

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10)

PL 242717 B1

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **437341**

(22) Data zgłoszenia: **2021.03.19**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2022.09.26 BUP 39/2022**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2023.04.11 WUP 15/2023**

(51) MKP:

C09K 11/07 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

C07D 417/10 (2006.01)

C07D 413/10 (2006.01)

C07D 279/12 (2006.01)

C07D 271/12 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

POLITECHNIKA ŁÓDZKA, Łódź, PL

(72) Twórca(-y) wynalazku:

MAŁGORZATA ŚWIERCZYŃSKA, Brzeziny, PL

MARCIN SZALA, Chorzów, PL

DANIEL SŁOWIŃSKI, Proćwin, PL

RADOSŁAW PODSIADŁY, Łódź, PL

(74) Pełnomocnik:

Ewa Kaczur-Kaczyńska, Łódź, PL

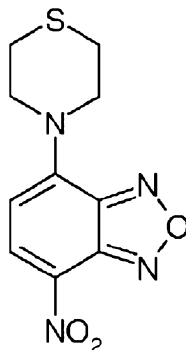
(54) Tytuł:

Zastosowanie pochodnej 4-nitro-2,1,3-benzoksadiazolu

PL 242717 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest zastosowanie pochodnej 4-nitro-2,1,3-benzoksadiazolu. Z opisu zgłoszenia patentowego US2005282818, a także z czasopisma *ChemMedChem*, 2015, 10(5), 797–803 jest znana pochodna 4-nitro-2,1,3-benzoksadiazolu, o wzorze 1,



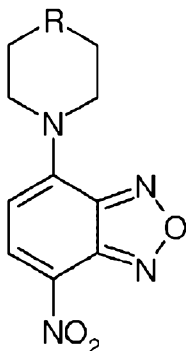
Wzór 1,

oraz sposób jej otrzymywania w reakcji 4-chloro-7-nitro-2,1,3-benzoksadiazolu z tiomorfoliną w środowisku dimetyloformamidu, prowadzonej w czasie 15 minut w łaźni lodowej, a następnie w temperaturze pokojowej w czasie 50 minut.

Dotychczas związek ten stosuje się jako inhibitor ubikwityny, zwłaszcza inhibitor ligazy ubikwityny.

Celem wynalazku jest znalezienie nowego zastosowania wyżej określonego związku, pochodnej 4-nitro-2,1,3-benzoksadiazolu.

Zastosowanie **według wynalazku** polega na tym, że pochodną 4-nitro-2,1,3-benzoksadiazolu, o wzorze 1, określoną powyżej, stosuje się jako fluorescencyjny próbnik do selektywnej detekcji kwasu chlorowego(I). Detekcja kwasu chlorowego(I) przy użyciu tego próbника polega na tym, że próbnik poddaje się reakcji z badanym związkiem, stosując 1–140% molowych badanego związku w stosunku do ilości próbника, w środowisku mieszaniny acetonitrylu i 0,1 M wodnego roztworu buforu fosforanowego użytych w stosunku objętościowym 1 : 9, o pH 7,4, w czasie inkubacji do 1 minuty, po czym identyfikuje się produkt tej reakcji i zidentyfikowanie jako produktu związku o wzorze 2,



Wzór 2,

w którym R stanowi grupę SO oznacza, że badany związek stanowi lub zawiera kwas chlorowy(I).

Zaletą zastosowania pochodnej 4-nitro-2,1,3-benzoksadiazolu, o wzorze 1, do detekcji kwasu chlorowego(I) jest krótki czas detekcji oraz selektywne powstawanie produktu stanowiącego jednoznaczne potwierdzenie obecności wykrywanego kwasu chlorowego(I). Związek o wzorze 2, w którym R oznacza grupę SO nie powstaje przy próbie użycia pochodnej o wzorze 1 do wykrycia innych biologicznych utleniaczy, takich jak H₂O₂ i nadtlenoazotyn. Pochodna 4-nitro-2,1,3-benzoksadiazolu, o wzorze 1 znajduje zastosowanie w procedurze detekcji kwasu chlorowego(I) w układach biologicznych, gdyż nie wykazuje reaktywności wobec glutationu, który jest związkiem występującym w środowisku komórkowym w dużym stężeniu.

