umožňuje poskytovať rôzne typy reakcií, ako *N*-alkylácie, acylácie, formylácie, nitrácie, cykloadície a kondenzačné reakcie za vzniku päť-, šesť- a sedemčlenných heterocyklov (Obr. 2). [18]



Obr. 2 Reakcie na furo[3,2-*b*]pyrolovom skelete

2.3.1 Reakcie furo[3,2-*b*]pyrolov na uhlíku C-2

Z reakcií prebiehajúcich na C-2 okrem už spomínanej Meerweinovej arylácie (Schéma 2), je najvýznamnejšia Vilsmeierova-Haackova formylácia, ktorou vznikajú 2-formylfuro[3,2-*b*]pyrol-5-karboxyláty **10** (Schéma 5). [18]

2.3.1.1 Formylácie a následné reakcie 2-formylfuro[3,2-*b*]pyrol-5-karboxylátov

Formylovanie furo[3,2-*b*]pyrolov prebieha za podmienok Vilsmeierovej-Haackovej reakcie prednostne do polohy C-2 na furánovom kruhu. Ak sa v polohe 2 nachádza substituent v tom prípade prebieha formylácia na dusík N-4 pyrolového kruhu. Zavedenie formylovej skupiny do polohy C-6 pyrolového kruhu je možné uskutočniť iba výrazným predĺžením reakčného času (Schéma 5). [19]

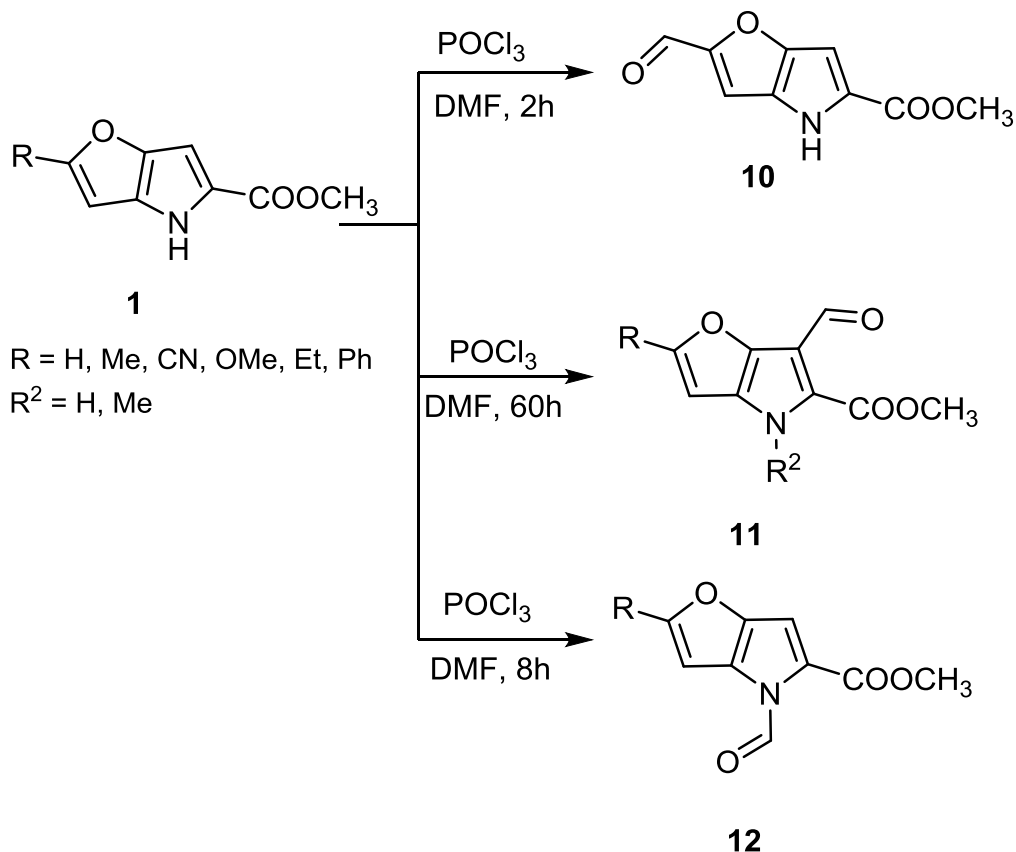


Schéma 5

Reakciou substituovanej kyseliny furo[3,2-*b*]pyrol-5-karboxylovej **35** s 6-formylfuro[3,2-*b*]pyrolmi **13** sa pripravili v trichlórétáne pri 100 °C rôzne komplexy **14** v 56 – 98 % výtťažkoch (Schéma 6). [20] Tieto komplexy predstavujú sériu látok s dobrými fluorescenčnými optickými vlastnosťami, ktoré umožňujú ľahšie určenie maxim absorpcie, emisie bez zmeny vlastností látok využívaných pri bioanalýze analytov.

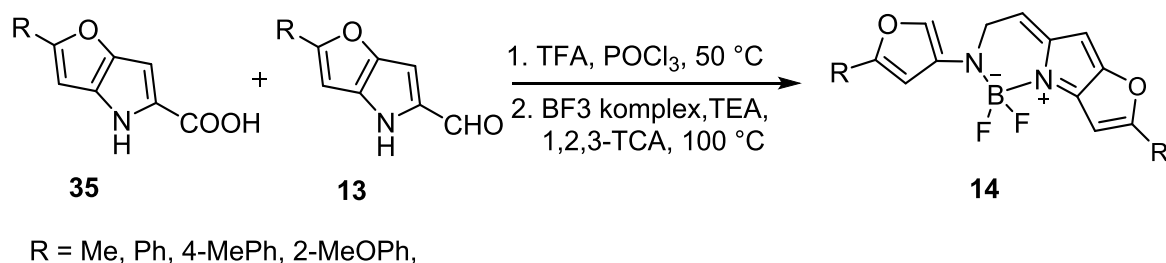


Schéma 6

Syntézou 2-formylfuro[3,2-*b*]pyrol-5-karboxylátu **10** s (2,6-dialkylfenyl)hydrazínmi v toluéne za katalýzy kyselinou 4-metylbenzénsulfónovou vznikajú hydrazóny **15** (Schéma

7). [14] Zlúčeniny **16** boli pripravené reakciou 2-furylacetonitrilu s derivátmi **10** v prítomnosti piperidínu. [21]

Reakciou 2-formylfuro[3,2-*b*]pyrol-5-karboxylátu **10** s 2-tioxo-4-tiazolidinónom v ľadovej kyseline octovej za katalýzy octanu draselného sa pripravili zlúčeniny **17**. [22]

Dimetyl 5-*R*-1*H*-furo[3,2-*b*:4,5-*b'*]dipyról-2,6-dikarboxyláty **18** sa pripravili podobne ako furo[3,2-*b*]pyrol-5-karboxyláty **1**. Reakciou metylesteru kyseliny azidoctovej v prítomnosti metoxidu sodného a následnou termolýzou vzniknutého azidoakrylátu. [23, 24]

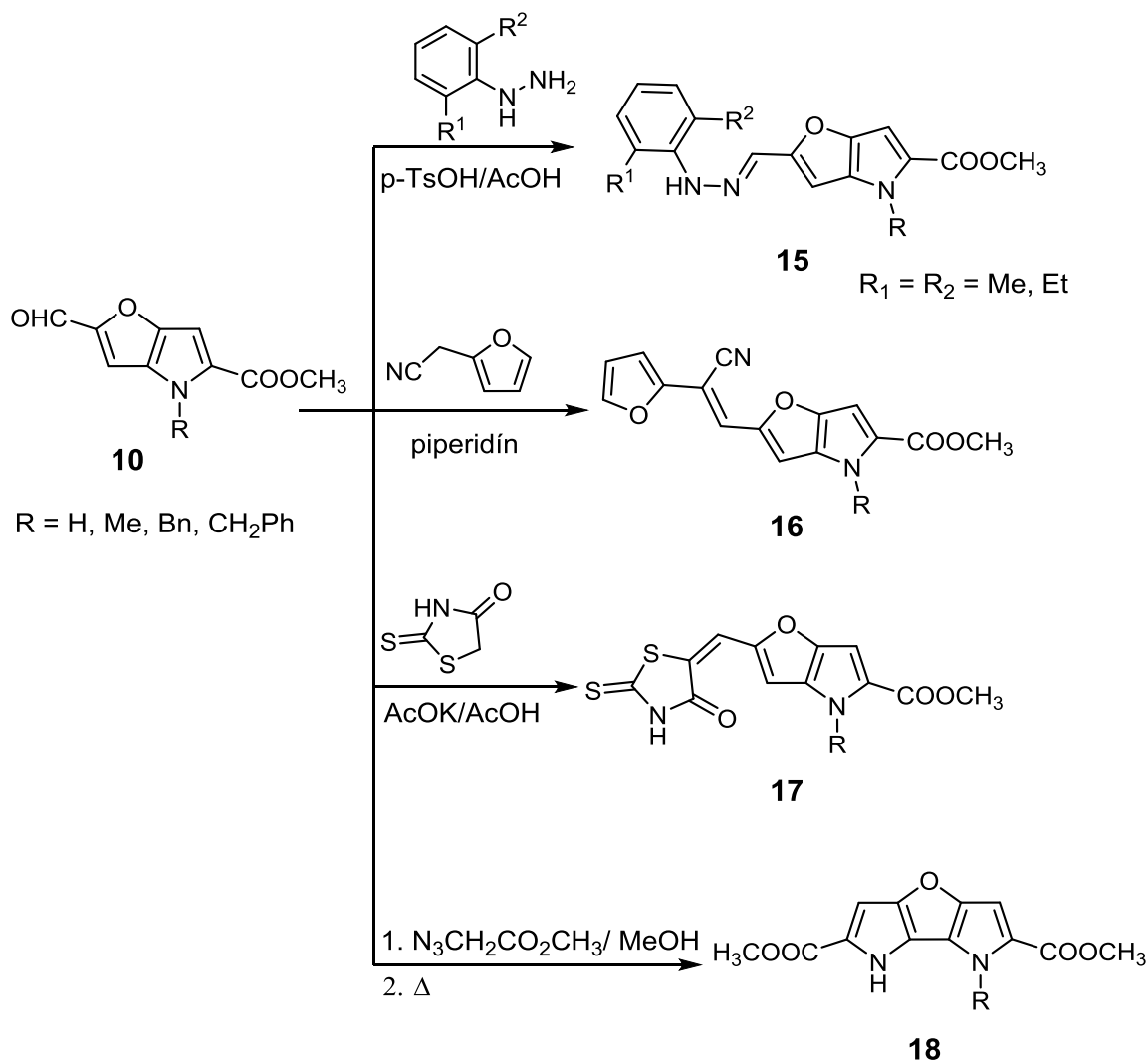


Schéma 7

2.3.1.2 Nitrácia

Priebeh nitrácie je v literatúre popísaný dvoma spôsobmi. Krutošíková a kol. [19] pripravili nitroderiváty **19** z aldehydov **10** v zmesi dymivej kyseliny dusičnej a acetanhydridu. Nitrácie boli úspešné vtedy, keď polohy 2 a 5 boli obsadené aspoň jedným elektrónakceptorným substituentom (Schéma 8). Ďalším postupom prípravy nitroderivátov

19 je priama nitrácia furo[3,2-*b*]pyrol-5-karboxylátov **1** v prostredí dusičnanu meďnatého a acetanhydridu (Schéma 8). [25]

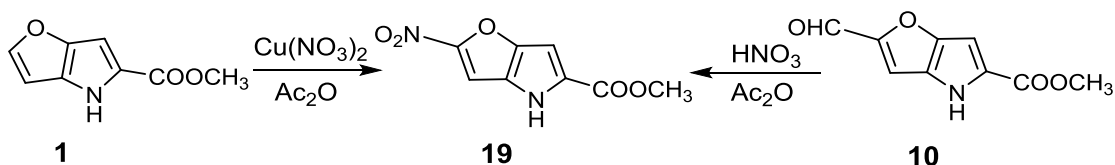


Schéma 8

2.3.1.3 Mannichova reakcia a chlorácia

Mannichovou reakciou karboxylátov **1** s *N,N*-dimetylaminom sa pripravili zodpovedajúce zlúčeniny **20** a **21** (Schéma 9). [19] Pôsobením sulfonylchloridu na furo[3,2-*b*]pyrol-5-karboxylát **1** vznikol chlórovaný derivát **22**. [26]

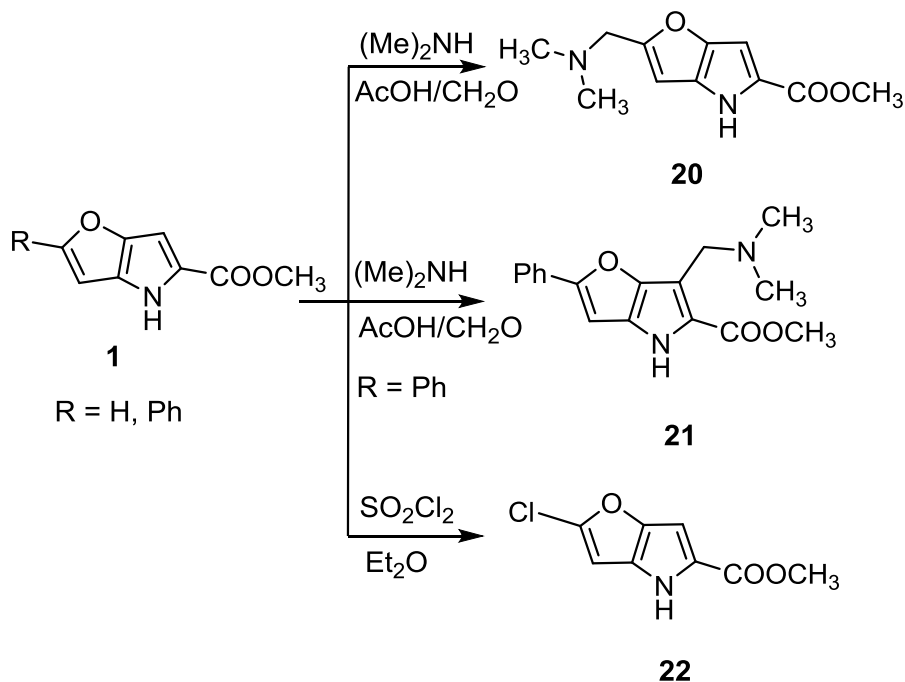


Schéma 9

2.3.2 Reakcie furo[3,2-*b*]pyrolon na uhlíku C-3

Z reakcií na C-3 je známy iba Suzukiho coupling 3-bróm-2-fenylfuro[3,2-*b*]pyrol-5-karboxylátu **1**, ktorý sa pripravil bromáciou 2-fenylfurán-2-karbaldehydu a za podmienok Hemetsbergerovej indolovej syntézy sa získa zodpovedný karboxylát **1**. Reakciou derivátu **1** s kyselinou 4-chlórphenylboronovou v toluéne a etanole za katalýzy $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ a Na_2CO_3

vznikol 3-(4-chlórphenyl)-2-fenylfuro[3,2-*b*]pyrol-5-karboxylát **23** v 82% výťažku (Schéma 10) [27]

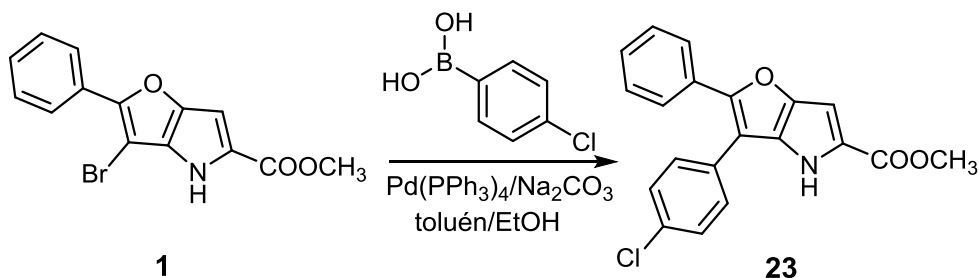


Schéma 10

2.3.3 Reakcie furo[3,2-*b*]pyrolon na NH skupine

Furo[3,2-*b*]pyrol-5-karboxyláty **1** podliehajú elektrofilným substitúciám na dusíku N-4 (Schéma 11).

S alkylhalogenidmi za podmienok fázovej transferovej katalýzy karboxyláty **1** poskytujú *N*-alkylované furo[3,2-*b*]pyrolové systémy **24**. [28] *N*-acetylované zlúčeniny **25** sa pripravili reakciou zlúčeniny **1** s hydridom lítnym v dimetylformamide za vzniku *N*-lítnej soli, ktorá následne reagovala s chloridom kyseliny octovej. Derivát **25** vzniká aj zahrievaním furo[3,2-*b*]pyrol-5-karboxylátu **1** v acetanhydride. [29]

Ďalším príkladom reakcie na dusíku N-4 pyrolového kruhu furo[3,2-*b*]pyrolon je nukleofilná substitúcia substituovaných 3-bróm-2-fenylfuro[3,2-*b*]pyrol-5-karboxylátov **26**, ktorá bola popísaná v práci Milkiewicz a kol. (Schéma 11). [27]

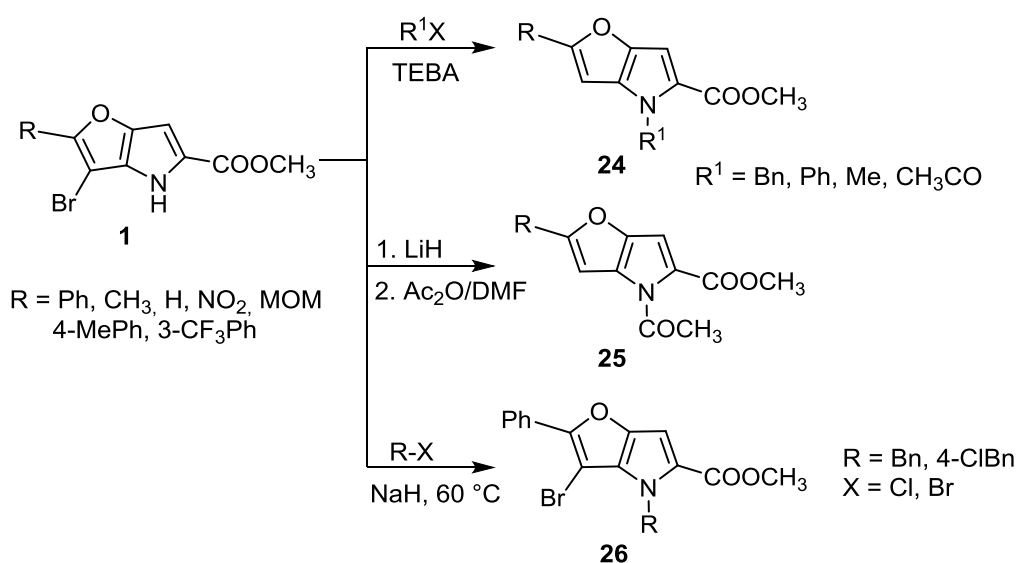


Schéma 11

2.3.4 Reakcie furo[3,2-*b*]pyrolon na esterovej skupine

Z reakcií na esterovej skupine možno spomenúť dve základné reakcie.

2.3.4.1 Hydrazinolýza a následné reakcie furo[3,2-*b*]pyrol-5-karbohydrazidov

Hydrazinolýza esterov **1** vedie ku karbohydrazidom **27** (Schéma 12). [30]

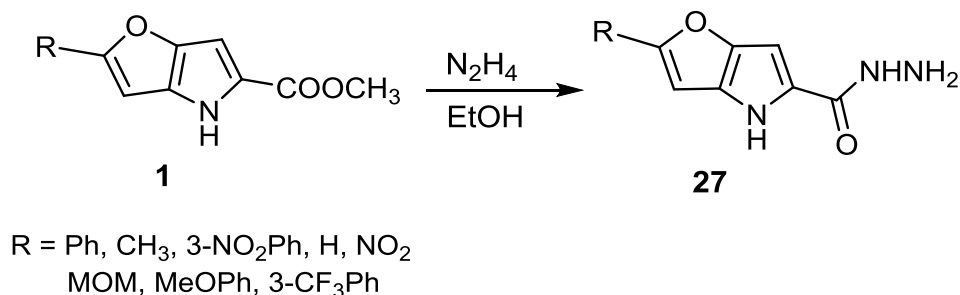


Schéma 12

Karbohydrazidy a ich deriváty sú zaujímavou skupinou látok, pretože mnohé vykazujú protinádorové [31], antimikrobiálne [32], analgetické a protizápalové účinky. [33]

Furo[3,2-*b*]pyrol-5-karbohydrazidy **27** boli v doterajšom výskume použité v reakciách s aldehydmi a na prípravu nových dusíkových heterocyklov. Azlaktóny, ktoré sa získali reakciou furán-2-karbaldehydu a tiofén-2-karbaldehydu s kyselinou hippurovou za podmienok Erlenmeyerovej reakcie [33], následne reagovali s karbohydrazidmi **27**. V závislosti od reakčných podmienok sa pripravili diacylhydrazínové deriváty **28** v 61 – 81 % výtťažkoch alebo imidazolové deriváty **29** v 66 - 77 % výtťažkoch (Schéma 13). [34]

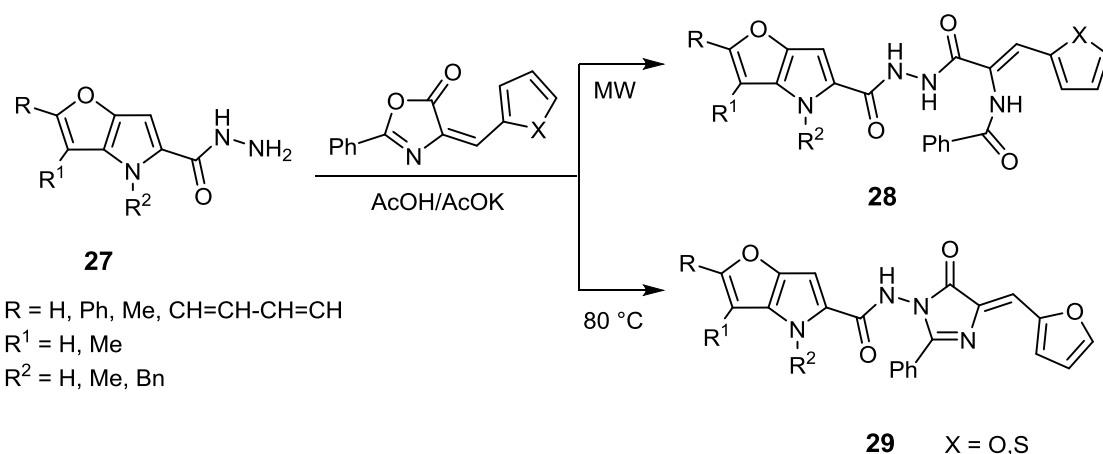


Schéma 13

Kyslo katalyzovanou reakciou **27** s pentán-2,4-diómom v etanole vznikol pyrazolový derivát **30** v 92 % výťažku (Schéma 14). Syntéza sa uskutočnila dvoma spôsobmi – konvenčným ohrevom a účinkom mikrovlnného žiarenia, pričom výhodou mikrovlnného ohrevu bolo skrátenie reakčného času.

Reakciou karbohydrazidov **27** s 2-formylfuro[3,2-*b*]pyrol-5-karboxylátom účinkom mikrovlnného žiarenia vznikli substituované furo[3,2-*b*]pyrol-5-karbohydrazidy **31**. [35]

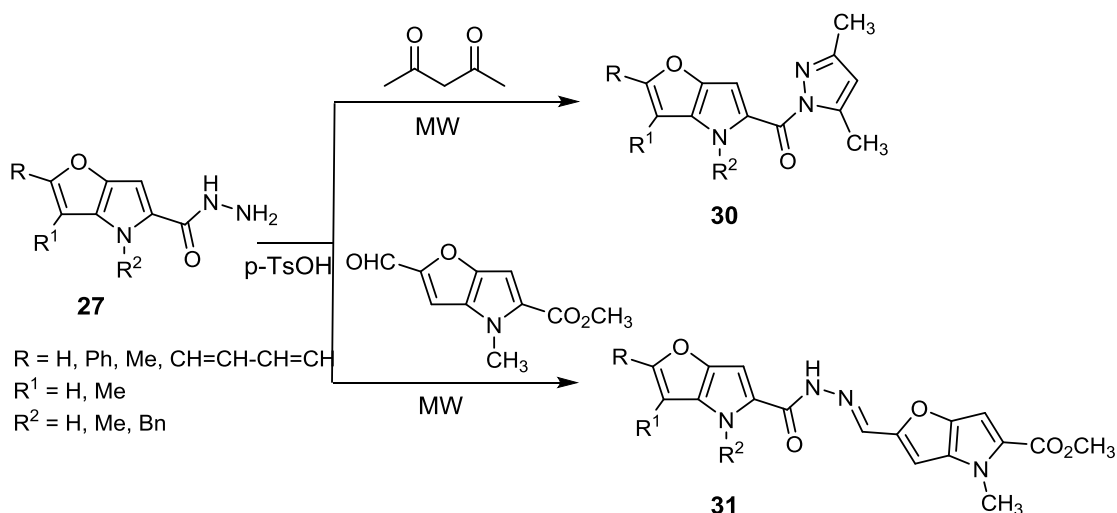


Schéma 14

Substituované furo[3,2-*b*]pyrol-5-karbohydrazidy **27** tiež reagovali s 5-arylfurán-2-karbaldehydmi, pričom vznikli príslušné deriváty karbohydrazidov **32** v 42 - 78 % výťažkoch (Schéma 15). [30, 34] Zahrievaním karbohydrazidov **27** s benzoylchloridom pri 110 °C v pyridíne boli syntetizované *N'*- benzoylkarbohydrazidy **33** v reakčnom čase od 45 min. po 2 hodiny v 45 - 90 % výťažkoch. [36]

N'-formyl- a *N'*-acetylfuro[3,2-*b*]pyrol-5-karbohydrazidy **34** boli syntetizované účinkom mikrovlnného žiarenia reakciou furo[3,2-*b*]pyrol-5-karbohydrazidov **27** s kyselinou octovou alebo kyselinou mravčou v 47 - 87 % výťažkoch (Schéma 15). [35]

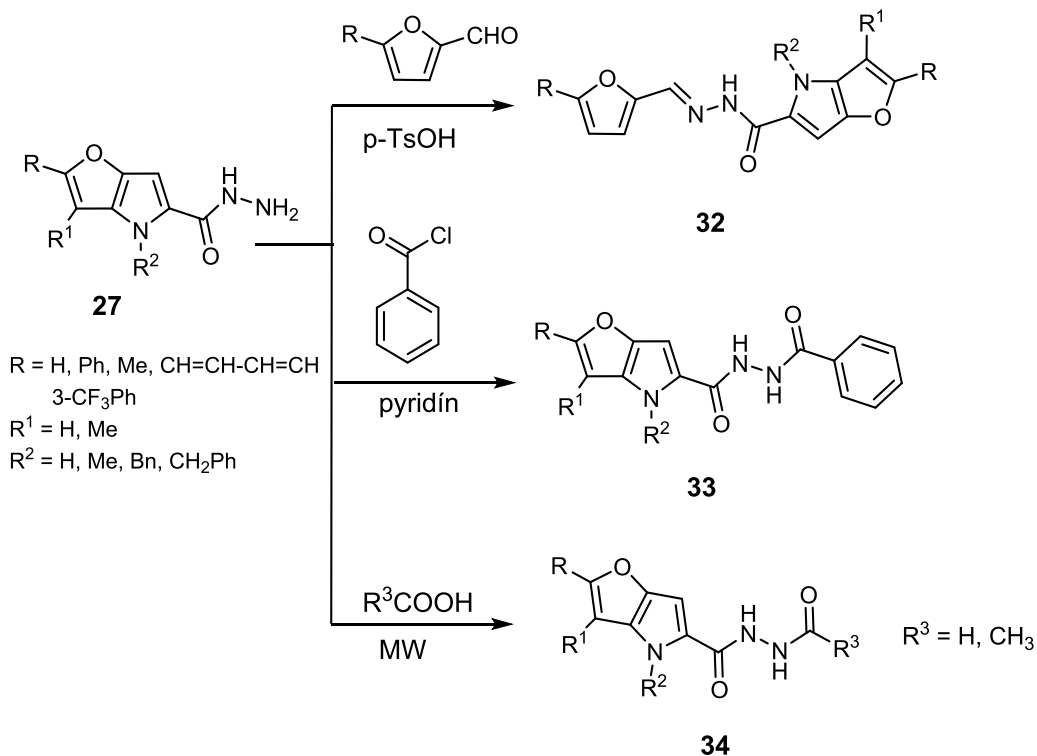


Schéma 15

2.3.4.2 Hydrolýza a následné reakcie

Zásaditou hydrolýzou furo[3,2-*b*]pyrrol-5-karboxylátu **1** vo vodnom roztoku NaOH sa pripravila kyselina furo[3,2-*b*]pyrrol-5-karboxylová **35** [19], ktorej reakciou s tionylchloridom v dichlórmetáne vznikol príslušný acylchlorid **36**. Takto pripravený acylchlorid **36** reagoval s plynným amoniakom na príslušný karboxamid **37** (Schéma 16). [37]

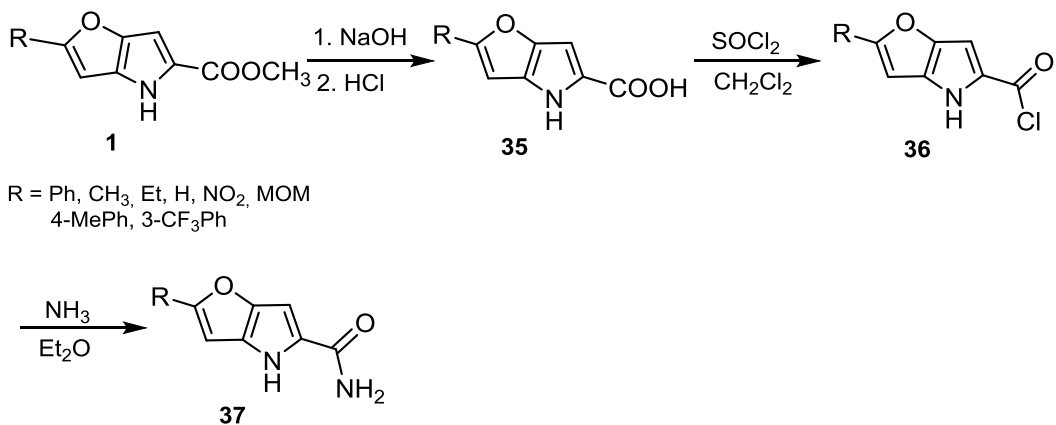


Schéma 16

Reakciou kyseliny furo[3,2-*b*]pyrrol-5-karboxylovej **35** s meďou v chinolíne pri 260 °C sa pripravili zodpovedné furo[3,2-*b*]pyroly **38** (Schéma 17). [38]

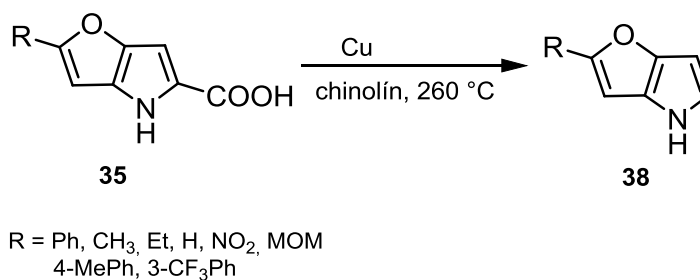


Schéma 17

2.3.5 Reakcie furo[3,2-*b*]pyrolov na uhlíku C-6

Reakcie na C-6 boli skúmané iba u 2-substituovaných derivátov tieno[3,2-*b*]pyrolu (Schéma 18 a 19).

2.3.5.1 Nitrácia a acylácia

Nitráciou tieno[3,2-*b*]pyrrolového derivátu **1** do polohy C-6 katalyzovanou Cu(NO₃)₂ a následnou *N*-alkyláciou vznikol metyl 2-R-4-metyl-6-nitrotieno[3,2-*b*]pyrrol-5-karboxylát **39** (Schéma 18). Redukcia nitroskupiny sa uskutočnila pôsobením chloridu cínateho v kyslom prostredí za vzniku 6-aminoderivátu **40**. [39]

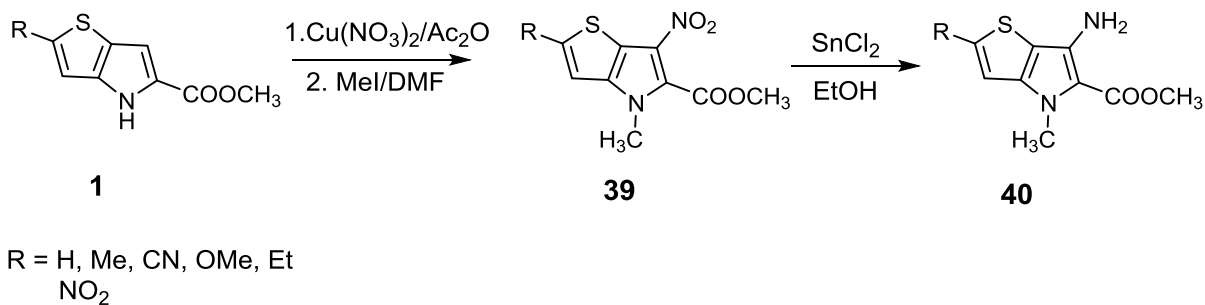


Schéma 18

Acylácia 2-metyltieno[3,2-*b*]pyrrol-5-karboxylátu **1** s acetylchloridom prebiehala v nitrometáne alebo dichlóretáne za katalýzy Lewisovou kyselinou AlCl₃ za vzniku derivátu **41** vo výťažku 93 % (Schéma 19). [40]

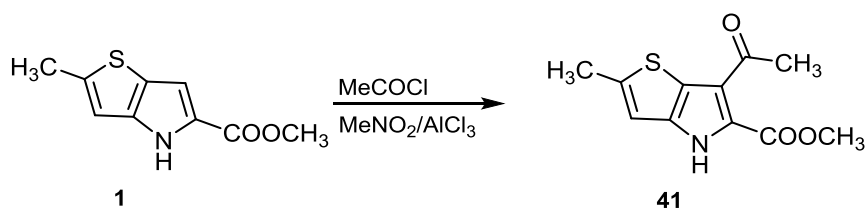


Schéma 19

2.3.6 Furo[3,2-*b*]pyrolové deriváty kondenzované s heterocyklickými kruhmi

Syntéza zlúčenín, obsahujúcich kondenzované triazínové kruhy je objektom záujmu kvôli biologickej aktivite mnohých 1,3,5- a 1,2,4-triazínových derivátov. [4, 41-42]

Z tohto hľadiska sú substituované furo[3,2-*b*]pyrol-5-karbohydrazidy **27** vhodné východiskové látky na prípravu kondenzovaných triazínových derivátov. Vznik triazínového kruhu umožňuje prítomnosť dvoch reakčných centier v karbohydrazide **27** pyrolového dusíka (N-4) a NH_2 skupiny hydrazidu, ktoré vstupujú do reakcie s ortoestermi, napr. trietyl ortoformiát, trietyl ortoacetát alebo trietyl ortopropionát za vzniku triazínov **42** v 53 - 88 % výtťažkoch (Schéma 20).

Z takto pripravených triazínónov **42** sa pripravili zodpovedajúce tióny **43** použitím sulfidu fosforečného v suchom pyridíne. Zahrievaním tiónov **43** v hydrazíne sa získali hydrazóny **44**. V molekule **44** sú tiež prítomné dve reakčné centrá, analogické s východiskovým hydrazidom **27**, ich reakciou s uvedenými ortoestermi vznikli furo[2',3':4,5]pyrolo[1,2-*d*]triazolo[3,4-*f*][1,2,4]triazínové deriváty **45** v 56 – 68 % výtťažkoch (Schéma 20). [43-45]

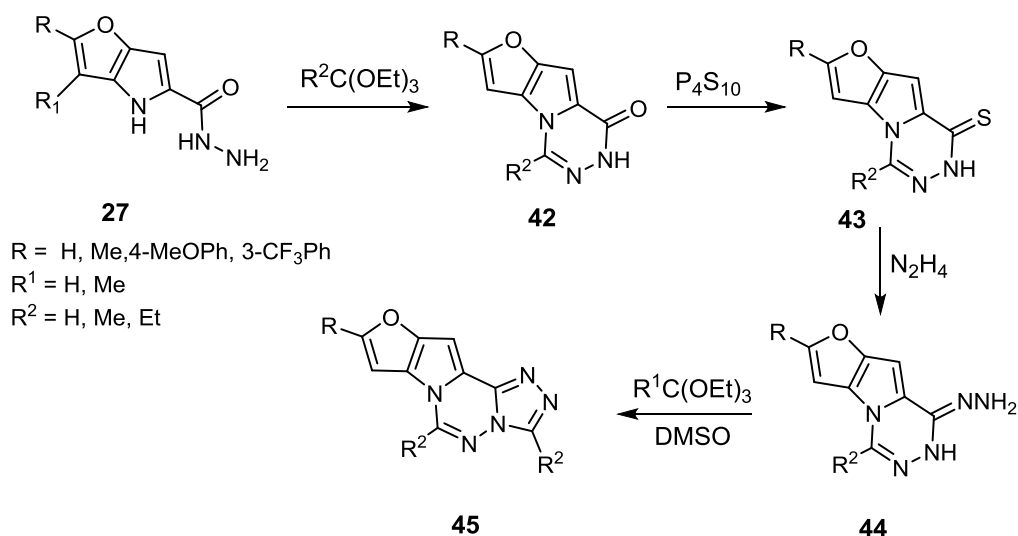


Schéma 20

6-Formyltieno[3,2-*b*]pyrol-5-karboxyláty **11** slúžili ako východiskové látky pri syntéze pyridazínových derivátov **48** (Schéma 21). Alkyláciou dusíka N-4 zlúčeniny **11** s metyljodidom v DMF sa pripravil derivát **46**, ktorý následnou reakciou v nadbytku hydrazínu poskytol pyridazínón **47**. Alkyláciou dusíka N-6 s rôznymi substituovanými alkyl alebo benzylchloridmi alebo bromidmi v DMF sa pripravili tieno[2',3':4,5]pyrol[2,3-*d*]pyridazínóny **48**. [39-40]

Buchwald a kol. [46] navrhli nový spôsob arylácie dusíka N-6 za katalýzy meďou, pričom tiež pripravili analogické tieno[2',3':4,5]pyrol[2,3-*d*]pyridazínóny **48**.

