

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10)

PL 245694 B1

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **440325**

(22) Data zgłoszenia: **2022.02.08**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2023.08.14 BUP 33/2023**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2024.09.23 WUP 39/2024**

(51) MKP:

C09K 11/06 (2006.01)

C07D 421/02 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:
POLITECHNIKA ŁÓDZKA, Łódź, PL

(72) Twórca(-y) wynalazku:
MAŁGORZATA ŚWIERCZYŃSKA, Brzeziny, PL
RADOSŁAW PODSIADŁY, Łódź, PL

(74) Pełnomocnik:
rzecz. pat. Ewa Kaczur-Kaczyńska, Łódź, PL

(54) Tytuł:

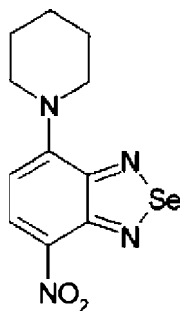
Związki, pochodne 4-nitro-2,1,3-benzenoselenodiazolu, sposób ich otrzymywania oraz ich zastosowanie

PL 245694 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku są związki, pochodne 4-nitro-2,1,3-benzenoselenodiazolu sposób ich otrzymywania oraz ich zastosowanie.

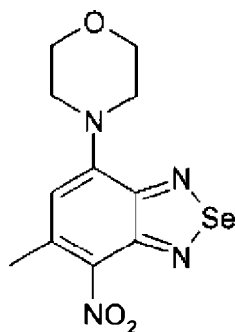
Z opisu zgłoszenia patentowego WO 2020187913 jest znany związek, pochodna selenobenzodiazolu, o wzorze a,



Wzór a,

Związek o wzorze a otrzymuje się w reakcji fluoro-7-nitrobenzo [c] [1,2,5] selenadiazolu z pirydyną, prowadzonej w środowisku acetonitrylu, w obecności dietyloaminy, w temperaturze pokojowej w czasie 5 minut.

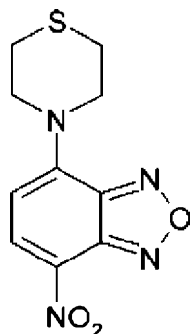
Z czasopisma *Indian Journal of Chemistry – Section B Organic and Medicinal Chemistry*, 1990, 29 (8), 781–783 znana jest pochodna 4-nitro-2,1,3-benzoksadiazolu, o wzorze b,



Wzór b,

Związek o wzorze b otrzymuje się w reakcji kondensacji 7-bromo-5-metylo-4-nitro-2,1,3-benzoselenodiazolu z morfoliną, prowadzonej w trakcie ogrzewania w czasie 24 godziny.

Z opisu zgłoszenia patentowego US2005282818, a także z czasopisma *ChemMedChem*, 2015, 10(5), 797–803 jest znany związek, pochodna benzoksadiazolu, o wzorze c,

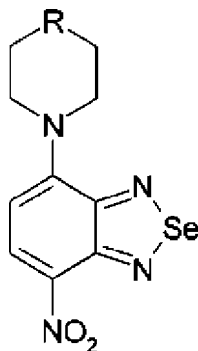


Wzór c,

Związek o wzorze c otrzymuje się w reakcji 4-chloro-7-nitro-2,1,3-benzoksadiazolu z tiomorfoliną, w środowisku dimetyloformamidu, w czasie 15 minut, w łaźni lodowej, a następnie w temperaturze pokojowej w czasie 50 minut.

Celem wynalazku jest otrzymanie nowych związków – pochodnych 4-nitro-2,1,3-benzenoselenodiazolu, które znajdują zastosowanie w badaniach komórkowych do śledzenia procesów biologiczno-chemicznych oraz do detekcji fluorescencyjnej kwasu chlorowego(I).

Przedmiotem wynalazku są związki, pochodne 4-nitro-2,1,3-benzenoselenodiazolu, o wzorze ogólnym 1,

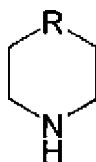


Wzór 1

w którym R oznacza atom S lub grupę SO.