Przedmiot wynalazku ilustruje poniższy przykład z powołaniem się na rysunek, na którym fig. 1 przedstawia chromatogram pochodnej 4-nitro-2,1,3-benzoksadiazolu, o wzorze 1 oraz zmiany jakie

powstają przy dodawaniu kwasu chlorowego(I) do pochodnej o wzorze 1, fig. 2 i 3 przedstawiają zmiany widm fluorescencyjnych oraz selektywność pochodnej 4-nitro-2,1,3-benzoksadiazolu, o wzorze 1, względem kwasu chlorowego(I), nadtlenu wodoru, nadtlenoazotynu oraz glutationu.

Części podane w przykładach oznaczają części wagowe.

Przykład

0,2 części 4-chloro-7-nitrobenzoksadiazolu (NBD-Cl) rozpuszczono w 5 częściach chloroformu i dodano 0,162 części tiomorfoliny oraz 0,12 części trietyloaminy, po czym całość mieszano w temperaturze 50°C w czasie 5 minut w atmosferze argonu z wykorzystaniem pola mikrofalowego o mocy 50 W. Następnie mieszaninę reakcyjną odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, dodano 30 części 20% kwasu cytrynowego i ekstrahowano za pomocą 30 części dichlorometanu. Fazę organiczną przemyto 30 częściami wody destylowanej i 30 częściami nasyconego roztworu wodorowęglanu sodu. Po odparowaniu rozpuszczalnika pod zmniejszonym ciśnieniem surowy produkt oczyszczono na drodze chromatografii kolumnowej stosując jako eluent mieszaninę dichlorometan/metanol 20 : 1 (v/v).

Otrzymano 4-tiomorfolino-7-nitro-2,1,3-benzoksadiazol o wzorze 1 z wydajnością 85%, w postaci ciemnoczerwonego proszku o temperaturze topnienia 182–185°C. Widmo ^1H NMR oraz widmo masowe HRMS-ESI otrzymanego związku:

^1H NMR (CDCl_3 , 250 MHz) d (ppm): 8.38 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H), 6.24 (d, $J = 8,9$ Hz, 1H), 4.39 (t, 4H), 2.82 (t, 4H);

HRMS (ESI): m/z 267,0557 ($[\text{M}+\text{H}]^+$)

HRMS (ESI-Na) m/z 289,0373 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$)

w pełni potwierdziły jego budowę.

Właściwości spektroskopowe w acetonitrylu (ACN) otrzymanego związku λ_{abs} [nm] (ϵ [$\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$]): 500 (22000), λ_{em} [nm]: 550, λ_{ex} [nm]: 500.

Wydajność kwantowa fluorescencji otrzymanego związku w ACN wynosiła 0,3%.

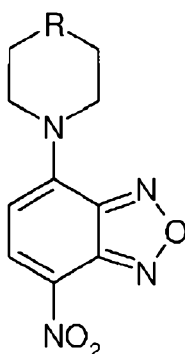
Przygotowano roztwór 0,00266 części 4-tiomorfolino-7-nitro-2,1,3-benzoksadiazolu o wzorze 1, oznaczonego jako NBD-TM, w 9,997 częściach acetonitrylu.

Przygotowano także roztwór 0,017 części kwasu chlorowego(I) (HOCl) w 9,983 częściach wody.

Następnie z przygotowanych roztworów sporządzono kompozycje zawierające 0,150 ml roztworu wyjściowego próbnika NBD-TM oraz 0–180 μl roztworu wyjściowego kwasu chlorowego(I).