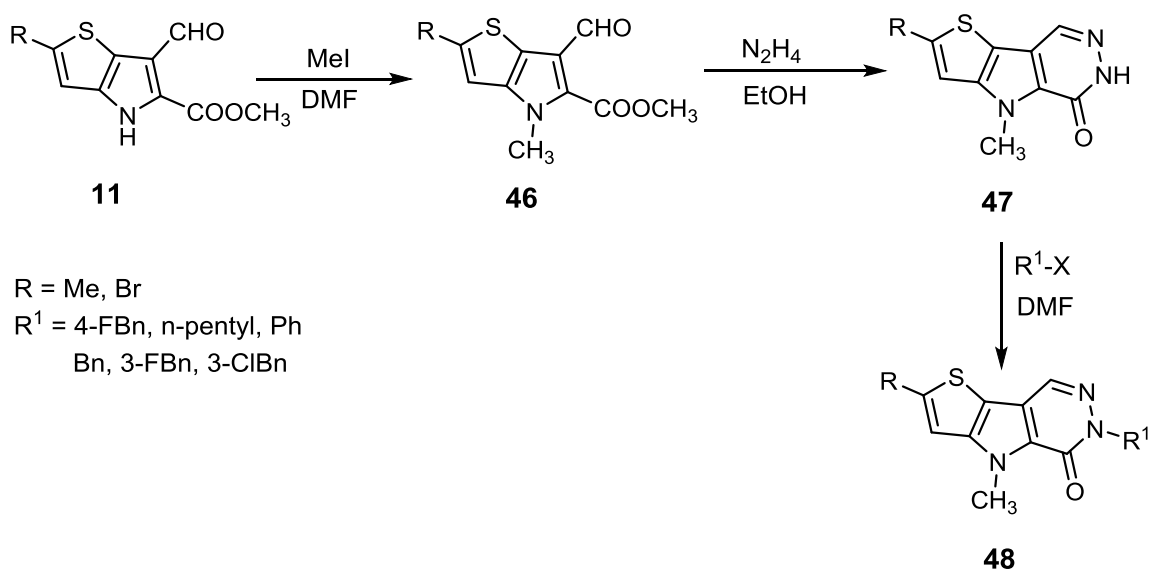


Schéma 21

Ďalším šesťčlánkovým heterocyklom, kondenzovaným s tieno[3,2-*b*]pyrolovým jadrom bol pyrimidínový kruh. Jiang a kol. [39] navrhli syntézu pyrimidínového derivátu **50** kondenzáciou zlúčeniny **40** s formamidom a mravčanom amónnym pri 120 °C. Aryláciou dusíka N-6 s rôznymi substituovanými alkyl alebo benzylchloridmi v dimetylformamide pripravili substituované tieno[2',3':4,5]pyrol[3,2-*d*]pyrimidínóny **50** (Schéma 22).

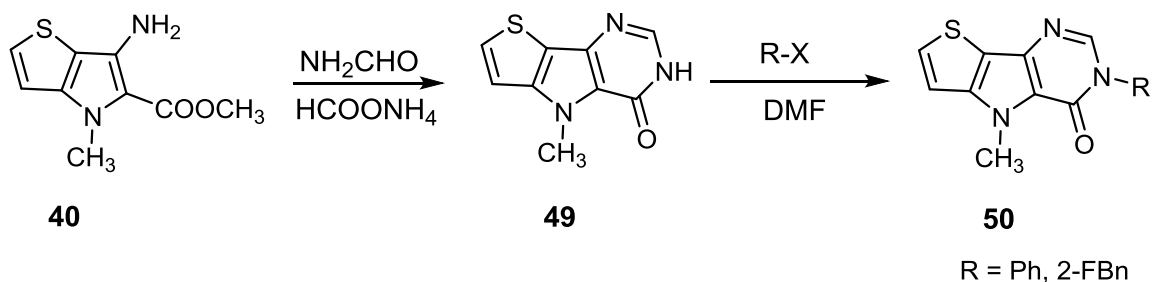
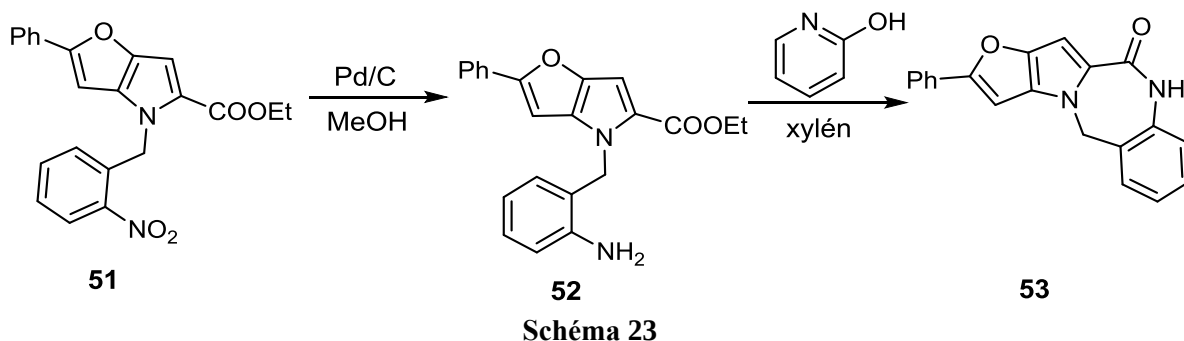


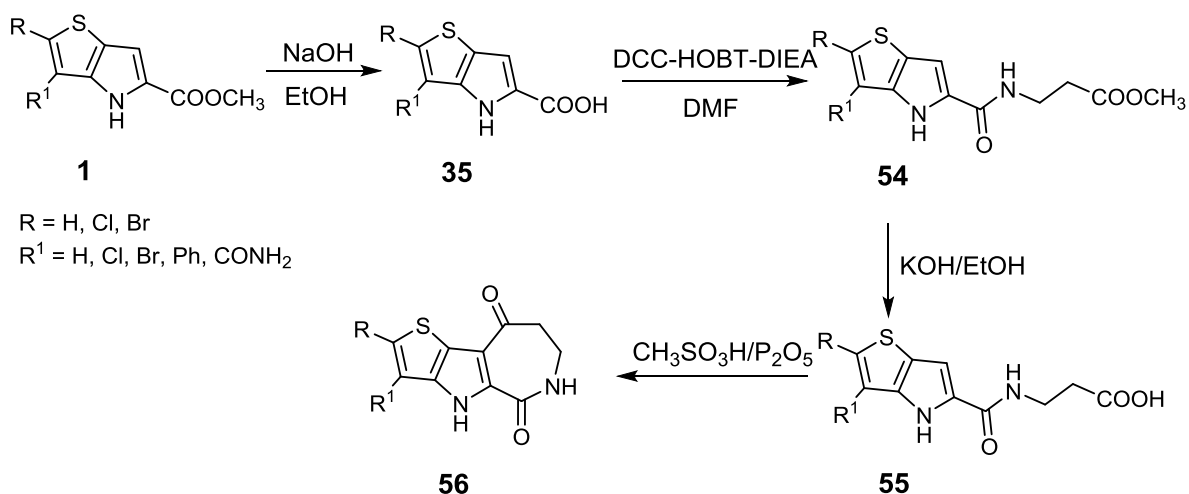
Schéma 22

Okrem šesťčlankových dusíkatých heterocyklov, kondenzovaných s tieno[3,2-*b*]pyrolovým a furo[3,2-*b*]pyrolovým jadrom, boli pripravené aj kondenzované sedemčlenné azepínové a diazepínové systémy.

Krutošíková a Hanes [47] opísali prípravu 2-fenyl-11*H*-benzo[*e*]furo[2',3':4,5]pyrol[1,2-*a*][1,4]diazepinónu **53**, ktorý sa pripravili reakciou 4-(2-aminobenzyl)-2-fenylfuro[3,2-*b*]pyrol-5-karboxylátu **52** s 2-hydroxypyridínom v xyléne (Schéma 23).

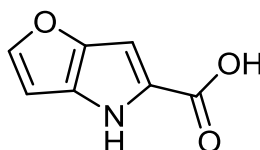


Parmentier a kol. [48] pripravili sériu derivátov tieno[3,2-*b*]pyrolazepinónov **55**, ktoré sa ukázali byť účinnými enzymatickými inhibítormi voči inhibítorom kináz CHK1 (serín-treonín), ktoré hrajú dôležitú úlohu v progresii bunkového rastu v prípade rakovinových buniek. Uvedené deriváty tieno[3,2-*b*]pyrolazepinónov **56** boli pripravené viacstupňovou syntézou vychádzajúcou z metyl tieno[3,2-*b*]pyrol-5-karboxylátov **1**, ktoré sa v prvom stupni hydrolyzovali na kyseliny **35**. Následne kyseliny **35** reakciou s metylesterom kyseliny 3-aminopropánovej v dimetylformamide poskytli zlúčeniny **54**. Po zásaditej hydrolýze a finálnej cyklizácii zlúčeniny **55** v zmesi kyseliny metánsulfónovej a oxidu fosforečného vznikli produkty **56** v 15 - 93 % výťažkoch (Schéma 24).



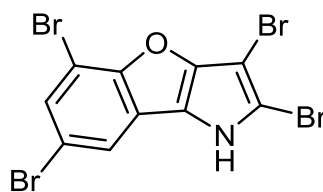
2.4 Biologická aktivita zlúčenín s furopyrolovým skeletom

Významnou biologicky účinnou látkou s furopyrolovým skeletom je kyselina 4*H*-furo[3,2-*b*]pyrol-5-karboxylová (Obr. 3), ktorá má potenciál ako antischizofrenikum, pretože vykazuje inhibičnú aktivitu voči oxidáze *D*-aminokyselín (DAO), čo je enzým, ktorý katalyzuje oxidatívnu deamináciu aminokyselín, teda aj *D*-serínu, a tým má vplyv na *N*-metyl-*D*-aspartátový receptor (NMDA). Hypofunkcia NMDA receptora sa spája s rozvojom schizofrénie. [49]



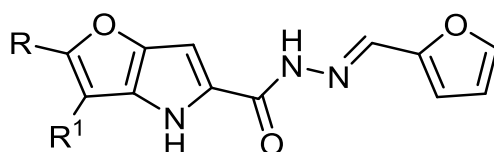
Obr. 3 Kyselina 4*H*-furo[3,2-*b*]pyrol-5-karboxylová

V prírode sa veľmi zriedkavo vyskytujú prírodné látky s furo[3,2-*b*]pyrolovým skeletom. K takýmto látkam môžeme priradiť 2,3,5,7-tetrabromobenzofuro[3,2-*b*]pyrol (Obr. 4), ktorý bol skúmaný ako antimikrobiálny metabolit, ktorý sa získal frakcionáciou morskej baktérie *Pseudoalteromonas spongiae*, izolovanej z povrchu nahožiabry (*Nudibranchia*) a vykazuje významnú antimikrobiálnu aktivitu voči metilicín rezistentnému *Staphylococcus aureus* (MRSA), ktorý je zodpovedný za ťažko liečiteľné infekcie u ľudí v nemocniciach, väzniciach a opatrovateľských zariadeniach. Z tohto pohľadu je izolovaný derivát veľmi zaujímavý, vzhľadom na zvyšujúcu sa rezistenciu bakteriálnych kmeňov voči známym antibiotikám. [50]



Obr. 4 2,3,5,7-Tetrabromobenzofuro[3,2-*b*]pyrol

Substituované deriváty furo[3,2-*b*]pyrol (Obr. 5) boli skúmané ako účinné inhibítory vplývajúce na rýchlosť vývoja kyslíka v algálnych suspenziách *Chlorella vulgaris*. Taktiež sa skúmal ich vplyv na fotosyntetické centrá chloroplastov špenátu, v ktorých preukázali svoj inhibičný účinok na prenos elektrónov. [35, 51]



Obr. 5 Substituované furo[3,2-*b*]pyrrol-5-karbohydrazidy

Fukuda a kol. [52] študovali vo svojej práci tenzidol A a tenzidol B (Obr. 6), ktoré boli izolované z huby *Aspergillus niger* ako perspektívne potenciátory antimykotickej aktivity voči *Candida albicans*. Tenzidol A má priaznivejšie antimykotické účinky ako tenzidol B a obe zlúčeniny majú mierne antibakteriálne aktivity.



Obr. 6 Vľavo – tenzidol A a vpravo – tenzidol B

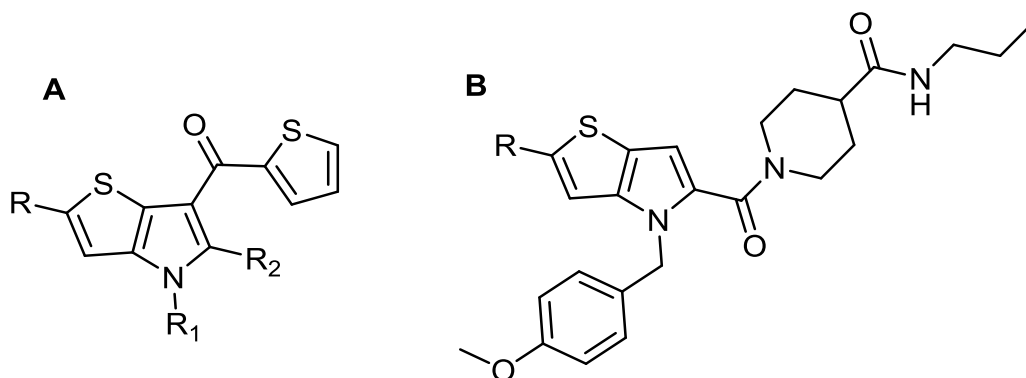
Tieno[3,2-*b*]pyrrol[3,2-*d*]pyridazinóny a tieno[3,2-*b*]pyrrol[3,2-*d*]pyrimidinóny (Obr. 7) boli skúmané ako aktivátory špecifickej M2 formy pyruvátkinázy (PKM2). [39] PKM2 je izoenzým glykolytického enzýmu pyruvátkinázy, ktorý sa exprimuje v diferencovaných tkanivách, ako sú pľúca, sieťnica a taktiež v bunkách s vysokou rýchlosťou syntézy nukleových kyselín – embryonálne bunky, nádorové bunky a normálne proliferujúce bunky. [53] Isoenzým PKM2 sa môže vyskytovať v tetramérnej a v dimérnej forme. Prítomnosť menej aktívnej dimerickej formy PKM2 je známa ako jeden z klinických markerov malignity, zatiaľ čo tetramér PKM2 sa vyskytuje v zdravých bunkách a je vysoko aktívny v glykolytických procesoch premeny energie na pyruvát a laktát. [39]



Obr. 7 Vľavo - tieno[3,2-*b*]pyrrol[3,2-*d*]pyridazinóny a vpravo - tieno[3,2-*b*]pyrrol[3,2-*d*]pyrimidinóny

Deriváty tieno[3,2-*b*]pyrolu (Obr. 8A) boli testované na protizápalovú aktivitu, ale oproti zlúčeninám, používaným na liečbu reumatoidnej artritídy a osteoartritídy, ako napr. 5-chloro-2-hydroxy-3-(2-tienylkarbonyl)-1*H*-indol-1-karboxamid (*tenidap*®) vykázali len miernu protizápalovú aktivitu. [54]

Ďalšie deriváty tieno[3,2-*b*]pyrolu (Obr. 8B) vykázali inhibičnú aktivitu na Chikungunya vírus, ktorý spôsobuje nadmernú bolesť kĺbov, alebo aj ich stuhnutosť. Tá môže trvať celé týždne až roky. [91]



Obr. 8 Deriváty tieno[3,2-*b*]pyrolu: **A** - s protizápalovou, **B** - s antivirotickou aktivitou

3. VÝVOJ KANDIDÁTOV LIEČIV A BIOANALYTICKÉ HODNOTENIE ZLÚČENÍN

Primárnou úlohou vedcov pri vývoji nových liečiv je identifikácia nosnej štruktúry. Nosná štruktúra liečiva sa môže získať z prírodných zdrojov, syntézou, biotechnologickým procesom alebo projektovaním metódami molekulového modelovania. Následne sa nosná štruktúra modifikuje s cieľom zlepšenia účinku, selektivity a potlačenia toxicity. Pri tomto procese sa hľadá a využíva vzťah medzi štruktúrou a aktivitou. Na splnenie týchto požiadaviek je nevyhnutné identifikovať miesto účinku, ktoré je cieľom pôsobenia vyvíjaného liečiva a tiež určiť jeho úlohy voči chorobe.

Ďalším krokom procesu vývoja nových liečiv je vyvinúť a pochopiť biochemické procesy, ktoré sú dôležité pre určitú chorobu. Poznanie molekulového mechanizmu choroby je významným krokom pri riadení výskumu a formovaní spôsobu liečby. [55]

Vedci na hľadanie potrebných nosných štruktúr využívajú výkonné počítačové programy, ktoré sú schopné vybrať také zlúčeniny, ktoré budú s najväčšou pravdepodobnosťou vhodné liečivá a následne sa takéto látky testujú. Z tohto poznatku vyplývajú hlavné kroky objavu nového liečiva. Nosná štruktúra je prototyp zlúčeniny so zaujímavou biologickou aktivitou, ale nevhodnou pre trh. Preto sa musí uskutočniť optimalizácia biologickej aktivity, zníženie toxicity a ďalších nežiaducich účinkov a ako posledný krok sa musí vyriešiť transport liečiva do organizmu. [56]

3.1 Metódy CADD pri projektovaní liečiv

Prvým krokom k objaveniu novej nosnej štruktúry je identifikácia farmakofóra a ďalším krokom je projektovanie a syntetizovanie s cieľom zvýšenia aktivity a redukovania vedľajších účinkov. V poslednom kroku prebieha modifikácia nefarmakofórovej oblasti s cieľom upravenia lipofilných a hydrofilných vlastností liečiva.

Na tento vývoj sa v súčasnosti využívajú metódy CADD (*Computer Aided Drug Design*). CADD je metóda, ktorá sa používa na vývoj zlúčenín s potenciálnym účinkom, ktoré spĺňajú požadované kritériá – vysoká účinnosť a špecificita, minimálna toxicita a dobrá biologická dostupnosť. Metóda využíva počítačovú grafiku na zobrazenie a manipuláciu s chemickými štruktúrami so zámerom určenia ich konformácie a odhadu podobnosti zlúčenín. Táto metóda je klasifikovaná na báze skrínungu štruktúry liečiv alebo na báze skrínungu ligandu daného liečiva. [57]

Sú dve hlavné oblasti aplikácie CADD metód. Prvá oblasť aplikácie zahŕňa molekulárnu dynamiku, kvantovú mechaniku, lineárne interakcie energie a mnohé iné analógy v princípe s vysoko priepustným skríningom. Výsledkom je informácia o štruktúre proteínu alebo ligandu, čo je nevyhnuté pre identifikáciu novej zlúčeniny. [58] Ďalšia oblasť aplikácie využíva informáciu o ligande na predikciu aktivity v závislosti na podobnosti alebo rozdielnosti už známeho účinného ligandu, vrátane modelovania farmakoforu a kvantitatívnych vzťahov medzi štruktúrou a aktivitou (QSAR). [59] Táto metóda využíva štatistické metódy na prepojenie štruktúrnych rys biologických aktivít a na identifikáciu špecifických rys ligandu potrebného pre interakciu s jeho cieľmi. Uvedené metódy sa môžu použiť v počiatočnom procese objavovania nových liečiv a môžu pomôcť nájsť východiskový základ pre úpravy na zlepšenie vlastností potenciálnych liečiv.

CADD je účinným nástrojom pri objavovaní nových liečiv, výrazne šetrí obmedzené zdroje a urýchľuje vývojové cykly v oblasti výskumu liekov. Jeho aplikácia bola úspešne použitá pri vývoji inhibítorov *beta*-sekretázy a inhibítorov *gamma*-sekretázy a ďalších zlúčenín pre diagnostiku a terapiu. [59]

3.2 Lipinského pravidiel

Lipinského pravidiel sú princípy navrhnuté pre vývoj nových látok s potenciálnym biologickým účinkom. Existujú mnohé úpravy týchto pravidiel podľa druhu podania liečiva. [60] Všeobecne však platí týchto päť pravidiel, ktoré musí spĺňať látka vhodná ako liečivo:

- molekulová hmotnosť látky ≤ 500 g/mol
- rozdeľovací koeficient $\log P \leq 5$ – látky, ktoré majú vyššiu hodnotu $\log P$ sú nepolárne a pri nich nedochádza k sorpcii do systému, naopak látky, ktoré majú $\log P$ veľmi nízke sú polárne a z organizmu sa rýchlo vylúčia
- počet vodíkovo-väzbových donorov ≤ 5
- počet vodíkovo-väzbových akceptorov, ktoré môžu tvoriť vodíkové väzby ≤ 10
- počet rotovateľných väzieb v sp^3 hybridizácii ≤ 5

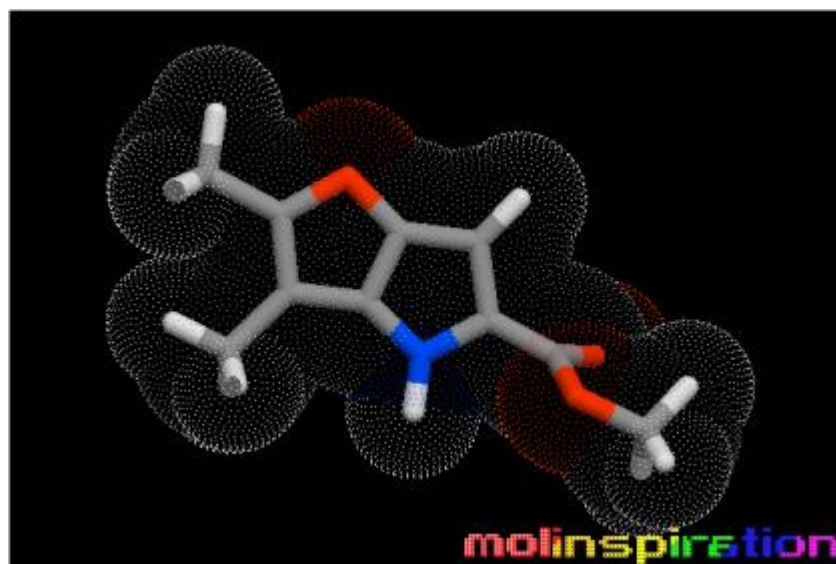
Látky, ktoré spĺňajú tieto podmienky musia byť dobre biologicky dostupné a vyznačovať sa schopnosťou pasívneho prechodu cez rôzne biologické bariéry. [61] Tieto pravidlá sú však orientačné, pretože ak nejaká látka nespĺňa kritériá tak s veľkou pravdepodobnosťou nebude vykazovať biologickú aktivitu. Látka, ktorá naopak spĺňa všetky kritériá nemusí

hneď byť biologicky aktívna. Lipinského pravidlá však majú zásadný vplyv na výber nových liečiv. [60]

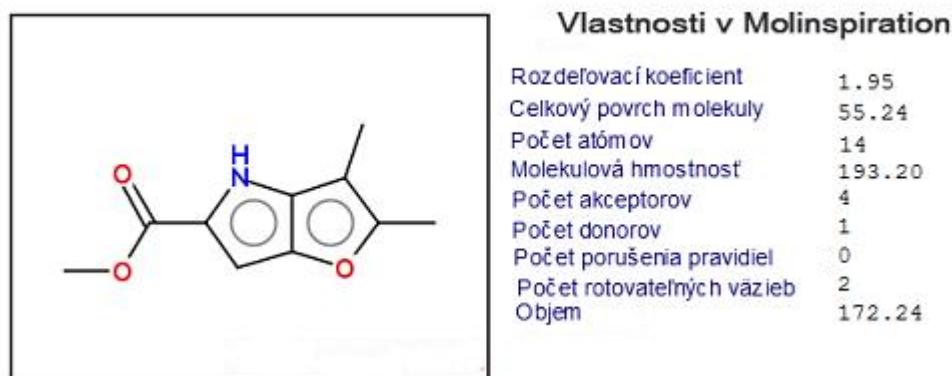
3.2.1 Predikcia biologickej aktivity dostupnými softvérmi

Farmakológia definuje biologickú aktivitu, resp. bioaktivitu ako vlastnosť s pozitívnymi alebo negatívnymi účinkami na živú hmotu. Biologická aktivita patrí medzi dôležité vlastnosti pri výbere novej účinnej látky s potenciálom na liečiva. Na to, aby bola látka účinným liečivom musí byť daná zlúčenina nielen aktívna voči cieľu, ale musí mať aj príslušné vlastnosti, ako sú absorpcia, distribúcia, metabolizmus a vylučovanie. Na základe chemickej štruktúry dokážeme predpovedať či bude daná zlúčenina biologicky aktívna. Chemické a biologické vedy využívajú na predikciu tejto vlastnosti kvantitatívny vzťah medzi štruktúrou a aktivitou QSAR (*Quantitative Structure Activity Relationship*). [62]

Molinspiration (<http://www.molinspiration.com>) je jedným zo softvérov na predikciu biologickej aktivity. Softvér je voľne dostupný a ponúka širokú škálu chemicko-informatických nástrojov na vypočítanie rôznych molekulárnych vlastností, modelovanie, navrhovanie a tiež virtuálny skrining, predpovede biologickej aktivity. Tento softvér umožňuje po nakreslení zvolenej štruktúry užívateľovi zobrazenie danej zlúčeniny v 3D priestore (Obr. 9), výpočet Lipinského pravidiel (Obr. 10) a predikciu biologickej aktivity (Obr. 11).

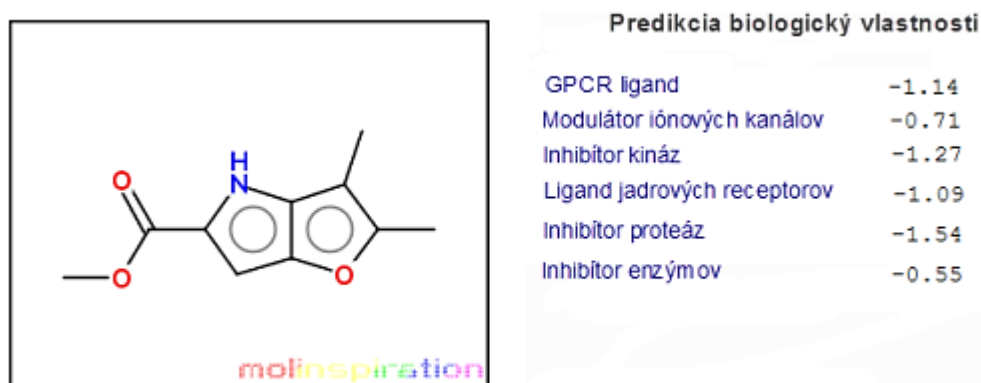


Obr. 9 3D zobrazenie štruktúry v softvéri Molinspiration



Obr. 10 Výpočet vlastností zlúčeniny v softvéri Molinspiration

Virtuálnymi parametrami predikcie biologickej aktivity v tomto softvéri sú: GPCR ligand – je to ligand receptorov spriahnutých s G proteínmi, modulátor iónových kanálov, inhibítor kináz – enzýmov, ktoré blokujú účinok jednej alebo viacerých proteínkináz, ligand jadrových receptorov, inhibítor proteáz a inhibítor enzýmov (Obr. 11).



Obr. 11 Predikcia biologických vlastností v softvéri Molinspiration

Ďalší typ softvéru, ktorý umožňuje nielen predikciu biologických vlastností je PreAdmet (<https://preadmet.bmdrc.kr>). Tento softvér ponúka užívateľovi rýchle posúdenie látok na 100 rôznych vlastností, ktoré pokrývajú kinetiku absorpcie, metabolizmus, vylučovanie, aktívny transport, väzbové interakcie liečiv a počiatočnú indikáciu bunkovej toxicity. PreAdmet je zameraný hlavne na identifikáciu vedenia molekuly, ktorá môže byť potenciálne škodlivá a takáto zlúčenina sa môže byť v počiatočných fázach vývoja nových liečiv vylúčená. V dôsledku syntetizovania čoraz zložitejších štruktúr potenciálnych liečiv je veľmi dôležité odhadnúť celkový ADMET profil pre ďalší výskum. Softvér PreAdmet má 4 hlavné časti:

3. Vývoj kandidátov liečiv a bioanalytické hodnotenie zlúčenín

- *výpočet molekulárnych deskriptorov* – sú to parametre, ktoré popisujú biologickú aktivitu testovaných zlúčenín. Deskriptory sú spojené s fyzikálno-chemickými vlastnosťami, ako sú lipofilita, molekulová hmotnosť, rozpustnosť vo vode a parciálny náboj
- *predpoveď podobnosti k liečivu* – výpočet Lipinského pravidiel, pravidlo Lead-like a predikcia podobných vlastností, ktoré sa majú komerčné lieky
- *ADMET predikcia* – poskytuje informácie o liečive a jeho vlastnostiach v CNS, ako sú väzby na bielkoviny, hematoencefalická bariéra, bunková línia ľudského karcinómu hrubého čreva, priepustnosť cez pokožku, schopnosť absorpcie ľudského čreva (Obr. 12)
- *predikcia toxicity* – Amesov test a test karcinogenity a mutagenity (Obr. 13)

+	BBB	2.19785
+	Buffer_solubility_mg_L	6636.99
+	Caco2	43.5353
+	CYP_2C19_inhibition	inhibitor
+	CYP_2C9_inhibition	inhibitor
+	CYP_2D6_inhibition	nie
+	CYP_2D6_substrate	nie
+	CYP_3A4_inhibition	inhibitor
+	CYP_3A4_substrate	slabý
+	HIA	88.281134
+	MDCK	388.479
+	Pgp_inhibition	nie
+	Plasma_Protein_Binding	76.838692
+	Pure_water_solubility_mg_L	1687.1
+	Skin_Permeability	-3.85864
+	SKlogD_value	2.065170
+	SKlogP_value	2.065170
+	SKlogS_buffer	-1.464040
+	SKlogS_pure	-2.058870

Obr. 12 Predikcia ADMET vlastností softvérom PreAdmet

	algae_at	0.0469019
	Ames_test	mutagén
	Carcino_Mouse	pozitívny
	Carcino_Rat	pozitívny
	daphnia_at	0.200737
	hERG_inhibition	stredne rizikový
	medaka_at	0.0555271
	minnow_at	0.0466534
	TA100_10RLI	pozitívny
	TA100_NA	pozitívny
	TA1535_10RLI	pozitívny
	TA1535_NA	pozitívny

Obr. 13 Predikcia toxicity softvérom PreAdmet

3.3 Antibakteriálna aktivita

Ľudstvo bojuje od nepamäti proti infekčným chorobám. Vyskytovali sa masovo a spôsobovali veľké straty na životoch. V minulosti bol človek voči infekciám bezmocný, ale až rozvoj mikrobiológie umožnil poznať hlavnú príčinu infekčných chorôb. Takto získané vedomosti o pôvode ochorení dali príležitosť urobiť opatrenia proti ich šíreniu a k hľadaniu nových spôsobov liečby.

Prvé používanie látok s antimikrobiálnymi vlastnosťami sa datuje k starovekým Egypťanom a Grékom, ktorí používali na liečbu infekcií špecifické plesne a rastlinné extrakty. Veľkým prínosom v tejto oblasti bolo popísanie inhibície rastu *Bacillus anthracis* Louisom Pasteurom v roku 1877 účinkom niektorých anaeróbných baktérii. Po objavení penicilínu Alexandrom Flemingom v roku 1929 sa začali antibiotiká prakticky využívať. V súčasnej dobe sa na liečbu infekčných chorôb využíva mnoho syntetických antibiotík, čo predstavuje veľké riziko rezistencie voči antibiotikám a vzniku alergických reakcií pacientov na niektoré antibiotiká. [63]

Vo všeobecnosti sa za antibakteriálne látky považujú také látky, ktoré ničia mikroorganizmy alebo zastavujú ich rast. Tieto látky sa rozdeľujú podľa pôsobenia na mikroorganizmy, na antibiotiká proti baktériám, antimykotiká proti hubám, antiparazitiká proti červom a antivirotiká proti vírusom. [64]

Antibiotiká sú chemoterapeutiká, ktoré inhibujú alebo ničia rast mikroorganizmov – baktérie, huby a prvokové parazity. Podľa spôsobu účinku ich delíme na bakteriostatické, ktorých účinkov vyjadrujeme ako aktivitu chemickej látky alebo zmesi látok, ktorá vedie k zastaveniu metabolickej aktivity bakteriálnej bunky a taktiež jej rastu a baktericídne, ktorých účinkov vyjadrujeme ako aktivitu látky alebo zmesi látok, ktorá vedie k usmrteniu bakteriálnej bunky. [65] U antibiotík rozlišujeme tri základné mechanizmy účinku:

- zastavenie syntézy bunkovej steny baktérií
- zásah do intermediárneho metabolizmu baktérii
- zmena proteosyntézy na ribozomálnej úrovni

Medzi antibakteriálne látky zaraďujeme jednak liečivá, ale k ochrane pred baktériami slúžia aj dezinfekčné prostriedky, ako sú antibakteriálne mydlá, gély, obrúsky, pesticídy a bielidlá.

3.3.1 Heterocyklické látky s možnou príbuznosťou k β -laktámom

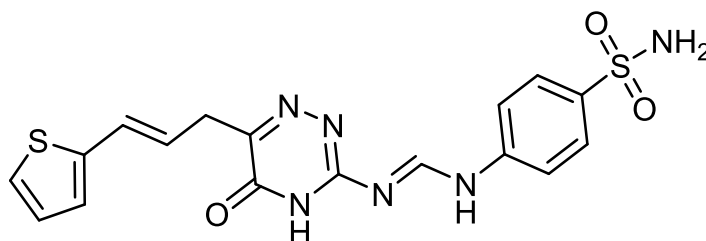
V posledných rokoch sa zvyšuje potreba hľadania nových tried antibakteriálnych prostriedkov, pretože sa stále objavujú nové infekčné choroby a zvyšuje sa počet multirezistentných mikrobiálnych patogénov, napriek zástupu antibiotík a chemoterapeutík. Za prípadnú rezistenciu môžu byť zodpovedné mutácie v mikrobiálnych genómoch, ale tiež nesprávne používanie antibiotík. [66]

3.3.1.1 1,2,4-Triazíny

Vedci vo svete stále hľadajú nové zlúčeniny s požadovanými terapeutickými účinkami. Väčšina prírodných produktov, ktorá sa využíva v liečbe majú charakter heterocyklov. K takýmto látkam môžeme zaradiť deriváty 1,2,4-triazínov, pretože ich skelet poskytuje základ pre dizajn biologicky významných látok so širokou biomedicínskou hodnotou ako sú liečiva. 1,2,4-Triazínové zlúčeniny sú známe svojou biologickou aktivitou, napr. protizápalovou, protinádorovou, protiplesňovou, antimikrobiálnou, antiparazitickou, antimalarickou, antiprotozoálnou aktivitou. [67]

Aly a kol. [68] pripravili nové tienyl-1,2,4-triazínysulfónamidy (Obr. 14) ako potenciálne zlúčeniny s antimikrobiálnym, antioxidačným a antiproliferatívnym účinkom. Syntetizované zlúčeniny boli testované *in vitro* na Gram-pozitívnych a Gram-negatívnych baktériách. Zlúčeniny, ktoré mali voľnú sulfónamidovú skupinu vykazovali vysoké

hodnoty antibakteriálnej aktivity proti obidvom typom baktérií. Derivát s voľným pyramídovým kruhom zvýšil svoju aktivitu voči Gram-pozitívnym druhom. Významná antioxidačná aktivita sa prejavila pri deriváte s [1,2,4]triazino[3,4-*b*][1,2,3]tiadiazíne, ktorá vykazovala až 69 % účinnosť voči kontrolnej glutathion S-transferáze (GSTs).



Obr. 14 4-{{5-oxo-6-[3-(2-tienyl)prop-2-en-1-yl]-4,5-dihydro-1,2,4-triazin-3-yl}imino)metyl}amino}benzénsulfónamid

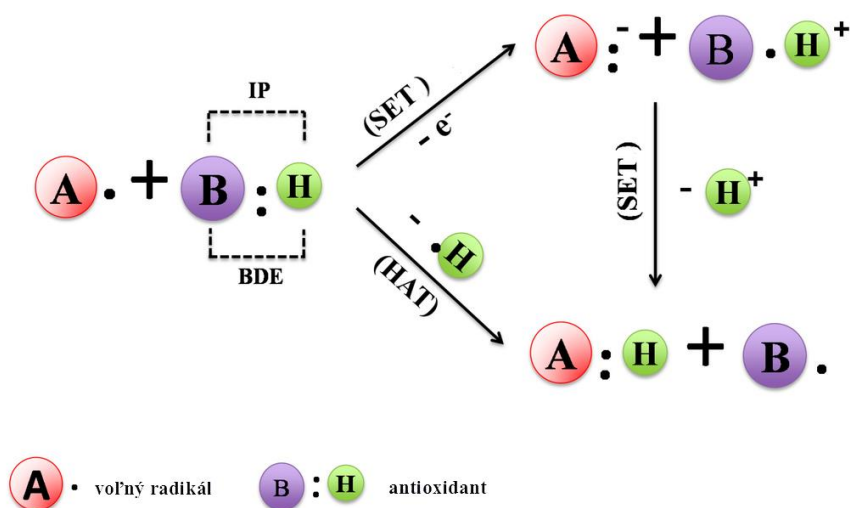
3.4 Antioxidačná aktivita

Voľným radikálom je v súčasnej dobre venovaná zvýšená pozornosť, pretože sú zodpovedné za vznik množstva ochorení, ako sú kardiovaskulárne ochorenia, rakovina, nervové poruchy a ďalšie. Molekuly, atómy alebo ióny s jedným nespáreným elektrónom, ktoré sú nestabilné a rýchlo reagujú s inými molekulami nazývame voľné radikály. Patria medzi ne reaktívne formy kyslíka (ROS), hlavne superoxidový aniónový radikál $O_2^{\cdot-}$, hydroxylový radikál $HO^{\cdot}$ peroxid vodíka H_2O_2 , reaktívne formy dusíka (RNS) a síry (RSS). [69] Proti voľným radikálom sa môžeme chrániť zvýšeným príjmom antioxidantov.