Związki o wzorze 1 mają postać ciał stałych (proszków) o barwie czerwonej, o temperaturze topnienia 210°C gdy R oznacza atom S i temperaturze topnienia >360°C gdy R oznacza grupę SO.

Sposób otrzymywania związków o wzorze 1, określonych powyżej, w reakcji 4-nitro-2,1,3-benzenoselenodiazolu z pochodną morfoliny, **według wynalazku** polega na tym, że 4-nitro-2,1,3-benzenoselenodiazol poddaje się reakcji z pochodną morfoliny, o wzorze 2,



Wzór 2

w którym R oznacza atom S lub grupę SO, w obecności trietyloaminy, w atmosferze gazu obojętnego, przy stosunku wagowym 4-nitro-2,1,3-benzenoselenodiazol/pochodna morfoliny/trietyloamina 0,2 części wagowe: 0,162 części wagowe: 0,12 części wagowych, w środowisku chloroformu użytego w ilości 5 części wagowych/0,2 części wagowe 4-nitro-2,1,3-benzenoselenodiazolu, w temperaturze 50°C w czasie 15 godzin, a po zakończeniu tej reakcji usuwa się rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem i do pozostałego produktu tej reakcji dodaje się 20% roztwór wodny kwasu cytrynowego w ilości 30 części wagowych/0,2 części wagowe 4-nitro-2,1,3-benzenoselenodiazolu, ekstrahuje dichlorometanem użytym w ilości 30 części wagowych/0,2 części wagowe 4-nitro-2,1,3-benzenoselenodiazolu, pozostałą fazę organiczną przemywa się kolejno wodą, nasyconym roztworem wodorowęglanu sodu, usuwa rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem i produkt finalny oczyszcza się na drodze chromatografii kolumnowej stosując jako eluent mieszaninę dichlorometan/metanol o stosunku objętościowym 20:1 (v/v).

Zastosowanie **według wynalazku** polega na tym, że związek o wzorze 1, w którym R oznacza atom S (NBD-Se-TM), 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 kwasem chlorowym(I) stosując 1–160% molowych kwasu chlorowego(I) 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 i w wyniku tej reakcji otrzymuje się związek o wzorze 1, w którym R oznacza grupę SO (NBD-Se-TSO).

Dzięki zastosowaniu nowych związków o wzorze 1, w którym R oznacza atom S jako próbników do detekcji kwasu chlorowego(I), ułatwiona jest identyfikacja próbniaka i produktów jego utleniania, a pośrednio również analiza jakościowa i ilościowa kwasu HOCl, bez konieczności identyfikacji niepożądanych produktów reakcji – związków o wzorze 1 z glutationem. Zaletą zastosowania związku o wzorze 1, w którym R oznacza atom S do detekcji kwasu chlorowego(I) jest krótki czas detekcji oraz selektywne powstawanie produktu, stanowiącego jednoznaczne potwierdzenie obecności wykrywanego kwasu chlorowego(I). Związek o wzorze 1, w którym R oznacza atom S 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. Związek o wzorze 1, w którym R oznacza grupę SO nie powstaje przy próbie użycia związku o wzorze 1, w którym R oznacza atom S, do wykrycia innych biologicznych utleniaczy, takich jak H_2O_2 i nadtlenoazotyn. Związki o wzorze 1, w którym R oznacza grupę S lub SO mogą być potencjalnie wykorzystane w badaniach komórkowych do zastosowania w śledzeniu procesów biologiczno-chemicznych.

Przedmiot wynalazku ilustrują poniższe przykłady, z powołaniem się na rysunek, na którym Fig. 1 przedstawia chromatogram związku o wzorze 1, w którym R oznacza atom S, zastosowanego jako próbnik do detekcji kwasu chlorowego(I), Fig. 2 i 3 oznaczają odpowiednio widmo fluorescencyjne oraz selektywność związku o wzorze 1, w którym R oznacza atom S, względem kwasu chlorowego(I), azotu oraz glutationu. Części podane w przykładach oznaczają części wagowe.

