

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **239295**
(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **430477**

(22) Data zgłoszenia: **03.07.2019**

(51) Int.Cl.
C07D 265/38 (2006.01)
C07D 265/34 (2006.01)

(54) **Związki, pochodne 5H-benzo[a]fenoksazyno-5-onu,
sposób ich wytwarzania oraz zastosowanie**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
11.01.2021 BUP 01/21

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
22.11.2021 WUP 34/21

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

(72) Twórca(y) wynalazku:
RADOSŁAW PODSIADŁY, Łódź, PL
ALEKSANDRA GRZELAKOWSKA, Łódź, PL
MARCIN SZALA, Chorzów, PL
JULIA MODRZEJEWSKA, Kutno, PL
PRZEMYSŁAW SIARKIEWICZ, Łódź, PL
DANIEL SŁOWIŃSKI, Proćwin, PL
MAŁGORZATA ŚWIERCZYŃSKA, Brzeziny, PL

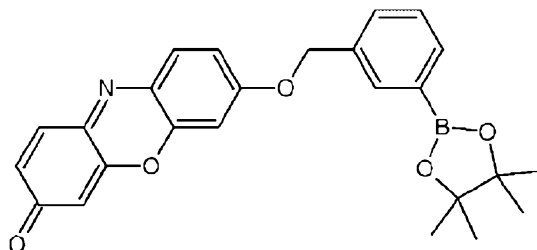
(74) Pełnomocnik:
rzecz. pat. Ewa Kaczur-Kaczyńska

PL 239295 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku są nowe związki, pochodne 5H-benzo[a]fenoksazyno-5-onu, sposób ich wytwarzania oraz zastosowanie.

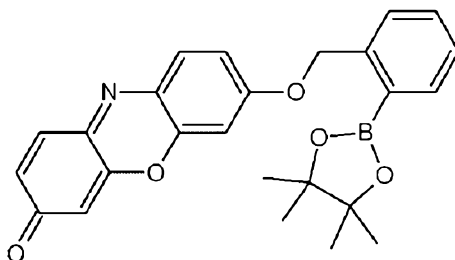
Z czasopisma Analytical Chemistry, 2018, 90, 855–858 znany jest związek, pochodna 7-hydroksy-3H-fenoksazyno-3-onu (rezorufiny), o wzorze a,



Wzór a,

Związek o wzorze a otrzymuje się w reakcji 7-hydroksy-3H-fenoksazyno-3-onu (rezorufiny) z estrem pinakolowym kwasu 3-bromometylofenyloboronowego, w środowisku bezwodnego N,N-dimetyloformamidu, w obecności węglanu potasu, w temperaturze pokojowej w czasie 24 godzin.

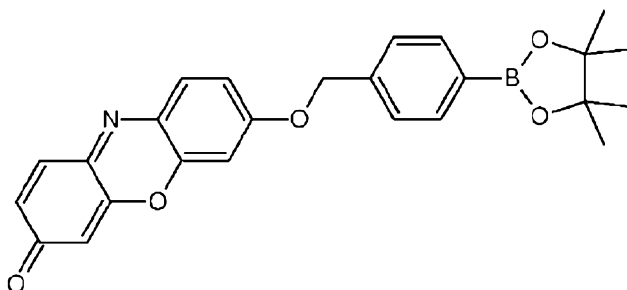
W czasopiśmie Chemical Communications, 2012, 48, 2809–2811 ujawniono związek, pochodną 7-hydroksy-3H-fenoksazyno-3-onu (rezorufiny), o wzorze b,



Wzór b,

Związek o wzorze b otrzymuje się w reakcji soli sodowej 7-hydroksy-3H-fenoksazyno-3-onu (soli sodowej rezorufiny) z estrem pinakolowym kwasu 2-bromometylofenylo-boronowego, w środowisku N,N-dimetyloformamidu, w obecności węglanu potasu, w temperaturze pokojowej, w czasie 24 godzin.