Antioxidant môže byť každá zlúčenina, ktorá je schopná inhibície a zachytávania voľných radikálov, čím poskytuje ochranu pred infekciou a degeneratívnymi ochoreniami. Významnú úlohu ochrany proti voľným radikálom zohrávajú vitamíny C, E a K, karotenoidy flavonoidy a rastlinné polyfenoly. Existujú aj prírodné antioxidačné enzýmy, ako sú superoxid dismutáza (SOD), glutathion peroxidáza, glutathion reduktáza a disulfidové väzby, ktoré tvoria pufrovací systém v každej bunke. [70]

V literatúre existuje veľký počet metód používaných na stanovenie antioxidačnej aktivity. Tieto metódy sa rozdeľujú na základe mechanizmu na dve hlavné skupiny (Obr. 15):

- metóda založená na prenose atómu vodíka HAT
- metóda založená na prenose elektrónu SET

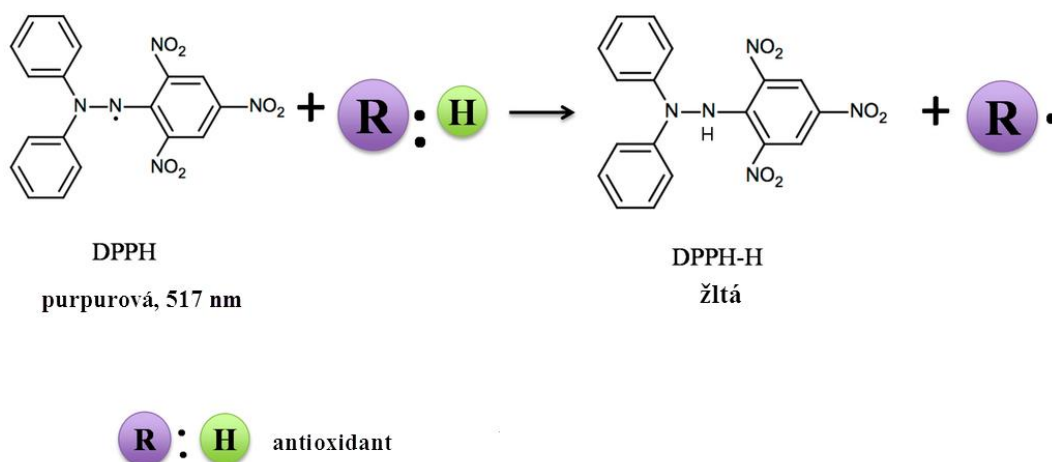


Obr. 15 Mechanizmus antioxidačnej reakcie s voľným radikálom – prenos elektrónu (SET) a prenos atómu vodíka (HAT). Pri SET mechanizme je ionizačný potenciál (IP) antioxidantu dôležitým energetickým faktorom účinku antioxidantu. V mechanizme HAT je entalpia disociácie väzby (BDE) antioxidantu dôležitým parametrom pre hodnotenie antioxidačného účinku. [71]

Metódy fungujúce HAT mechanizmom sú nezávislé od pH a sú veľmi rýchle (inhibícia lipidov a chemiluminiscenčné metódy). Metódy, ktoré prebiehajú SET mechanizmom sú závislé od pH, sú pomerne pomalé a vyžadujú dlhší čas na úplne zreagovanie (FRAP). DPPH a ABTS metódy fungujú oboma mechanizmami. [72]

3.4.1 Metóda DPPH

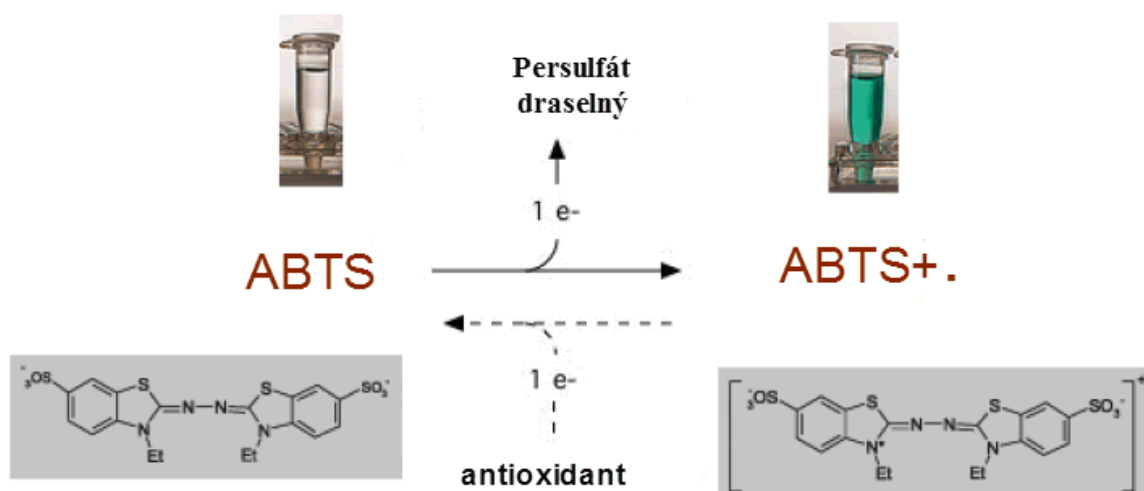
Táto metóda je považovaná za jednu zo základných metódik pre posúdenie antiradikálovej aktivity čistých látok aj rôznych zmesných vzoriek. Spočíva v reakcii testovanej látky so stabilným radikálom DPPH[·] (difenylpicrylhydrazyl, resp. 1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl). Stabilný radikál DPPH[·] má nespárený elektrón, vďaka ktorému má silné absorpčné maximum pri $\lambda = 517$ nm a je purpurovej farby. Pri reakcii dochádza k redukcii radikálu za vzniku DPPH-H formy (difenylpicrylhydrazín). Farba sa mení z purpurovej na žltú. (Obr. 16). [73] Reakcia je najčastejšie sledovaná spektrofotometricky. Pokles absorbancie pri 517 nm sa meria buď po uplynutí konštantného času, alebo sa sleduje kinetika reakcie.



Obr. 16 Reakčný mechanizmus 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazylu s antioxidantom [71]

3.4.2 Metóda ABTS

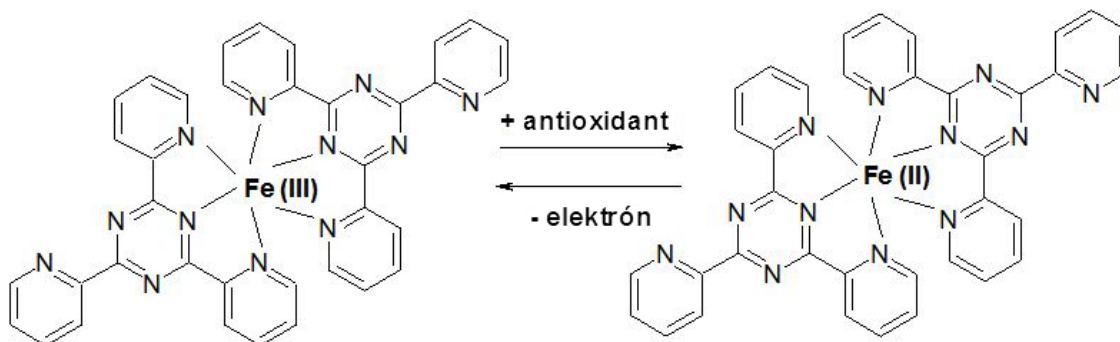
Antioxidačná aktivita metódou ABTS je založená na schopnosti zhášať radikál $\text{ABTS}^{\cdot+}$. Táto metóda využíva na meranie zmeny zafarbenia antioxidantu spektrofotometer s diódovým poľom. $\text{ABTS}^{\cdot+}$ (2,2'-azinobis(3-etyl-2,3-dihydrobenzotiazol-6-sulfonát) sa generuje oxidáciou v systéme $\text{ABTS-H}_2\text{O}_2$ alebo $\text{ABTS- metmyoglobín-H}_2\text{O}_2$ a antioxidant je pridaný k vygenerovanému modrozelenému chromoforu $\text{ABTS}^{\cdot+}$ (Obr. 17). Zhášanie radikálu $\text{ABTS}^{\cdot+}$ sa sleduje spektrofotometricky a meria sa absorbancia pri 734 nm. [74]



Obr. 17 Chemická reakcia ABTS [75]

3.4.3 Metóda FRAP

Táto metóda sa zakladá na schopnosti redukcie komplexu tripyridyltriazínu Fe^{3+} na Fe^{2+} . Komplex Fe^{3+} sa v kyslom prostredí redukuje antioxidantami na modro sfarbený komplex Fe^{2+} . Redukcia sa sleduje meraním zmeny absorpcie pri 593 nm za použitia spektrofotometra, pričom nárast absorbancie je mierou antioxidačnej aktivity. Reakcia je nešpecifická a odráža schopnosť látok redukovať ión Fe^{3+} (Obr. 18). [76]



Obr. 18 Reakčná mechanizmus FRAP metódy [76]

3.5 Inhibítory proteináz

Proteolytické enzýmy resp. proteázy sú enzýmy zo skupiny hydroláz, ktoré sú schopné štiepiť peptidovú väzbu medzi dvoma aminokyselinami peptidového reťazca. Proteázy môžeme nájsť v rastlinách, živočíchoch, hubách, baktériách a vírusoch. Podľa miesta štiepenia bielkovín rozlišujeme exoproteázy, ktoré štiepia peptidovú väzbu na koncoch peptidových reťazcov a endoproteázy, ktoré štiepia proteíny vo vnútri peptidového reťazca. [77]

Samotné endoproteázy sa ďalej delia podľa katalytického deja na cysteínové, serínové, treonínové, metaloproteázy, glutamátové a aspartátové proteázy. K nekontrovateľnej deštrukcii stavebných a iných dôležitých proteínov v organizme môže dôjsť vďaka katalytickej aktivite týchto proteináz. Za normálnych podmienok je ich aktivita pod kontrolou kontrolných mechanizmov akými sú – produkcia proteináz vo forme neaktívnych zymogénov, obmedzená proteolýza a telom produkované fyziologické inhibítory. [78]

4. CIELE DIZERTAČNEJ PRÁCE

Cieľom dizertačnej práce s názvom „*Nové deriváty furo[3,2-*b*]pyrolu: Syntéza, štúdium vlastností a biologickej aktivity*“ je syntéza derivátov s furo[3,2-*b*]pyrolovým skeletom a ich analýza dostupnými metódami.

Vzhľadom na rozsiahlu oblasť skúmania sme sa zamerali na nasledovné prístupy:

- syntéza východiskových metyl furo[3,2-*b*]pyrol-5-karboxylátov
- skúmanie a optimalizácia chemických postupov prípravy nových zlúčenín s furo[3,2-*b*]pyrolovým skeletom
- reakcie východiskových metyl furo[3,2-*b*]pyrol-5-karboxylátov na esterovej skupine
- reakcie furo[3,2-*b*]pyrol-5-karboxylátov s cieľom pripraviť 2-substituované, 4-substituované a 5-5-6 kondenzované systémy
- analyzovanie štruktúry pripravených látok dostupnými technikami analytickej chémie ako sú ^1H a ^{13}C NMR, IČ, MS a prvková analýza
- hlavným cieľom je analýza chemických posunov v ^1H a ^{13}C NMR spektrách vybraných zlúčenín
- ďalším krokom je analýza vplyvu substituenta na chemické posuny v ^1H NMR spektrách vybraných zlúčenín
- analyzovanie čistoty vybraných látok metódou HPLC
- významným krokom práce je testovanie vybraných látok na biologickú aktivitu a hodnotenie vybraných biologických aktivít ako sú antioxidačná aktivita, antibakteriálna aktivita a inhibičná aktivita na serínové, aspartátové proteínázy a metaloproteázy

Súčasťou vypracovania dizertačnej práce je aj zapojenie sa do vedeckých projektov na domácej a zahraničnej úrovni ako sú projekty VEGA, KEGA, APPV a FPPV. Dôležitou časťou práce je aj publikovanie získaných výsledkov v zahraničných a domácich vedeckých časopisoch registrovaných vo WoS a Scopuse, rovnako aj prezentovanie výsledkov na vedeckých podujatiach vo forme orálnych prezentácií.

5. METÓDY VYHODNOTENIA VLASTNOSTÍ LÁTKO

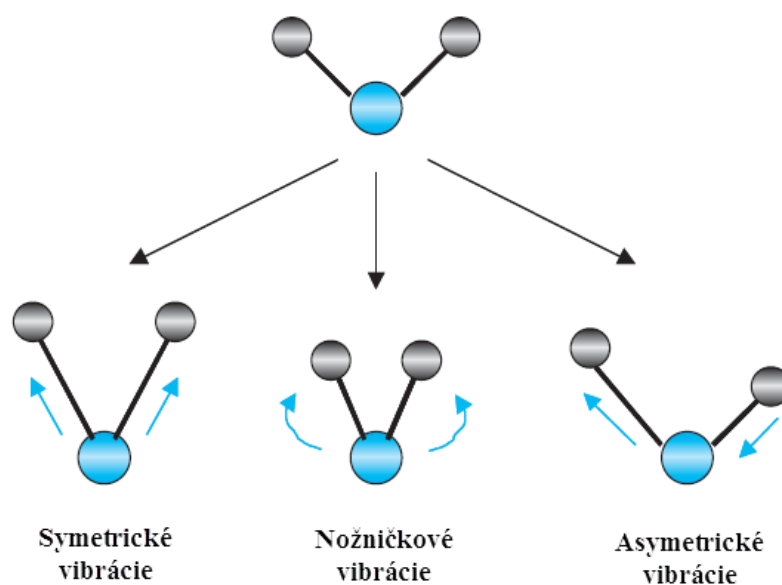
Dôležitou súčasťou výskumu chémie je charakterizácia a analýza pripravených zlúčenín. Predstavuje najzložitejšiu a najdrahšiu časť výskumu. Súčasná doba prináša množstvo analytických metód na zisťovanie štruktúry a zloženia pripravených chemických látok. Uprednostňujú sa techniky, ktoré nespôsobujú rozklad analyzovanej vzorky. Získané výsledky sú podporené teoretickými výpočtami založenými na kvantovej chémii.

V práci sa použili dostupné analytické metódy na presne určenie vlastností pripravených látok a v nasledujúcich podkapitolách sú stručne popísané základné princípy použitých analytických metód.

5.1 Infračervená spektrometria

Patri k vibračným technikám, ktoré skúmajú interakciu elektromagnetického žiarenia s molekulami zlúčeniny. Infračervená spektrometria poskytuje nesmierne dôležité informácie o štruktúre molekuly z hľadiska jej funkčných skupín, orientácie týchto skupín a taktiež informácie o izoméroch.

Za zmeny vibračných a rotačných stavov molekuly je zodpovedné absorbujúce infračervené žiarenie (Obr. 19). Zmena vibračného alebo rotačného stavu molekuly nastane ak dôjde k zmene dipólového momentu molekuly. Čím je väčšia zmena dipólového momentu, tým je intenzívnejší absorpčný pás v spektre. [79]



Obr. 19 Vibrácie molekuly po absorpcii infračerveného žiarenia [80]

Infračervené žiarenie môžeme rozdeliť na tri oblasti:

- a) blízka oblasť (*near-infrared*, NIR) – 4000 až 12 000 cm^{-1}
- vyššie harmonické vibrácie väzieb C-H, C-O, N-H
- b) stredná oblasť (*middle-infrared*, MIR) – 200 až 4000 cm^{-1}
- používa sa na meranie rotačných pohybov molekúl
- c) ďaleká oblasť (*far-infrared*, FIR) – 10 až 200 cm^{-1}

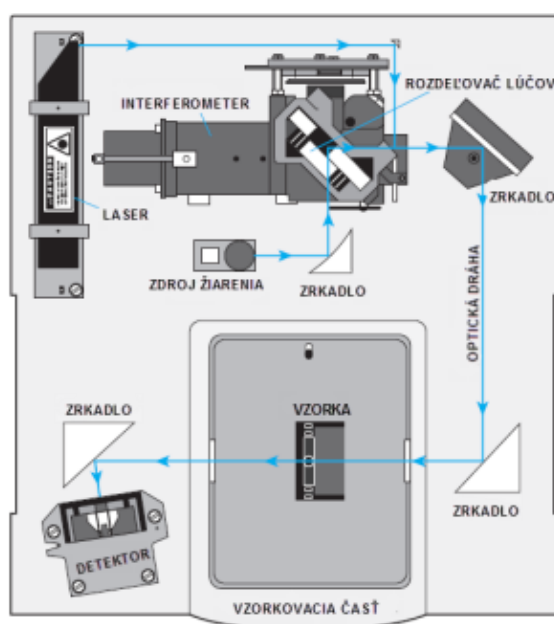
Nízkoenergetické žiarenie v ďalekej infračervenej oblasti spôsobuje zmeny rotačných stavov molekúl, v strednej a blízkej oblasti dochádza k vibračno-rotačným zmenám molekúl. Pri interpretácii spektier sa zameriavame na tri hlavné charakteristiky - poloha a tvar absorpčných pásov, počet a ich intenzita. [81]

5.1.1 Experimentálna technika

Súčasná doba využíva na meranie infračervených spektier spektrofotometre založené na Fourierovej transformácii. Tieto prístroje využívajú namiesto monochromátora interferometer a získané údaje sa spracujú Fourierovou transformáciou do podoby infračerveného spektra.

FTIR spektrometer sa skladá zo (Obr. 20):

- zdroja (globar 5000 - 250 cm^{-1} ; volfrámové vlákno pre blízku oblasť do 10 000 cm^{-1} ; ortuťová výbojka pre ďalekú oblasť do 20 cm^{-1})
- laserom kontrolovaného interferometra
- kyvety
- detektora (fotoelektrické – TGS, fotovodivostné)



Obr. 20 Schéma FTIR spektrometra s Michelsonovým interferometrom [80]

Infračervené spektrá sú zaznamenávané ako závislosť priepustnosti od vlnočtu absorbovaného žiarenia. Intenzita absorpcie sa riadi Lambertovým-Beerovým zákonom a vyjadruje sa pomocou priepustnosti T (%) alebo absorbancie A .

Infračervené spektrá môžeme merať v závislosti od skupenstva látky v plynom a v kvapalnom stave, v roztoku, metódou KBr, nujolovou a reflexnou technikou. V prípade reflexných metód sa merania uskutočňujú z povrchu tenkých filmov na tuhej fáze odrazom, čiže sa meria reflektancia - zoslabený celkový odraz (ATR technika) alebo viacnásobný vnútorný odraz (MIR technika). Pre štruktúrnú analýzu sa využívajú charakteristické skupinové vibrácie, ktoré sú pre príslušnú štruktúrnú jednotku v molekule charakteristické. Oblasť charakteristických skupinových vibrácií leží v oblasti 4 000 až 1 500 cm^{-1} . Túto oblasť možno rozdeliť do troch oblastí:

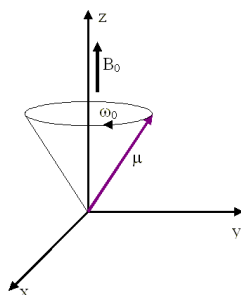
- oblasť valenčných vibrácií X-H (4 000 až 2500 cm^{-1})
- oblasť trojitých väzieb (2 500 až 2000 cm^{-1})
- oblasť dvojítých väzieb (2 000 až 1500 cm^{-1})

Oblasť skeletálnych vibrácií – oblasť „odtlačkov prstov“ (1 500 až 600 cm^{-1}) predstavuje oblasť, kde jednotlivé pásy nemožno priradiť jednotlivým väzbám, ale sú charakteristické pre molekulu ako celok. [79]

5.2 Nukleárna magnetická rezonancia (NMR)

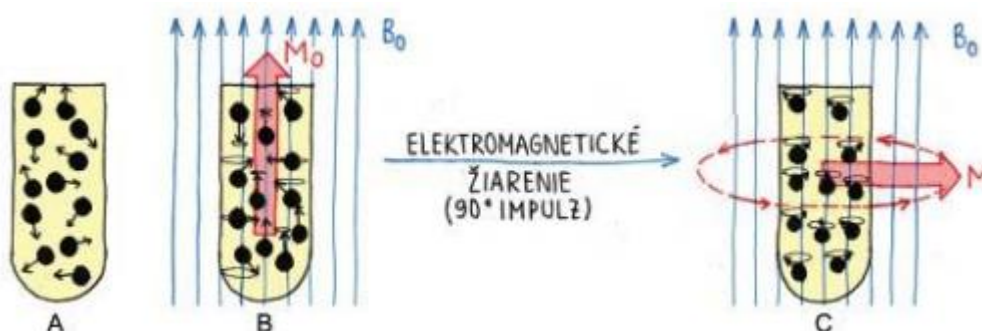
Nukleárna magnetická rezonancia patrí k spektrálnej metóde, pri ktorej interakciou rádiovfrekvenčného žiarenia sa mení stav jadrových spinov. Interakcia rádiovfrekvenčného žiarenia s jadrami sa uskutočňuje v prítomnosti silného homogénneho magnetického poľa.

Jadrá s nenulovým spinovým kvantovým číslom ($I \neq 0$) sú schopné absorbovať rádiovfrekvenčné žiarenie v magnetickom poli. Takéto jadrá majú jadrový magnetický moment, t.j. správajú sa ako mikroskopické magnety. Ak je takéto jadro umiestnené do vonkajšieho magnetického poľa, tak toto pole núti magnetický moment jadra zorientovať sa do jeho smeru. Spin jadra sa bráni tejto zmene orientácie a výsledkom je, že magnetický moment začne rotovať okolo vonkajšieho poľa, pričom sa jeho orientácia k tomuto poľu nemení a zachová sa paralelná zložka μ s magnetickým poľom B_0 , zložka μ kolmá na magnetické pole B_0 rotuje v rovine kolmej na B_0 (Obr. 21).



Obr. 21 Rotácia atómového magnetického dipólu (μ) okolo magnetického poľa (B_0)

Merateľnou veličinou v NMR je výsledný magnetický moment všetkých spinov vo vzorke, ktorý sa nazýva *magnetizácia vzorky*. Ak je vzorka mimo magnetického poľa, tak orientácia atómových magnetov je pravdepodobne rovnaká a výsledná magnetizácia je nulová. Naopak ak sa vzorka vloží do silného magnetického poľa, tak orientácie atómových magnetov budú viac paralelné s poľom B_0 energeticky výhodnejšie a preto v rovnovážnej vzorke aj viac zastúpené (Obr. 22).



Obr. 22 A - vzorka mimo magnetické poľa, B - vzorka v magnetickom poli a C – po aplikácii elektromagnetického žiarenia

Relaxácia je proces, v ktorom sa vzorka spontánne polarizuje a trvá ~ 1 s. Ak aplikujeme na vzorku v rovnovážnom stave elektromagnetické žiarenie, ktoré má rovnakú frekvenciu ako je rotácia spinov, vychýli sa magnetizácia zo smeru B_0 a vznikne nerovnovážna magnetizácia, ktorá rotuje okolo B_0 podobne ako každý individuálny spin. Takáto magnetizácia sa priamo meria v NMR experimentoch. Z toho vyplýva, že pri NMR sa nemeria zmena intenzity elektromagnetického žiarenia (jeho absorpcia alebo emisia ako pri UV a IČ), ale odozva vzorky na pôsobenie elektromagnetického žiarenia. [82]

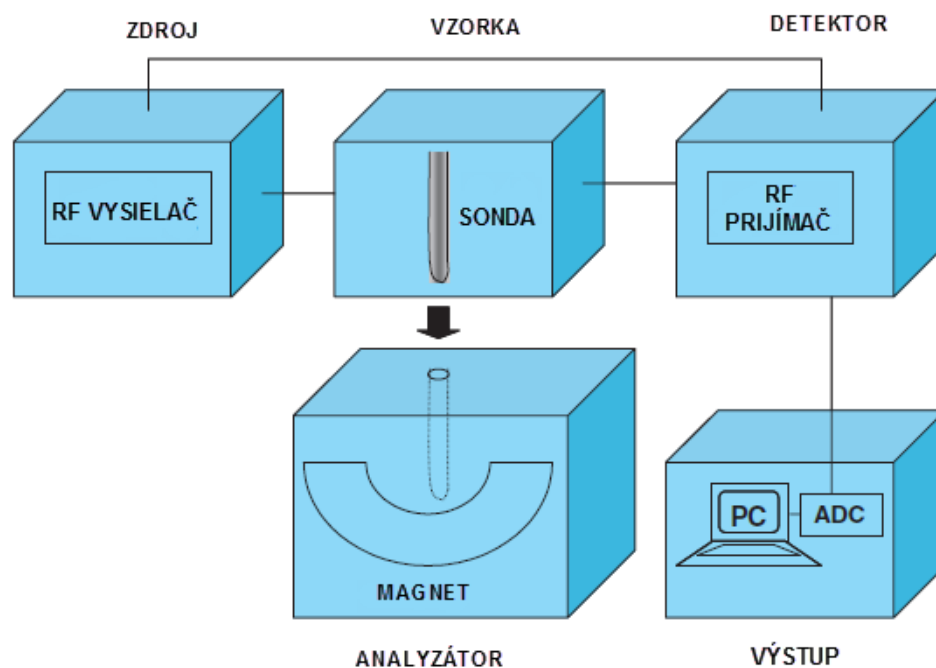
5.2.1 Experimentálna technika

V spektroskopii sa používajú dve metódy na skúmanie zlúčeniny:

- *vysokorozlišovacia metóda* – využíva sa na meranie spektier látok v roztokoch, pričom sa pozorujú úzke a dobre rozlíšené signály. Takto získané spektrá sa používajú pri výskume štruktúry zlúčenín, geometrickej izomérie, konformácie, tautomérie a kvantitatívnej analýze.
- *širokopásmová metóda* – používa pri meraní spektier tuhých látok a pozorujú sa široké signály. Táto metóda sa využíva pri štúdiu zmien pohyblivosti molekúl alebo funkčných skupín v makromolekulách, pri skúmaní kryštalinity polymérov a pod.

NMR spektrometre pozostávajú z týchto hlavných častí (Obr. 23):

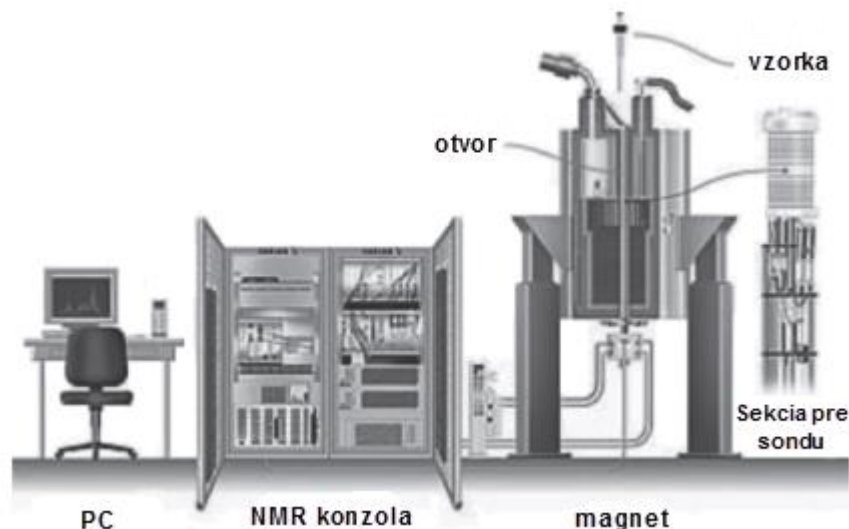
- magnet
- rádiový generátor
- sonda
- vysielač
- prijímač
- detekčný a zapisovací systém
- dekapler



Obr. 23 Schéma NMR spektrometra [80]

Podľa spôsobu merania spektier sa spektrometre rozdeľujú (Obr. 24):

- *spektrometre s kontinuálnym záznamom* – v dnešnej dobe už menej používané. Záznam spektra sa získava plynulou zmenou frekvencie rádiofrekvenčného žiarenia. Použiteľné pre dostatočne citlivé jadrá ako ^1H , ^{19}F a ^{31}P .
- *pulzné spektrometre s Fourierovou transformáciou* – na jadrá sa pôsobí silným rádiofrekvenčným pulzom s danou spektrálnou šírkou, čo zapríčini prechod všetkých jadier v danom pásme do iného stavu.



Obr. 24 Súčasti NMR prístroja [80]

V NMR existujú efekty ako **chemický posun (δ)** a **spin-spinová interakcia**, ktoré umožňujú chemické rozlíšenie spinov jedného druhu v molekule. Dôsledkom týchto efektov je, že spiny toho istého druhu zabudované v molekule rozdielnym spôsobom majú rozdielne rezonančné frekvencie. Všetky vnútromolekulové efekty závisia od orientácie molekuly v magnetickom poli. V kvapalných vzorkách sa orientácia molekúl rýchlo mení, preto sa v spektrách kvapalnej vzorky prejavujú len spriemernené efekty chemického posunu a spin-spinových interakcií. [81]

5.2.1.1 Chemický posun (δ)

Je efekt elektrónového oblaku molekuly a vzniká ako reakcia elektrónov na účinok magnetického poľa B_0 . Z toho vyplýva, že počet signálov sa rovná počtu chemicky rozdielnych skupín, v ktorých sa meraný spin v danej molekule nachádza. Chemicky rovnakým spinom prislúcha rovnaký signál, a preto intenzita signálu je úmerná počtu spinov, ktorým tento signál prislúcha.

5.2.1.2 Spin-spinová interakcia

Je vzájomné pôsobenie spinov prostredníctvom svojich magnetických momentov. Spin-spinová interakcia pôsobí dvoma spôsobmi: **priamou interakciu** – v tuhom skupenstve, v ktorom dominuje interakcia medzi magnetickými dipólmi cez priestor, čo vedie k širokým absorpčným signálom. **Nepriamou interakciou** – v kvapalnom skupenstve, v ktorom pozorujeme slabšiu interakciu, ktorá sa prenáša cez väzbové elektróny molekuly.

Intenzita spinových interakcií sa vyjadruje pomocou interakčnej konštanty (J), ktorá nezávisí od indukcie magnetického poľa B_0 a frekvencie elektromagnetického žiarenia a udáva sa v Hz. [81]

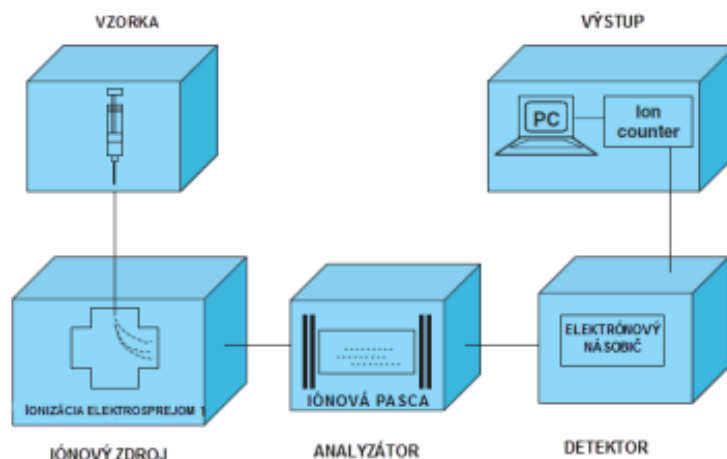
5.3 Hmotnostná spektrometria

Hmotnostná spektrometria patrí k fyzikálno-chemickej metóde určovania hmotnosti atómov, molekúl a ich časti po ich prevedení na kladné alebo záporné ióny. Uplatnenie si našla v analýze organických látok (štruktúra), v izotopovej analýze plynov a tuhých anorganických látok. Hmotnostné spektrum je zápis relatívneho zastúpenia rozdelených druhov iónov, charakterizovaných pomerom hmotnosti a náboja (m/z). V hmotnostnom spektrometri prebiehajú všetky deje vo veľmi zriedenom plynnom stave, a preto možno vznik spektra chápať ako výsledok viacerých konkurenčných a následných monomolekulárnych reakcií. Z toho vyplýva, že spektrá organických zlúčenín sú oveľa zložitejšie, ako spektrá prvkov. V spektre môžeme vidieť okrem vrcholu molekulového iónu aj ďalšie signály, ktoré vznikli rozštiepením iónov. [79]

5.3.1 Experimentálna technika

Hmotnostný spektrometer musí obsahovať tieto základné funkčné časti (Obr. 25):

- vstup na vzorku
- iónový zdroj
- analyzátor hmotností
- detektor
- počítač



Obr. 25 Schéma hmotnostného spektrometra [80]

Iónový zdroj slúži na prevedenie analyzovanej látky do ionizovaného stavu. V jeho priestore dochádza k väčšine fragmentačných reakcií vedúcich k deštrukcii chemických väzieb vzniknutého iónu. [79] Skúmanú látku môžeme ionizovať viacerými spôsobmi:

- ionizácia nárazom elektrónov (**EI**)
- chemická ionizácia (**CI**)
- elektrospej ionizácia (**ESI**)
- ionizácia poľom (**FI**)
- fotoionizácia pri atmosférickom tlaku (**APPI**)
- laserová desorpcia/ionizácia v matrici (**MALDI**)

Analyzátor slúži k rozdeleniu iónov v plynnej fáze za vákua podľa pomeru ich hmotnosti a náboja (m/z). Poznáme viacero spôsobov rozdeľovania iónov v hmotnostnom analyzátoe – magnetický hmotnostný analyzátor, kvadrupólový analyzátor, iónovú pascu, preletový analyzátor (**TOF**) a iónovú cyklotrónovú rezonanciu. [81]

Hmotnostná spektrometria sa v súčasnej dobe spája so separačnými technikami ako HPLC-MS a GC-MS, ktoré umožňujú analýzu zmesi v organickej technológii, kde vzorka obsahuje širokú paletu rôznorodých organických látok. [79]

5.4 Kvapalinová chromatografia

Kvapalinová chromatografia je analytická separačná metóda, ktorá slúži na analýzu zmesi látok. Vzorky môžu byť zmesi kvapalných alebo tuhých látok. Základnou podmienkou separácie je, aby látky boli rozpustné v bežných rozpúšťadlách, vo vode alebo

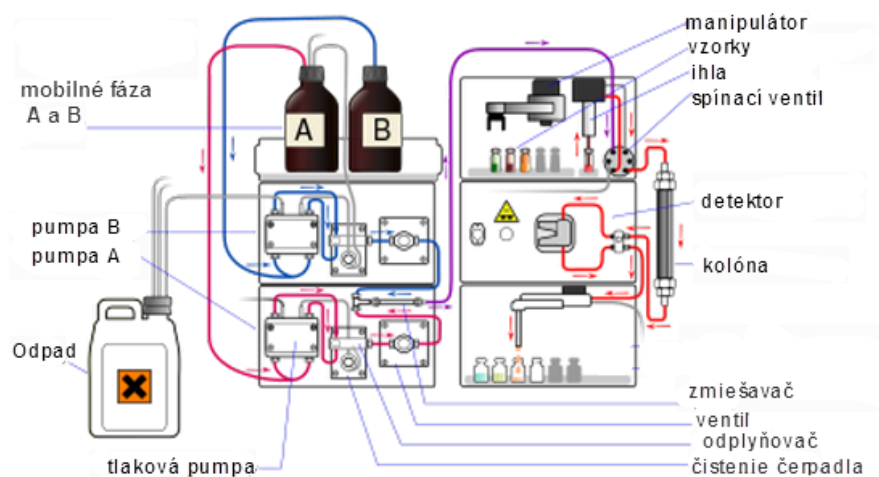
v zriedených minerálnych kyselinách. Princípom všetkých separačných metód je ustálenie rovnováhy prestupu analytu z jednej fázy do druhej alebo jeho akumulácia na povrchu jednej z fáz.

Analyzovaná vzorka sa dávkuje do prúdu mobilnej fázy a tá ju unáša kolónou, v ktorej je umiestnená stacionárna fáza. Počas separácie sa uplatňujú rôzne interakcie medzi molekulami látok a molekulami stacionárnej a mobilnej fázy. Vhodne zvoleným detektorom detegujeme zóny separovaných látok, čím nám vzniká chromatografický záznam, ktorý sa vyhodnocuje z hľadiska kvalitatívnej a kvantitatívnej analýzy. [82]

5.4.1 Experimentálna technika

HPLC prístroj pozostáva z týchto častí (Obr. 26):

- zásobníkov mobilnej fázy
- čerpadla
- zariadenia na meranie pracovného tlaku
- dávkovacieho zariadenia – injektora
- chromatografickej kolóny
- detektora
- vyhodnocovacieho zariadenia



Obr. 26 Schéma HPLC prístroja [84]

5.4.2 Hlavné charakteristiky chromatogramu

Na získanom chromatograme, ktorý nám vznikne elučnou metódou môžeme pozorovať píkove maxima jednotlivých zložiek vystupujúce z kolóny. Pomocou hlavných a

relatívnych elučných charakteristík môžeme charakterizovať chromatografické správanie sa látok v chromatografickej kolóne (Obr. 27).

Elučný čas (t_R) – je to časový interval, ktorý uplynie od nadávkovania látky do kolóny do okamihu detekcie signálu zodpovedajúceho prechodu maximálnej koncentrácie látky detektorom.

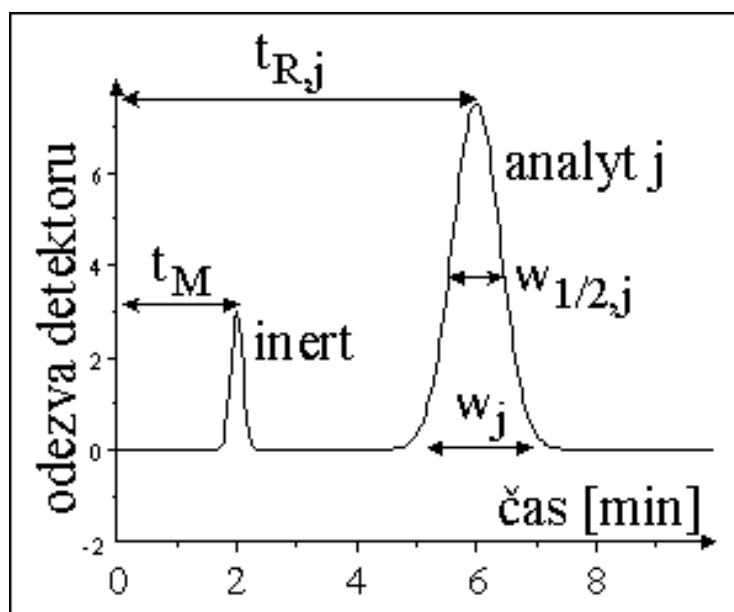
Mŕtvy elučný čas (t_M) – je to interval, ktorý uplynie od nadávkovania látky do okamihu detekcie maximálnej koncentrácie látky, ktorá sa v kolóne nezadržiava a pohybuje sa rovnakou rýchlosťou ako mobilná fáza.

Elučný objem (V_R) – je objem mobilnej fázy pretečený kolónou od nadávkovania analytu po detekciu analytu

Mŕtvy elučný objem (V_M) – objem mobilnej fázy pretečený kolónou od nadávkovania po detekciu látky, ktorá sa v kolóne nesorbuje.

Šírka píku - šírka píku pri základni alebo v polovici výšky píku ($w_{1/2}$)

Veľkosť píku – je vyjadrená výškou píku alebo plochou pod krivkou píku určenou integráciou v intervale od začiatku do konca píku, ktoré sa vzťahujú k množstvu alebo koncentrácii analytu.



Obr. 27 Elučné charakteristiky chromatogramu [84]

5.4.3 Chemicky viazané fázy

Pomocou chemickej väzby sa naviaže stacionárna fáza na nosič, čím sa zabráni vymývaniu zakotvenej fázy mobilnou fázou. Nosičmi chemicky viazanej väzby sú

povrchovo pórovité nosiče –najčastejšie silikagél. Naviazanie stacionárnej fázy na povrch nosiča prebieha viacerými chemickými reakciami. Prvou chemickou reakciou je kondenzácia silanolových skupín z povrchu nosiča s alkoholmi alebo silanizácia silanolových skupín na povrchu nosiča pomocou alkylchlorsilánov, pričom vznikajú trialkylsiloxány. Najbežnejšie sa používajú trioktyl- alebo trioktadecyl chlór-silány a podľa počtu uhlíkov naviazaných v alifatickom reťazci sa takéto kolóny nazývajú C 8 RP alebo C18 RP. Selektivitu separačného systému môžeme meniť na základe naviazaných rôznych funkčných skupín na konci alifatického reťazca. [82]

5.4.4 Detektory

Detektory používané v HPLC by mali byť selektívne pre analyty a málo citlivé na mobilné fázy. Najčastejšie využívanými detektormi sú fotometrické, refraktometrické a fluorescenčné. Využívajú sa tiež spojenia s MS detektorom a s elektrochemickými detektormi, ako sú vodivostné alebo voltampérometrické. Fotometrické detektory merajú absorbanciu eluátu vychádzajúceho z kolóny. K týmto detektorom zaradujeme aj DAD detektor, ktorý meria absorpčné spektrum v určenej oblasti vlnových dĺžok. Detekčný limit tohto detektora je 10^{-10} g/ml a citlivosť je pre rôzne látky rôzna a pri zvolenej vlnovej dĺžke závisí od veľkosti molárneho absorpčného koeficientu látky. [83]

Kvapalinovú chromatografiu môžeme využívať na kvalitatívnu analýzu ako dôkaz prítomnosti zložky vo vzorke, kedy sa používa zhodnosť elučných charakteristík zložiek vzorky a referenčných látok. Spojením s inými metódami, ako sú hmotnostná spektrometria, infračervená spektroskopia a nukleárna magnetická rezonancia môžeme dosiahnuť spoľahlivosť identifikácie prítomných zložiek vo vzorke.