Przykład 1

0,2 części 4-nitro-2,1,3-benzenoselenodiazolu (NBD-Se-Cl) rozpuszczono w 5 częściach chloroformu, dodano 0,162 części tiomorfoliny oraz 0,12 części trietyloaminy, po czym całość mieszano w temperaturze 50°C w czasie 15 godzin w atmosferze argonu. Następnie mieszaninę reakcyjną odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, dodano 30 części 20% roztworu wodnego 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-benzenoselenodiazol (NBD-Se-TM) z wydajnością 85%, w postaci ciemnoczerwonego proszku o temperaturze topnienia 210°C .

Widmo ^1H NMR oraz widmo masowe HRMS-ESI otrzymanego związku:

^1H NMR (CDCl_3 , 250 MHz) d (ppm): 8.55 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 6.47 (d, $J = 8.9$ Hz, 1H), 4.39 – 4.03 (m, $J = 10.3$ Hz, 4H), 3.02 – 2.76 (m, $J = 5.2$ Hz, 4H);

HRMS (ESI): m/z 330.9773 ($[\text{M}+\text{H}]^+$)

HRMS (ESI-Na) m/z 352.9590 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$)

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.

Przykład 2

0,2 części 4-nitro-2,1,3-benzenoselenodiazolu (NBD-Se-Cl) rozpuszczono w 5 częściach chloroformu, dodano 0,162 części monotlenku tiomorfoliny oraz 0,12 części trietyloaminy, po czym całość mieszano w temperaturze 50°C w czasie 15 godzin w atmosferze argonu. Następnie mieszaninę reakcyjną odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem, dodano 30 części 20% roztworu wodnego 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-monotlenek tiomorfolino-7-nitro-2,1,3-benzenoselenodiazol (NBD-Se-TSO) z wydajnością 80% w postaci ciemnoczerwonego proszku o temperaturze topnienia $>360^\circ\text{C}$.

Widmo ^1H NMR oraz widmo masowe HRMS-ESI otrzymanego związku:

^1H NMR (DMSO , 250 MHz) d (ppm): 8.50 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H), 6.81 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 4.73 (d, $J = 15$ Hz, 2H), 4.23 (d, $J = 11.9$ Hz, 2H), 3.09 (d, $J = 14.3$ Hz, 2H), 2.92 – 2.62 (m, 2H);

HRMS (ESI): m/z 346.9720 ($[\text{M}+\text{H}]^+$)

HRMS (ESI-Na) m/z 368.9539 ($[\text{M}+\text{H}]^+$)

w pełni potwierdziły jego budowę.

Właściwości spektroskopowe w acetonitrylu (ACN) otrzymanego związku:

λ_{abs} [nm] (ϵ [$\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$]): 500 (16760), λ_{em} [nm]: 620, λ_{ex} [nm]: 500.

Przykład 3

Przygotowano roztwór próbnika tj. roztwór 0,00329 części 4-tiomorfolino-7-nitro-2,1,3-benzenoselenodiazolu (związku o wzorze 1, w którym R oznaczał atom S (NBD-Se-TM) w 9,997 częściach acetonitrylu.

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

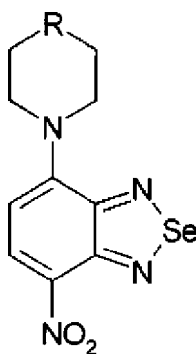
Następnie z przygotowanych roztworów sporządzono kompozycje zawierające 0,150 ml roztworu wyjściowego próbnika NBD-Se-TM oraz 0–80 μ l roztworu wyjściowego kwasu chlorowego(I).

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 x 4,6 mm) o średnicy ziarna 2,6 μ m; 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 μ l.