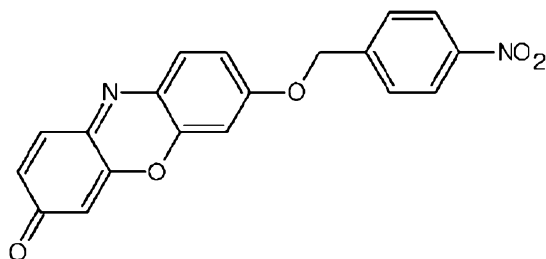
Znana jest także, z czasopisma Chemistry – A European Journal, 2015, 21, 15167–15172, pochodna 7-hydroksy-3H-fenoksazyno-3-onu (rezorufiny), o wzorze c,



Wzór c,

Pochodną o wzorze c otrzymuje się w reakcji 7-hydroksy-3H-fenoksazyno-3-onu (rezorufiny) z estrem pinakolowym kwasu 4-bromometylofenyloboronowego, w środowisku N,N-dimetyloformamidu, w obecności węglanu cezu, w temperaturze pokojowej w czasie 24 godzin.

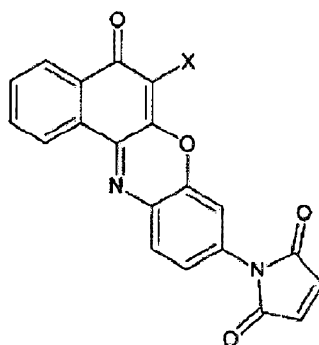
Z czasopisma ChemRxiv Preprint, 2018 znana jest pochodna 7-hydroksy-3H-fenoksazyno-3-onu (rezorufiny), o wzorze d,



Wzór d

Pochodną o wzorze d otrzymuje się w reakcji soli sodowej 7-hydroksy-3H-fenoksazyno-3-onu (soli sodowej rezorufiny) z 1-(bromometylo)-4-nitrobenzenem, w środowisku N,N-dimetyloformamidu, w obecności węglanu potasu, w temperaturze 100°C w czasie 17 godzin.

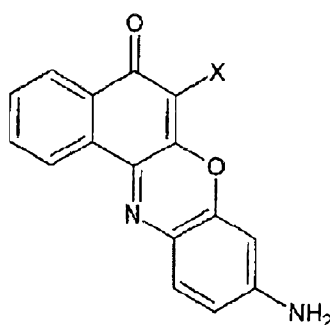
Z opisu patentowego PL 231073 są znane związki, pochodne 5H-benzo[*a*]fenoksazyno-5-onu, które stanowią pochodne 9-maleimido-5H-benzo[*a*]fenoksazyno-5-onu, o wzorze e,



Wzór e

w którym X oznacza atom wodoru, chloru lub bromu.

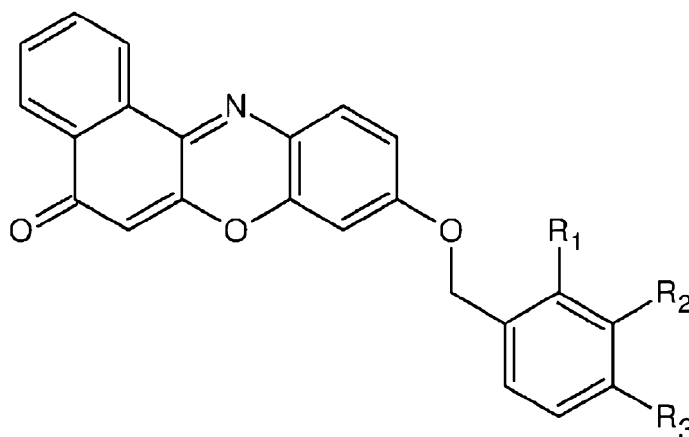
Związki o wzorze e otrzymuje się z pochodnej 5H-benz[*a*]fenoksazyno-5-onu o wzorze f,



Wzór f

w którym X ma wyżej wymienione znaczenie, którą poddaje się reakcji z bezwodnikiem maleinowym w środowisku chloroformu, w temperaturze wrzenia chloroformu, w czasie 45–55 godzin, po czym produkt tej reakcji, po przemyciu chloroformem, poddaje się reakcji domykania pierścienia maleimidu w obecności octanu sodu, w środowisku bezwodnika octowego, w temperaturze 100°C w czasie 2–5 godzin, a następnie odfiltrowuje się produkt finalny, który przemycza się wodą.