V kvantitatívnej analýze sa využívajú rôzne metódy pre stanovenie množstva látky vo vzorke, a to metóda kalibračnej čiary, metóda prídavku štandardu a kombinácia oboch metód s vnútorným štandardom. [82]

5.5 Stanovenie antibakteriálnej, antioxidačnej a inhibičnej aktivity

Na stanovenie antibakteriálnej aktivity sa všetky vzorky zlúčenín pripravili ako roztoky v 1ml DMSO s koncentráciou 0,2048 M. Na testovanie aktivity sa použili mikroplošnice, kde do každej jamky prvého stĺpca sa pipetovalo 180 μ l a do stĺpcov 2 – 11 sa pipetovalo po 100 μ l bakteriálnej suspenzie. Následne sa do prvého stĺpca pridala testovaná látka

s koncentráciou 0,2048 M v DMSO. Každá látka sa testovala v dvoch paralelkách. Po kultivácii sa pridal do každej jamky 0,03 % TTB a nechal sa inkubovať 1 h pri 37 °C. Hodnoty MIC sa odčítali vizuálne, kde posledná jamka bola bez modrého sfarbenia s odpovedajúcou koncentráciou daného stĺpca charakterizujúcu hodnotu MIC. Všetky bakteriálne kmene pochádzali z Czech Collection of Microorganisms – CCM Brno. [65]

5.5.1 Antioxidačná aktivita metódou DPPH

Na stanovenie antioxidačnej aktivity metódou DPPH sa pripravil základný roztok TROLOX-u s koncentráciou 1 mg/ml rozpustením v metanole. Z takto pripraveného roztoku sa pripravili nasledovné koncentrácie: 10, 30, 50, 60, 70, 90 a 100 µg/ml. Do mikroplošnice sa pipetovalo po 25 µl podľa schémy (Obr. 28) metanol, pripravené štandardy a vzorky látok v koncentrácii 204,8 mM. Pripravený roztok DPPH (12 mg/100 ml metanolu – 0,000304M) sa dávkoval po 100 µl do všetkých jamiek. Po 10 minútach sa zmerala antioxidačnú aktivitu na mikroplošničkovom čítači OPSYS pri vlnovej dĺžke 490 nm. Dáta absorbie zaznamenané pri meraní boli vyhodnotené ako TROLOX ekvivalent - TEAC. [65]

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	B	B	B	B	B	L ₁ C ₁	L ₁ C ₁	L ₁ C ₁	L ₁ C ₁	L ₁ C ₁	L ₁ C ₁
B	Š ₁	Š ₁	Š ₁	Š ₁	Š ₁	Š ₁	L ₂ C ₁	L ₂ C ₁	L ₂ C ₁	L ₂ C ₁	L ₂ C ₁	L ₂ C ₁
C	Š ₂	Š ₂	Š ₂	Š ₂	Š ₂	Š ₂	L ₃ C ₁	L ₃ C ₁	L ₃ C ₁	L ₃ C ₁	L ₃ C ₁	L ₃ C ₁
D	Š ₃	Š ₃	Š ₃	Š ₃	Š ₃	Š ₃	L ₄ C ₁	L ₄ C ₁	L ₄ C ₁	L ₄ C ₁	L ₄ C ₁	L ₄ C ₁
E	Š ₄	Š ₄	Š ₄	Š ₄	Š ₄	Š ₄	L ₅ C ₁	L ₅ C ₁	L ₅ C ₁	L ₅ C ₁	L ₅ C ₁	L ₅ C ₁
F	Š ₅	Š ₅	Š ₅	Š ₅	Š ₅	Š ₅	L ₆ C ₁	L ₆ C ₁	L ₆ C ₁	L ₆ C ₁	L ₆ C ₁	L ₆ C ₁
G	Š ₆	Š ₆	Š ₆	Š ₆	Š ₆	Š ₆	L ₇ C ₁	L ₇ C ₁	L ₇ C ₁	L ₇ C ₁	L ₇ C ₁	L ₇ C ₁
H	Š ₇	Š ₇	Š ₇	Š ₇	Š ₇	Š ₇	L ₈ C ₁	L ₈ C ₁	L ₈ C ₁	L ₈ C ₁	L ₈ C ₁	L ₈ C ₁

Obr. 28 Templát mikroplošnice pre test DPPH, kde L₁ – L₇ sú zlúčeniny a L₈ je 6-APA

5.5.2 Antioxidačná aktivita metódou ABTS

Na stanovenie antioxidačnej aktivity metódou ABTS sa pripravil základný roztok TROLOX-u s koncentráciou 1 mg/ml rozpustením v metanole a z takto pripraveného roztoku sa pripravili nasledovné koncentrácie: 10, 30, 50, 60, 70, 90 a 100 µg/ml. Do

mikroplatničky sa pipetovalo po 25µl podľa schémy (Obr. 28) metanol a pripravené štandardy a vzorky látok v koncentrácii 204,8 mM. Pripravený ABTS sa dávkoval po 100 µl do všetkých jamiek. Po 10 minútach sa zmerala antioxidačná aktivita na mikroplatničkovom čítači OPSYS pri vlnovej dĺžke 630 nm. [65]

5.5.3 Antioxidačná aktivita metódou FRAP

Na stanovenie antioxidačnej aktivity metódou ABTS bolo nutné si pripraviť základný roztok TROLOX-u s koncentráciou 1 mg/ml rozpustením v metanole a z tohto roztoku sa pripravili nasledovné koncentrácie: 10, 30, 50, 60, 70, 90 a 100 µg/ml. Do mikroplatničky sa pipetovalo po 25µl podľa schémy (Obr. 28) metanolu a pripravené štandardy a vzorky látok v koncentrácii 204,8 mM. Reagencia pre metódu FRAP sa pripravila z 0,3M octanového tlmivého roztoku s pH 3,6 a rozpustením TPTZ a FeCl₃ v destilovanej vode. Následne sa dávkovalo po 100µl reagentie do všetkých jamiek. Po 10 minútach sa zmerala antioxidačná aktivita na mikroplatničkovom čítači OPSYS pri vlnovej dĺžke 630 nm. [65]

5.5.4 Inhibičná aktivita na proteínázy

Pre stanovenie inhibičnej aktivity vzoriek na proteínázy sa pripravil pufo Tris-HCl s pH = 7.0 rozpustením 2 tabliet v 100 ml deionizovanej vody a 100 ml metanolu. Roztok S₀ – je 60 mM roztok substrátov, ktorý vznikol rozpustením 25 mg Z-Lys-SBzl.HCl a 23,7 mg DTNBA v 1 ml metanolu do malej fľaštičky.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	K	Lc ₁	Lc ₂	Lc ₃	Lc ₄	Lc ₅	BLC ₁	BLC ₂	BLC ₃	BLC ₄	BLC ₅	B
B	K	Lc ₁	Lc ₂	Lc ₃	Lc ₄	Lc ₅	BLC ₁	BLC ₂	BLC ₃	BLC ₄	BLC ₅	B
C	K	P ₁ C ₁	P ₁ C ₂	P ₁ C ₃	P ₁ C ₄	P ₁ C ₅	BP ₁ C ₁	BP ₁ C ₂	BP ₁ C ₃	BP ₁ C ₄	BP ₁ C ₅	B
D	K	P ₁ C ₁	P ₁ C ₂	P ₁ C ₃	P ₁ C ₄	P ₁ C ₅	BP ₁ C ₁	BP ₁ C ₂	BP ₁ C ₃	BP ₁ C ₄	BP ₁ C ₅	B
E	K	P ₂ C ₁	P ₂ C ₂	P ₂ C ₃	P ₂ C ₄	P ₂ C ₅	BP ₂ C ₁	BP ₂ C ₂	BP ₂ C ₃	BP ₂ C ₄	BP ₂ C ₅	B
F	K	P ₂ C ₁	P ₂ C ₂	P ₂ C ₃	P ₂ C ₄	P ₂ C ₅	BP ₂ C ₁	BP ₂ C ₂	BP ₂ C ₃	BP ₂ C ₄	BP ₂ C ₅	B
G	K	P ₃ C ₁	P ₃ C ₂	P ₃ C ₃	P ₃ C ₄	P ₃ C ₅	BP ₃ C ₁	BP ₃ C ₂	BP ₃ C ₃	BP ₃ C ₄	BP ₃ C ₅	B
H	K	P ₃ C ₁	P ₃ C ₂	P ₃ C ₃	P ₃ C ₄	P ₃ C ₅	BP ₃ C ₁	BP ₃ C ₂	BP ₃ C ₃	BP ₃ C ₄	BP ₃ C ₅	B

Obr. 29 Templát mikroplatničky

Ďalej sa roztok E_0 s koncentráciou 1 mg/ml rozpustí v pufri a uschová sa v chladničke. Roztok S_1 sa pripravil rozpustením 300 μ l roztoku S_0 v 29,7ml pufri a roztok E_1 zriedením roztoku E_0 5 000-krát a uschová sa v chladničke. Vzorky sa testujú v 5-tich koncentráciách v binomickom móde riedenia ($C1$ až $C9 = C1/256$) (Obr. 29). Pre každú látku sa pripraví roztok $I_{1,i}$ – 1 skúmavka, do ktorej sa dá 0,99 ml roztoku S_1 a 10 μ l roztoku I_0 s koncentráciou 204,8 mM. Do platničky sa dávkuje po 200 μ l roztokov CH, CHNa, CH₂Na, Sn(CH)₂, Q, QNa, Q₂Na, Sn(Q)₂ do pozícií A2, B2, C2, D2, E2, F2, G2, H2. Ďalej sa dávkuje 100 μ l roztoku S1 do všetkých ostatných jamiek okrem stĺpca 10. Na koniec sa dávkuje po 100 μ l pufri P do pozícií A12, B12, C12, D12, E12, F12, G12, H12. Prevedie sa polovičné riedenie v smere riadkov 2 - 3 - 4 - 5 - 6 - 7 - 8 - 9 - 10. Do vrchnáku mikropatničky sa vleje roztok E_1 a pridá sa všade 100 μ l. Následne sa zmeria absorbancia pri 405 nm v prvej minúte a v 31-vej minúte po inkubácii pri laboratórnej teplote. [65]

6. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

Priebeh reakcií sme sledovali pomoc TLC (EtOAc-hexán), pričom sme využívali detekciu pri 245 nm a 366 nm alebo parami I₂. Pripravené zlúčeniny sme identifikovali dostupnými spektrálnymi metódami.

Elementárna analýza bola realizovaná na meracom prístroji Thermo Electron FlashEA 2000. Kvantitatívne stanovenie C, H, N a S vo vzorkách prebieha spálením vzorky pri vysokej teplote (1800 °C) a následnou separáciou spálených plynov a detekciou na TCD detektore.

Infračervené spektrá boli namerané na meracom prístroji FTIR IRAffinity-1 v rozsahu vlnočtov 400 – 4000 cm⁻¹ použitým KBr techniky. Zlúčenina sa zmieša s bezvodým KBr a je zlisovaná do tablety, ktorá sa vloží do prístroja v smere trasy lúča. Pozadie merania je nastavené zo spektra čistého bezvodého KBr.

Niektoré infračervené spektrá pripravených zlúčenín boli namerané na prístroji Agilent Cary 630 FTIR s diamantovým ATR v rozsahu vlnočtov 400 – 4000 cm⁻¹. Tuhé vzorky sa pritlačili na plochu kryštálu a zmeral sa zoslabený celkový odraz.

¹H NMR a ¹³C NMR spektrá pripravených látok boli namerané na 300 MHz a 75 MHz spektrometri VARIAN GEMINI 2000 v DMSO-d₆ s tetrametylsilánom ako vnútorným štandardom za účelom identifikácie daných zlúčenín. Vzorka sa rozpustí v deuterovanom rozpúšťadle a umiestni sa do dutiny magnetu, ktorá je pri teplote miestnosti. Súčasťou meracej sondy je rádiovfrekvenčná cievka, ktorá slúži ako vysielateľ elektromagnetického žiarenia na vzorku a v poslednej fáze merania slúži ako prijímač, ktorý sníma odozvu vzorky.

MS spektrá boli namerané na prístroji Agilent Technologies 1200 a teploty topenia boli stanovené na Koflerovom prístroji a neboli korigované.

6.1 Stanovenie antibakteriálnej aktivity

Substituované furo[2',3':4,5]pyrolo[1,2-d][1,2,4]triazinóny **Xa-e** a **VIIIa-c**, furo[2',3':4,5]pyrolo[1,2-d][1,2,4]triazintióny **XI** a **XIIa,b** boli testované ako potenciálne antibakteriálne látky na 4 bakteriálnych kmeňoch z toho dva Gram-negatívne (G⁻) *Escherichia coli* (CCM 7929), *Pseudomonas syringae* (CCM 2114) a dva Gram-pozitívne (G⁺) *Bacillus pumilus* (CCM 2218), *Micrococcus luteus* (CCM 732).

Antibakteriálna aktivita zlúčenín vo forme minimálnej inhibičnej koncentrácie (MIC), bola stanovená po 24 h kultivácie pri 37 °C a porovnávala sa so štandardom kyseliny 6-aminopenicilánovej (6-APA), ako známej stavebnej štruktúry účinných antibiotík – penicilínov.

Deriváty s furo[3,2-*b*]pyrolovým skeletom sa testovali na antibakteriálnu aktivitu na Gram-pozitívnej baktérii *Micrococcus luteus* (CCM 732) a Gram-negatívnej baktérii *Escherichia coli* (CCM 7929). Výsledné hodnoty MIC sa stanovovali po 24 h kultivácie pri 37 °C a porovnávali so štandardom kyseliny 6-aminopenicilánovej (6-APA).

6.2 Stanovenie antioxidačnej aktivity

Stanovenie antioxidačnej aktivity derivátov s furo[3,2-*b*]pyrolovým skeletom sa uskutočnilo tromi metódami DPPH, ABTS a FRAP. Metódy boli upravené na mikroplatničkovú techniku. Do mikroplatničiek sa pipetovalo 25 µl vzorky a pridala sa reagencia v danom množstve pre DPPH a ABTS 100 µl roztoku. V prípade metódy FRAP sa pridalo 100 µl roztoku do zmesi obsahujúceho 7mM octanového pufru a 10 mM FeCl₃ (pomere 10:1:1). Takto pripravené vzorky sa inkubovali pri teplote 25 °C 10 minút. Následne prebehlo meranie antioxidačnej aktivity na mikroplatničkovom čítači Obsys Reader pri vlnových dĺžkach – 405 nm pri metóde DPPH a 630 nm pri metóde ABTS a FRAP.

6.3 Analýza čistoty vybraných zlúčenín

Na analýzu čistoty vybraných syntetizovaných zlúčenín sme vybrali HPLC chromatografiu s diódovým poľom. Analýzy sa uskutočnili na HPLC zostave Waters, ktorá pozostávala z týchto častí – čerpadlo (1525 Binary HPLC Pump), kolónový termostát (Column Heater 1500), autosampler (Autosampler 2707), detektor s diódovým poľom (Detector Photodiode Array 2998) a softvéru Empower II.

Na stanovenie čistoty bola použitá mobilná fáza, ktorá pozostávala z roztoku A (0,1 % - nej kyseliny mravčej vo vode alebo čistej vody) a z roztoku B (acetonitrilu). Na analýzu bola použitá izokratická metóda. V prvom prípade bolo zloženie izokratickej metódy takéto - roztok A 20 % (0,1 % - nej kyseliny mravčej vo vode) a roztok B 80 % (acetonitrilu). V druhom prípade bol roztok A 40 % (čistá voda) a roztok B 60 % (acetonitrilu). Prietok bol 1 ml za min. pri teplote 35 °C s nástrekom 10 µl. Elučné píky východiskových látok

spolu s nečistotami boli detekované pri vlnových dĺžkach 210, 260, 280 a 305 nm a zároveň sa merali aj spektrálne dáta v rozmedzi 210-400 nm.

6.4 Syntetická časť

6.4.1 Syntéza východiskových furo[3,2-*b*]pyrol-5-karboxylátov

Východiskové furo[3,2-*b*]pyrol-5-karboxyláty **I** sme pripravili dvoma spôsobmi. V prvom spôsobe sme vychádzali z postupu, ktorý je dobre popísaný v literatúre [14]. Z komerčne dostupného metyl chlóracetátu sme pripravili metyl azidoacetát **II**, ktorý sme ďalej využili na prípravu azidoakrylátu **IV** Knoevenagelovou kondenzáciou. Za podmienok Hemetsbergerovej indolovej syntézy sme pripravili zodpovedajúce furo[3,2-*b*]pyrol-5-karboxyláty **I** (Schéma 25). V tabuľke 1 sú uvedené jednotlivé charakteristiky pripravených furo[3,2-*b*]pyrol-5-karboxylátov **Ia-c**.

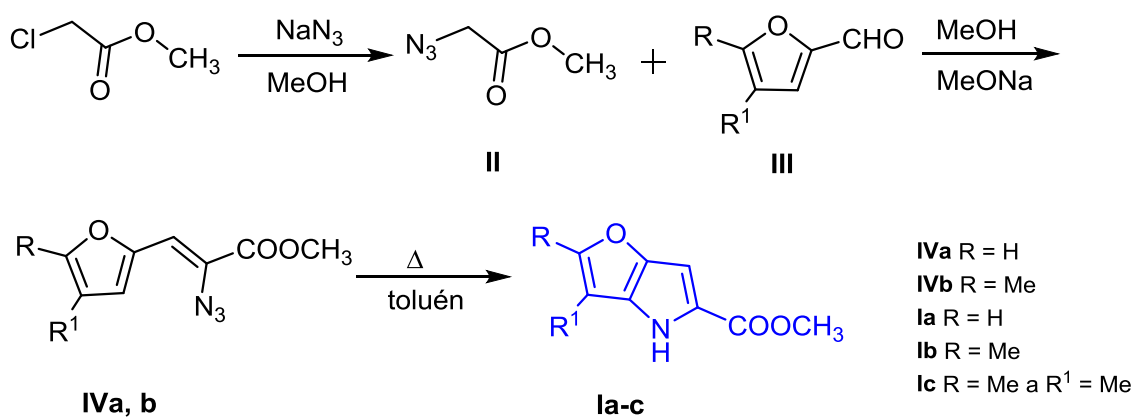


Schéma 25 Príprava východiskových furo[3,2-*b*]pyrol-5-karboxylátov

V druhom prípade sme vychádzali z pripraveného furo[3,2-*b*]pyrol-5-karboxylátu **I**, ktorý nukleofilnou substitúciou tritylchloridom v dimetylformamide poskytol 2-tritylfuro[3,2-*b*]pyrol-5-karboxylátu **V** (Schéma 26). Charakteristika takto pripravenej látky je popísaná v tabuľke 1.

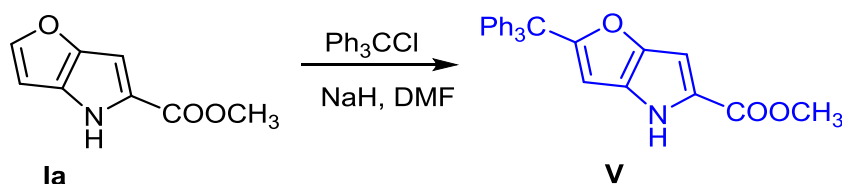


Schéma 26 Príprava metyl 2-trifenylyfuro[3,2-*b*]pyrol-5-karboxylátu

Metyl 2-trifenylnmetyl-4H-furo[3,2-b]pyrol-5-karboxylát (V)

Roztok **Ia** (0.83 g, 5 mmol) v DMF (10 mL) sa pomaly pridal do zmesi NaH (0.24 g, 6 mmol) v DMF (15 mL). Reakčná zmes sa miešala pri 20 °C za vývoja vodikového plynu, potom sa pridal za miešania trifenylnmetylchlorid (1.39 g, 5 mmol) a miešanie pokračovalo ďalej pri laboratórnej teplote cez noc. Roztok sa vylial do ľadu (100 mL) a vzniknutá zrazenina sa odsala a kryštalizovala z etanolu. V tabuľke 1 je uvedená charakteristika zlúčeniny.

¹H NMR (DMSO-d₆) δ 11,66 (s, 1H, NH); 7,36-7,28 (m, 9H, H-3', H-4', H-5'); 7,07 (dd, *J* = 8,4Hz, 1,8 Hz, 6H, H-2', H-6'); 6,74 (s, 1H, H-6); 6,06 (d, 1H, *J* = 0,6 Hz, H-3); 3,77 (s, 3H, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ 165,2; 161,6; 146,9; 144,1; 129,7; 129,2; 127,9; 126,9; 122,6; 100,5; 96,2; 61,5; 51,2.

Tab. 1 C Výsledky prvkovej analýzy pripravených zlúčenín I-V

zlúčenina	sumárny vzorec / molárna hmotnosť	w (vypočítané) / w (namerané) [%]			teplota topenia / výťažok [%]
		C	H	N	
Ia	C ₈ H ₇ NO ₃	58,18	4,27	8,48	140 – 142
	165,15	57,98	4,30	8,56	54
Ib	C ₉ H ₇ NO ₃	60,33	5,06	7,82	135 – 137
	179,17	59,59	4,98	7,97	65
Ic	C ₁₀ H ₁₁ NO ₃	62,17	5,74	7,25	230 – 232
	193,20	62,65	5,16	7,42	70
IVa	C ₈ H ₇ N ₃ O ₃	49,74	3,65	21,76	34 – 36
	193,16	49,68	3,56	21,92	56
IVb	C ₉ H ₉ N ₃ O ₃	52,17	4,40	20,28	30 – 32
	207,19	52,26	4,40	20,44	60
V	C ₂₇ H ₂₁ NO ₃	79,59	5,19	3,44	262 – 265
	407,47	79,32	5,16	3,42	89

6.4.2 Syntéza furo[2',3':4,5]pyrolo[1,2-d][1,2,4]triazinónov

Deriváty **VIIIa-c** sme syntetizovali dvoma metódami. V prvom prípade sme vychádzali z pripraveného karbohydrazidu **IX**, ktorý sme pripravili hydrazinolýzou furo[3,2-b]pyrol-5-karboxylátu **Ia**. Takto pripravený karbohydrazid **IX** v prostredí rôznych ortoesterov cyklizuje na zodpovedné furo[2',3':4,5]pyrolo[1,2-d][1,2,4]triazinóny **VIIIa-c** v 69 – 75%

výtťažkoch. V druhom spôsobe prípravy sme vychádzali z acetylovaného furo[3,2-*b*]pyrol-5-karboxylátu **VI**, ktorý následnou tionáciou s P_2S_5 poskytol derivát **VII**. Cyklizáciou pripraveného tiónu **VII** v prostredí hydrazín hydrátu vznikol príslušný furo[2',3':4,5]pyrolo[1,2-*d*][1,2,4]triazinón **VIIIc** vo výtťažku 65 % (Schéma 27).

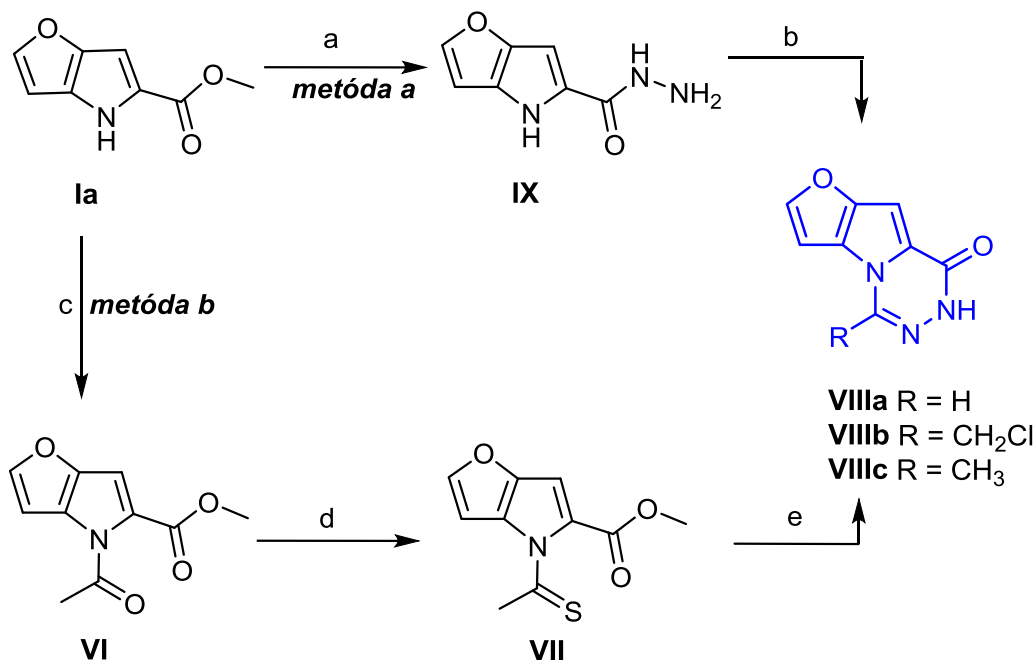


Schéma 27 Príprava furo[2',3':4,5]pyrolo[1,2-*d*][1,2,4]triazín-8(7*H*)-ónov **VIIIa-c**: a) EtOH, N₂H₄, reflux; b) RC(OEt)₃, DMF; c) CH₃COCl alebo (Ac₂O); d) P₂S₅, pyridín; e) EtOH, N₂H₄, reflux

Metyl 4-acetyl-4*H*-furo[3,2-*b*]pyrol-5-karboxylát (**VI**)

Zlúčenina **Ia** (1,79 g, 11 mmol) sa refluxovala v acetanhydride (30 mL) 4 h. Nadbytočné rozpúšťadlo sme oddestilovali za zníženého tlaku a produkt sme kryštalizovali z etanolu za vzniku bielej práškovej látky. V tabuľke 2 je uvedená charakteristika zlúčeniny.

IČ (KBr) ν/cm^{-1} 3268 (NH), 1660 (C=O). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,79 (d, 1H, *J* 2,4 Hz, H-2); 6,76 (dd, 1H, *J* 2,1, 0,9 Hz, H-6); 6,61 (dd, 1H, *J* 2,4, 0,9 Hz, H-3); 3,78 (s, 3H, CH₃); 3,32 (s, 3H, CH₃).

Metyl 4-etantioyl-4*H*-furo[3,2-*b*]pyrol-5-karboxylát (**VII**)

Roztok **VI** (1,48 g, 7,14 mmol) a P₂S₅ (2,38 g, 10,7 mmol) v pyridíne (20 mL) sa refluxoval 10 h. Zmes bola ochladená a vyliata do horúcej vody (30 mL) a extrahovaná chloroformom (2 x 15 mL). Organická fáza bola vysušená MgSO₄ a rozpúšťadlo sa

oddestilovalo za vákua. Surový produkt sa kryštalizoval z dimetylformamidu a v tabuľke 2 je uvedená charakteristika zlúčeniny.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 8,65 (d, 1H, J 2,7 Hz, H-2); 7,98 (t, 1H, J 2,9, 0,9 Hz, H-6); 7,54 (dd, 1H, J 2,7, 0,9 Hz, H-3); 3,45 (s, 3H, CH_3); 3,17 (s, 3H, CH_3). ^{13}C NMR nebolo namerané, pretože zlúčenina **VII** má nízku rozpustnosť.

Furo[2',3':4,5]pyrolo[1,2-d][1,2,4]triazín-8(7H)-óny (VIIIa-c)

Metóda A

Zmes **IX** (0,52 g, 3,1 mmol) a ortoesteru (0,46 g, 3,1 mmol) bola refluxovaná v suchom dimetylformamide (3 mL) 4 h (pre **VIIIb**: 80 °C, 24 h). Roztok sa ochladil a vzniknutá zrazenina sa odsala a prekryštalizovala sa z dioxánu.

Metóda B

Do roztoku **VII** (0,4 g, 1,9 mmol) v etanole (15 mL) sa pridal hydrazín hydrát (2,7 g, 86 mmol). Reakčná zmes sa miešala pri 80 °C 168 h. Roztok sa ochladil a vzniknutá zrazenina sa odsala a prekryštalizovala sa z dioxánu. V tabuľke 2 sú uvedené charakteristiky zlúčenín.

Furo[2',3':4,5]pyrolo[1,2-d][1,2,4]triazín-8(7H)-ón (VIIIa)

IČ (KBr) ν/cm^{-1} 3114 (NH), 1641 (C=O). ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 11,81 (s, 1H, NH); 8,75 (s 1H, H-5); 8,00 (d, 1H, J 2,4 Hz, H-2); 7,14 (s, 1H, H-9); 7,11 (dd, 1H, J 2,4, 0,8 Hz, H-3). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 155,2; 149,5; 148,4; 127,7; 124,8; 123,5; 100,0; 92,4. MS (ESI+): m/z 176,1 (MH^+).

5-(Chloromethyl)furo[2',3':4,5]pyrolo[1,2-d][1,2,4]triazín-8(7H)-ón (VIIIb)

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 12,09 (s, 1H, NH); 7,97 (d, 1H, J 2,1 Hz, H-2); 6,88 (d, 1H, J 2,7 Hz, H-9); 6,67 (dd, 1H, J 2,1, 0,6 Hz, H-3); 5,09 (s, 2H, CH_2). ^{13}C NMR nebolo namerané, pretože zlúčenina **VIIIb** má nízku rozpustnosť.

5-Methylfuro[2',3':4,5]pyrolo[1,2-d][1,2,4]triazín-8(7H)-ón (VIIIc)

IČ (KBr) ν/cm^{-1} 3126 (NH), 1633 (C=O). ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 11,65 (s, 1H, NH); 7,99 (d, 1H, J 2,1 Hz, H-2); 7,15 (dd, 1H, J 2,4, 0,8 Hz, H-3); 7,10 (d, 1H, J 2,4

Hz, H-9); 2,60 (s, 3H, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ 155,3; 149,8; 148,9; 135,7; 125,6; 123,9; 101,7; 92,9; 18,0.

Tab. 2 Výsledky prvkovej analýzy pripravených zlúčenín VI-IX

zlúčenina	sumárny vzorec / molárna hmotnosť	w (vypočítané) / w (namerané) [%]				teplota topenia / výťažok [%]
		C	H	N	S	
VI	C ₁₀ H ₉ NO ₄	57,97	4,38	6,76		141 – 143
	207,19	58,19	4,35	6,93		60
VII	C ₁₀ H ₉ NO ₃ S	53,80	4,06	6,27	14,36	> 360
	223,25	53,48	4,11	5,89	14,22	60
VIIIa	C ₈ H ₅ N ₃ O ₂	54,86	2,88	23,99		284-286
	175,14	54,69	2,93	24,16		69
VIIIb	C ₉ H ₆ ClN ₃ O ₂	48,34	2,70	18,79		224-226
	223,62	48,20	2,73	18,61		75
VIIIc	C ₉ H ₇ N ₃ O ₂	57,14	3,73	22,21		258-261
	189,17	56,76	3,41	21,62		71
IX	C ₇ H ₇ N ₃ O ₂	50,91	4,27	25,44		227 – 230
	165,15	51,27	4,26	25,36		85

6.4.3 Syntéza substituovaných furo[2',3':4,5]pyrolo[1,2-d][1,2,4]triazinov

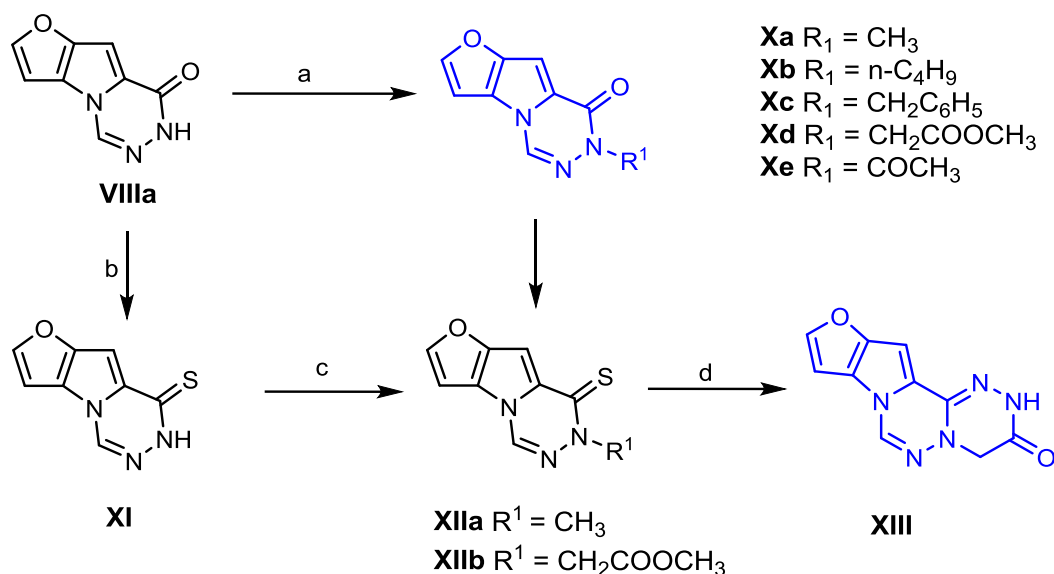


Schéma 28 Príprava derivátov **Xa-e** a derivátov **XIII**: a) $R^1\text{Cl}$, NaH, DMF; b) P_2S_5 , pyridín; c) MeI alebo $\text{ClCH}_2\text{COOMe}$, NaH, DMF; d) EtOH, N_2H_4 , reflux

7- R^1 -furo[2',3':4,5]pyrolo[1,2-d][1,2,4]triazín-8(7H)-óny (**Xa-e**)

Hydrid sodný (0,42 g, 17 mmol) sa pridal do roztoku **VIIIa** (1,5 g, 8 mmol) v DMF (15 mL) za miešania. Po 15 min bol do reakčnej zmesi po kvapkách pridaný príslušný alkylhalogenid (MeI, n-C₄H₉Br, PhCH₂Br) (14 mmol) a miešanie pokračovalo 2,5 h pri laboratórnej teplote (PhCH₂Br sa miešal cez noc pri 55 °C). Zmes sa vyliala do ľadovej vody za vzniku zrazeniny, ktorá sa odsala a prekryštalizovala sa z etanolu za vzniku bieleho kryštalického produktu. V tabuľke 3 sú uvedené charakteristiky zlúčenín.

7-Methylfuro[2',3':4,5]pyrolo[1,2-d][1,2,4]triazín-8(7H)-ón (**Xa**)

IČ (KBr) ν/cm^{-1} 1641 (C=O). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8,81 (d, 1H, *J* 0,6 Hz, H-5); 7,99 (d, 1H, *J* 2,4 Hz, H-2); 7,14 (s, 1H, H-9); 7,09 (dd, 1H, *J* 2,1, 0,9 Hz, H-3); 3,56 (s, 3H, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ 154,6; 149,9; 149,2; 127,8; 124,9; 123,8; 100,6; 93,0; 37,4.

7-Butylfuro[2',3':4,5]pyrolo[1,2-d][1,2,4]triazín-8(7H)-ón (**Xb**)

IČ (KBr) ν/cm^{-1} 1643 (C=O). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8,82 (d, 1H, *J* 0,9 Hz, H-5); 7,99 (d, 1H, *J* 2,4 Hz, H-2); 7,13 (d, 1H, *J* 0,3 Hz, H-9); 7,09 (dd, 1H, *J* 2,4, 0,9 Hz, H-3); 3,99 (t, 2H, CH₂); 1,73 (sextet, 2H, CH₂); 1,37 (sextet, 2H, CH₂); 0,93 (t, 3H, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ 154,3; 150,0; 149,3; 128,0; 124,9; 123,8; 100,6; 93,3; 48,3; 30,5; 19,7; 14,1. MS (ES): *m/z* 232,2 (MH⁺).

7-Benzylfuro[2',3':4,5]pyrolo[1,2-d][1,2,4]triazín-8(7H)-ón (**Xc**)

IČ (KBr) ν/cm^{-1} 1641 (C=O). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 8,83 (s, 1H, H-5); 8,01 (d, 1H, *J* 2,1 Hz, H-2); 7,33-7,27 (m, 5H, Ph); 7,19 (s, 1H, H-9); 7,09 (dd, 1H, *J* 2,1, 0,9 Hz, H-3); 5,17 (s, 2H, CH₂). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ 153,9; 149,7; 148,7; 137,3; 128,3; 127,8; 127,6; 127,6; 127,3; 127,3; 124,2; 123,5; 100,1; 93,2; 51,6.

Metyl (8-oxofuro[2',3':4,5]pyrolo[1,2-d][1,2,4]triazín-8(7H)-yl)acetát (**Xd**)

Do roztoku **VIIIa** (1 g, 6 mmol) v DMF (18 mL) bola pridaná suspenzia hydridu sodného (0,21 g, 8,55 mmol) v DMF (16 mL). Po 30 min bola reakčná zmes ochladená na 0 °C a metyl chlóracetát (1,54 g, 14,3 mmol) sa pridal po kvapkách za stáleho miešania. Miešanie pokračovalo pri laboratórnej teplote 6 h a zmes sa vyliala do ľadovej vody

(30 mL) za vzniku zrazeniny, ktorá sa odsala a prekryštalizovala sa z etanolu za vzniku bielej kryštalickej látky.

IČ (KBr) ν/cm^{-1} 1745, 1662 (C=O). ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 8,83 (d, 1H, J 0,3 Hz, H-5); 8,09 (d, 1H, J 2,4 Hz, H-2); 7,39 (t, 1H, J 0,6 Hz, H-9); 7,11 (dd, 1H, J 2,1, 0,9 Hz, H-3); 2,59 (s, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ 168,2; 153,7; 149,7; 148,3; 127,5; 123,6; 123,5; 99,8; 93,2; 51,7; 50,1,

7-Acetylfuro[2',3':4,5]pyrolo[1,2-*d*][1,2,4]triazín-8(7H)-óny (**Xe**)

Zlúčenina **VIIIa** (1,1 g, 6 mmol) v acetanhydride (15 mL) refluxovala 1,5 h. Po skončení reakcie sa zmes ochladila a tuhý produkt sa odsal a kryštalizoval z acetónu za vzniku bielej kryštalickej látky.

IČ (KBr) ν/cm^{-1} 1745, 1662 (C=O). ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 8,83 (d, 1H, J 0,3 Hz, H-5); 8,09 (d, 1H, J 2,4 Hz, H-2); 7,39 (t, 1H, J 0,6 Hz, H-9); 7,11 (dd, 1H, J 2,1, 0,9 Hz, H-3); 2,59 (s, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (DMSO- d_6) δ 170,6; 154,4; 151,6; 149,2; 128,6; 125,7; 124,3; 100,7; 97,6; 26,9.

Furo[2',3':4,5]pyrolo[1,2-*d*][1,2,4]triazín-8(7H)-tión (**XI**)

Zmes zlúčeniny compound **VIIIa** (1,5g, 8,5 mmol) a P_2S_5 (1,9g, 8,5 mmol) sa miešala za refluxu v pyridíne (8,6 mL) 5h. Po ochladení sa vyliala do horúcej vody (30 mL) a vylúčená pevná látka sa odsala a kryštalizovala z dioxánu.

IČ (KBr) ν/cm^{-1} 3126 (NH) , 1257 (C=S). ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 13,29 (s, 1H, NH); 9,16 (d, 1H, J 0,6 Hz, H-5); 8,09 (d, 1H, J 2,1 Hz, H-2); 7,29 (d, 1H, J 2,4 Hz, H-9); 7,15 (dd, 1H, J 2,1, 0,9 Hz, H-3). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 173,1; 150,5; 149,4; 131,7; 130,5; 123,9; 100,2; 95,3. MS (ESI+) m/z 192,1 (MH^+).

7-Metylfuro[2',3':4,5]pyrolo[1,2-*d*][1,2,4]triazín-8(7H)-tión (**XIIa**)

Metóda A

Látka **XI** (0,3 g, 1,6 mmol) bola rozpustená v dimetylformamide (3 mL) a za miešania sa pridal do roztoku hydrid sodný (0,07 g, 3,1 mmol). Po 1 h sa po kvapkách pridal metyljodid (0,44 g, 3.1 mmol) a miešanie pokračovalo 4 h. Reakčná zmes sa vyliala do ľadovej vody (30 mL) a vzniknutá zrazenina sa filtrovala a kryštalizovala z dimetylformamidu.