Przygotowane kompozycje rozcieńczono do objętości 1,5 ml przez dodanie buforu fosforanowego o pH 7,4 (0,1 M). Po 1 minucie inkubacji próbek w temperaturze pokojowej wykonano analizy chromatograficzne przygotowanych próbek za pomocą chromatografu firmy Shimadzu z detektorem DAD (model SPD-M20A); kolumna Kinetex Core-Shell (C18) firmy Phenomenex (100 mm $\times$ 4,6 mm) o średnicy ziarna 2,6 μm ; faza ruchoma: woda + 0,1% TFA – acetonitryl + 0,1% TFA o gradientowym przepływie od 10 do 100% acetonitryl + 0,1% TFA przez 15 minut, v/v; szybkość przepływu 1,5 ml/minutę; objętość pobieranej próbki: 20 μl .

Przeprowadzony eksperyment z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej potwierdził zastosowanie pochodnej 4-nitro-2,1,3-benzoksadiazolu, o wzorze 1 do selektywnej detekcji kwasu chlorowego(I), w wyniku czego powstaje związek o wzorze 2,

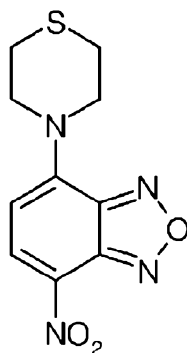


Wzór 2,

w którym R stanowi grupę SO, zarejestrowany po 1 minucie inkubacji NBD-TM z kwasem chlorowym(I) w środowisku o pH 7,4 (mieszanina acetonitrylu i 0,1 M wodnego roztworu buforu fosforanowego użytych w stosunku objętościowym 1 : 9) – fig. 1.

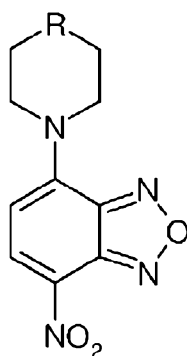
Zastrzeżenia patentowe

1. Zastosowanie pochodnej 4-nitro-2,1,3-benzoksadiazolu, o wzorze 1,



Wzór 1

- jako fluorescencyjnego próbnika do selektywnej detekcji kwasu chlorowego(I).
2. Zastosowanie według zastrz. 1, **znamiennie tym**, że detekcja kwasu chlorowego(I) przy użyciu jako próbnika pochodnej 4-nitro-2,1,3-benzoksadiazolu, o wzorze 1, określonej w zastrzeżeniu 1, polega na tym, że próbnik poddaje się reakcji z badanym związkiem, stosując 1–140% molowych badanego związku w stosunku do ilości próbnika, w środowisku mieszaniny acetonitrylu i 0,1 M wodnego roztworu buforu fosforanowego użytych w stosunku objętościowym 1 : 9, o pH 7,4, w czasie inkubacji do 1 minuty, po czym identyfikuje się produkt tej reakcji i zidentyfikowanie jako produktu związku o wzorze 2,



Wzór 2

w którym R stanowi grupę SO oznacza, że badany związek stanowi lub zawiera kwas chlorowy(I).