Przedmiotem wynalazku są związki, pochodne 5H-benzo[a]fenoksazyno-5-onu, o wzorze 1,

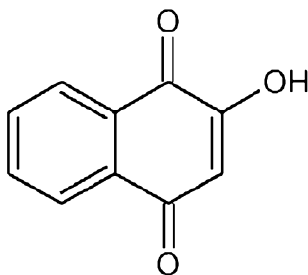


Wzór 1

w którym R_1 , R_2 i R_3 oznaczają niezależnie od siebie atom wodoru, grupę nitrową, boronową, grupę estrową kwasu boronowego.

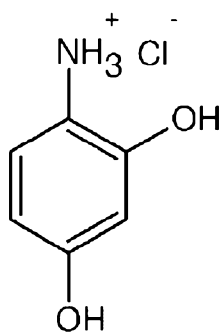
Związki o wzorze 1 stanowią ciała stałe (proszki) o barwie pomarańczowej, o temperaturze topnienia 195–325°C i znajdują zastosowanie jako barwniki fluoryzujące.

Sposób otrzymywania związków o wzorze 1, określonych powyżej, **według wynalazku** polega na tym, że 2-hydroksy-1,4-naftochinon o wzorze 2,



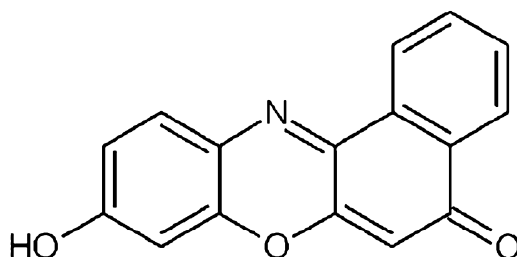
Wzór 2

poddaje się reakcji z chlorowodorkiem 4-aminorezorcyny o wzorze 3,



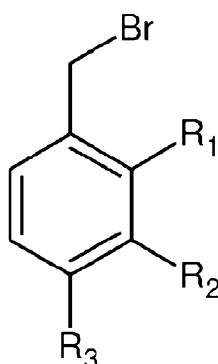
Wzór 3

przy stosunku molowym substratów 1 : 1, w środowisku kwasu octowego o stężeniu 80% użytego w ilości 57 moli na 1 mol substratów, w atmosferze gazu obojętnego, w temperaturze 80–150°C w czasie 15–45 minut, z wykorzystaniem pola mikrofalowego o mocy 10–300 W. Produkt tej reakcji, 9-hydroksy-5H-benzo[a]fenoksazyno-5-on o wzorze 4,



Wzór 4

po oczyszczeniu na drodze chromatografii kolumnowej, poddaje się reakcji z pochodną (bromometylo)benzenu o wzorze 5,



Wzór 5

w którym R_1 , R_2 i R_3 mają wyżej podane znaczenie, przy stosunku molowym substratów 1 : 1,3, w środowisku bezwodnego N,N-dimetyloformamidu, w obecności węgla metalu alkalicznego, takiego jak węgiel sodu, węgiel potasu lub węgiel cezu, użytego w ilości 1,3 mola na 1 mol związku o wzorze 4, w atmosferze gazu obojętnego, w temperaturze 50–80°C w czasie 15–90 minut, z wykorzystaniem pola mikrofalowego o mocy 10–300 W, po czym odfiltrowuje się produkt finalny, który przemywa się wodą, lub uzyskaną mieszaninę poreakcyjną rozcieńcza się octanem etylu, fazę organiczną przemywa się kolejno nasyconym roztworem octanu amonu, wodą oraz nasyconym roztworem chlorku sodu, a następnie usuwa się rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowy produkt oczyszcza się na drodze chromatografii kolumnowej.