Metóda B

Zmes **Xd** (1 g, 5,7 mmol) a P_2S_5 (1,27 g, 5,7 mmol) sa refluxovala v pyridíne (10 mL) 5 h. Reakčná zmes sa vyliala do horúcej vody (20 mL) a organická fáza sa extrahovala chloroformom (2 x 10 mL), roztok sa vysušil Na_2SO_4 a rozpúšťadlo sa oddestilovalo.

1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 10,95 (s, 1H, H-5); 8,31 (d, 1H, J 2,4 Hz, H-2); 7,76 (s, 1H, H-9); 7,34 (dd, 1H, J 2,4, 0,9 Hz, H-3); 4,17 (s, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 162,3; 157,7; 156,5; 144,8; 130,9; 125,9; 106,1; 99,7; 51,8.

Metyl (8-tioxofuro[2',3':4,5]pyrolo[1,2-d][1,2,4]triazin-8(7H)-yl)acetát (**XIIb**)

Reakčná zmes **Xd** (2,47 g, 10 mmol) a P_2S_5 (2,67 g, 12 mmol) v pyridíne (14 mL) sa refluxovala 9 h. Zmes sa vyliala do horúcej vody (20 mL) a vzniknutá zrazenina sa filtrovala a kryštalizovala z dioxánu za vzniku žltého kryštalického produktu. V tabuľke 2 je uvedená charakteristika zlúčeniny.

1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 9,25 (s, 1H, H-5); 8,11 (d, 1H, J 2,4 Hz, H-2); 7,36 (s, 1H, H-9); 7,15 (dd, 1H, J 2,4, 0,9 Hz, H-3); 5,32 (s, 2H, CH_2); 3,57 (s, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 173,3; 167,4; 150,9; 131,6; 130,6; 127,9; 100,4; 96,8; 93,6; 56,7; 52,3.

7-Metylfuro[2',3':4,5]pyrolo[1,2-d][1,2,4]triazín-8(7H)-tión (**XIII**)

Hydrazín hydrát (6 g, 120 mmol) sa pridal do roztoku **XIIb** (2,11 g, 8 mmol) v etanole (9,5 mL) a zmes sa miešala 140 h za refluxu. Po ochladení roztoku sa pevná látka filtrovala, premyla vodou a kryštalizovala z dioxánu za vzniku žltého kryštalického produktu. V tabuľke 3 je uvedená charakteristika zlúčeniny.

1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 10,72 (s, 1H, NH); 8,79 (s, 1H, H-5); 8,01 (d, 1H, J 2,1 Hz, H-2); 7,17 (s, 1H, H-12); 7,11 (dd, 1H, J 2,4, 0,9 Hz, H-3); 4,55 (s, 2H, CH_2). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 160,3; 154,3; 149,8; 147,9; 127,8; 124,5; 100,1; 93,1; 90,2; 50,3.

Tab. 3 Výsledky prvkovej analýzy pripravených zlúčenín X- XIII

zlúčenina	sumárny vzorec / molárna hmotnosť	w (vypočítané) / w (namerané) [%]				teplota topenia / výťažok [%]
		C	H	N	S	
Xa	C ₉ H ₇ N ₃ O ₂	57,14	3,73	22,21		210 – 214
	189.17	57,33	3,82	22,11		72
Xb	C ₁₂ H ₁₃ N ₃ O ₂	62,33	5,67	18,17		115 – 118
	231.26	61,89	5,56	18,18		47
Xc	C ₁₅ H ₁₁ N ₃ O ₂	67,92	4,18	15,84		184 – 186
	265.27	68,19	4,32	16,29		27
Xd	C ₁₁ H ₉ N ₃ O ₂	53,44	3,67	17,00		175 – 180
	247.21	52,77	4,02	17,79		45
Xe	C ₁₀ H ₇ N ₃ O ₂	55,30	3,25	19,35		242 – 245
	217.18	55,10	3,31	19,64		53
XI	C ₈ H ₅ N ₃ OS	50,25	2,64	21,98	16,77	268 – 270
	191.21	50,48	2,62	22,14	16,89	85
XIIa	C ₉ H ₇ N ₃ OS	52,67	3,44	20,47	15,62	> 360
	205.24	52,91	3,49	20,58	15,88	76
XIIb	C ₁₁ H ₉ N ₃ O ₃ S	50,18	3,45	15,96	12,18	168 – 172
	263.27	49,97	3,56	14,32	12,06	71
XIII	C ₁₀ H ₇ N ₅ O ₂	52,40	3,08	30,56		247 – 250
	229.20	52,09	3,13	30,78		64

6.4.4 Syntéza substituovaných 4H-furo[3,2-b]pyrole-5-karbaldehydov a 8-etoxy-2-metylfuro[2',3':4,5]pyrolo[1,2-d]/[1,2,4]triazínu

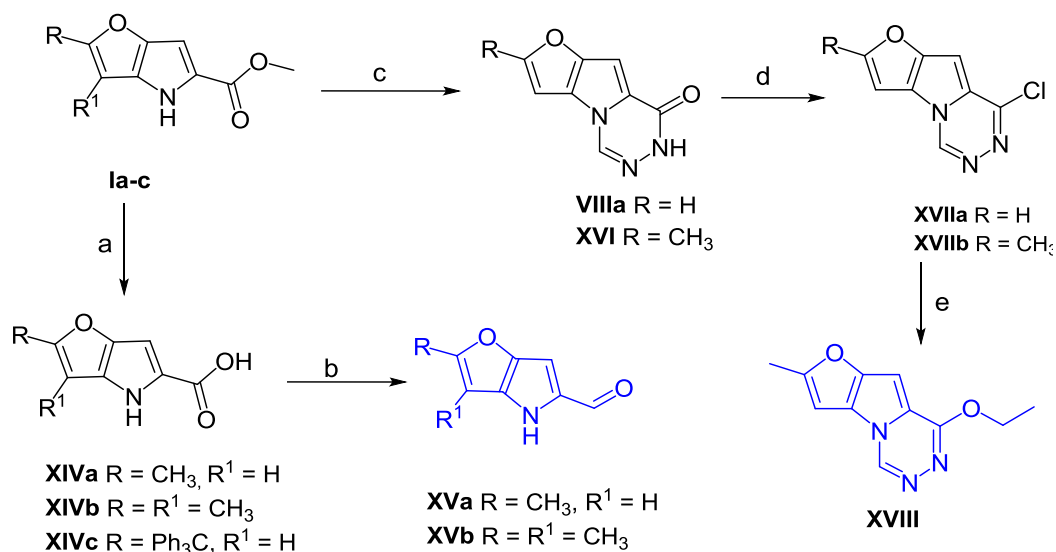


Schéma 29 Príprava furo[3,2-b]pyrol-5-karbaldehydov **XVa,b** a furo[2',3':4,5]pyrolo[1,2-d]/[1,2,4]triazínu **XVIII**: a) 2M NaOH, EtOH b) TFA, HC(OEt)₃; c) 1. N₂H₄, EtOH, 2. HC(OEt)₃, DMF; d) POCl₃, DMF; e) EtONa, EtOH

Kyseliny 2-R-4H-furo[3,2-b]pyrol-5-karboxylové (**XIVa-c**)

Do roztoku **Ia-c** (2,8 g, 15 mmol) v etanole (10 mL) sa pridal NaOH (0,9 g, 22 mmol) vo vode (10 mL) a reakčná zmes sa refluxovala 1,5 – 4h. Po ochladení sa reakčná zmes okyslila koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou. Vylúčená zrazenina sa odsala, premyla vodou a kryštalizovala z etanolu za vzniku slabofialových produktov **XIV a-c**.

Kyselina 2-Metyl-4H-furo[3,2-b]pyrol-5-karboxylová (**XIVa**)

IČ (KBr) ν/cm^{-1} 3373 (NH), 1640 (C=O). ¹H NMR (DMSO-d₆) δ 12,13 (brs, 1H, OH); 11,29 (s, 1H, NH); 6,58 (s, 1H, H-6); 6,21(s, 1H, H-3); 2,34 (s, 3H, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ 163,1; 158,8; 146,3; 130,4; 123,0; 96,2; 96,0; 15,1

Kyselina 2,3-Dimetyl-4H-furo[3,2-b]pyrol-5-karboxylová (**XIVb**).

IČ (KBr) ν/cm^{-1} 3200 (NH), 1630 (C=O). ¹H NMR (DMSO-d₆) δ 12,08 (brs, 1H, OH); 11,38 (s, 1H, NH); 6,52 (d, *J* 1,8 Hz, 1H, H-6); 2,26 (s, 3H, CH₃); 2,01 (s, 3H, CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-d₆) δ 163,2; 154,1; 144,9; 132,0; 122,8; 104,3; 95,9; 12,9; 8,3.

Kyselina 2-trityl-4H-furo[3,2-b]pyrol-5-karboxylová (XIVc)

IČ (KBr) ν/cm^{-1} 3190 (NH), 1640 (C=O). ^1H NMR (DMSO- d_6) δ 11,44 (s, 1H, NH); 7,33 (t, 3H, J 7,5, 3,6 Hz, H-4'); 7,27 (t, J 7,2, 3,6 Hz, 6H, H-3', H-5'); 7,04 (d, J 3,9 Hz, 6H, H-2', H-6'); 6,65 (s, 1H, H-6); 6,01 (s, 1H, H-3). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 165,1; 163,1; 147,4; 144,7; 130,2; 129,0; 128,4; 127,3; 124,3; 101,1; 96,4; 61,9.

Substituované 4H-furo[3,2-b]pyrol-5-karbaldehydy (XVa-b)

Kyselina 4H-furo[3,2-b]pyrol-5-karboxylová **XIV** (1 g, 6 mmol) sa rozpustila v trifluóroctovej kyseline (8 mL) a zmes sa miešala pri 50 °C. Po 10 min sa do reakčnej zmesi pridal trietyl ortoformát (1 mL) a miešanie pokračovalo ďalších 10 minút. Po ochladení sa do reakčnej zmesi pridával vodný roztok NaHCO_3 . Vzniknutá zrazenina sa odsala, premyla vodou a čistila kolónovou chromatografiou na SiO_2 s mobilnou fázou hexán/etyl acetát (od 75:25 do 60:40) za vzniku žltých produktov **XVa-b**.

2-Metyl-4H-furo[3,2-b]pyrol-5-karbaldehyd (XVa)

IČ (KBr) ν/cm^{-1} 3198 (NH), 1618 (C=O). ^1H NMR (DMSO- d_6) δ 11,68 (s, 1H, NH); 9,32 (s, 1H, H-C=O); 6,82 (s, 1H, H-6); 6,29 (s, 1H, H-3); 2,37 (s, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 179,3; 161,9; 147,1; 134,2; 133,6; 101,8; 96,2; 15,3.

2,3-Dimetyl-4H-furo[3,2-b]pyrol-5-karbaldehyd (XVb)

IČ (KBr) ν/cm^{-1} 3205 (NH), 1626 (C=O). ^1H NMR (DMSO- d_6) δ 11,75 (s, 1H, NH); 9,31 (s, 1H, H-C=O); 6,77 (s, 1H, H-6); 2,29 (s, 3H, CH_3); 2,02 (s, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 179,1; 157,4; 145,7; 135,8; 133,5; 104,3; 101,7; 13,1; 8,1.

8-Chlórfuro[2',3':4,5]pyrolo[1,2-d][1,2,4]triazín (XVIIa)

Zmes triazínónu **VIII** alebo **XVI** (1 g, 5 mmol) a POCl_3 (5 mL) bola refluxovaná za miešania 4h. Po ochladení sa reakčná zmes vyliala do vody a neutralizovala amoniakom. Tuhá zrazenina sa odsala, premyla vodou a čistila kolónovou chromatografiou na SiO_2 a ako eluent sa použil chloroform.

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 8,73 (s, 1H, H-5); 8,12 (d, 1H, J 2,1 Hz, H-2); 7,97 (d, 1H, J 2,1 Hz, H-9); 7,26 (d, 1H, J 2,1 Hz, H-3). ^{13}C NMR spektrum nebolo namerané pretože vzniknutá zlúčenina je slabo rozpustná.

8-Chlór-2-metylfuro[2',3':4,5]pyrolo[1,2-d]/[1,2,4]triazín (XVIIb)

Derivát **XVIIb** bol pripravený rovnakým spôsobom ako **XVIIa**, na ďalší krok syntézy bol použitý bez izolácie.

8-Etoxy-2-metylfuro[2',3':4,5]pyrolo[1,2-d]/[1,2,4]triazín (XVIII)

Roztok chlórtriazínu **XVIIb** (0,58g, 3,1 mmol) v absolútnom etanole (5 mL) bol sa pridal do roztoku etoxidu sodného (0,02g, 8 mmol Na) v etanole (5 mL) pri 0 °C. Reakčná zmes sa miešala pri laboratórnej teplote 3h a potom refluxovala 48h. Po ochladení sa rozpúšťadlo odparilo za vákuu a vzniknutý surový produkt sa odsal, premyl vodou (15 mL) a kryštalizoval z etanolu.

^1H NMR (DMSO- d_6) δ 7,93 (s, 1H, H-5); 7,57 (s, 1H, H-6); 7,33 (s, 1H, H-3); 4,16 (q, 2H, CH_2); 2,40 (s, 3H, CH_3); 1,19 (t, 3H, J 6,9Hz, CH_3). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 155,9; 148,3; 147,2; 145,6; 127,7; 118,8; 96,5; 92,2; 56,5; 18,9; 15,1.

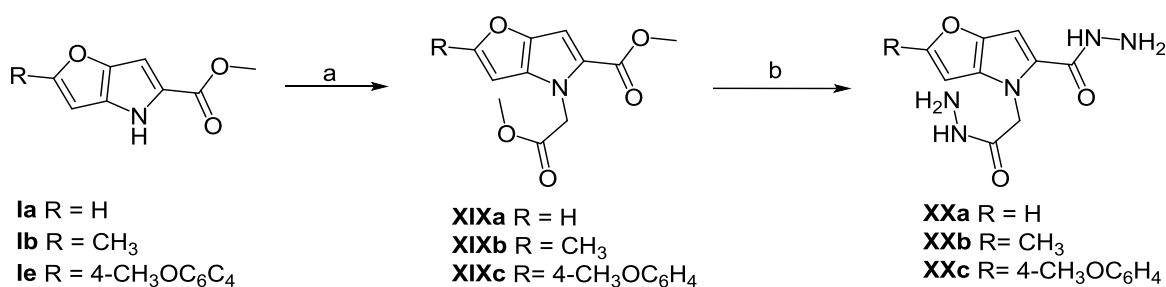
Tab. 4 Výsledky prvkovej analýzy pripravených zlúčenín **XIV-XVIII**

zlúčenina	sumárny vzorec / molárna hmotnosť	w (vypočítané) / w (namerané) [%]			teplota topenia / výťažok [%]
		C	H	N	
XIVa	$\text{C}_9\text{H}_9\text{NO}_3$	58,18	4,27	8,48	192 – 194
	179,17	58,11	4,22	8,51	66
XIVb	$\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{NO}_3$	60,33	5,06	7,82	162 – 164
	193,20	58,89	5,28	7,05	70
XIVc	$\text{C}_{27}\text{H}_{21}\text{NO}_3$	79,37	4,87	3,56	138 – 140
	407,46	76,41	4,96	3,48	80
XVa	$\text{C}_8\text{H}_7\text{NO}_2$	64,42	4,73	9,39	162 – 164
	149,15	64,81	4,69	8,94	55
XVb	$\text{C}_9\text{H}_9\text{NO}_2$	66,25	5,56	8,58	132 – 134
	163,18	66,03	5,59	8,21	58

Tab. 5 Výsledky prvkovej analýzy pripravených zlúčenín XVII-XVIII

zlúčenina	sumárny vzorec / molárna hmotnosť	w (vypočítané) / w (namerané) [%]			teplota topenia / výťažok [%]
		C	H	N	
XVIIa	C ₈ H ₄ ClN ₃ O	49,65	2,08	21,71	135 – 140
	193,59	49,19	2,14	21,25	97
XVIII	C ₁₁ H ₁₁ N ₃ O ₂	60,82	5,10	19,34	217 – 220
	217,23	61,16	5,18	19,78	57

6.4.5 Syntéza furo[2',3':4,5]pyrolo[1,2-a]pyrazíndiónu a dihydrofuro[2',3':4,5]pyrolo[1,2-a]pyrazin-7(8H)-yl]acetamidov

Schéma 30 Príprava derivátov **Xa-c** – a) NaH, DMF, ClCH₂CO₂CH₃; b) N₂H₄, EtOH

Metyl 4-(2-metoxi-2-oxoetyl)-4H-furo[3,2-b]pyrol-5-karboxyláty (**XIXa-c**)

Do roztoku furo[3,2-*b*]pyrol-5-karboxylátu **I** (0,66g, 4,0 mmol) v DMF (15 mL) bola pridaná suspenzia NaH (0,5 g, 21 mmol) v DMF (10 mL). Po 15 min miešania pri laboratórnej teplote sa pridal metyl chlóracetát (0,8 mL, 9 mmol) po kvapkách. Zmes sa ďalej miešala pri laboratórnej teplote cez noc, potom sa vyliala do ľadovej vody (20 mL) a koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou sa upravilo pH na 2. Zmes sa potom extrahovala dietyléterom (2x20 mL), organická fáza sa vysušila Na₂SO₄ a rozpúšťadlo sa oddestilovalo za vákua. Vzniknuté produkty **XXa-c** sa kryštalizovali z etanolu.

Metyl 4-(2-metoxi-2-oxoetyl)-4H-furo[3,2-b]pyrol-5-karboxylát (XIXa)

^1H NMR (DMSO- d_6) δ 7,83 (d, J 2,4 Hz, 1H, H-2); 6,89 (d, J 0,9 Hz, 1H, H-6); 6,83 (dd, J 2,4, 0,9, 1H, H-3); 5,20 (s, 2H, CH_2); 3,73 (s, 6H, 2 x CH_3). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 168,6; 161,5; 149,5; 144,7; 133,7; 122,8; 99,2; 98,5; 60,8; 51,1; 48,7.

Metyl 4-(2-metoxi-2-oxoetyl)-2-metyl-4H-furo[3,2-b]pyrol-5-karboxylát (XIXb)

IČ (KBr) ν/cm^{-1} 1754, 1685 (C=O). ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 6,78 (d, 1H, J 0,6 Hz, H-6); 6,43 (s, 1H, H-3); 5,15 (s, 2H, CH_2); 3,69 (s, 3H, CH_3); 3,65 (s, 3H, CH_3); 2,36 (s, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 169,6; 162,1; 159,7; 144,0; 135,3; 121,4; 98,9; 95,9; 52,4; 51,4; 48,9; 15,2;

Metyl 4-(2-metoxi-2-oxoetyl)-2-(4-metoxifynyl)-4H-furo[3,2-b]pyrol-5-karboxylát (XIXc)

IČ (KBr) ν/cm^{-1} 1747, 1685 (C=O); ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 7,67 (d, 2H, J 4,5 Hz, H-2', H-6'); 7,11 (s, 1H, H-6); 7,02 (d, 2H, J 4,2 Hz, H-3', H-5'); 6,89 (s, 1H, H-3); 5,21 (s, 2H, CH_2); 3,78 (s, 3H, CH_3); 3,72 (s, 3H, CH_3); 3,67 (s, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 169,6; 161,9; 159,9; 159,8; 144,5; 135,8; 125,8; 123,6; 122,6; 115,0; 99,0; 93,2; 55,7; 52,5; 51,6; 49,0.

4-(2-Hydrazino-2-oxoetyl)-4H-furo[3,2-b]pyrole-5-karbohydrazidy (XXa-c)

Reakčná zmes zlúčeniny **XIX** (10 mmol) a hydrazín hydrátu (20 mmol) sa refluxovala v etanole (30 mL) 48 h. Po ochladení sa tuhá látka odsala a kryštalizovala z etanolu.

4-(2-Hydrazino-2-oxoetyl)-4H-furo[3,2-b]pyrole-5-karbohydrazid (XXa)

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 9,34 (s, 1H, NH); 9,12 (s, 1H, NH); 7,65 (d, 1H, J 2,4 Hz, H-2); 6,78 (s, 1H, H-6); 6,64 (dd, 1H, J 2,1, 0,6 Hz, H-3); 5,02 (s, 2H, CH_2); 4,28 (brs, 2H, NH_2); 4,18 (brs, 2H, NH_2). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 167,2; 162,1; 147,2; 144,9; 131,2; 125,9; 99,4; 93,6; 48,0.

4-(2-Hydrazino-2-oxoethyl)-2-metyl-4H-furo[3,2-b]pyrole-5-karbohydrazid (**XXb**)

IČ (KBr) ν/cm^{-1} 3296, 3195, 2919, 2851 (NH), 1655, 1602 (C=O). ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 9,23 (s, 1H, NH); 9,09 (s, 1H, NH); 6,72 (s, 1H, H-6); 6,26 (s, 1H, H-3); 4,98 (s, 2H, CH₂); 4,21(bris, 4H, 2 x NH₂); 2,33 (s, 3H, CH₃). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 167,7; 162,8; 157,1; 144,2; 132,7; 124,5; 96,1; 94,1; 48,5; 15,1.

4-(2-Hydrazino-2-oxoethyl)-2-(4-metoxifenyl)-4H-furo[3,2-b]pyrol-5-karbohydrazid (**XXc**)

IČ (KBr) ν/cm^{-1} 3275, 3159, 2918, 2850 (NH), 1675, 1644 (C=O). ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 9,34 (s, 1H, NH); 9,15 (s, 1H, NH); 7,65 (d, 2H, J 4,2 Hz, H-2', H-6'); 6,99 (d, 2H, J = 4,4 Hz, H-3', H-5'); 6,96 (s, 1H, H-6); 6,81 (s, 1H, H-3); 5,05 (s, 2H, CH₂); 4,28 (bris, 2H, NH₂); 4,20 (bris, 2H, NH₂); 3,77(s, 3H, CH₃). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 167,7; 162,5; 159,3; 157,6; 144,9; 133,4; 125,8; 125,3; 124,3; 114,9; 94,2; 93,6; 55,7; 48,5. MS (ES): m/z 342,0 (MH⁺).

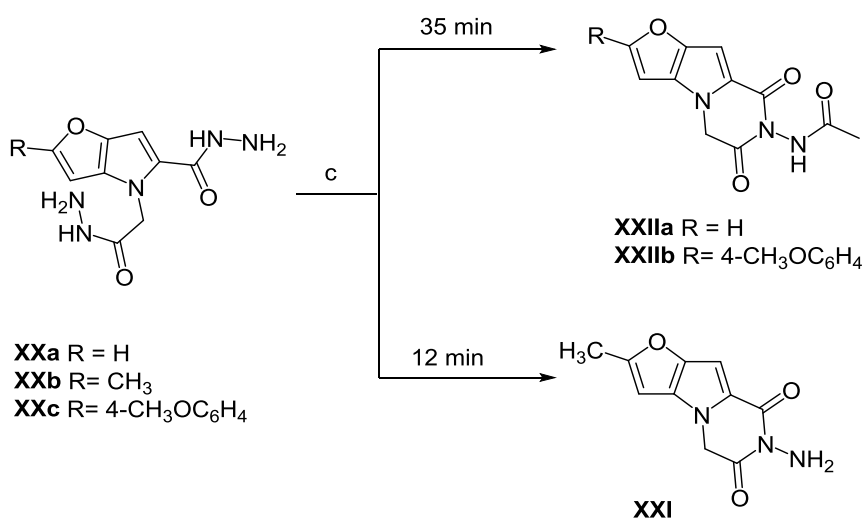


Schéma 31 Príprava zlúčenín **XXI** a **XXIIa,b**: a) MW, CH₃COOH

7-Amino-2-metyl-furo[2',3':4,5]pyrolo[1,2-a]pyrazin-6,8(5H,7H)-dión (**XXI**)

Zlúčenina **XXb** (0,5g, 2 mmol) bola rozpustená v kyselinej octovej (5 mL) a ožarovaná v mikrovlnnej rúre pri 90 W 12 min. Po ochladení sa tuhý produkt odsal, premyl vodou (20 mL) a kryštalizoval z etanolu.

IČ (KBr) ν/cm^{-1} 3337 (NH), 1665 (C=O). ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 6,83 (s, 1H, H-6); 6,41 (s, 1H, H-3); 5,31 (s, 2H, NH); 5,13 (s, 2H, CH_2); 2,39 (s, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 163,9; 160,4; 156,3; 146,5; 132,1; 120,6; 96,0; 95,0; 48,3; 15,2.

N-(6,8-Dioxo-5,6-dihydrofuro[2',3':4,5]pyrolo[1,2-*a*]pyrazin-7(8H)-yl)acetamidy (**XXIIa-b**)

Zlúčenina **XX** (2 mmol) bola rozpustená v kyselinej octovej (5 mL) a ožarovaná v mikrovlnnej rúre pri 180 W 35 min. Po ochladení sa surový produkt odsal, premyl vodou (20 mL) a kryštalizoval z etanolu.

N-(6,8-Dioxo-5,6-dihydrofuro[2',3':4,5]pyrolo[1,2-*a*]pyrazin-7(8H)-yl)acetamid (**XXIIa**)

IČ (KBr) ν/cm^{-1} 3191 (NH), 1729, 1669 (C=O). ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 10,41 (s, 1H, NH); 7,91(d, 1H, J 2,4 Hz, H-2); 6,99 (d, 1H, J 0,9 Hz, H-9); 6,79 (dd, 1H, J 2,1, 0,6 Hz, H-3); 5,44 (d, 1H, J 19,6 Hz, H-5 $_{\alpha}$); 5,34 (d, 1H, J 19,6 Hz, H-5 $_{\beta}$); 1,99 (s, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 168,6; 164,9; 156,1; 151,2; 147,7; 131,2; 122,0; 99,9; 96,2; 48,7; 20,8.

N-[2-(4-Metoxyfenyl)-6,8-dioxo-5,6-dihydrofuro[2',3':4,5]pyrolo[1,2-*a*]pyrazin-7(8H)-yl]acetamid (**XXIIb**)

IČ (KBr) ν/cm^{-1} 3180 (NH), 1729, 1670, 1607 (C=O). ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 10,41 (s, 1H, NH); 7,75 (d, 2H, J 8,9 Hz, H-2', H-6'); 7,12 (d, 1H, J = 0,8 Hz, H-3); 7,03 (d, 3H, J 8,7, Hz, H-9, H-3', H-5'); 5,43 (d, 1H, J 19,1 Hz, H-5 $_{\alpha}$); 5,32 (d, 1H, J 19,1 Hz, H-5 $_{\beta}$); 3,79 (s, 3H, CH_3); 2,00 (s, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6) δ 168,6; 164,8; 160,9; 160,1; 155,8; 147,0; 133,4; 126,1; 123,3; 121,3; 115,1; 96,3; 93,3; 55,8; 48,7; 20,8.

Tab. 6 Výsledky prvkovej analýzy pripravených zlúčenín XIX-XII

zlúčenina	sumárny vzorec / molárna hmotnosť	w (vypočítané) / w (namerané) [%]			teplota topenia / výťažok [%]
		C	H	N	
XIXa	C ₁₁ H ₁₁ NO ₅	55,70	4,67	5,90	72 – 74
	237,21	55,45	5,23	5,85	61
XIXb	C ₁₂ H ₁₃ NO ₅	57,37	5,22	5,58	95 – 97
	251,24	58,24	5,61	5,29	55
XIXc	C ₁₈ H ₁₇ NO ₆	62,97	4,99	4,08	173 – 175
	343,33	63,22	5,08	4,63	67
XXa	C ₉ H ₁₁ N ₅ O ₃	45,57	4,67	29,52	194 – 196
	237,22	45,98	4,66	28,84	70
XXb	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	47,82	5,22	27,87	188 – 190
	251,24	47,59	5,19	28,04	70
XXc	C ₁₆ H ₁₇ N ₅ O ₄	55,97	4,99	20,40	263 – 266
	343,34	56,28	4,94	19,97	65
XXI	C ₁₀ H ₉ N ₃ O ₃	54,79	4,14	19,17	221 - 224
	219,20	54,38	4,17	19,65	87
XXIIa	C ₁₁ H ₉ N ₃ O ₄	53,44	3,67	17,00	278 – 280
	247,21	52,98	3,71	17,32	86
XXIIb	C ₁₈ H ₁₅ N ₃ O ₅	61,19	4,28	11,89	286 – 288
	353,33	60,94	4,16	11,26	85

7. VÝSLEDKY A DISKUSIA

Problematika dizertačnej práce „*Nové deriváty furo[3,2-b]pyrolu: Syntéza, štúdium vlastností a biologickej aktivity*“ bola riešená v rámci dvoch projektov VEGA 1/0534/16 pod názvom *Nové zlúčeniny s aplikačným potenciálom*, VEGA 1/0233/12 pod názvom *Reaktivita a vlastnosti aromatických zlúčenín, vzťahy, štruktúra -vlastnosti - aktivita v komplexných systémoch* a FPPV 04-2014 pod názvom *Štúdium vlastností a biologickej aktivity zlúčenín s furopyrolovým skeletom*.

Výsledky dizertačnej práce sú súčasťou nasledujúcich publikácií:

Prvý článok „*Synthesis of furo[2',3':4,5]pyrrolo[1,2-d][1,2,4]triazine derivatives and their antibacterial activity*” bol publikovaný v karentovanom časopise *Arkivoc* – Príloha A.

Druhý článok “ *Synthesis and antibacterial activity of furo[3,2-b]pyrrole derivatives*” bol poslaný do karentovaného časopisu *Arkivoc* – Príloha B

Tretí článok „*NMR spectroscopic properties of furo[2',3':4,5]pyrrolo[1,2-d][1,2,4]triazine derivatives*” bol akceptovaný v skopusovanom časopise *Nova Biotechnologica et Chimica* – Príloha C.

Štvrtý článok, týkajúci sa problematiky furo[3,2-b]pyrolových derivátov bol publikovaný v domácom časopise *Nova Biotechnologica et Chimica* v roku 2013 – Príloha D.

V rámci PhD. štúdia som sa podieľala aj na riešení problematiky syntézy chroménových derivátov, ktorá je taktiež súčasťou projektu VEGA 1/0534/16. Výsledky výskumu v tejto oblasti boli publikované v skopusovanom časopise *Nova Biotechnologica et Chimica* pod názvom „*Synthesis of 4-oxo-4H-chromene derivative with fused benzodiazepine ring*“.

Výsledky tejto práce boli prezentované v roku 2015 a 2013 na 4. a 5. medzinárodnej konferencii “Aplikované prírodné vedy“ v Nízkych a Vysokých Tatrách.

7.1 Syntetická časť

Prvým cieľom predkladanej dizertačnej práce bola syntéza východiskových metyl furo[3,2-b]pyrol-5-karboxylátov **Ia-c**. Použili sme postup, popísaný v [14], spočívajúci v kondenzácii substituovaného furán-2-karbaldehydu s esterom kyseliny azidooctovej za vzniku zodpovedajúceho azidoakrylátu, ktorý následne cyklizoval na príslušné furo[3,2-b]pyrol-5-karboxyláty v dobrých výťažkoch (Schéma 1). V prípade syntézy 2-

tritylfuro[3,2-*b*]pyrol-5-karboxylátu **V** sme vychádzali z pripraveného metyl furo[3,2-*b*]pyrol-5-karboxylátu **Ia**, ktorý reagoval s tritylchloridom v prostredí hydridu sodného a dimetylformamidu (Schéma 26). Uvedený postup bol popísaný v literatúre [86] pre [2,3-*b*] izomér.

Z reakcií východiskových metyl furo[3,2-*b*]pyrol-5-karboxylátov **I** na esterovej skupine sme uskutočnili prípravu substituovaných furo[3,2-*b*]pyrol-5-karboxylových kyselín **XIVa-c** v 65-80% výťažkoch bázičkou hydrolyzou esterov **I** a syntézu furo[3,2-*b*]pyrol-5-karbaldehydov **XVa,b** v 55-58% výťažkoch *one pot* dekarboxyláciou kyselín **XIVa,b** a následnou formyláciou *in situ* vzniknutého furo[3,2-*b*]pyrolu s trietyl ortoformiátom s cieľom skúmania biologickej aktivity oboch typov zlúčenín.

Posledným krokom v syntetickej časti práce bola syntéza 5-5-6 kondenzovaných systémov (Schémy 27 a 28). Do tejto kategórie patria furo[2',3':4,5]pyrolo[1,2-*d*][1,2,4]triazínové deriváty **VIII** - **XIII** a 7-amino-2-metylfuro[2',3':4,5]pyrolo[1,2-*a*]pyrazin-6,8(5*H*,7*H*)-diónové deriváty **XXI** a **XXII**. Konštrukcia 1,2,4-triazínového kruhu cyklokondenzáciou furo[3,2-*b*]pyrol-5-karbohydrazidov s ortoestermi je popísaná v literatúre [30], preto sme sa pokúsili uskutočniť aj novú metódu prípravy **VIII** (Schéma 27 - metóda b), spočívajúcu v príprave *N*-acetylderivátu **VI**, jeho následnej tionácii a cyklizácii tiónu **VII** s hydrazínom. Hoci sme požadovaný derivát **VIIIc** pripravili v 65% výťažku, uvedená metóda je kvôli dlhému reakčnému času (168h) nevýhodná. Syntetizované deriváty boli testované na antibakteriálnu aktivitu **VIIIa,c** - **XIII**.

V literatúre nájdeme popísané reakcie zlúčenín obsahujúcich na susedných polohách esterovej skupine COOR a CH₂COOR skupiny s hydrazínom za vzniku rôznych produktov. Monge a kol. [87] pripravili zahrievaním metyl 2-(2-metoxi-2-oxoetyl)-1*H*-indol-3-karboxylátu so 40%-ným hydrazínom v etanole počas 36 h 2,3,5,6-tetrahydro[1,2]diazepino[5,4-*b*]indol-1,4-dión. Na druhej strane Voievudskyi a kol. [88] pripravili reakciou 2-amino-1,3-dioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrol[1,2-*a*]pyrazín z 1-(2-metoxi-2-oxoethyl)pyrol-2-karboxylátu a 95% -ného hydrazínu v etanole počas 1h. Nám sa aplikovaním rovnakých podmienok na deriváty **XIXa-c** nepodarilo ani v jednom prípade pripraviť analogické produkty, vznikli výhradne bis-hydrazidy **XXa-c** (Schéma 30). Keďže bis-hydrazidy **XX** môžu cyklizovať v kyslom prostredí [89] uskutočnili sme cyklizáciu **XX** v kyseline octovej. Použitím klasického ohrevu sme aj po 3 dňoch refluxu detegovali pomocou TLC (hexán-etylacetát 30:70) prítomnosť východiskovej látky **XX**, preto sme uskutočnili reakciu účinkom mikrovlnného žiarenia. Ožarovaním zlúčeniny **XXb** pri 90W 12 min., vznikol pyrazín **XXI** v 87 % výťažku, zatiaľ čo predĺžením

ožarovania na 35 min. a výkone 180W vznikli acetamidy **XXII** v 85 - 86% výťažkoch (Schéma 31).

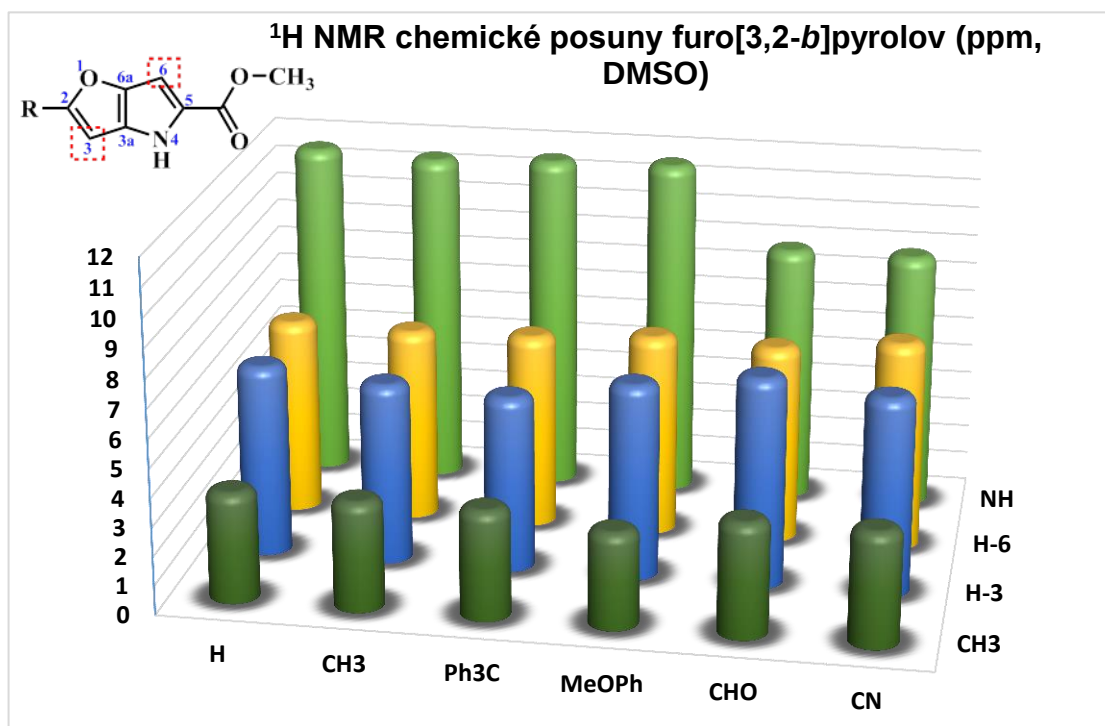
7.2. Spektrálna časť

Štruktúru všetkých pripravených zlúčenín sme identifikovali dostupnými analytickými technikami a to ^1H a ^{13}C NMR, IČ, MS a prvkovou analýzou. Prvková analýza, sumárny vzorec, teploty topenia a výťažky sú uvedené v tabuľkách 1-6. ^1H a ^{13}C NMR spektrá sú súčasťou experimentálnej časti a priložených článkov.

Cieľom práce bola aj analýza vplyvu substituenta na chemické posuny v ^1H a ^{13}C NMR spektrách (Obr. 30 a 31). U 2-substituovaných furo[3,2-*b*]pyrol-5-karboxylátov **I** sa skúmal vplyv substituenta na C-2 na chemické posuny protónov na C-3, N-4 a C-6, pričom v polohe C-2 boli elektrónodonorné (CH_3 , Ph_3C , 4- $\text{CH}_3\text{OC}_6\text{H}_4$) aj elektrónakceptorné (CHO, CN) skupiny. Z grafického zobrazenia na Obr. 30 vidno, že 2-metoxyfenylový derivát mal najvyššie hodnoty chemických posunov všetkých protónov furo[3,2-*b*]pyrolového skeletu. Vplyv formylovej a nitrilovej skupiny sa najviac prejavil u chemických posunov protónov N-4 k nižším hodnotám ppm (8.9 a 9.1ppm) v porovnaní s nesubstituovaným derivátom. U elektrónodonorných skupín v polohe C-2 sa výraznejší vplyv substituenta v porovnaní s nesubstituovaným derivátom neprejavil (Tabuľka 7).

Rovnaké správanie môžeme sledovať pri posunoch protónov v polohách H-3, kde Me a Ph_3C skupina majú posuny protónov H-3 pri 6.24 a 6.06 ppm, zatiaľ čo CHO a CN skupina majú posuny protónov v polohách H-3 pri 6.83 ppm a 7.24 ppm. V polohe H-6 pozorujeme posuny Me a Ph_3C skupiny pri 6.67 a 6.74 ppm a CHO a CN skupiny pri 6.23 a 7.23 ppm. Výrazné rozdiely sú predovšetkým v posunoch protónov NH skupín. Je zaujímavé, že u zlúčenín s elektrónakceptornými skupinami v polohe 2 (CHO a CN) sa signály protónov NH skupín nachádzajú pri nižších hodnotách ppm. Avšak uvedené výsledky sú v zhode s výsledkami dosiahnutými v práci publikovanej Silverbergom a kol. [90] a Krutošíkovou [14].