Rysunki

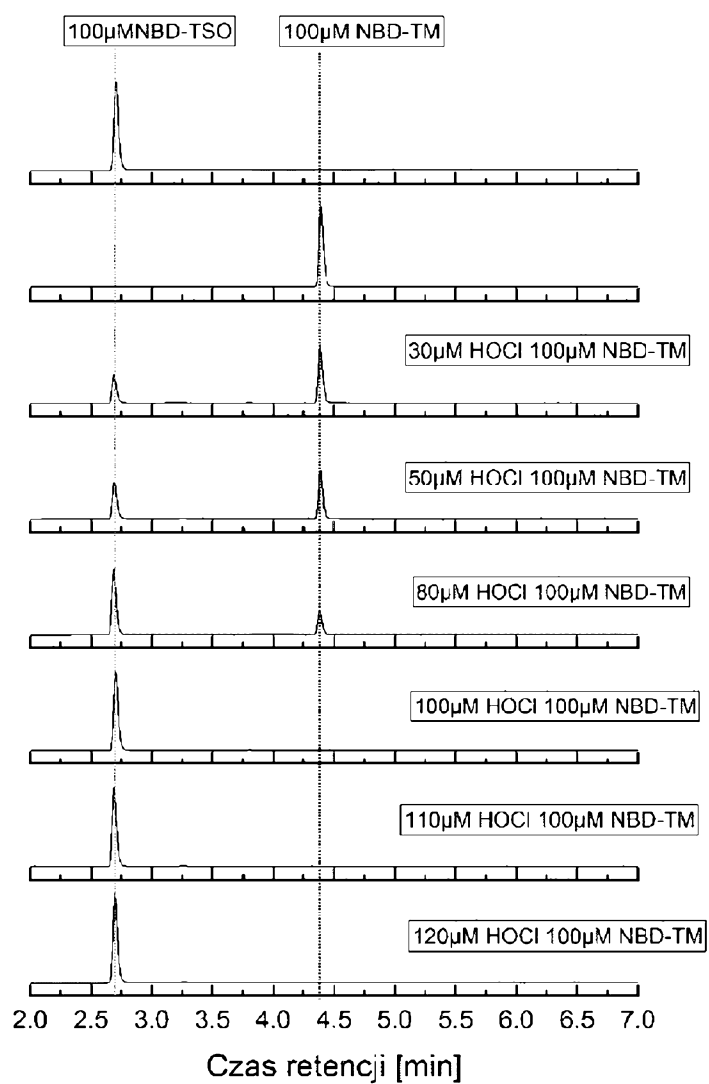


Fig. 1

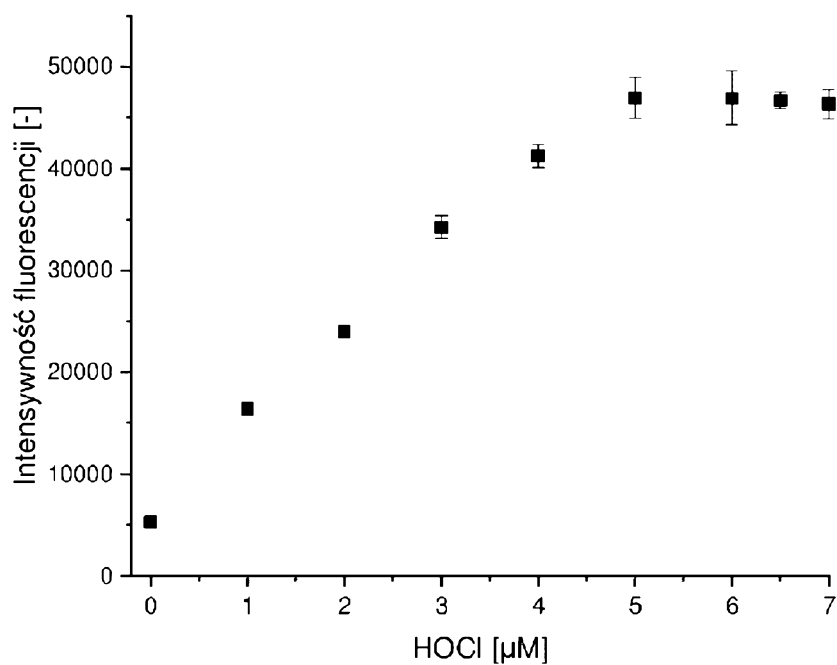
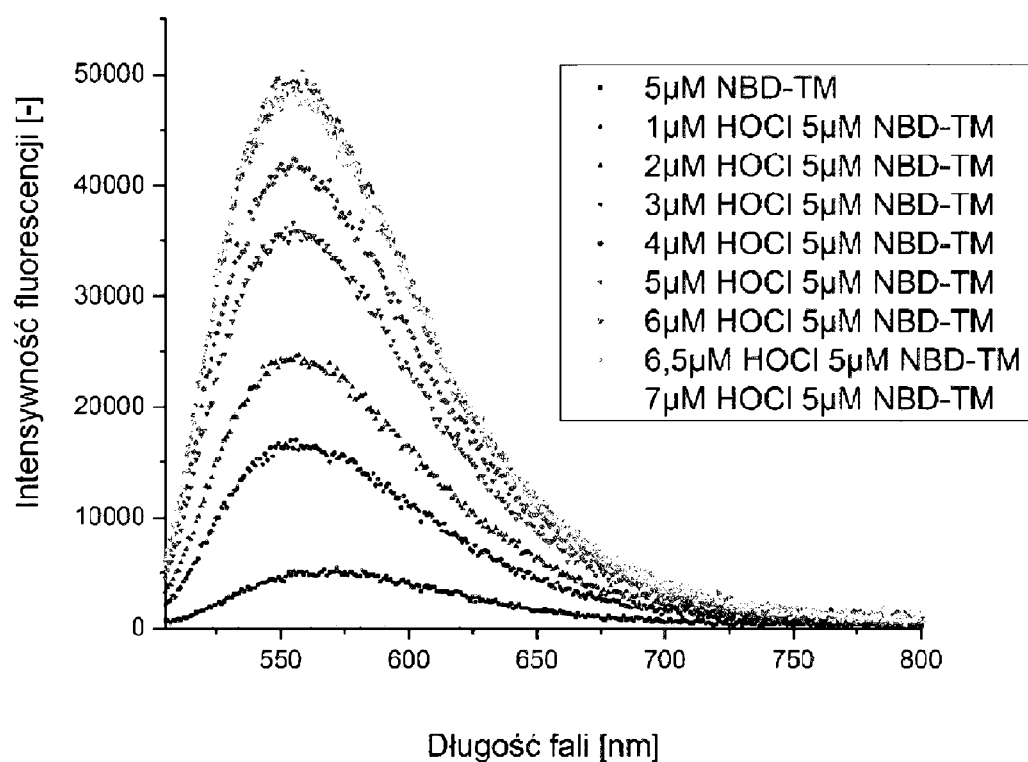