Zastosowanie **według wynalazku** polega na tym, że związki o wzorze 1, w których R_1 , R_2 i R_3 oznaczają niezależnie od siebie grupę boronową lub grupę estru pinakolowego kwasu boronowego, stosuje się jako kolorymetryczne i fluorescencyjne próbki do detekcji reaktywnych form tlenu i azotu, zwłaszcza nadtlenku wodoru, kwasu chlorowego(I) lub nadtlenoazotynu. Zastosowanie to polega na reakcji próbki z nadtlenkiem wodoru, kwasem chlorowym(I) lub nadtlenoazotynem, użytymi w ilości 1–300% molowych w stosunku do ilości próbki, w środowisku mieszaniny acetonitrylu i 0,1 M wodnego roztworu buforu fosforanowego użytych w stosunku objętościowym 1 : 4, o pH 5,7–8,0, w czasie inkubacji do 1440 minut.

Nowe próbki według wynalazku, w porównaniu ze znanymi próbnikami pochodnymi kwasu boronowego, opartymi na szkielecie rezorufiny (wzór a, b, c), nie wykazują reaktywności wobec glutationu, który jest związkiem występującym w środowisku komórkowym w dużym stężeniu. Dzięki temu próbki według wynalazku umożliwiają detekcję reaktywnych form tlenu i azotu z pominięciem identyfikacji niepożądanych produktów reakcji tych próbników z glutationem. Nadto próbki według wynalazku wykazują odpowiedź kolorymetryczną i fluorescencyjną wobec reaktywnych form tlenu i azotu ze znacznym batochromowym przesunięciem maksimum pasma absorpcji i emisji w warunkach pH fizjologicznego, dzięki czemu ułatwiona jest identyfikacja próbki i produktu jego utleniania, a pośrednio również analiza jakościowa i ilościowa analitów.

Przedmiot wynalazku ilustrują poniższe przykłady, z powołaniem się na rysunek, na którym fig. 1 przedstawia chromatogram związku o wzorze 1, zastosowanego jako próbnik do detekcji reaktywnych form tlenu, z zastosowaniem nadtlenu wodoru jako reagenta, fig. 2 i 3 – widma absorpcyjne związku o wzorze 1, zastosowanego jako próbnik do detekcji reaktywnych form tlenu, z zastosowaniem nadtlenu wodoru jako reagenta. Części podane w przykładach oznaczają części wagowe.

Przykład 1.

0,175 części 2-hydroksy-1,4-naftochinonu i 0,162 części chlorowodoru 4-amino-rezorcyny rozpuszczono w 4,3 częściach 80% kwasu octowego, po czym całość mieszano w temperaturze 150°C w atmosferze argonu przez 15 minut. Następnie mieszaninę reakcyjną rozcieńczono 20 częściami wody i ekstrahowano za pomocą 30 części dichlorometanu. Po odparowaniu rozpuszczalnika pod zmniejszonym ciśnieniem surowy produkt oczyszczono na drodze chromatografii kolumnowej stosując jako eluent mieszaninę dichlorometan/metanol 20 : 1 (v/v). Otrzymano 0,060 części 9-hydroksy-5H-benzo[a]fenoksazyno-5-onu o wzorze 4 z wydajnością 23%, w postaci ciemnoczerwonego proszku o temperaturze topnienia 303–305°C.