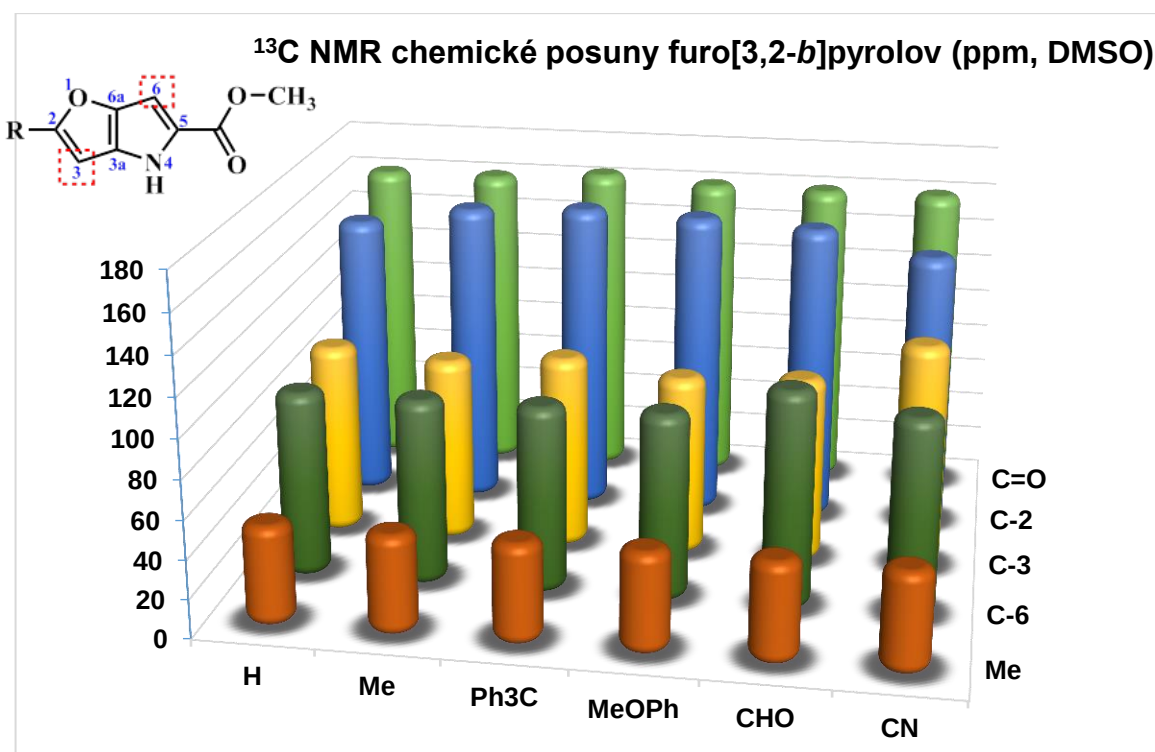
V prípade analýzy ^{13}C NMR nepozorujeme výrazne zmeny v chemických posunoch uhlíkov (Obr. 31). Menšie zmeny v posunoch uhlíkov môžeme pozorovať v polohách C-6, kde vplyvom formylovej skupiny má chemický posun uhlíka v polohe C-6 hodnotu 95.88 ppm a u nitrilového derivátu hodnotu 102.14 ppm, čím sa odlišujú od ostatných derivátov, kde sa posuny uhlíkov C-6 pohybujúv rozmedzi 93.65 ppm – 96.24 ppm. Posuny uhlíkov analyzovaných furo[3,2-*b*]pyrol-5-karboxylátov sú uvedené v tabuľke 8.



Obr. 30 Grafické vyjadrenie analýzy chemických posunov v ^1H NMR furo[3,2-*b*]pyrol-5-karboxylátov

Tab. 7 Chemické posuny v ^1H NMR spektrách furo[3,2-*b*]pyrol-5-karboxylátov

	H-3	H-6	NH	CH ₃	Iné signály, $J_{H,H}$
H	6,61 dd	6,76 s	11,68 s	3,79 s	7,79 (d, H-2); J_{H-2} 2,4 Hz; J_{H-3} 1,2 Hz
CH₃	6,24 m	6,67 dd	11,51 s	3,76 s	2,36 (d, CH ₃); J_{CH-3} 0,6 Hz; J_{H-3} 0,9 Hz; J_{H-6} 1,2 Hz
Ph₃C	6,06 d	6,74 s	11,66 s	3,76 s	7,36-7,21 (m, Ph); 7,07 (dd, Ph); J_{Ph} 1,8 Hz; J_{H-3} 0,6 Hz
MeOPh	6,75 s	6,97 d	11,71 s	3,31 s	7,73 (d, Ph); 6,99 (d, Ph); 3,77 (d, OCH ₃); J_{Ph} 4,2 Hz; J_{Ph} 4,5 Hz; J_{H-6} 2,7 Hz; J_{OCH_3} 2,4 Hz
CHO	7,24 d	6,83 d	8,92 s	3,94 s	9,67 (s, CHO); J_{H-3} 0,9 Hz; J_{H-6} 1,5 Hz
CN	6,83 d	7,23 d	8,91 s	3,93 s	



Obr. 31 Grafické vyjadrenie analýzy chemických posunov v ^{13}C NMR furo[3,2-*b*]pyrol-5-karboxylátov

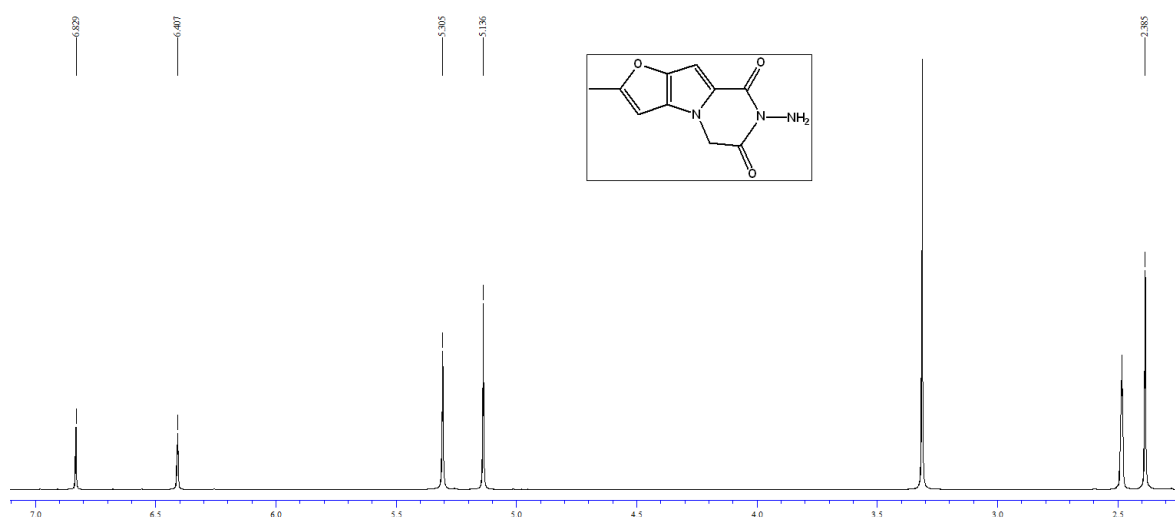
Tab. 8 Chemické posuny v ^{13}C NMR spektrách furo[3,2-*b*]pyrol-5-karboxylátov

	C-2	C-3	C-5	C-6	C=O	OCH ₃	Iné signály
H	149,37	99,47	123,21	95,98	161,65	51,19	129,35 (C-3a); 146,96 (C-6a)
CH₃	158,95	95,87	121,41	95,76	161,69	50,98	14,63 (CH ₃); 130,55 (C-3a); 145,91 (C-6a)
Ph₃C	161,57	100,53	126,87	96,24	165,24	51,19	61,49 (C-kvart.); 129,16 (C-3a); 146,93 (C-6a); 144,11 (Ph); 129,68 (Ph); 128,85 (Ph); 128,15 (Ph); 127,89 (Ph)
MeOPh	159,62	96,44	114,84	93,65	161,93	51,59	55,66 (CH ₃); 131,60 (C-3a); 146,84 (C-6a); 125,74 (Ph); 123,98 (Ph); 123,12 (Ph)
CHO	156,55	111,43	128,79	95,88	161,19	52,08	178,87 (CHO); 129,78 (C-3a); 150,85 (C-6a)
CN	144,76	117,2	125,3	102,14	161,37	51,45	149,5 (C-6a); 130,8 (C-3a); 96,9 (CN)

Podobnú štúdiu sme uskutočnili aj u triazínových derivátov **VIII**, **X**, **XI** a **XII**. Zistili sme v ^1H NMR spektrách nevýrazný vplyv chlórmetylovej skupiny v polohe C-5 na

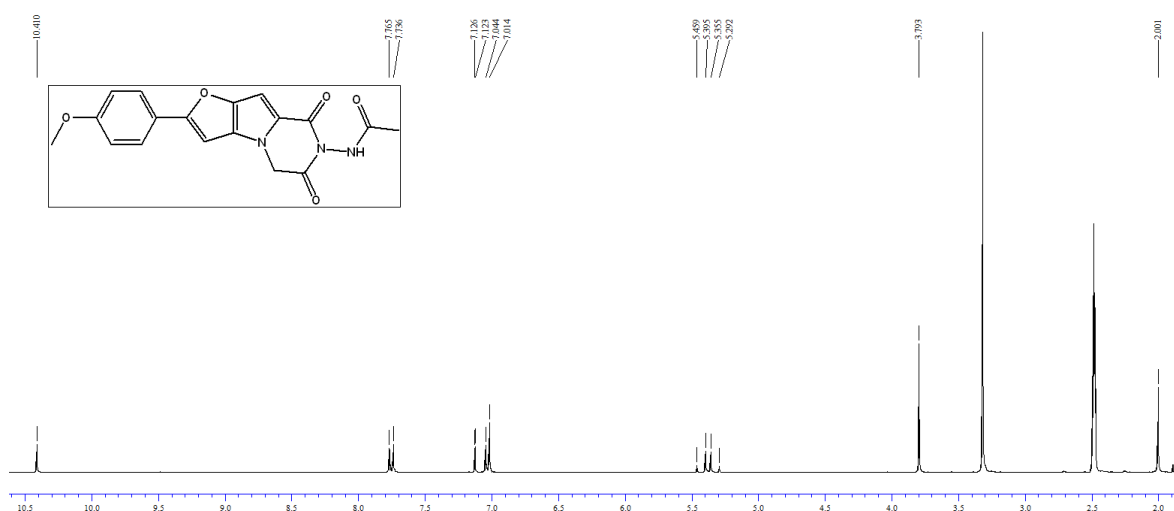
chemický posun H-7 protónu. Substitúciou N-7 derivátov **X** či už elektrónodonornými, alebo elektrónakceptornými skupinami nedochádza k signifikantnej zmene hodnôt chemických posunov protónov H-2, H-3, H-5 alebo H-9. Tiónová skupina na C-8 derivátov **XI**, **XII** spôsobila posun signálov protónov H-5 k nižšiemu poľu (9.16-10.98 ppm) v porovnaní s analogickými oxoderivátmi **VIII** a **X** (8.75-8.83 ppm). Prítomnosť tiónovej skupiny sa prejavila aj v ^{13}C NMR spektrách, keď došlo k chemickému posunu C-8 derivátov **XI**, **XII** (162-173 ppm) v porovnaní s chemickými posunmi C-8 oxoderivátov (153-155 ppm). Štúdia je súčasťou publikácie priloženej k práci – Príloha C.

Za významnú zmienku stojí štúdia ^1H NMR spektier derivátov **XXI** a **XXII**. Zatiaľ čo v ^1H NMR spektre derivátu **XXI** nie je v oblasti okolo 10 ppm žiaden signál NH skupiny a pri 5.31 ppm sa nachádza singlet NH_2 skupiny (Obr. 32)



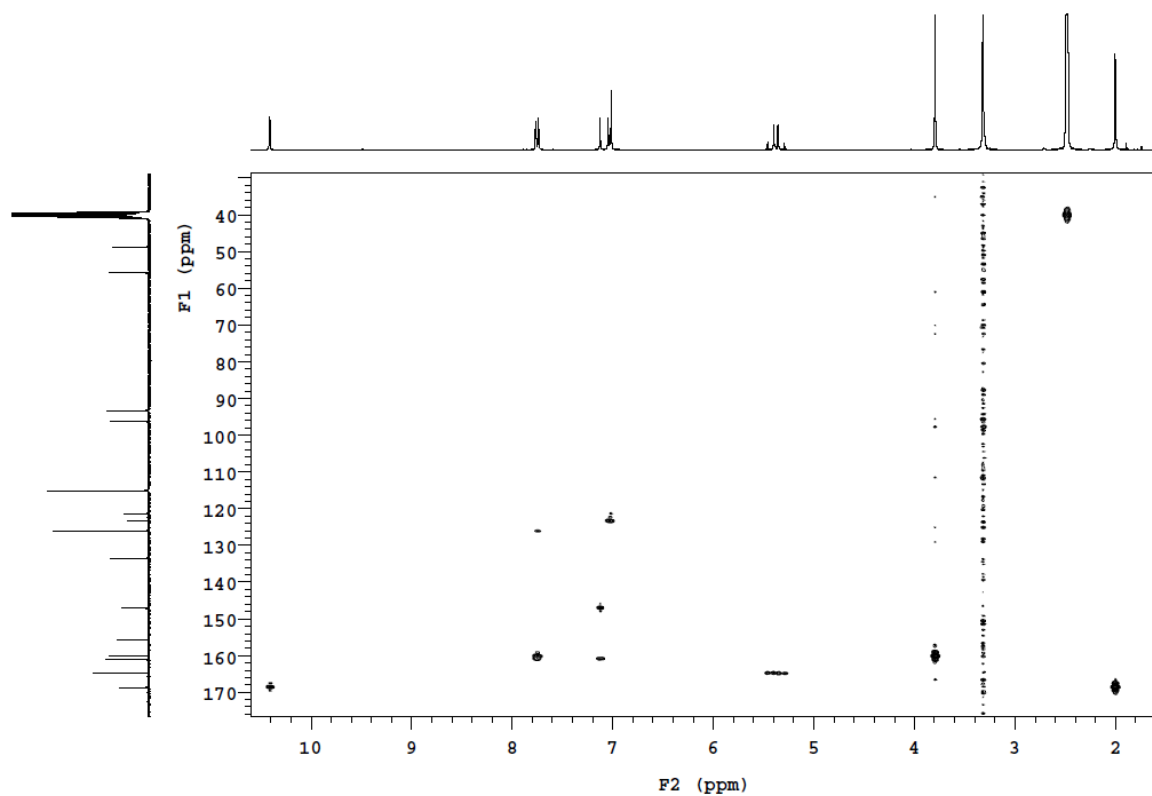
Obr. 32 ^1H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) zlúčeniny **XXI**

U derivátov **XXII** sme pozorovali singlet NH skupiny pri 10.41 ppm a neočakávaný chemický posun (5.43 a 5.32 ppm) and štiepenie ($J = 19.1$ Hz) protónov C-5 metylénovej skupiny (Obr. 33).

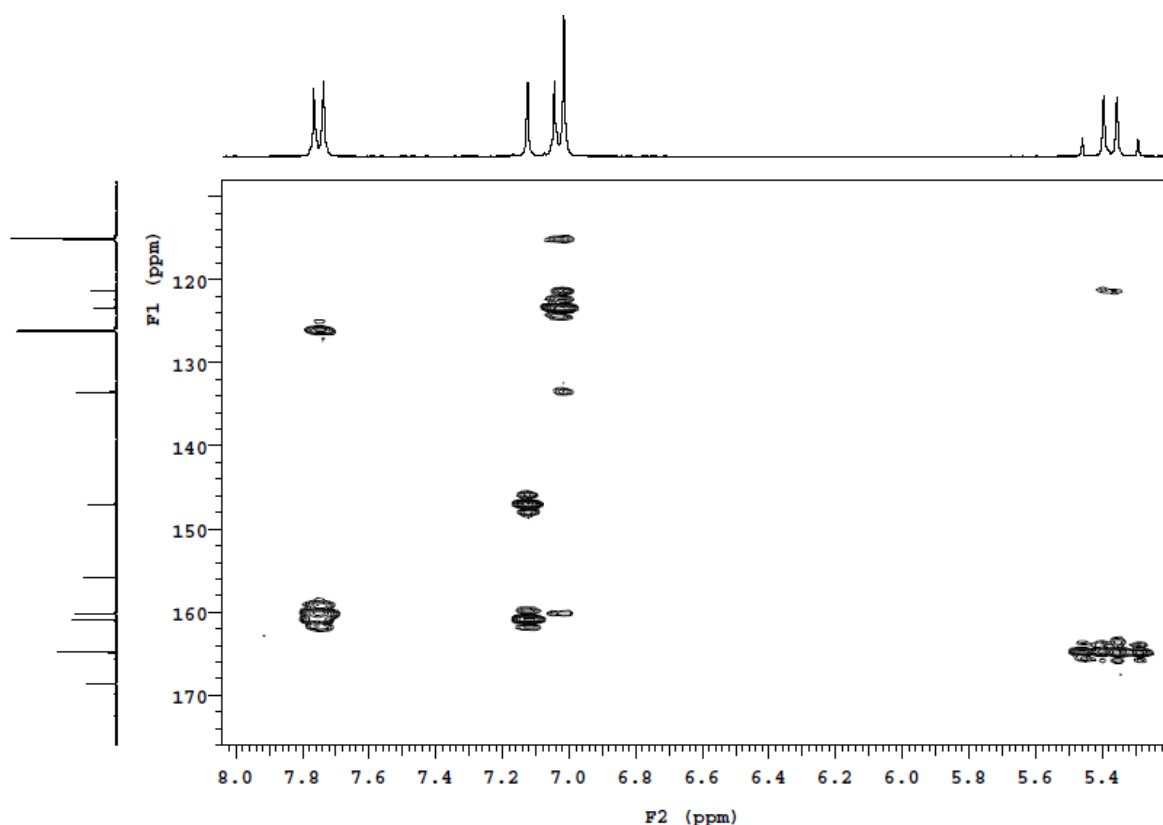


Obr. 33 ^1H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) zlúčeniny XXIb

U zlúčeniny XXIb boli preto merané aj HMBC a HSQC spektrá (Obr. 34 a 35).



Obr. 34 HMBC spektrum (DMSO-d_6) zlúčeniny XXIb

Obr. 35 HMBC spektrum (DMSO- d_6) zlúčeniny **XXIIb**

Tieto spektrálne štúdie vedú k záveru, že štiepenie C-5 protónov **XII** je dôsledkom toho, že naviazaním acetylovej skupiny na aminoskupinu sa C-5 protóny stali diastereotopickými. To znamená, že zlúčeniny **XXII** sú chirálne. Ich chiralita je dôsledkom prítomnosti centrálnej stereogénnej jednotky (s čiastočnou delokalizáciou voľného elektrónového páru karbonylovej skupiny), čiže exocyklického dusíka amidickej skupiny. Alebo sa pravdepodobnejšie jedná o axiálnu chiralitu medzi amidickou skupinou a dihydropyrazíndiónovým zvyškom, spôsobenú silnou delokalizáciou voľného elektrónového páru a elektrostatickým odpudzovaním medzi atómami kyslíka, ktoré zabraňuje voľnej rotácii amidickej skupiny (Schéma 32).

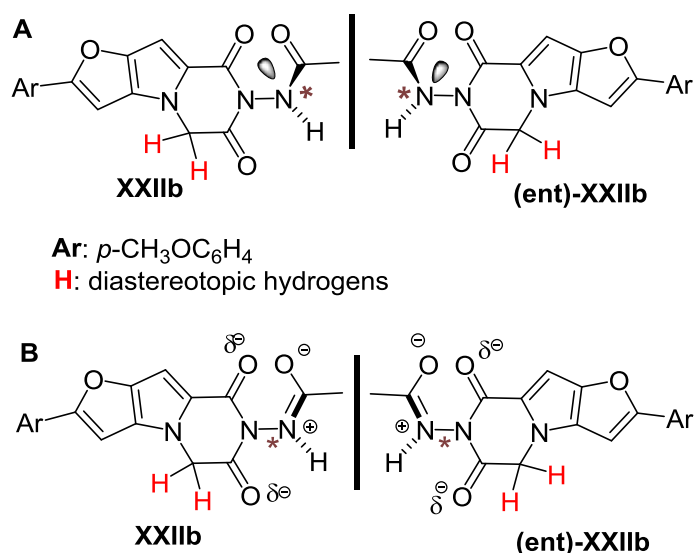


Schéma 32 Dva enantioméry **XXIIb** ako zrkadlové obrazy. Hviezdička označuje centrálnu (**A**) alebo axiálnu (**B**) stereogénnu jednotku

Metyl furo[3,2-*b*]pyrol-5-karboxyláty **I** majú charakteristické valenčné vibrácie $\nu(\text{C}=\text{O})$ skupiny v rozmedzi $1660\text{--}1678\text{ cm}^{-1}$. Valenčné vibrácie $\nu(\text{NH})$ väzby sú v rozmedzi $3269\text{--}3298\text{ cm}^{-1}$. V infračervených spektrách metyl furo[3,2-*b*]pyrol-5-karboxylátov **I** sú prítomné asymetrické valenčné vibrácie $\nu(\text{CH}_3)$ v rozmedzi $2920\text{--}2952\text{ cm}^{-1}$ a symetrické valenčné vibrácie $\nu(\text{CH}_3)$ v oblasti $2846\text{--}2850\text{ cm}^{-1}$. V infračervených spektrách pozorujeme skeletálne vibrácie derivátov metyl furo[3,2-*b*]pyrol-5-karboxylátov **I** v oblasti pod 1595 cm^{-1} .

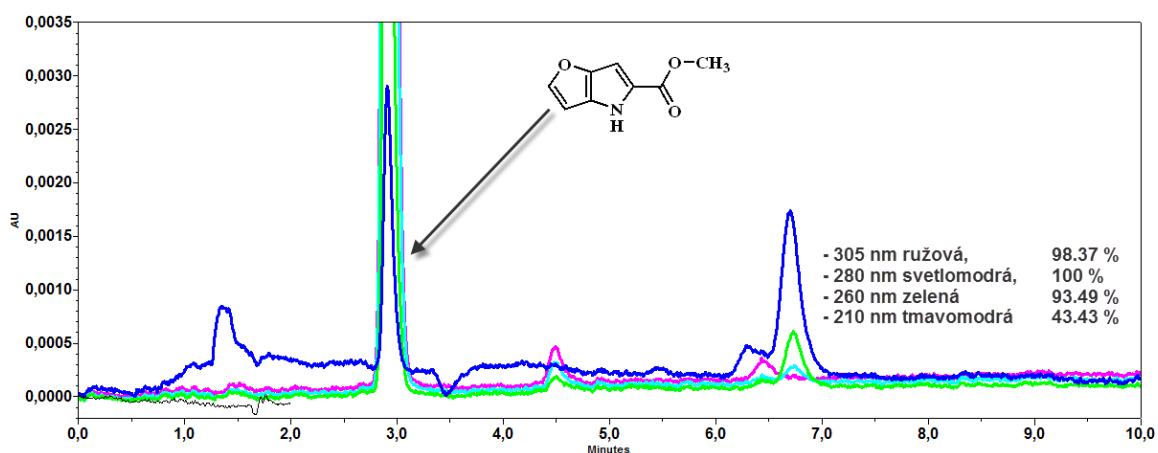
Deriváty furo[2',3',4:5]pyrol[1,2-*d*][1,2,4]triazinónu **Xa-e** majú charakteristické valenčné vibrácie $\nu(\text{C}=\text{O})$ väzby v oblasti $1643\text{--}1662\text{ cm}^{-1}$. Valenčné kruhové vibrácie $\nu(\text{C}=\text{C})$ väzby v oblasti $3144\text{--}3125\text{ cm}^{-1}$. Valenčná vibrácia $\nu(\text{NH})$ väzby je v oblasti $3462\text{--}3148\text{ cm}^{-1}$. Pod 1550 cm^{-1} v infračervených spektrách pozorujeme skeletálne vibrácie derivátov furo[2',3',4:5]pyrol[1,2-*d*][1,2,4]triazinónov **Xa-e**.

Pri derivátoch furo[2',3',4:5]pyrol[1,2-*d*][1,2,4]triazintiónov **XI** a **XIIa-b** pozorujeme valenčné vibrácie $\nu(\text{C}=\text{S})$ väzby v oblasti $1555\text{--}1550\text{ cm}^{-1}$. Valenčné kruhové vibrácie $\nu(\text{C}=\text{C})$ väzby sú v oblasti $3109\text{--}3022\text{ cm}^{-1}$. Skeletálne vibrácie v infračervených spektrách derivátov furo[2',3',4:5]pyrol[1,2-*d*][1,2,4]triazintiónov **XI** a **XIIa-b** pozorujeme v oblasti $1510\text{--}700\text{ cm}^{-1}$.

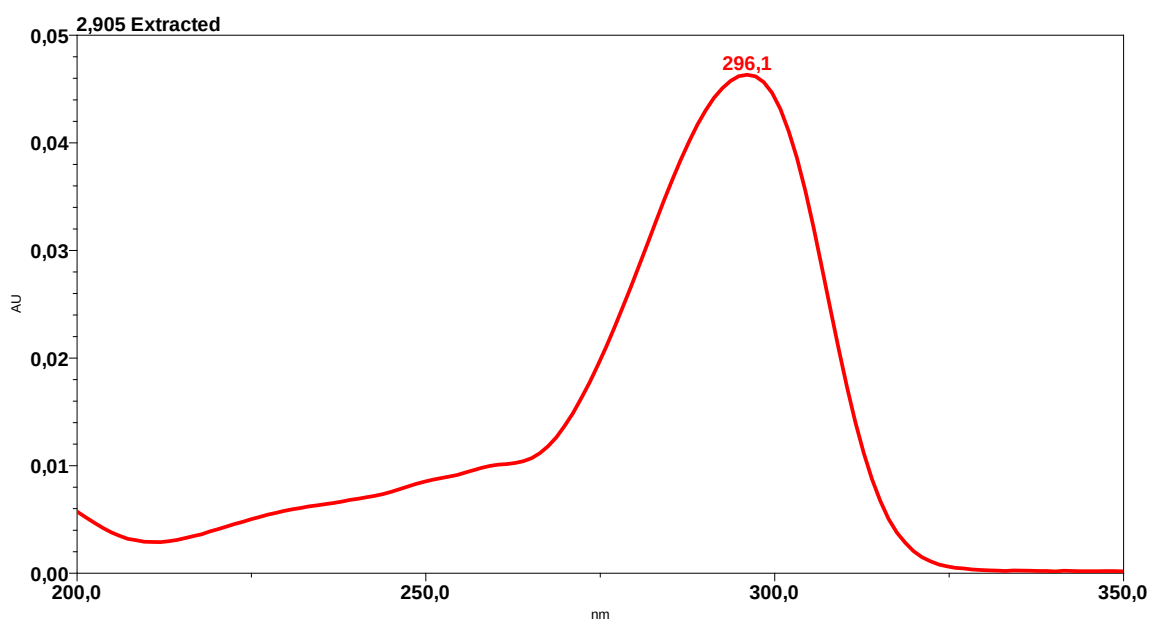
Charakteristické pásy funkčných skupín v IČ spektrách ostatných zlúčenín sú uvedené v experimentálnej časti a v priložených publikáciách - Prílohy A a B.

7.3 Analýza čistoty zlúčenín metódou HPLC

Čistotu východiskového metyl furo[3,2-*b*]pyrol-5-karboxylátu **I** sme zisťovali metódou HPLC. Stacionárnou fázou bola kolóna YMC Triart C18 s rozmermi 150 x 4,6 mm a veľkosťou častíc 5 µm. Mobilnou fázou bola zmes vody a acetonitrilu v pomere 40:60. Na Obr. 36 môžeme vidieť chromatogram metyl furo[3,2-*b*]pyrol-5-karboxylátu **I** spolu s prítomnými nečistotami pri vlnových dĺžkach 210, 260, 280 a 305 nm. Retenčný čas analytu bol 2,91 min a jeho UV spektrum je na Obr. 37. Absorpčné maximum metyl furo[3,2-*b*]pyrol-5-karboxylátu bolo pri 296,1 nm.



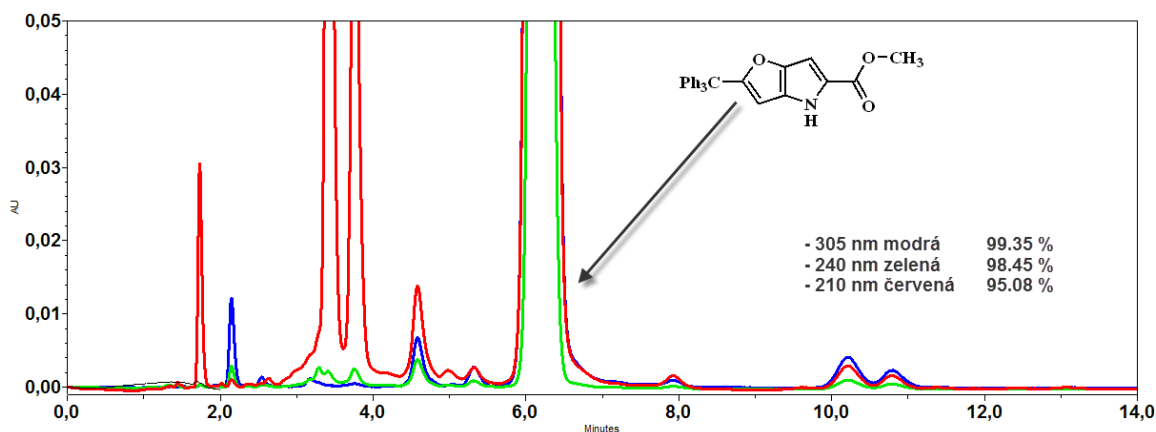
Obr. 36 Chromatogram metyl furo[3,2-*b*]pyrol-5-karboxylátu **I** pri rôznych vlnových dĺžkach



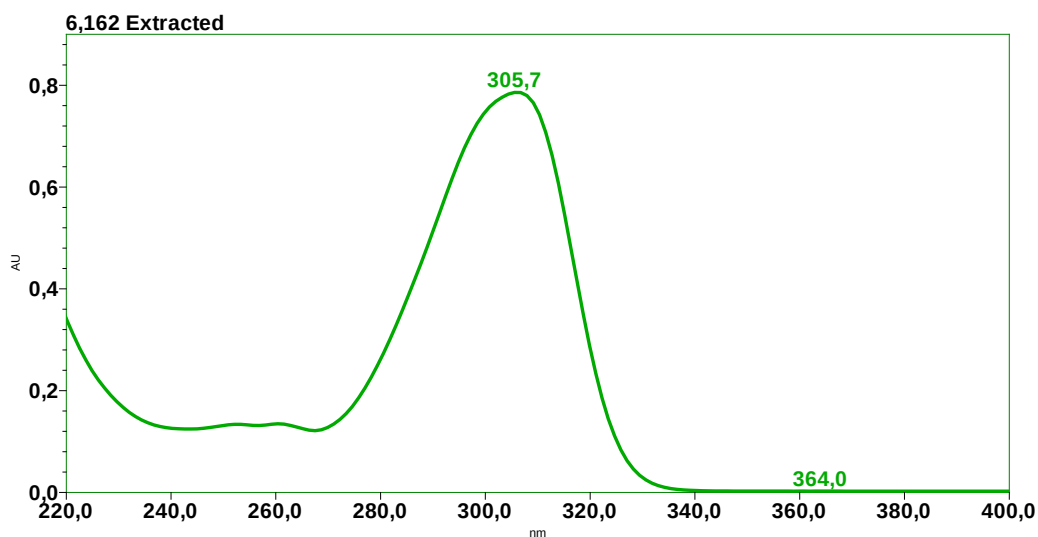
Obr. 37 UV spektrum metyl furo[3,2-*b*]pyrol-5-karboxylátu **I**

7. Výsledky a diskusia

Chromatogram novo-nasyntetizovanej látky metyl 2-tritylfuro[3,2-*b*]pyrol-5-karboxylátu **V** pri troch vlnových dĺžkach je uvedený na Obr. 38. Mobilnou fázou v tomto prípade bola zmes okyslenej vody s 0,1% roztokom kyseliny mravčej a acetonitrilu v pomere 20:80. Retenčný čas analytu bol 6,17 min. a jeho UV spektrum je na Obr. 39 s absorpčným maximom pri 305,7 nm.



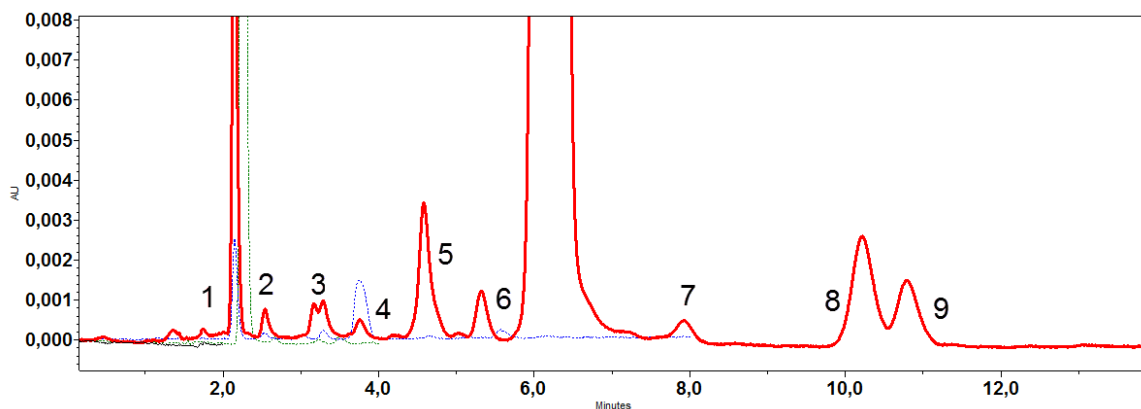
Obr. 38 Chromatogram metyl 2-tritylfuro[3,2-*b*]pyrol-5-karboxylátu **V** pri rôznych vlnových dĺžkach



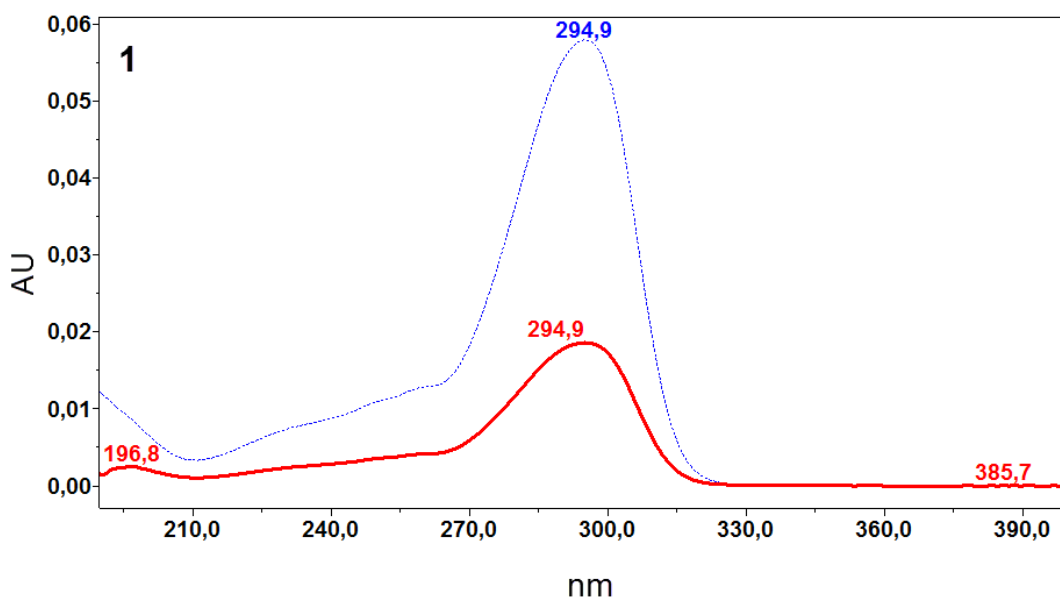
Obr. 39 UV spektrum metyl 2-tritylfuro[3,2-*b*]pyrol-5-karboxylátu **V**

Porovnaním retenčného času a UV spektra nečistoty s chromatogramom a UV spektrom východiskovej látky sme identifikovali, že nečistotou 1 je východisková látka metyl furo[3,2-*b*]pyrol-5-karboxylát (Obr. 40a). Nečistota 1 eluuje v čase 2,15 min. tak isto ako východisková látka metyl furo[3,2-*b*]pyrol-5-karboxylát. Ich UV spektrá sú tiež zhodné (Obr. 40b). Porovnaním retenčného času a UV spektra východiskového metyl 2-tritylfuro[3,2-*b*]pyrol-

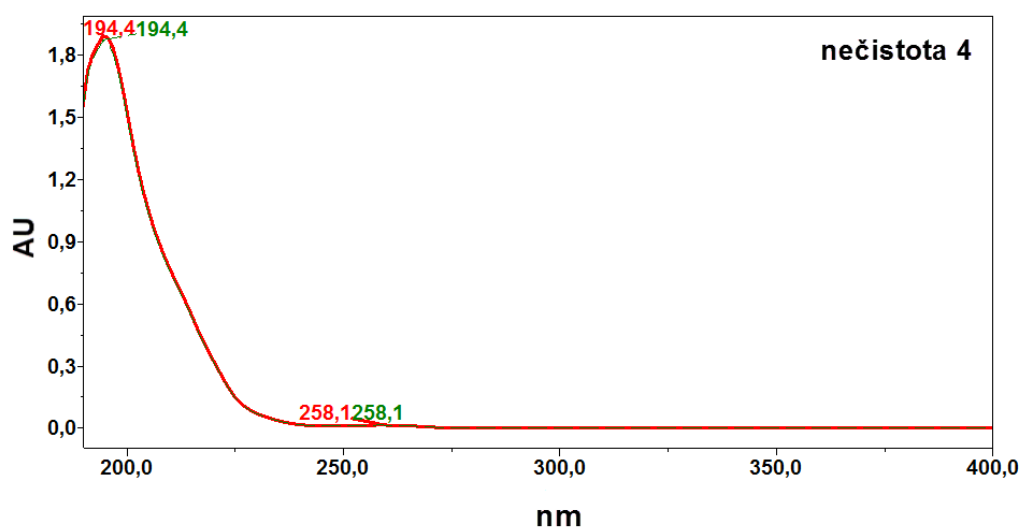
5-karboxylátu a tritylchloridu sme identifikovali, že nečistota 4 je pravdepodobne východiskový tritylchlorid (Obr. 41). Ostatné nečistoty sú neznáme predpokladáme, že to môžu byť medziprodukty reakcie alebo interferenty a ich UV spektrá sú uvedené na Obr. 42.