Przeprowadzony eksperyment potwierdził powstawanie produktu utlenienia próbnika NBD-Se-TM z kwasem chlorowym(I) tj. związku o wzorze 1, w którym R oznacza grupę SO (NBD-Se-TSO), a tym samym potwierdził, za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją diodową, zastosowanie próbnika NBD-Se-TM do detekcji kwasu chlorowego(I) – Fig. 1 rysunku przedstawiająca chromatogramy (detektor DAD 450 nm) zarejestrowane po 1 minucie inkubacji próbnika NBD-Se-TM (50 μ M) z kwasem chlorowym(I) (0–80 μ M) w środowisku o pH 7,4 (mieszanina acetonitrylu i 0,1 M wodnego roztworu bufora fosforanowego użytych w stosunku objętościowym 1:9).

Zastrzeżenia patentowe

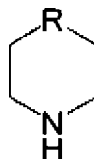
1. Związki, pochodne 4-nitro-2,1,3-benzenoselenodiazolu, o wzorze 1,



Wzór 1

w którym R oznacza atom S lub grupę SO.

2. Sposób otrzymywania związków o wzorze 1, określonych w zastrzeżeniu 1, w reakcji 4-nitro-2,1,3-benzenoselenodiazolu z pochodną morfoliny, **znamienny tym**, że 4-nitro-2,1,3-benzenoselenodiazol poddaje się reakcji z pochodną morfoliny, o wzorze 2,



Wzór 2

w którym R oznacza atom S lub grupę SO, w obecności trietyloaminy, w atmosferze gazu obojętnego, przy stosunku wagowym 4-nitro-2,1,3-benzenoselenodiazol/pochodna morfoliny/trietyloamina 0,2 części wagowe: 0,162 części wagowe: 0,12 części wagowych, w środowisku chloroformu użytego w ilości 5 części wagowych/0,2-części wagowe 4-nitro-2,1,3-benzenoselenodiazolu, w temperaturze 50°C w czasie 15 godzin, a po zakończeniu tej reakcji usuwa się rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem i do pozostałego produktu tej reakcji dodaje się 20% roztwór wodny kwasu cytrynowego w ilości 30 części wagowych/0,2 części wagowe 4-nitro-2,1,3-benzenoselenodiazolu, ekstrahuje dichlorometanem użytym w ilości 30 części wagowych/0,2 części wagowe 4-nitro-2,1,3-benzenoselenodiazolu, pozostałą fazę organiczną przemywa się kolejno wodą, nasyconym roztworem wodorowęglanu sodu, usuwa rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem i produkt finalny oczyszcza się na drodze chromatografii kolumnowej stosując jako eluent mieszaninę dichlorometan/metanol o stosunku objętościowym 20:1 (v/v).

3. Zastosowanie związku o wzorze 1 określonego w zastrzeżeniu 1, w którym R oznacza atom S jako fluorescencyjnego próbnika do selektywnej detekcji kwasu chlorowego(I).
4. Zastosowanie według zastrz. 3, **znamiennie tym**, że detekcja kwasu chlorowego(I) przy użyciu związku o wzorze 1, w którym R oznacza atom S jako próbnika polega na tym, że próbnik ten poddaje się reakcji z kwasem chlorowym(I), stosując 1–160% molowych kwasu chlorowego(I) 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 i w wyniku tej reakcji otrzymuje się związek o wzorze 1, w którym R oznacza grupę SO.