Fig. 2

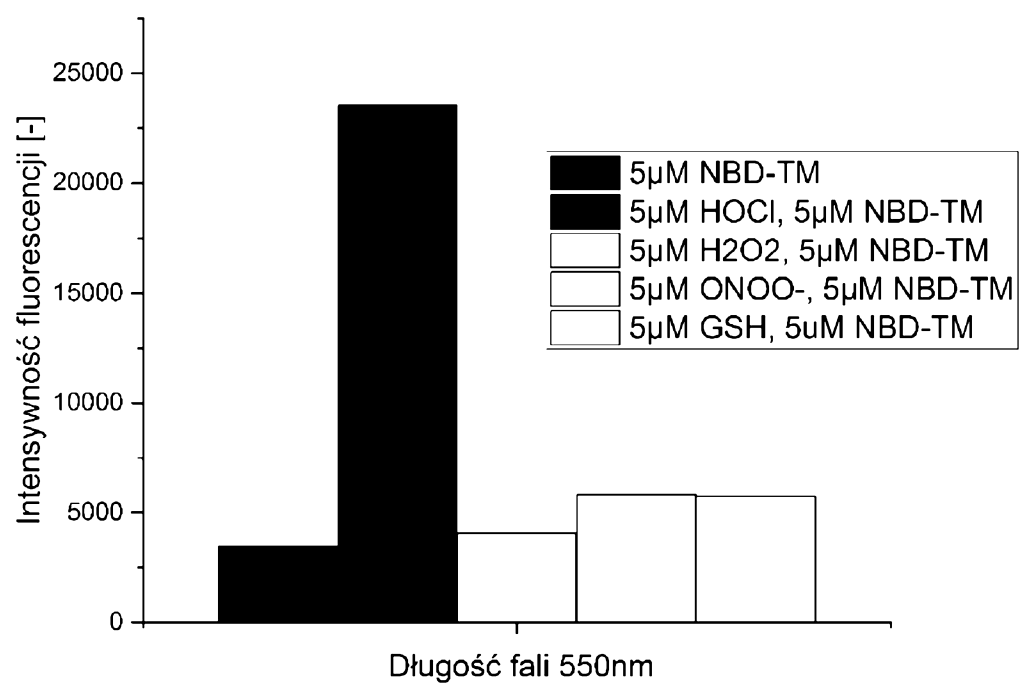


Fig. 3