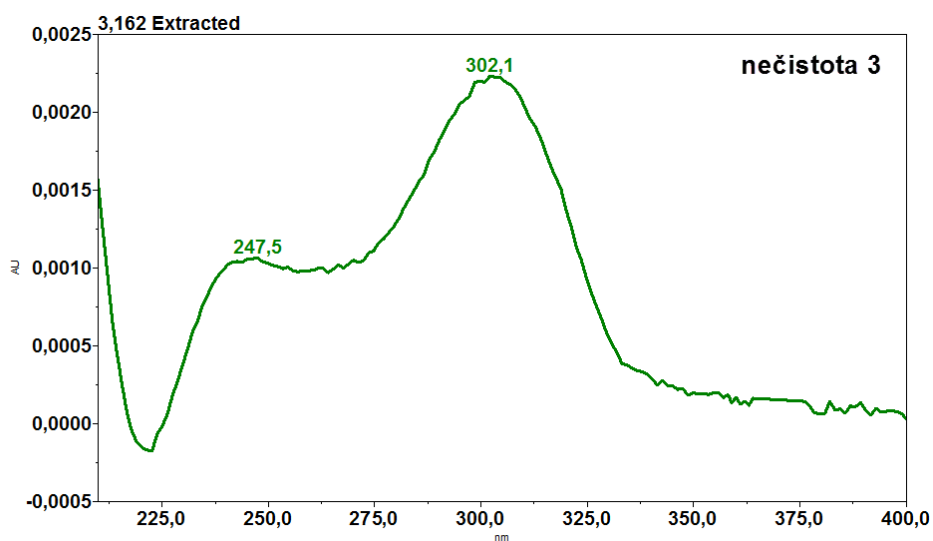
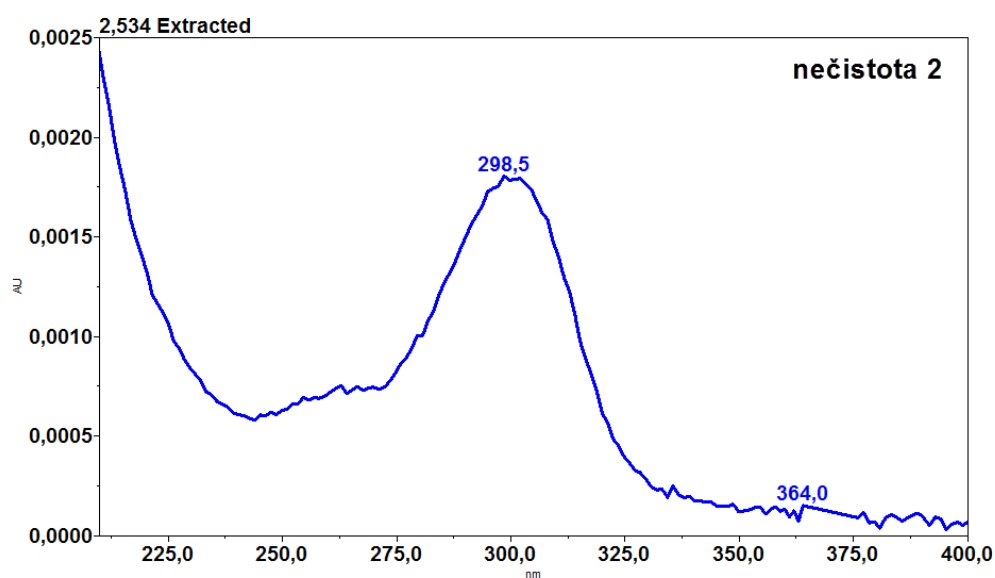
Obr. 40a Porovnanie nečistôt pri 305 nm - metyl furo[3,2-*b*]pyrol-5-karboxylát (zelený) a metyl 2-tritylfuro[3,2-*b*]pyrol-5-karboxylát (červený)

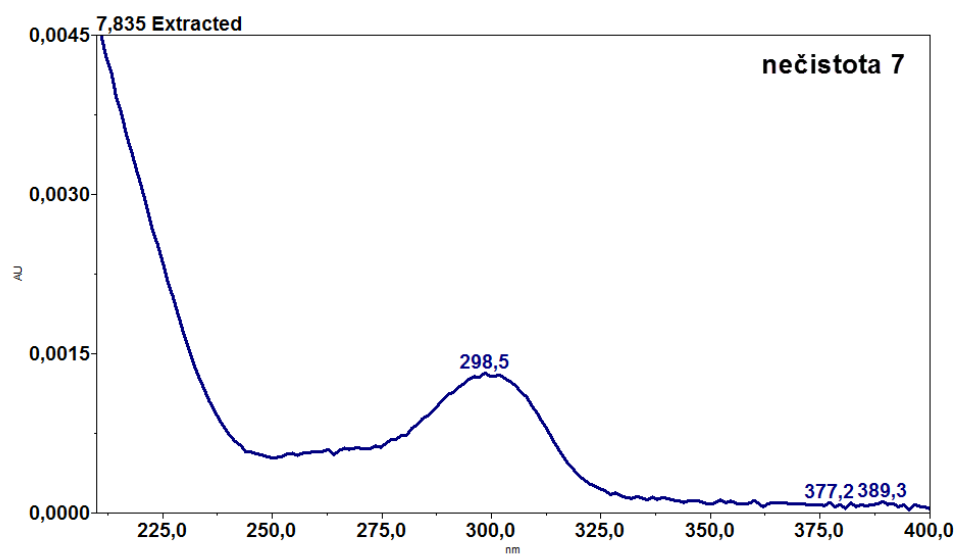
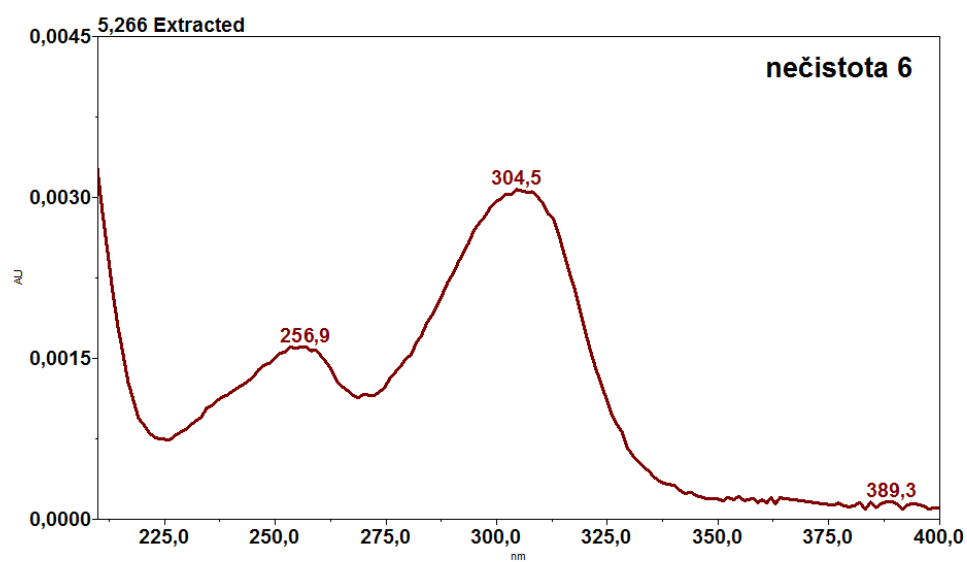
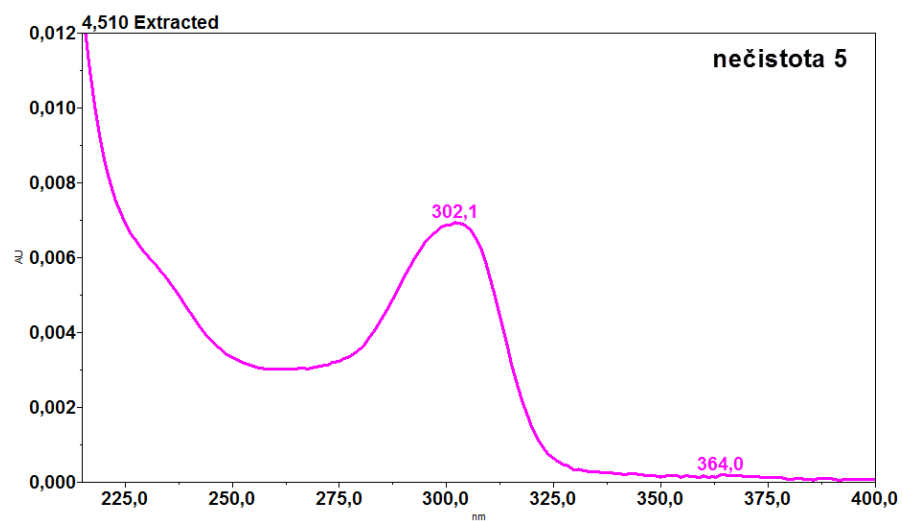


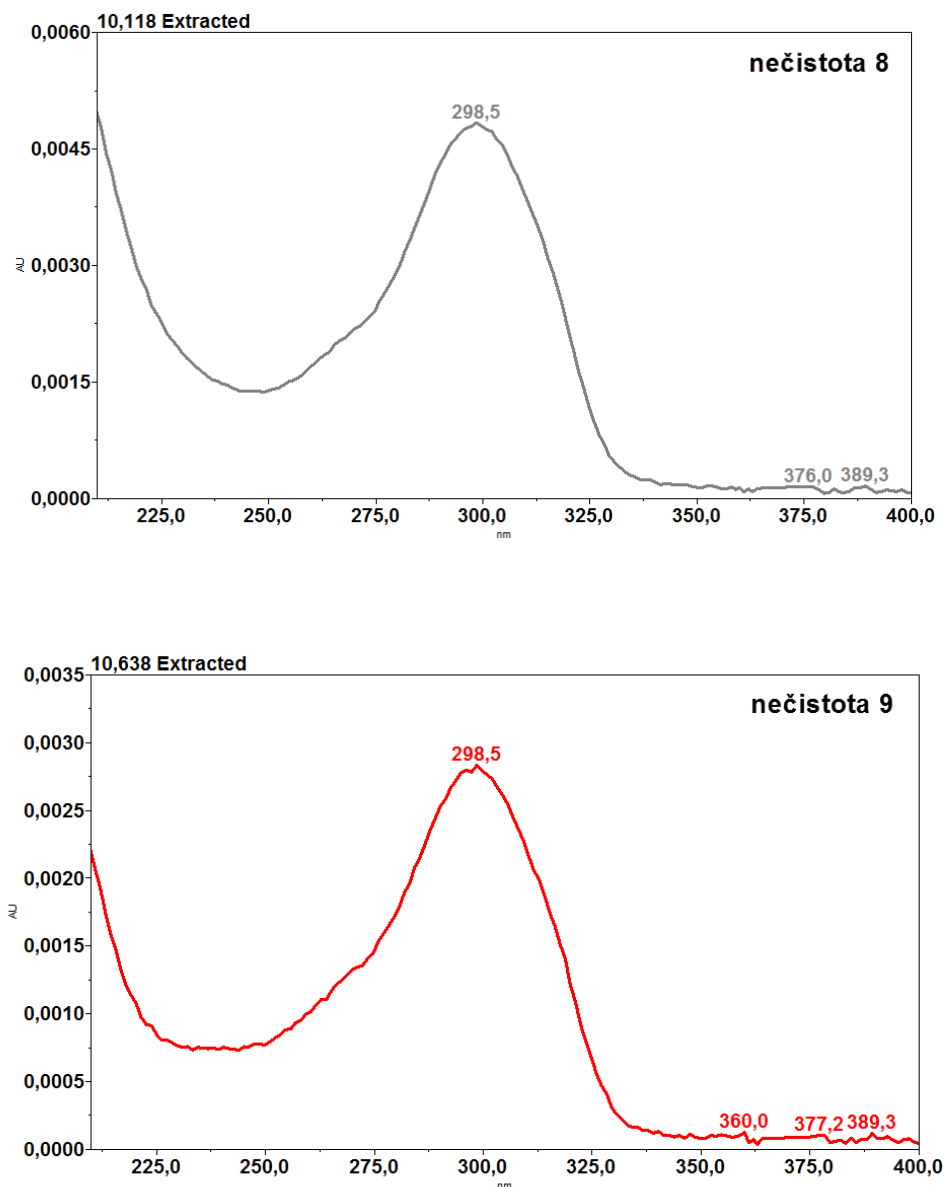
Obr. 40b UV spektrá - metyl furo[3,2-*b*]pyrol-5-karboxylát (červená) a nečistota 1 (modrá)



Obr. 41 Nečistota 4 – tritylchlorid a UV spektrá tritylchloridu (červená) a nečistota 4 (zelená)

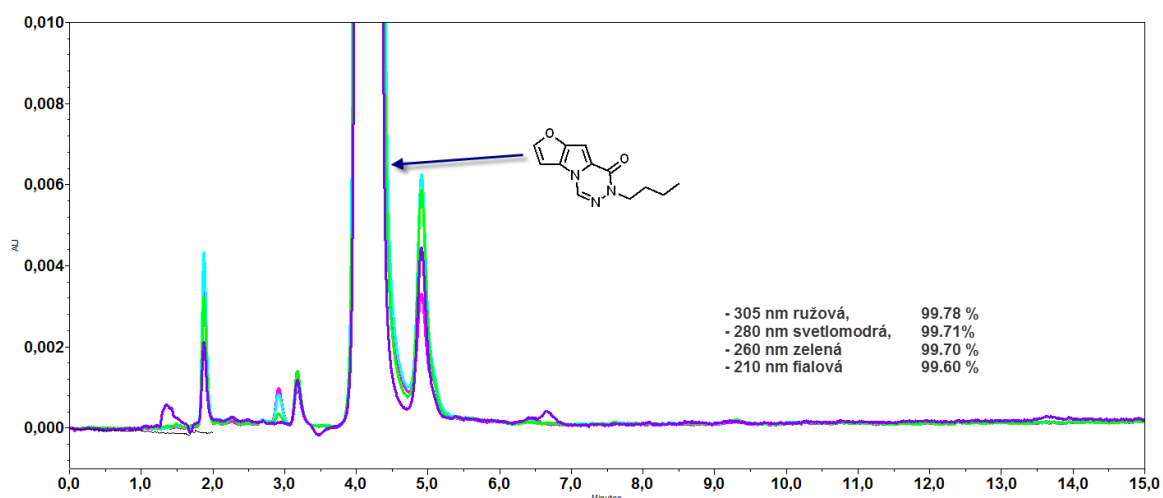




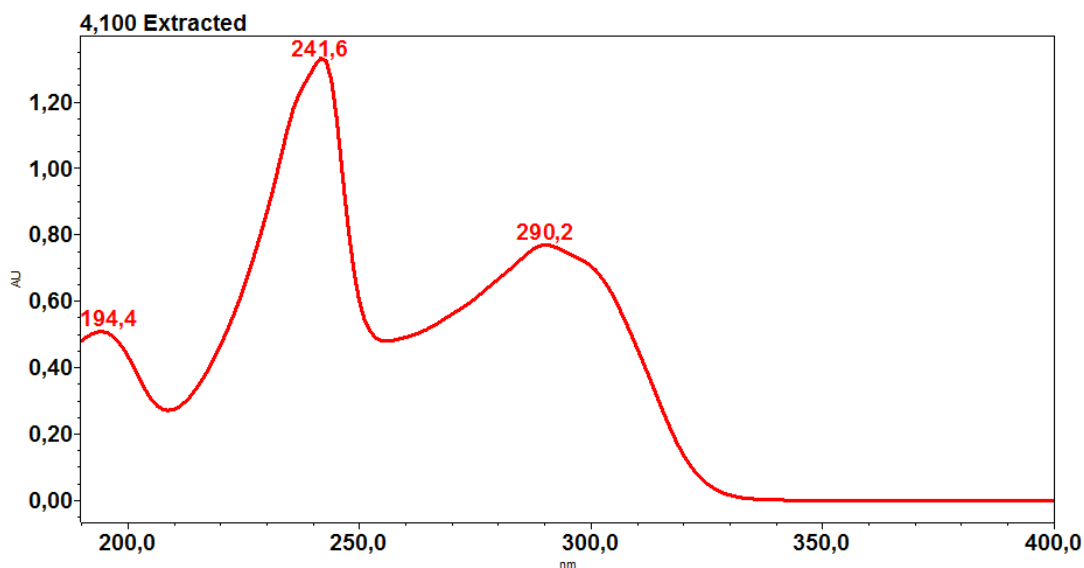


Obr. 42 UV spektrá nečistôt na chromatograme metyl 2-tritylfuro[3,2-*b*]pyrol-5-karboxylátu

Z novo pripravených 7-substituovaných furo[2',3',4:5]pyrol[1,2-*d*][1,2,4]triazínov **Xa-e** bola metódou HPLC analyzovaná čistota 7-butyľfuro[2',3',4:5]pyrol[1,2-*d*][1,2,4]triazín-8(7*H*)-ónu **Xb** (Obr. 43). Mobilnou fázou bola zmes vody a acetonitrilu v pomere 40:60. Retenčný čas analytu je 4,12 min. a jeho UV spektrum s absorpčné maximum pri 241,6 nm je zobrazené na Obr. 44.

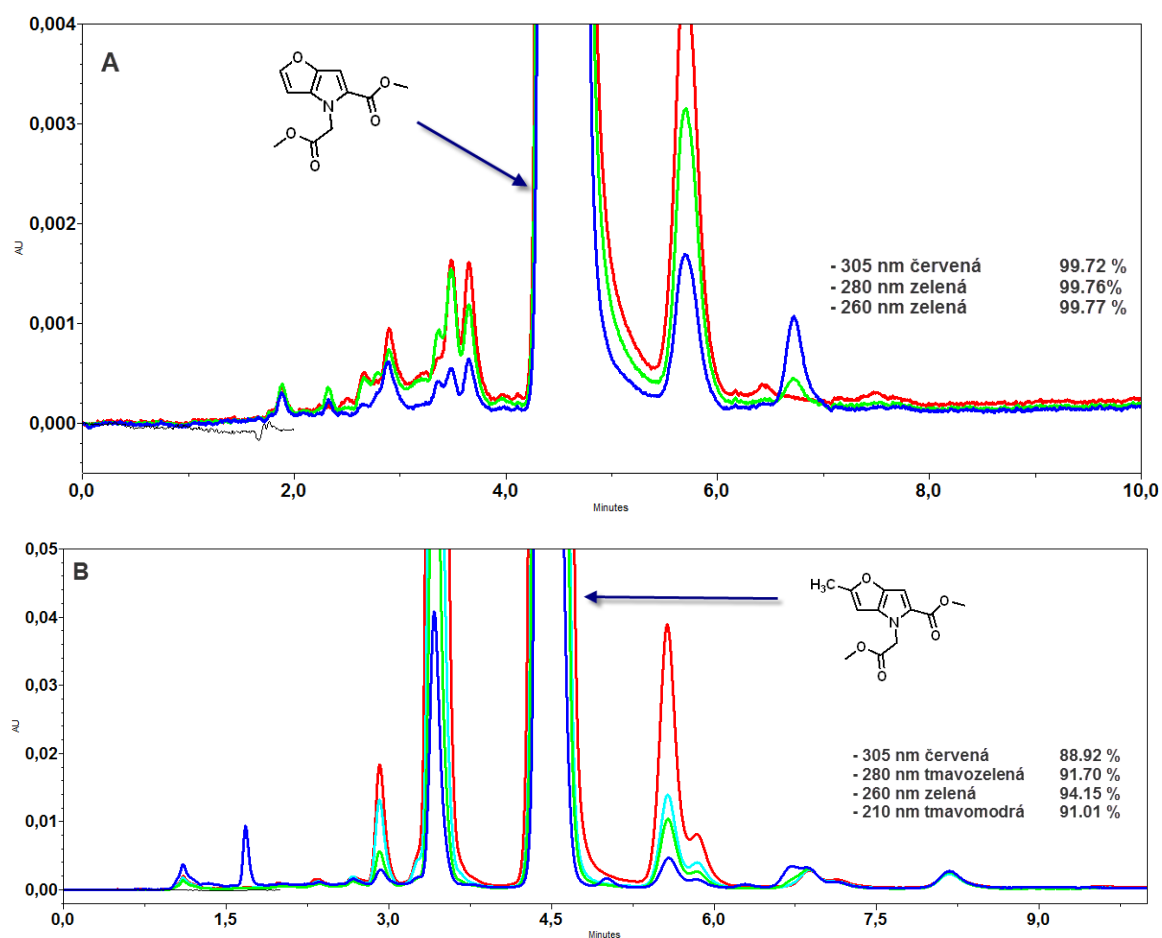


Obr. 43 Chromatogram 7-butylfuro[2',3',4:5]pyrrol[1,2-d][1,2,4]triazín-8(7H)-ónu **Xb** pri rôznych vlnových dĺžkach

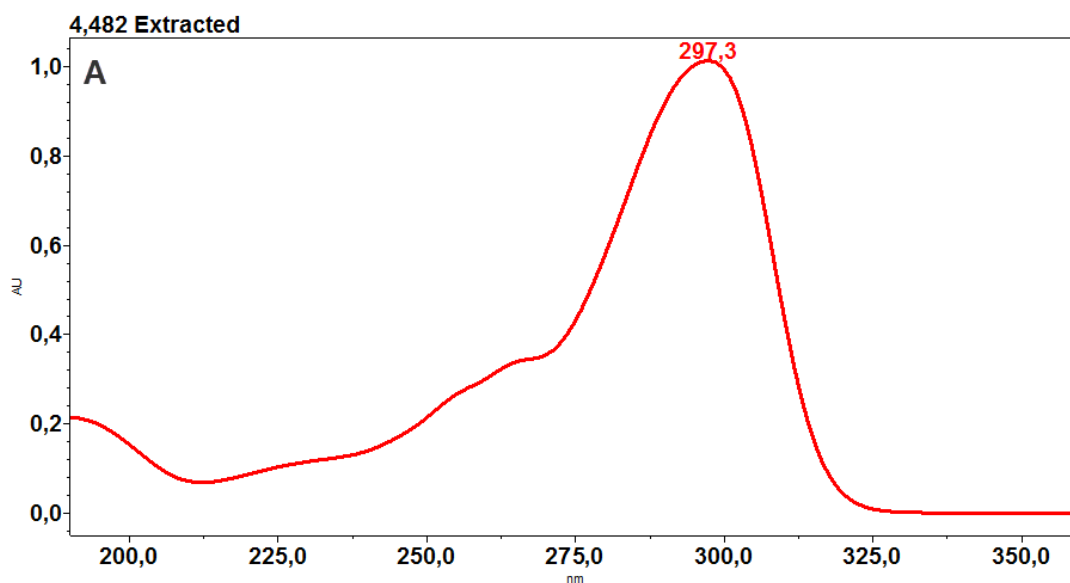


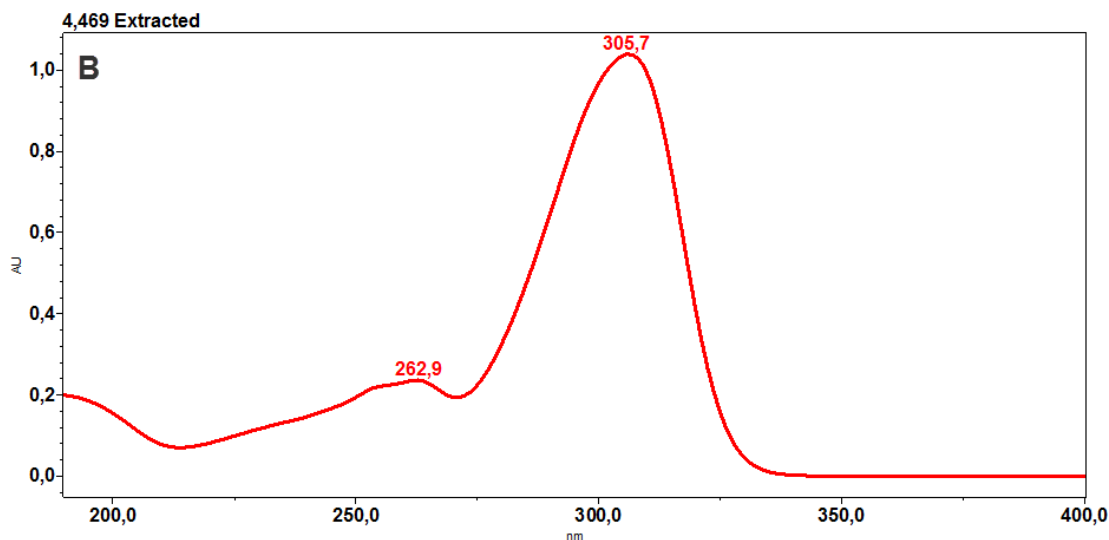
Obr. 44 UV spektrum 7-butylfuro[2',3',4:5]pyrrol[1,2-d][1,2,4]triazín-8(7H)-ónu **Xb**

Metódou HPLC sme analyzovali čistotu aj u novo pripravených metyl 4-(2-metoxi-2-oxoetyl)-4H-furo[3,2-b]pyrrol-5-karboxylátov **XIXa-b** (Obr. 45), kde mobilnou fázou bola zmes vody a acetonitrilu v pomere 40:60. Retenčný čas analytu A je 4,48 min. a analytu B je 4,44 min. Ich UV spektrá sú na Obr. 46 a absorpčné maximum analytu A je 297,3 nm a analytu B je 305,7 nm.



Obr. 45 Chromatogram metyl 4-(2-metoxi-2-oxoetyl)-4*H*-furo[3,2-*b*]pyrrol- 5-karboxylát **XIXa** (A) a metyl 4-(2-metoxi-2-oxoetyl)-2-metyl-4*H*-furo[3,2-*b*]pyrrol- 5-karboxylát **XIXb** (B) pri rôznych vlnových dĺžkach





Obr. 46 UV spektrá metyl 4-(2-metoxi-2-oxoetyl)-4*H*-furo[3,2-*b*]pyrol- 5-karboxylát **XIXa** (A) a metyl 4-(2-metoxi-2-oxoetyl)-2-metyl-4*H*-furo[3,2-*b*]pyrol- 5-karboxylát **XIXb** (B)

Čistota vybraných derivátov sa pohybovala v rozmedzí 99,7 – 94,5 %, pričom najnižšiu čistotu vykazoval 2-tritylfuro[3,2-*b*]pyrol-5-karboxylát **V**, preto sme sa snažili aj o podrobnejšie určenie nečistôt. Zistili sme, že medzi nečistotami boli obe východiskové látky, preto bude v budúcnosti potrebné u tohto derivátu zlepšiť purifikačné postupy. U ostatných derivátov bude, aj napriek dosiahnutej vysokej čistote, taktiež potrebné podrobnejšie skúmanie nečistôt a prípadne interferentov.

7.4 Stanovenie antibakteriálnej, antioxidačnej a inhibičnej aktivity

Významným cieľom práce je štúdium antibakteriálnej, antioxidačnej a inhibičnej aktivity syntetizovaných látok. V tomto smere sa uskutočnili dve štúdie.

V prvej štúdii (viď príloha A) boli zlúčeniny **VI**, **IX** a predovšetkým triazínové deriváty **VIIIa**, **VIIIc**, **Xa**, **Xb**, **Xc**, **Xd**, **XI**, **XIIa**, **XIIb** a **XIII** testované na antibakteriálnu aktivitu na Gram-negatívne kmene *Escherichia coli* CCM 7929, *Pseudomonas syringae* CCM 2114 a na Gram-pozitívne kmene *Micrococcus luteus* CCM 732, *Bacillus pumilus* CCM 2218. Ako štandard sa použila kyselina 6-aminopenicilánová (6-APA). Výsledky sú v tabuľke 9.

Tab. 9 Antibakteriálna aktivita štandardu 6-APA a furo[3,2-b]pyrolov **IX - XIII** na G^- kmene (*Escherichia coli* CCM 7929, *Pseudomonas syringae* CCM 2114) a G^+ kmene (*Micrococcus luteus* CCM 732, *Bacillus pumilus* CCM 2218), vyjadrená ako minimálna inhibičná koncentrácia (MIC)

zlúčenina	MIC/ (mM)			
	<i>M. luteus</i>	<i>B. pumilus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. syringae</i>
6-APA	4,00	7,3	3,2	5,82
IX	3,84	5,12	15,36	10,24
VI	0,64	5,12	10,24	2,56
VIIIa	0,016	3,2	1,28	1,28
VIIIc	2,56	2,56	2,56	2,56
Xa	0,024	20,48	12,88	3,84
Xb	1,92	2,56	2,56	2,56
Xc	20,48	20,48	20,48	20,48
Xd	0,64	10,24	10,24	1,6
XI	15,36	20,48	15,36	15,36
XIIa	>20,48	>20,48	>20,48	>20,48
XIIb	12,24	20,48	12,24	20,48
XIII	>20,48	>20,48	>20,48	>20,48

Z výsledkov vyplýva, že iba látky **VIIIa**, **VIIIc** a **Xb** vykazovali vyššiu antibakteriálnu aktivitu než 6-APA na všetky bakteriálne kmene s hodnotami minimálnej inhibičnej koncentrácie (MIC) 0,016 - 2,56 mM. Miernu antibakteriálnu aktivitu vykazovali zlúčeniny **VIIIa** a **Xa** (MIC = 0,016 a 0,024 mM). Zlúčeniny **VI** a **Xd** vykazovali miernu aktivitu iba voči *Micrococcus luteus* s MIC = 0,64 mM. Všetky testované zlúčeniny vykazovali vyššiu aktivitu na oboch G^+ bakteriálnych kmeňoch (*M. luteus* and *B. pumilus*) než na G^- kmeňoch (*E. coli* and *P. syringae* CCM 2114). Uvedený výsledok je typický pre inhibitory syntézy peptidoglykánú – hlavného komponentu bakteriálnych bunkových stien.

V druhej štúdii boli furo[3,2-b]pyrolové deriváty **Ie**, **XIVa-c**, **XVa**, **XIXb**, **XIXc** a **XXa-8c** testované jednak na antibakteriálnu aktivitu na dva bakteriálne kmene: G^- kmeň *Escherichia coli*, CCM 7929 a G^+ kmeň *Micrococcus luteus*, CCM 732. Ako štandard sa aj v tomto prípade použila kyselina 6-aminopenicilánová. Výsledky sú v tabuľke 10. V tomto prípade sa hodnoty MIC testovaných látok nachádzajú v širokom rozmedzí koncentrácií (0,1 – 20,48 mM). Rovnakú antibakteriálnu aktivitu ako štandard vykazuje látka **XXa** pri kmeni *Escherichia coli* a pri kmeni *Micrococcus luteus* sa k hodnote MIC štandardu

približuje. Keďže **XXa** vykazuje rovnakú antibakteriálnu aktivitu na G^+ a G^- kmene, možno predpokladať, že mechanizmus účinku nesúvisí s inhibíciou komponentov bakteriálnej bunkovej steny, lebo je známe, že architektúra bunkovej steny medzi G^+ a G^- je odlišná (napr. v množstve peptidoglykán). Istú mieru antibakteriálnej aktivity vykazuje aj látka **XIXc**, pričom vyššiu mieru aktivity vykazuje voči G^+ bakteriálnemu taxómu. Vyššiu antibakteriálnu aktivitu než 6-APA vykazuje aj látka **XXc** s MIC = 2,56 mM na *Escherichia coli* a MIC = 1,92 mM na *Micrococcus luteus*. Testovaná látka **XIVc** vykázala vysokú aktivitu v mikromolárnej škále (MIC = 0,16 mM) na *Escherichia coli* a s MIC > 0,1 na *Micrococcus luteus*.

Tab. 10 Antibakteriálna aktivita štandardu 6-APA a furo[3,2-*b*]pyrolov **Ie** - **XXc** na G^- kmeň (*Escherichia coli* CCM 7929) a G^+ kmeň (*Micrococcus luteus* CCM 732), vyjadrená ako minimálna inhibičná koncentrácia (MIC)

zlúčenina	MIC (mM)	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
6-APA	3,84	5,12
Ie	3,84	5,12
XIVa	5,12	>20,48
XIVb	20,48	>20,48
XIVc	0,16	>0,1
XVa	20,48	>20,48
XIXb	16,38	>20,48
XIXc	10,24	15,36
XXa	5,12	5,12
XXb	10,24	>20,48
XXc	2,56	1,92

Prekvapujúcu antibakteriálnu aktivitu zlúčeniny **XIVc** na oboch bakteriálnych kmeňoch možno vysvetliť prítomnosťou objemnej tritylovej skupiny, ktorá predstavuje lipofilnú časť molekuly v kontraste s karboxylovou skupinou na opačnej strane molekuly. Táto konštrukcia vedie k zlúčeninám s "detergentnými" vlastnosťami a je prínosom pre elimináciu bakteriálnej membránovej bariéry takej zlúčeniny. Najmä zlúčenina **XIVc** by mala byť vedúcou štruktúrou generovania ďalších zlúčenín so zvýšenou antibakteriálnou účinnosťou.

V druhej štúdii (príloha B) sa skúmala aj antioxidačná aktivita syntetizovaných furo[3,2-b]pyrolových derivátov metódami DPPH, ABTS a FRAP (Tabuľka 11).

Tab. 11 Výsledky antioxidačnej aktivity furo[3,2-b]pyrolových derivátov **Ie-XXc** a klinických liečiv hodnotených látok metódami DPPH, ABTS a FRAP vyjadrená hodnotou ekvivalentu TROLOX-u v (M/M).

zlúčenina	TEAC (M/M)		
	DPPH	ABTS	FRAP
Ie	0.000 ± 0.000	0.053 ± 0.002	0.161 ± 0.012
Xd	0.014 ± 0.001	0.053 ± 0.005	0.006 ± 0.001
XVIb	0.023 ± 0.002	0.092 ± 0.008	0.151 ± 0.010
XIXc	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000
XXa	0.175 ± 0.005	0.211 ± 0.010	0.321 ± 0.016
XXc	0.175 ± 0.003	0.041 ± 0.004	0.437 ± 0.048
azitromycín	0.000 ± 0.000	0.883 ± 0.052	0.143 ± 0.020
amoxycilín	0.011 ± 0.001	0.065 ± 0.011	0.089 ± 0.009
doxycilín	0.000 ± 0.000	0.731 ± 0.037	0.754 ± 0.088

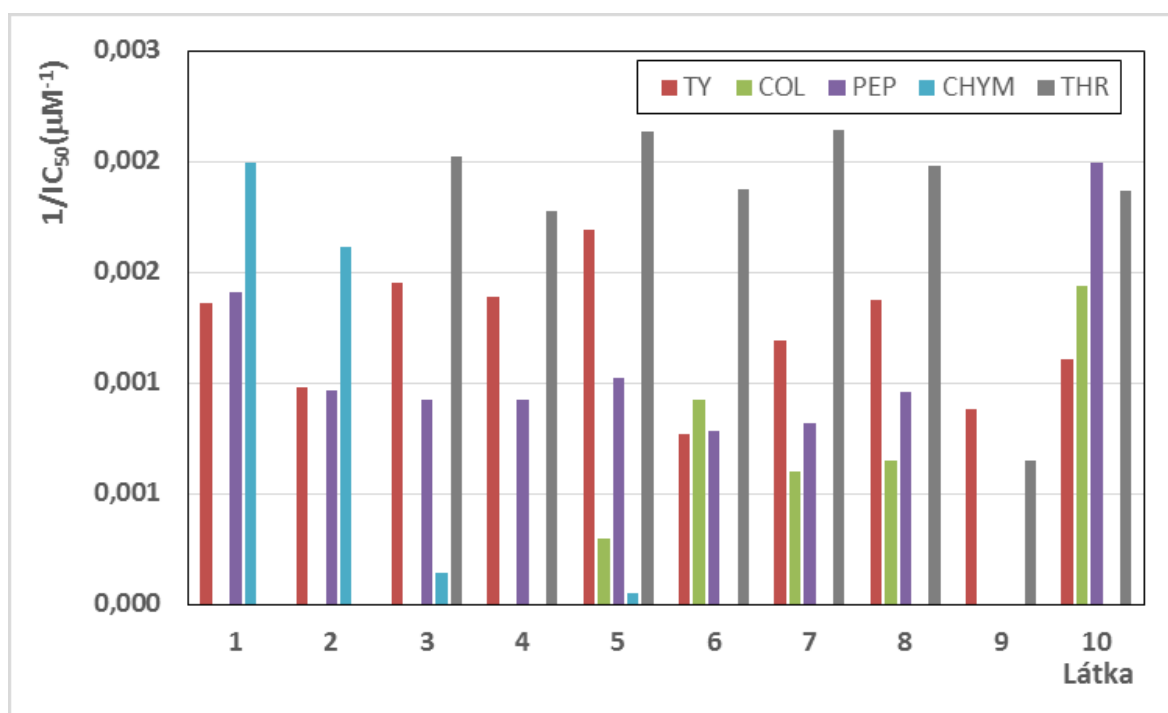
Najvyššiu mieru antioxidačnej aktivity metódou DPPH vykázala látka **XXa**. Jedná sa o derivát, ktorý obsahuje dve hydrazidové skupiny, ktoré sú donormi vodíkovej väzby. Táto látka vykazuje vyššiu antioxidačnú aktivitu aj metódami FRAP a ABTS a javí sa ako perspektívna aj ako inhibítor farmakologicky zaujímavých enzýmov, čo bude predmetom ďalšej časti tejto štúdie. Jedným z možných vysvetlení, prečo látka **XXa** dosiahla mieru antibakteriálnej aktivity na úrovni štandardu, 6-APA je predpoklad, že má parametre inhibítora bakteriálnych enzýmov. Rovnakú mieru antioxidačnej aktivity vykázala štruktúrne príbuzná látka **XXc** metódou vychytávania radikálu DPPH. Metódou ABTS vykazuje miernu aktivitu, avšak čo sa týka metódy FRAP vykazuje najvyššiu antioxidačnú aktivitu spomedzi všetkých testovaných látok. Antioxidačnú aktivitu nevykazuje iba jedna z testovaných látok - **XIXc**. Klinicky aplikované liečivá Azitromycín a Doxycyklín majú nízke hodnoty antioxidačnej aktivity metódou DPPH a vyššie hodnoty antioxidačnej aktivity metódami ABTS a FRAP.

Vybrané furo[3,2-b]deriváty boli testované aj ako inhibítory piatich proteáz, pričom sa použili nasledovné enzýmy:

- trypsin - predstaviteľ serínových proteináz

- pepsín - predstaviteľ aspartických proteináz
- kolagenáza - metaloproteináz
- chymotrypsín - predstaviteľ špecifických serínových proteináz príbuzný elastázam
- trombín - predstaviteľ špecifických serínových proteináz, aktívnych v procesoch zrážania krvi a digescie fibrínového koagulátu

Do testovania boli zaradené syntetizované látky: **Ie**, **XIVa-c**, **Xd**, **XIXb**, **XXb-c**. Nakoľko sa jednalo o látky s molekulovou hmotnosťou okolo 200-250 g/mol neočakávala sa vysoká miera inhibičnej aktivity, ale indícia či daný skelet by mohol byť stavebným blokom úspešných inhibítorov uvedených enzýmov. Pre úplnosť treba dodať, že štrukturálne preferencie inhibítorov uvedených enzým sa od seba líšia. Miera inhibičnej aktivity testovaných látok na Obr. 47 je vyjadrená parametrom $1/IC_{50} \mu M^{-1}$ a to znamená čím vyšší stĺpec, tým vyššia miera inhibičnej aktivity.



Obr. 47 Inhibičná aktivita testovaných látok na vybrané proteinázy (1-**XIVb**, 2-**XIVc**, 3-**XIVa**, 4-**XIXb**, 5-**XXb**, 8-**Xd**, 9-**XXc**, 10-**Ie**). Pod číslami 6 a 7 sú štrukturálne podobné látky, ktoré boli syntetizované v rámci našej výskumnej skupiny v predchádzajúcom období

Z výsledkov vyplýva, že pre celú skupinu látok bola pozorovaná nízka inhibičná aktivita na trypsín a pepsín. Inhibičnú aktivitu na chymotrypsín vykázali látky **XIVa** – **XIVc**. Podobne inhibičnú aktivitu na kolagenázu vykázali látky: **XIXa**, **XXd** a **Ie**. Na trombín inhibičnú aktivitu vykázali všetky látky okrem **XIVb** a **XIVc**. Výsledky štúdie biologickej aktivity furo[3,2-*b*]pyrolov sú súčasťou literatúry [65].