Rysunki

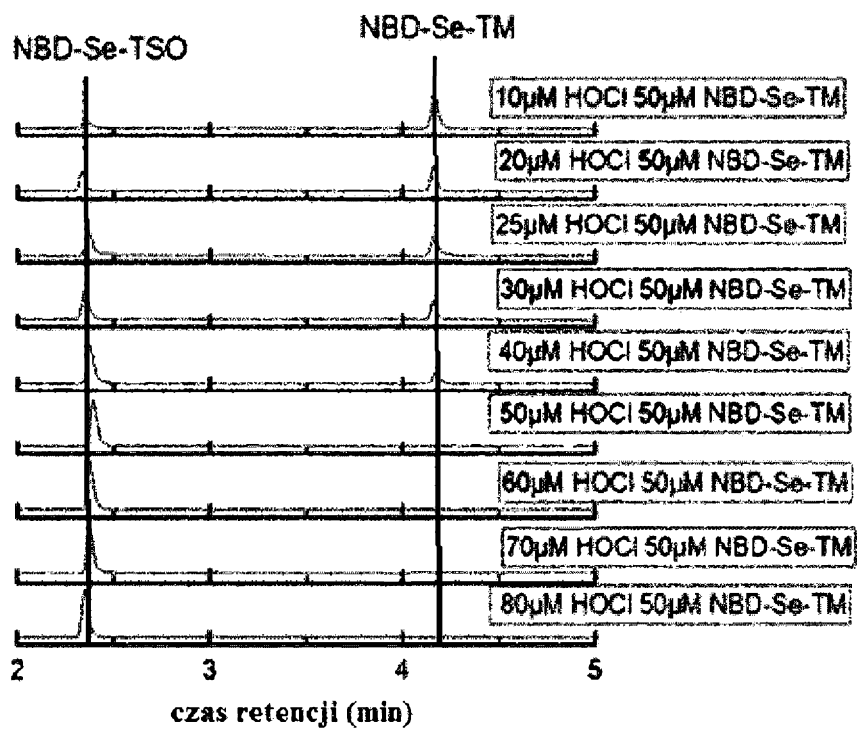


Fig. 1

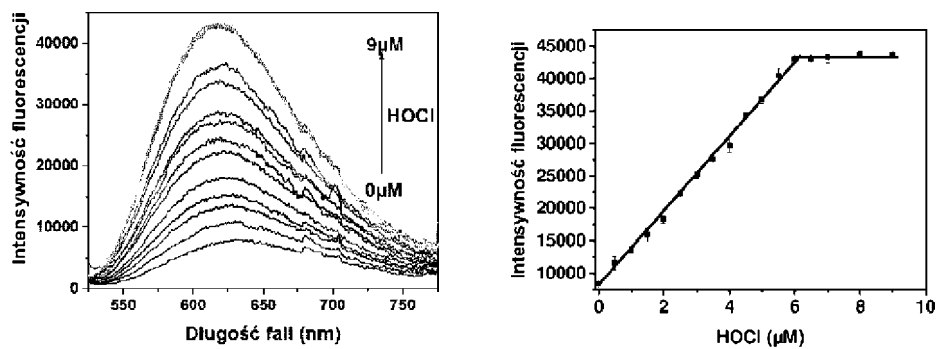


Fig. 2

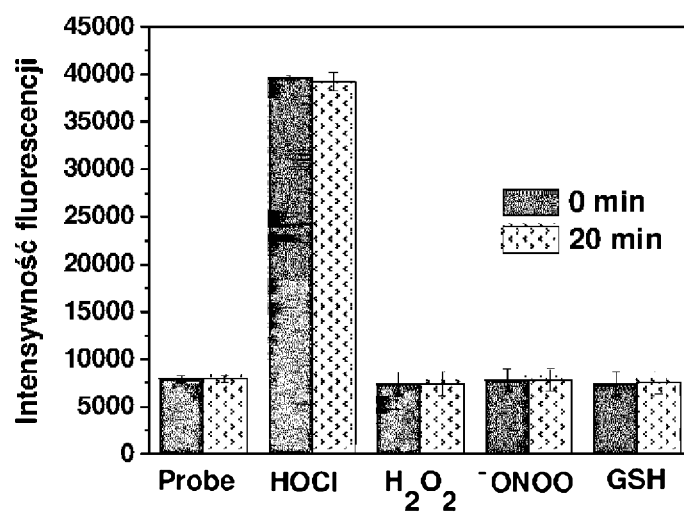


Fig. 3