Widmo ^1H NMR oraz widmo masowe ES otrzymanego związku w pełni potwierdziły jego budowę:

^1H NMR (250 MHz, CDCl_3): δ 6,32 (s, 1H), 6,75 (d, $J = 2,3$ Hz, 1H), 6,83 (dd, $J_1 = 8,7$ Hz, $J_2 = 2,4$ Hz, 1H), 7,60 (d, $J = 8,7$ Hz, 1H), 7,62–7,74 (m, 2H), 8,20 (d, $J = 7,3$ Hz, 1H), 8,62 (d, $J = 6,9$ Hz, 1H)

MS (ES): m/z 264,0668 ($[\text{M}+\text{H}]^+$)

Właściwości spektroskopowe w dimetylosulfotlenku (DMSO):

λ_{abs} [nm] (ϵ [$\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$]): 458 (6500)

λ_{em} [nm]: 571

λ_{ex} [nm]: 458

Wydajność kwantowa fluorescencji otrzymanego związku w DMSO wynosiła 0,41. Następnie 0,015 części otrzymanego 9-hydroksy-5H-benzo[a]fenoksazyno-5-onu rozpuszczono w 1,9 częściach bezwodnego N,N-dimetyloformamidu, po czym dodano 0,010 części węglanu potasu i całość mieszano w temperaturze pokojowej w atmosferze argonu przez 5 minut. Po tym czasie, do tak przygotowanego roztworu dodano 0,013 części (bromometylo)benzenu i całość mieszano w temperaturze 60°C w atmosferze argonu przez 45 minut, przy zastosowaniu pola mikrofalowego o zmiennej mocy 10300 W. Po ochłodzeniu do temperatury pokojowej mieszaninę reakcyjną rozcieńczono 12 częściami octanu etylu. Fazę organiczną przemyto kolejno 10 częściami nasyconego roztworu chlorku amonu, 10 częściami wody i 10 częściami nasyconego roztworu chlorku sodu. Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowy produkt oczyszczono na drodze chromatografii kolumnowej stosując jako eluent mieszaninę dichlorometan/metanol 20 : 1 (v/v).

Otrzymano 0,019 części związku (wydajność 94%) o wzorze 1, w którym R_1 , R_2 i R_3 oznaczały atom wodoru, w postaci pomarańczowego proszku o temperaturze topnienia 233–235°C.

Widmo ^1H NMR oraz widmo masowe ES otrzymanego związku w pełni potwierdziły jego budowę:

^1H NMR (250 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 5,30 (s, 2H), 6,38 (s, 1H), 7,10–7,16 (m, 2H), 7,32–7,54 (m, 5H), 7,75–7,94 (m, 3H), 8,17 (dd, $J_1 = 7,6$ Hz, $J_2 = 1,6$ Hz, 1H), 8,64 (dd, $J_1 = 7,4$ Hz, $J_2 = 1,8$ Hz, 1H)

MS (ES): m/z 354,1139 ($[\text{M}+\text{H}]^+$)

Właściwości spektroskopowe w dimetylosulfotlenku (DMSO):

λ_{abs} [nm] (ϵ [$\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$]): 453 (15300)

λ_{em} [nm]: 568

λ_{ex} [nm]: 453

Wydajność kwantowa fluorescencji otrzymanego związku w DMSO wynosiła 0,21.

Przykład 2.

9-hydroksy-5H-benzo[a]fenoksazyno-5-on otrzymano postępując analogicznie jak w przykładzie 1.

Następnie 0,025 części otrzymanego 9-hydroksy-5H-benzo[a]fenoksazyno-5-onu rozpuszczono w 3,8 częściach bezwodnego N,N-dimetyloformamidu, po czym dodano 0,017 części węglanu potasu i całość mieszano w temperaturze pokojowej w atmosferze argonu przez 5 minut. Do tak przygotowanego roztworu dodano 0,027 części 1-(bromometylo)-4-nitrobenzenu i całość mieszano w temperaturze 80°C w atmosferze argonu przez 45 minut, przy zastosowaniu pola mikrofalowego o zmiennej mocy 10–300 W. Powstały po tym czasie osad odsączono i przemyto dichlorometanem.