8. ZÁVERY PRE PRAX A ROZVOJ VEDNEJ DISCIPLÍNY

Dizertačná práca si kládla za cieľ predovšetkým komplexné štúdium vybraných furo[3,2-*b*]pyrolových derivátov od ich syntézy až po identifikáciu ich štruktúry pomocou dostupných spektroskopických metód a analýzu ich čistoty pomocou metódy HPLC. Z výsledkov, prezentovaných v práci vyplýva niekoľko zaujímavých poznatkov a tým sa otvárajú ďalšie perspektívne smery výskumu.

Z reakcií východiskových metyl furo[3,2-*b*]pyrol-5-karboxylátov **I** na esterovej skupine sme uskutočnili prípravu substituovaných furo[3,2-*b*]pyrol-5-karboxylových kyselín **XIVa-c** v 65-80% výťažkoch, furo[3,2-*b*]pyrol-5-karbaldehydov **XVa,b** v 55-58%, z reakcií na dusíku pyrolového kruhu sme uskutočnili alkylácie za vzniku derivátov **XIXa-c** v 55-67% a acetyláciu za vzniku zlúčeniny **VI** v 60% výťažku. Oba typy zlúčenín slúžili ako východiskové látky pre ďalšie reakcie. Hydrazinolýzou **XIXa-c** vznikli bis-hydrazidy **XXa-c** v 65-70% výťažkoch a tionáciou **VI** s P₂S₅ vznikol derivát **VIII** v 60% výťažku. Takto pripravené zlúčeniny sme podrobili následným reakciám s cieľom pripraviť 5-5-6 kondenzované heterocyklické systémy. Do tejto kategórie patria jednak furo[2',3':4,5]pyrolo[1,2-*d*][1,2,4]triazínové deriváty **VIII – XIII a XVIII** a tiež 7-amino-2-metylfuro[2',3':4,5]pyrolo[1,2-*a*]pyrazin-6,8(5*H*,7*H*)-diónové deriváty **XXI a XXII**.

Všetky novosyntetizované zlúčeniny boli úspešne identifikované dostupnými analytickými technikami – ¹H a ¹³C NMR, IČ, prvkovou analýzou, prípadne MS. Pre budúcnosť sa ako perspektívna javí podrobnejšia štúdia acetamidov **XXII**, ktoré vznikli ako neočakávané produkty reakcie bis-hydrazidov **XX** v kyseline octovej ich pomerne dlhým ožarovaním (35 min) v mikrovlnnej rúre, zatiaľ čo na vznik požadovaného derivátu **XXI** stačil 12-minútový mikrovlnný ohrev. Vznikom acetamidovej funkčnej skupiny u zlúčenín **XXII** došlo k vzniku stereogénnej jednotky v molekule (centrálnej/axiálnej chiralite) a CH₂ protóny na C-5 stali diastereotopickými, čo sa prejavilo v ich ¹H NMR spektrách štiepením na dva dublety s ²*J* = 19,1 Hz s chemickým posunom pri 5.43 and 5.32 ppm. Bolo by preto perspektívne uskutočniť štúdiu modifikácie štruktúry **XXII** jednak substitúciou jedného z protónov diastereotopickej CH₂ skupiny, s cieľom pripraviť prípadné diastereoméry, resp. uskutočniť vhodnú derivatizáciu exocyklickej aminoskupiny u zlúčeniny **XXI**.

Z výsledkov štúdia vplyvov substituentov v polohe 2 v ¹H NMR spektrách na chemické posuny protónov na C-2, C-3, C-6 a N-4 u 2-substituovaných furo[3,2-*b*]pyrol-5-

karboxylátov **I** sa najviac prejavil vplyv formylovej a nitrilovej skupiny v porovnaní s nesubstituovaným derivátom. Podobne sme uskutočnili štúdiu vplyvov substituentov v polohách C-5, C-8 a N-7 na posuny protónov aj u furo[2',3',4:5]pyrol[1,2-d][1,2,4]triazinových derivátov **VIII**, **X**, **XI** a **XII**. Najzaujímavejším výsledkom bol vplyv substituenta na C-5 na chemický posun protónov na dusíku N-7. Z hľadiska ďalšieho výskumu by bolo perspektívne zavedenie rôznych substituentov práve na uhlík C-5, ktoré je v súčasnosti obmedzené dostupnosťou ortoesterov (viď. syntetický postup *cesta a* na schéme 27). Prvý pokus v tejto oblasti sme síce uskutočnili preskúmaním alternatívneho postupu syntézy **VIII** (schéma 27, *cesta b*), tento sa však zatiaľ kvôli dlhému reakčnému času javí ako neperspektívny a bude potrebné uskutočniť prípadne reakciu účinkom mikrovlnného žiarenia.

V ^1H NMR spektrách tiónových derivátov **XI**, **XII** dochádza k posunom protónov v polohe H-5 k nižšiemu poľu v porovnaní s analogickými oxoderivátmi **VIII** a vplyv tiónovej skupiny je pozorovateľný aj v ^{13}C NMR spektrách **XI** a **XII**, v ktorých je signál C-8 uhlíka tiež posunutý k vyšším hodnotám ppm.

Dizertačná práca je prvou rozsiahlejšou štúdiou biologickej aktivity furo[3,2-b]pyrolových derivátov, hoci kratšie štúdie už boli na našom pracovisku v minulosti publikované [34, 35]. Z výsledkov štúdia antibakteriálnej aktivity sa ako perspektívne pre ďalšie skúmanie ukázalo niekoľko zlúčenín (napr. **VIIIa**, **VIIIc**, **Xb** a **XXc**) a predovšetkým metyl 2-tritylfuro[3,2-b]-5-karboxylát **XIVc**, s hodnotami MIC v mikromolárnej škále, od ktorého by sa mala odvíjať syntéza ďalších štruktúr s cieľom vyššej miery antibakteriálnej aktivity. K tomuto cieľu bude potrebná podrobná štúdia na základe predikcie parametrov ADMET, ako i štúdie QSAR. Využitím výsledkov týchto štúdií bude následne možné pripraviť nové štruktúry, napr. zavedením vhodných substituentov.

Zo štúdia antioxidačnej aktivity metódami DPPH, ABTS a FRAP sa ako perspektívna pre ďalší výskum ukázali látky **XXa** a štruktúrne príbuzná **XXc**, čiže deriváty s dvoma hydrazidovými skupinami. Z výsledkov testov inhibičnej aktivity vyplýva, že pre celú skupinu látok bola pozorovaná nízka inhibičná aktivita na trypsín a pepsín. Inhibičnú aktivitu na chymotrypsín vykázali látky **XIVa** – **XIVc**. Podobne inhibičnú aktivitu na kolagenázu vykázali látky **XIXa**, **XXd** a **Ie**. Na trombín inhibičnú aktivitu vykázali všetky látky okrem **XIVb** a **XIVc**. V tejto oblasti bola uskutočnená aj predbežná chemometrická štúdia [65], konkrétne analýza hlavných komponentov (PCA analýza) a zhuková analýza (klastrová). Keďže metódy modernej chemometrie hrajú kľúčovú úlohu pri štúdií

a predikcii biologickej aktivity zlúčenín, bude potrebné sa chemometrickej analýze venovať podrobnejšie.

Z vybraných novopripravených zlúčenín sme metódou HPLC analyzovali ich spektrálnu čistotu, ktorá sa pohybovala od 99,7 – 94,15%. Keďže uvedené deriváty sa javia ako perspektívne z hľadiska biologickej aktivity a v budúcnosti by mohli slúžiť, napr. ako antibakteriálne prostriedky, bude potrebné zlepšiť separáciu a čistenie derivátov využitím napr. stĺpcovej chromatografie, keďže látky boli v práci čistené prevažne kryštalizáciou a následne identifikovať prípadné prítomné nečistoty. Je známym faktom, že čistejšie produkty možno získať aj uskutočnením reakcií účinkom mikrovlnného žiarenia, preto bude v ďalšom výskume vhodné zamerať sa aj na túto oblasť.

Prínos pre rozvoj vednej disciplíny sa ukazuje v spojení syntetických, analytických a spektrálnych detekčných metód pri výskume kondenzovaných heterocyklických zlúčenín s potenciálnym farmakologickým využitím. Integrácia analytickej chémie a organickej chémie sa stáva dôležitou pri identifikácii reakčných medziproduktov, samotných produktov a overení priebehu reakcií. Súčasťou modernej organickej chémie je spojenie metódy HPLC a HPLC-MS na identifikáciu produktov, resp. prítomných nečistôt. O aktuálnosti výskumu svedčí aj nárast citovanosti takýchto publikácií.

9. SUMMARY

The dissertation thesis is focused on the complex study of selected furo[3,2-*b*]pyrrole derivatives, on their synthesis and analysis of their structures using available spectroscopic methods and determination of their purity by HPLC. The presented results show some interesting facts and thus they open further perspectives of research.

By reaction the starting methyl furo[3,2-*b*]pyrrole-5-carboxylate **I** there were prepared substituted furo[3,2-*b*]pyrrole-5-carboxylic acids **XIVa-c** in 65-80% yields and furo[3,2-*b*]pyrrole-5-carbaldehydes **XVa,b** in 55% -58% yields. Alkylations on the nitrogen atom of the pyrrole ring gave derivatives **XIXa-c** in 55-67% yields and acetylation led to the derivative **VI** in 60% yield. Both types of compounds were used as starting materials for subsequent reactions. Hydrazinolysis **XIXa-c** produced bis-hydrazides **XXa-c** in 65-70% yields and thionation of derivatives **VI** with P₂S₅ gave derivative **VII** in 60% yield.

These compounds were subjected to subsequent reactions to prepare 5-5-6 fused heterocyclic systems, particularly furo[2',3':4,5]pyrrolo[1,2-*d*][1,2,4]triazinone derivatives **VIII – XIII** and **XVIII** and 7-amino-2-methylfuro[2',3':4,5]pyrrolo[1,2-*a*]pyrazine-6,8(5*H*,7*H*)-dione derivatives **XXI** and **XXII**. The all new compounds were successfully analyzed by available analytical methods - ¹H and ¹³C NMR, IR, elemental analysis or MS.

The future perspectives we can see in the detailed study of acetamides **XII**, which arised as unexpected products of reaction of bis-hydrazides **XX** in acetic acid by their relatively long irradiation for 35 min in the microwave oven, while derivative **XXI** were formed after 12 min of the irradiation.

The formation of the acetamide functional group in compounds **XXII** formed a stereogenic unit in the molecule (central / axial chirality) and the CH₂ protons at the C-5 became diastereotopic, which was reflected in their ¹H NMR spectra by splitting into two doublets with ²*J* = 19,1 Hz with chemical shifts at 5,43 and 5,32 ppm. Therefore, it would be advantageous to carry out the study of structure **XXII** modification by substituting one of the protons of the diastereotopic CH₂ group in order to prepare the diastereomers, or to carry out a suitable derivatization of the exocyclic amino group of compound **XXI**, respectively.

The results of the study of the effects of substituents at position 2 in ¹H NMR spectra on the chemical shifts of protons at C-2, C-3, C-6 and N-4 in 2-substituted furo[3,2-*b*]pyrrole-5-carboxylates mostly affected the effect of the formyl and nitrile groups compared to the unsubstituted derivative. Similarly, we performed a study of the effects of substituents at

the C-5, C-8 and N-7 positions on proton chemical shifts for furo[2',3',4:5]pyrol[1,2-*d*][1,2,4]triazine derivatives **VIII**, **X**, **XI** and **XII**.

The most interesting result presents the effect of the substituent at C-5 on the chemical shift of protons at N-7 nitrogen. From the point of view of further research, it would be perceived to introduce various substituents directly on the C-5 carbon, which is currently limited by the availability of orthoesters (see synthetic procedure and Scheme 27). However, the first experiment in this area has been carried out by reviewing the alternative synthetic procedure **VIII** (Scheme 27, route b), but this is still due to a long reaction time and appears to be ineffective and will eventually have to be effected under microwave irradiation.

In the ^1H NMR spectra of thione derivatives **XI**, **XII**, the protons in the H-5 position shift to the lower field compared to the analogous oxoderivatives **VIII** and the thione group effect are also observable in ^{13}C NMR spectra of **XI** and **XII** where C-8 carbon signal was also shifted to higher ppm values.

The dissertation thesis is the first more extensive study of the biological activity of furo[3,2-*b*]pyrrole derivatives. In our work-team the shorter studies have already take place [34, 35]. The results of the antibacterial activity study showed several perspective compounds (e.g., **VIIIa**, **VIIIc**, **Xb** and **XXc**), and in particular methyl 2-tritylfuro[3,2-*b*]pyrrole-5-carboxylate **XIVc** with MIC values in micromolar scale, from which be to run the synthesis of other structures with the aim of increase antibacterial activity. The future goal of this study will require a detailed study based on ADMET's predictions as well as on QSAR studies. By using the results of these studies, it will be possible to prepare new structures, e.g. by the introduction of suitable substituents.

From the study of antioxidant activity by methods DPPH, ABTS and FRAP, compounds **XXa** and structurally related **XXc**, i.e. derivatives with two hydrazide groups, have been shown to be prospective for further investigation. The results of the inhibition activity assays show that low inhibition activity for trypsin and pepsin was observed for all substances. Compounds **XIVa-XIVc** showed the best inhibition activity on chymotrypsin. Similarly, collagenase inhibition activity was shown by the compounds **XIXa**, **XXd** and **Ie**. All substances except **XIVb** and **XIVc** have shown inhibition activity on thrombin.

The preliminary chemometric study [65] was realised, based on the analysis of components (cluster analysis) and cluster analysis (cluster). Since modern chemometry

9. Summary

methods play a key role in the study and prediction of biological activity of compounds, chemometric analysis will need to be spent in more detail.

The selected new-prepared compounds were analysed on their spectral purity by HPLC. They showed purity in 99.7-94.15% range. These derivatives appear to be perspective due to their biological activity and in the future they could serve, for example, as antibacterial agents. Therefore it will be necessary to improve the separation and purification of the derivatives by column chromatography, since the substances were largely purified by crystallization and subsequently the impurities should to be identified. It is a well-known that cleaner products can also be obtained by reactions, under microwave irradiation, so it will be appropriate to focus on this area in further research.

10. ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

1. KRUTOŠÍKOVÁ, A. 1996. *Bicyclic 5-5 Systems: Two Heteroatoms 1:1*. In *Comprehensive Heterocyclic Chemistry II*. Pergamon, Oxford: C. A. Ramsden, Ed. 1996. 47s. ISBN 978-0-08-044991-3
2. GRACZA, T., KRUTOŠÍKOVÁ, A. 2009. Chemistry of hetero analogs of pentalene dianion. In *Topics in heterocyclic chemistry*. ISSN 1861-9282, 2009, vol.19. p. 249-283
3. KAWASHIMA, Y., et al. 1986. Structure-activity studies of 4,6-disubstituted 2-(morpholinocarbonyl)furo[3,2-*b*]indole derivatives with analgesic and antiinflammatory activities. In *Journal of Medicinal Chemistry*. ISSN 1520-4804, 1986, vol. 29, p. 2284–2290
4. GEORGE, M. D. et al. 2015. Discovery of selective and orally bioavailable protein kinase C θ (PKC θ) inhibitors from a fragment hit. In *Journal of Medicinal Chemistry*. ISSN 1520-4804, 2015, vol. 58, p. 222-236
5. ASTAKHINA, V. et al. 2016. Synthesis and biological activity of novel ethyl esters of 4-*R*-6,8-dimethyl-1-oxo-1,2-dihydropyrrolo[1,2-*d*][1,2,4]triazine-7-carboxylic acids. In *Journal of Heterocyclic Chemistry*. ISSN 1943-5193, 2016, vol. 53, no. 2, p. 421-428
6. SCHOENFELD, C. R. et al. 2013. Discovery of novel series of potent non-nucleoside inhibitors of hepatitis C virus NS5B. In *Journal of Medicinal Chemistry*. ISSN 1520-4804, 2013, vol. 56, no. 20, p. 8163-8182
7. ZHAN, P. et al. 2012. Structure-based bioisosterism design, synthesis and biological evaluation of novel 1,2,4-triazin-6-ylthioacetamides as potent HIV-1 NNRTIs. In *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. ISSN 0960-894X, 2012, vol. 22, p. 7155-7162
8. EL-GENDY, A. A. et al. 2008. Synthesis and biological activity of functionalized indole-2-carboxylates, triazino- and pyridazino-indoles. In *Archiv der Pharmazie Chemistry in Life Sciences*. ISSN 1521-4184, 2008, vol. 341, p. 294-300

9. SUBRAMANIAN, G., SCHLEYER, R. V. P., JIAO, H. 1996. Are the most stable fused heterobicycles the most aromatic ? In *Angewandte Chemie International Edition England*. ISSN 0570-0833, 1996, vol. 35, no. 22, p. 2638-2641
10. NOVAK, I. 1997. Structure, stability and aromaticity of bis-heteropentales. In *Journal of Molecular Structure (Theochem)*. ISSN 0166-1280, 1997, vol. 398-399, p. 315-323
11. KRUTOŠÍKOVÁ, A. et al. 1997. Synthesis and reactions of furo[2,3-*b*]pyrroles. In *Molecules*. ISSN 1420-3049, vol. 2, p. 69-79
12. CYRAŇSKI, K. M. et al. 2001. Aromaticity of dihetero analogues of pentalene dianion. X-Ray and ab initio studies of eight methyl furo[3,2-*b*]pyrrole-5-carboxylate derivatives and five methyl furo[2,3-*b*]pyrrole-5-carboxylate derivatives. In *Tetrahedron*. ISSN 0040-4020, 2001, vol. 57, p. 8867-8873
13. GIMARC, B.M. 1983. Topological charge stabilization. In *Journal of the American Chemical Society*. ISSN 1520-5126, 1983, vol. 105, p. 1979
14. KRUTOŠÍKOVÁ, A., DANDÁROVÁ, M., ALFÖLDI, J. 1994. Substituted vinyl azides in the synthesis of condensed nitrogen heterocycles. In *Chemical Papers*. ISSN 1336-9075, 1994, vol. 48, p. 268-273
15. JANDA, Ľ., VOTICKÝ, Z. 1984. Semisynthesis cephalosporines. I. An improved synthesis of 5-aryl-2-furancarboxylic acids. In *Chemické zvesti*. ISSN 0366-6352, 1984, vol. 38, no. 4, p. 507-513
16. ZHAO, H. et al. 2014. Practical nonazide synthesis of D-amino acid oxidase inhibitor via a sequential Erlenmeyer-Plöchl reaction and ligand-free copper(I) amination protocol. In *Organic Process Research and Development*. ISSN 1520-586X, 2014, vol.18, p. 198-204
17. GRONOWITZ, S., WESTERLUND, CH., HÖRNFELDT, B. A. 1976. The synthetic utility of heteroaromatic azido compounds. III. Preparation of some furo-, thieno-, selenolo[3,2-*b*]pyrroles. In *Acta Chemica Scandinavica*. ISSN 0001-5393, 1976, B 30, p. 391-396
18. KRUTOŠÍKOVÁ, A., DANDÁROVÁ, M., BOBOŠÍK, V. 1994. Derivatives of furo[3,2-*b*]pyrrole. In *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*. ISSN 1212-6950, 1994, vol. 59, p. 473-481

19. DANDÁROVÁ, M., KRÁĽOVIČOVÁ, E., KRUTOŠÍKOVÁ, A., KOVÁČ, J. 1986. Electrophilic substitution reactions of furo[3,2-*b*]pyrrole derivatives. In *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*. ISSN 1212-6950, 1986, vol. 51, p. 106-111
20. UMEZAWA, K. et al. 2009. Bright, color-tunable fluorescent dyes in the VIS/NIR region: Establishment of new „Tailor-Made“ multicolor fluorophores based on borondipyrromethene. In *Chemistry a European Journal*. ISSN 1521-3765, 2009, vol. 15, p. 1096-1103
21. KRUTOŠÍKOVÁ, A., DANDÁROVÁ, M., ALFÖLDI, J. 1993. Synthesis and reactions of furo[3,2-*b*]pyrrole type aldehyde. In *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*. ISSN 1212-6950, 1993, vol. 58, p. 2139-2149
22. DANDÁROVÁ, M. et al. 2000. Effect of microwave irradiation on reaction of furo[3,2-*b*]pyrrole and furo[2,3-*b*]pyrrole-2-carbadehydes with some active methylene compounds. In *Arkivoc*. ISSN 1424-6376, 2000, vol. 3, p. 409-420
23. KRUTOŠÍKOVÁ, A., DANDÁROVÁ, M. 1994. Substituted vinyl azides in synthesis of furo[3,2-*b*:4,5-*b'*]dipyrrole and pyrrolo[2',3':4,5]furo[3,2-*c*]pyridines. In *Heterocycles*. ISSN 1881-0942, 1994, vol. 37, p. 1695-1700
24. CHYLOVA, J. et al. 1992. Condensed O-, N-heterocycles by the transformation of azidoacrylates. In *Monatshefte für Chemie*. ISSN 1434-4475, 1992, vol. 123, p. 807-815
25. GLENN, W. R., LIM, I. M. 2006. Keratin dyeing compounds, keratin dyeing compositions containing them, and use thereof. 2006, USA, US 2006/0042025 A1
26. HEFFERNAN, L. R. M. et al. 2008. Fluoro-substituted inhibitors of D-amino acid oxidase. 2008, USA, US 2008/0004327 A1
27. MILKIEWICZ, L. K., PARKS, J. D., LU, T. 2003. Synthesis of a novel series of tetrasubstituted furan[3,2-*b*]pyrrols. In *Tetrahedron Letters*. ISSN 0040-4039, 2003, vol. 44, p. 4257-4260
28. KRUTOŠÍKOVÁ, A. 1990. Synthesis and reactions of condensed furan derivatives. In *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*. ISSN 1212-6950, 1990, vol. 55, p. 597-618
29. KRÁĽOVIČOVÁ, E. et al. 1988. Reactions of furo[3,2-*b*]pyrroles and their benzo[*b*] analogues. In *Chemical Papers*. ISSN 1336-9075, 1988, vol. 42, p. 89-95

30. GAJDOŠ, P. et al. 2005. 2-[3-(Trifluoromethyl)phenyl]furo[3,2-*b*]pyrroles: synthesis and reactions. In *Central European Journal of Chemistry*. ISSN 1644-3624, 2005, vol. 3, no. 2, p. 311-325
31. ABDEL-AZIZ, H. A et al. 2013. Synthesis and anticancer potential of certain novel 2-oxo-*N'*-(2-oxoindolin-3-ylidene)-2*H*-chromene-3-carbohydrazides. In *European Journal of Medicinal Chemistry*. ISSN 0223-5234, 2013, vol. 70, p. 358-363
32. GASPAROVA, R. et al. 1997. Synthesis and antimicrobial activity of some new 3-heterocyclic substituted chromones. In *Il Farmaco*. ISSN 0014-827X, 1997. vol. 52, p. 251-253
33. SANTOS, M. R. L. et al. 1997. Syntheses of new isochromanylacetylhydrazones designed as probable non-addictive analgesic agents. In *Journal of the Brazilian Chemical Society*. ISSN 0103-5053, 1997, vol. 8, p. 471-478
34. GAŠPAROVÁ, R. et al. 2005. Reactions of substituted furo[3,2-*b*]pyrrole-5-carboxhydrazides and their biological activity. In *Central European Journal of Chemistry*. ISSN 1644-3624, 2005, vol. 3, no. 4, p. 622-646
35. GAŠPAROVÁ, R., MONCMAN, M., HORVÁTH, B. 2008. Microwave assisted reactions of 2-[3-(trifluoromethyl)phenyl]-4-*R*¹-furo[3,2-*b*]pyrrole-5-carboxhydrazides. In *Central European Journal of Chemistry*. ISSN 1644-3624, 2008, vol. 6, p. 180-187
36. LANCELOT, CH. J., MAUME, D., ROBBA, M. 1980. Pyrrolo[1,2-*d*]triazines-1,2,4. I. Dérivés Pyrroliques. In *Journal of Heterocyclic Chemistry*. ISSN 1943-5193, 1980, vol. 17, p. 625-629
37. HEFFERNAN, L. R. M. et al. 2011. Prodrugs of fused heterocyclic inhibitors of D-amino acid oxidase. 2011. USA, US 2011/0034434 A1
38. SOTH, S., FARNIER, M., PAULMIER, C. 1978. Recherches en série hétérocyclique. XXIX. Sur des voies d'accès à des thiéno, sélénolo, furo et pyrrolopyrroles. In *Canadian Journal of Chemistry*. ISSN 1978, vol. 56, no. 10, p. 1429-1434
39. JIANG, K. J. et al. 2010. Evaluation of thieno[3,2-*b*]pyrrole[3,2-*d*]pyridazinones as activators of tumor cell specific M2 isoform of pyruvate kinase. In *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. ISSN 0930-894X, 2010, vol. 20, p. 3387-3393

40. YAROVENKO, N. V. et al. 2003. Regioselective acylation of methyl 2-methyl-4*H*-thieno[3,2-*b*]pyrrole-5-carboxylate. In *Russian Chemical Bulletin, International Edition*. ISSN 1066-5285, 2003, vol. 52, p. 451-456
41. GALAL, A. S. et al. 2013. Design, synthesis and structure-activity relationship of novel quinoxaline derivatives as cancer chemopreventive agent by inhibition of tyrosine kinase receptor. In *European Journal of Medicinal Chemistry*. ISSN 0223-5234, 2013, vol. 69, p. 115-124
42. MOHAMED, S. M., YOUNS, M. M., AHMED, M. N.. 2013. Synthesis, antimicrobial, antioxidant activities of novel 6-aryl-5-cyanothiouracil derivatives. In *European Journal of Medicinal Chemistry*. ISSN 0223-5234, 2013, vol. 69, p. 591-600
43. KRUTOŠÍKOVÁ, A., DANDÁROVÁ, M. 1999. Synthesis of substituted furo[2',3':4,5]pyrrolo[1,2-*d*][1,2,4]triazolo[3,4-*f*][1,2,4]triazines. In *Chemical Papers*. ISSN 1336-9075, 1999, vol. 53, p. 123-125
44. KRUTOŠÍKOVÁ, A., DANDÁROVÁ, M. 1997. Synthesis of substituted benzo[4',5']furo[2',3':4,5]pyrrolo[1,2-*d*][1,2,4]triazolo[3,4-*f*][1,2,4]triazines. In *Chemical Papers*. ISSN 1336-9075, 1997, vol. 51, p. 412-415
45. KRUTOŠÍKOVÁ, A., DANDÁROVÁ, M., MASTIK, S., LYČKA, A. 1997. Synthesis and reactions of 8-hydrazinofuro[2',3':4,5]pyrrolo[1,2-*d*][1,2,4]triazolo[3,4-*f*][1,2,4]triazines. In *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*. ISSN 1212-6950, 1997, vol. 62, p. 1612-1622
46. BUCHWALD, S. L., KLAPARS, A., ANTILLA, J. C., HUANG, X.. 2001. A general and efficient copper catalyst for the amidation of aryl halides and the *N*-arylation of nitrogen heterocycles. In *Journal of the American Chemical Society*. ISSN 1520-5126, 2001, vol. 123, p. 7727-7729
47. KRUTOŠÍKOVÁ, A., HANES, M. 1992. Substituted 4-benzylfuro[3,2-*b*]pyrroles. In *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*. ISSN 1212-6950, 1992, vol. 57, p. 1487-1494
48. PARMENTIER, G. J., PORTEVIN, B., GOLSTEYN, M. R., PIERRÉ, A. HICKMAN, J., GLOANEC, P., NANTEUIL, D. G. 2009. Synthesis and CHK1

- inhibitory potency of hymenialdisine analogues. In *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. ISSN 0930-894X, 2009, vol. 19, p. 841-844
49. SPAREY, T. et al. 2008. The discovery of fused pyrrole carboxylic acids as novel, potent *D*-amino acid oxidase (DAO) inhibitors. In *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. ISSN 0960-894X, 2008, vol. 18, p. 3386-3391
50. FÉHER, D. et al. 2010. Highly brominated antimicrobial metabolites from a Marine *Pseudoalteromonas* sp. In *Journal of Natural Products*. ISSN 1520-6025, 2010, vol. 73, p. 1963-1966
51. GAŠPAROVÁ, R. et al. 2005. Reactions of substituted furo[3,2-*b*]pyrrole-5-carboxhydrazides and their biological activity. In *Central European Journal of Chemistry*. ISSN 1644-3624, 2005, vol. 3, no. 4, p. 622-646
52. FUKUDA, T. et al. 2006. Tensidols, new potentiators of antifungal Miconazole activity, produced by *Aspergillus niger* FKI-2342. In *The Journal of Antibiotics*. ISSN 0021-8820, 2006, vol. 59, p. 480-485
53. MAZUREK, S. et al. 2005. Pyruvate kinase type M2 and its role in tumor growth and spreading. In *Seminar in Cancer Biology*. ISSN 1044-579X, 2005, vol. 15, p. 300-308
54. KUMAR, P. R. et al. 2004. Synthesis and biological evaluation of thiophene[3,2-*b*]pyrrole derivatives as potential anti-inflammatory agents. In *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. ISSN 0968-0896, 2004, vol. 12, p. 1221-1230
55. REMKO, M. 2005. *Základy medicínskej a farmaceutickej chémie*. Bratislava: SAP, 2005. 392s. ISBN 80-89104-64-9
56. REMKO, M. 1999. *Metódy výskumu a vývoja liečiv*. Bratislava: SAP, 1999. 235s. ISBN 80-88908-45-0
57. LARSEN-KROGSGAARD, P.-LILJEFORS, T.-MADSEN, U. 2002. *Textbook of drug design and discovery*. British: Taylor nd Francis, 2002. 572s. ISBN 0-415-28288-8 PB
58. HUANG, J. H. et al. 2010. Current developments of computer-aided drug design. In *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. ISSN 1876-1070, 2010, vol. 41, p. 623-635

59. ZENG, H., WU, X. 2016. Alzheimer`s disease drug development based on computer-aided drug design. In *European Journal of Medicinal Chemistry*. ISSN 0223-5234, 2016, vol. 121 , p. 851-863
60. ZHANG, Q. M., WILKINSON, B. 2007. Drug discovery beyond the „rule-of-five“. In *Current Opinion in Biotechnology*. ISSN 0958-1669, 2007, vol. 18, p. 478-488
61. DUCHOWICZ, R. P. et al. 2007. Application of descriptors based on Lipinski`s rules in the QSPR study of aqueous solubilities. In *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. ISSN 0968-0896, 2007, vol. 15, p. 3711-3719
62. REDDY, J. M. et al. 2012. Computational approach for designing and development of potent Inhibitor for hepatitis - B virus X- associated protein through molecular docking studies. In *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. ISSN: 0975-7384, 2012, vol. 4, p. 265-271
63. WAINWRIGHT, M. 1989. Moulds in ancient and more recent medicine. In *Mycologist*. ISSN 0269-915X , 1989, vol. 3, no. 1, p. 21-23
64. REEVES, T. P. 2011. *1. Antibiotics: Group and Properties*. New Jersey: John Wiley and Sons, 2011. 366s. ISBN 978-1-118-06720-8
65. GALBAVÁ, S. 2017. *Antioxidačná a antibakteriálna aktivita derivátov dusíkatých heterocyklov prírodného i syntetického pôvodu*. Diplomová práca. Trnava: UCM, 2017, p. 95
66. GAVADE, N. S. et al. 2012. Synthesis and biological evaluation of novel 2,4,6-triazine derivatives as antimicrobial agents. In *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. ISSN 0960-894X, 2012, vol. 22, p. 5075-5077
67. ARSHAD, M., KHAN, A. T., KHAN, A. M. 1,2,4-Triazine derivatives: Synthesis and Biological applications. In *International Journal of Pharma Sciences and Research*. ISSN 0975-9492, 2014, vol. 5, no. 4, p. 149-162
68. ALY, M. R. E. et al. 2015. Synthesis, reactions and biological activity of some triazine derivatives containing sulfa drug moieties. In *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. ISSN 1068-1620, 2015, vol. 41, no. 4, p. 437-450
69. ĎURAČKOVÁ, Z. 1998. *Voľné radikály a antioxidanty v medicíne (1)*. Bratislava: Slovak Academic Press, 1998. 285s. ISBN 80-88908-11-6

70. ANSARI, Q. A. et al. 2013. Extraction and determination of antioxidant activity of *Withania somnifera* Dunal. In *European Journal of Experimental Biology*. ISSN 2248-9215, 2013, vol. 3, no. 5, p. 502-507
71. LIANG, N., KITTS, D. 2014. Antioxidant Property of Coffee Components: Assessment of Methods that Define Mechanisms of Action. In *Molecules*. ISSN 1420-3049, 2014, vol. 19, p. 19180-19208
72. GULCIN, I. 2012. Antioxidant activity of food constituent: An overview. In *Archives of Toxicology*. ISSN 0340-5761, 2012, vol. 86, p. 345-391
73. PATIL, A. R. et al. 2014. Antioxidant study and phenolic content of *caralluma fimbriata* herb. In *World Journal of Pharmaceutical Research*. ISSN 2277 – 7105, vol. 7, p. 565-575
74. CANO, A. et al. 1998. An end-point method for estimation of the total antioxidant activity in plant material. In *Phytochemical Analysis*. ISSN 1099-1565, 1998, vol. 9, p. 196-202
75. PANNALA, S. A. et al. 2001. Flavomoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics. In *Biochemical and Biophysical Research Communications*. ISSN 0006-291X, 2001, vol. 282, p. 1161-1168
76. HUANG, B. O. et al. 2002. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing Antioxidant power (FRAP) assays: A comparative study. In *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. ISSN 0021-8561, 2002, vol. 50, p. 3122-3128
77. BARRET, A.-RAWLING, N.-WOESSNER, J. 2012. *Handbook of Proteolytic Enzymes. Third Edition*. British: Academic Press, 2012. 4094s. ISBN 978-0-12-38220-8
78. TIDWELL, R. R., FOX, L. L., GERATZ, J. D. 1976. Aromatic tris-amidines: A new class of highly active inhibitors of Trypsin-like proteases. In *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology*. ISSN 1570-9639, 1976, vol. 445, p. 729-738
79. MILATA, V. - SEGĽA, P - BREZOVÁ, V. a kol. 2008. *Aplikovaná molekulová spektroskopia*. Bratislava: STU, 2008. 600 s. ISBN 978-8022729-60-4
80. MCMAHON, G. 2007. *Analytical Instrumentation: A guide to Laboratory, Portable and Miniaturized Instruments*. Ireland: John Wiley and Sons, 2007. 283 s. ISBN 978-0470-07950

81. KOVÁČ, Š. – ILAVSKÝ, D. – LEŠKO, J. 1987. *Metódy kontroly technologických procesov: Spektrálne metódy v organickej chémii a technológií*. Bratislava: Alfa, 1987. 461 s.
82. LABUDA, J a kol. 2014. *Analytická chémia*. Bratislava: STU, 2014. 671s. ISBN 978-8022742-42-9
83. KLOUDA, P. 2003. *Moderní analytické metody*. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. 132s. ISBN 80-86369-07-2
84. <https://cs.wikipedia.org/wiki/HPLC> [online 23.6.2017]
85. KRUTOŠIKOVÁ, A., KOVÁČ, J., DANDÁROVÁ, M. 1984. Synthesis and reactions of furocondensed derivatives. In *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*. ISSN 1212-6950, 1984, vol. 49, no. 1, p. 65-70
86. SLEZIAK, R. et al. 2000. Furo[2,3-b]pyrrole derivatives. Syntheses and reactions in the furan and pyrrole ring. In *Polish Journal of Chemistry*. ISSN 0137-5083, 2000, vol. 74, no. 2, p. 207-217
87. MONGE, A. et al. 1984. Synthesis of 3H[1,2]diazepino[5,6-b]indole and 3H[1,2]diazepino[4,5-b]indole derivatives. In *Journal of Heterocyclic Chemistry*. ISSN 1943-5193, 1984, vol. 21, p. 381-384
88. VOIEVUDSKYI, M. et al. 2016. Synthesis and reactivity of novel pyrrolo[1,2-a]pyrazine. In *Monatshefte fur Chemie*. ISSN 1434-4475, 2016, vol. 147, p. 783-789
89. BIAGI, G. et al. 2002. New 1,2,3-triazolo[4,5-d]1,2,4-triazolo[3,4-b]pyridazine derivatives II. In *Journal of Heterocyclic Chemistry*. ISSN 1943-5193, 2002, vol. 39, p. 889-893
90. SILVERBERG, J. L. et al. 2016. Synthesis and spectroscopic properties of a series of novel 2-aryl-3-phenyl-2,3-dihydro-4H-1,3-benzothiazin-4-ones. In *Arkivoc*. ISSN 1551-7004, 2016, vol. vi, p. 122-143
91. CHING, K.-C. et al. 2017. Structural optimizations of thieno[3,2-b]pyrrole derivatives for the development of metabolically stable inhibitors of chikungunya virus. In *Journal of Medicinal Chemistry*. ISSN 0022-2623, 2017, vol. 60, p. 3165 – 318

11. ZOZNAM PUBLIKOVANÝCH VEDECKÝCH PRÁC

ADC Vedecké práce v zahraničných karentovaných časopisoch

1. ZEMANOVÁ, I., GAŠPAROVÁ, R., KRAIC, F., KRUŽLICOVÁ, D., MALIAR, T., BOHÁČ, A., ADDOVÁ, G. 2017. Synthesis of furo[2,3:4,5]pyrrolo[1,2-d][1,2,4]triazine derivatives and their antibacterial activity. In *Arkivoc*. ISSN 1551-7004, 2017, vol. IV, p. 184-193
2. ZEMANOVÁ, I., GAŠPAROVÁ, R., MALIAR, T., BOHÁČ, A., KRAIC, F., ADDOVÁ, G. 2017. Synthesis and antibacterial activity of furo[3,2-b]pyrrole derivatives. In *Arkivoc*. – odoslané

ADN Vedecké práce v domácich časopisoch registrované vo WoS

1. ZEMANOVÁ, I., POTANČOKOVÁ, M., GAŠPAROVÁ, R. 2016. Synthesis of 4-oxo-4H-chromene derivative with fused benzodiazepine ring. In *Nova Biotechnologica et Chimica*. ISSN 1338-6905, 2016, 15, s. 85-89
2. ZEMANOVÁ, I., GAŠPAROVÁ, R. 2017. NMR spectroscopic properties of furo[2',3':4,5]pyrrolo[1,2-d][1,2,4]triazine derivatives. In *Nova Biotechnologica et Chimica*. – akceptované

ADF Vedecké práce v ostatných domácich časopisoch

1. ZEMANOVÁ, I., GAŠPAROVÁ, R. 2013. Synthesis and reactions of new derivatives of furo[3,2-b]pyrrole. In *Nova Biotechnologica et Chimica*. ISSN 1338-6905, 2013, 12, s. 100-107

AFH Abstrakty z príspevkov z domácich vedeckých konferencií

1. ZEMANOVÁ, I., GAŠPAROVÁ, R. 2013. *Reactivity of furo[3,2-b]pyrrole derivatives*. In *Applied natural sciences 2013: The 4th international scientific conference: Book of abstracts*. Trnava: Univerzita sv. Cyrila a Metoda, 2013. s. 79. ISBN 978-80-8105-501-0
2. ZEMANOVÁ, I., GAŠPAROVÁ, R., KRAIC, F., BOHÁČ, A., MALIAROVÁ, M. 2015. *Synthesis of furo[3,2-b]pyrrole derivatives fused with heterocyclic rings*. In *Applied natural sciences 2015: The 5th international scientific conference: Book of Abstracts*. Trnava: Univerzita sv. Cyrila a Metoda, 2015. s. 88. ISBN 978-80-8105-723-6