Otrzymano 0,010 części związku (wydajność 26%) o wzorze 1, w którym R_1 i R_2 oznaczały atom wodoru, a R_3 oznaczało grupę nitrową, w postaci pomarańczowego proszku o temperaturze topnienia 323–325°C.

Widmo ^1H NMR oraz widmo masowe ES otrzymanego związku w pełni potwierdziły jego budowę:
 ^1H NMR (250 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 5,46 (s, 2H), 6,39 (s, 1H), 7,17 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H), 7,74–7,86 (m, 5H), 8,17 (dd, $J_1 = 7,1$ Hz, $J_2 = 1,9$ Hz, 1H), 8,26 (d, $J = 8,7$ Hz, 2H), 8,65 (dd, $J_1 = 7,3$ Hz, $J_2 = 2,0$ Hz, 1H)
MS (ES): m/z 399,0977 ($[\text{M}+\text{H}]^+$)

Właściwości spektroskopowe w dimetylosulfotlenku (DMSO):

λ_{abs} [nm] (ϵ [$\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$]): 450 (12100)

λ_{em} [nm]: 565

λ_{ex} [nm]: 450

Wydajność kwantowa fluorescencji otrzymanego związku w DMSO wynosiła 0,18.

Przykład 3.

9-hydroksy-5H-benzo[a]fenoksazyno-5-on otrzymano postępując analogicznie jak w przykładzie 1.

Następnie 0,042 części otrzymanego 9-hydroksy-5H-benzo[a]fenoksazyno-5-onu rozpuszczono w 1,9 częściach bezwodnego N,N-dimetyloformamidu, po czym dodano 0,029 części węgla potasu i całość mieszano w temperaturze pokojowej w atmosferze argonu przez 5 minut. Do tak przygotowanego roztworu dodano 0,061 części estru pinakolowego kwasu 4-bromometylofenyloboronowego i całość mieszano w temperaturze 60°C w atmosferze argonu przez 30 minut, przy zastosowaniu pola mikrofalowego o zmiennej mocy 10–300 W. Po ochłodzeniu do temperatury pokojowej mieszaninę reakcyjną rozcieńczono 16 częściami octanu etylu. Fazę organiczną przemyto kolejno 15 częściami nasyconego roztworu chlorku amonu, 15 częściami wody i 15 częściami nasyconego roztworu chlorku sodu. Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowy produkt oczyszczono na drodze chromatografii kolumnowej stosując jako eluent mieszaninę dichlorometanu/metanolu 20 : 1 (v/v).

Otrzymano 0,040 części związku (wydajność 52%) o wzorze 1, w którym R_1 i R_2 oznaczały atom wodoru, a R_3 oznaczało grupę estru pinakolowego kwasu boronowego, w postaci pomarańczowego proszku o temperaturze topnienia $195\text{--}197^\circ\text{C}$.

Widmo ^1H NMR oraz widmo masowe ES otrzymanego związku w pełni potwierdziły jego budowę:

^1H NMR (250 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 1,35 (s, 12H), 5,20 (s, 2H), 6,43 (s, 1H), 6,87 (d, $J = 2,6$ Hz, 1H), 6,99 (dd, $J_1 = 8,8$ Hz, $J_2 = 2,7$ Hz, 1H), 7,45 (d, $J = 8,1$ Hz, 2H), 7,71–7,78 (m, 3H), 7,86 (d, $J = 8,1$ Hz, 2H), 8,30 (dd, $J_1 = 6,7$ Hz, $J_2 = 2,3$ Hz, 1H), 8,69 (dd, $J_1 = 6,8$ Hz, $J_2 = 2,2$ Hz, 1H)

MS (ES): m/z 480,1996 ($[\text{M}+\text{H}]^+$)

Właściwości spektroskopowe w dimetylosulfotlenku (DMSO):

λ_{abs} [nm] (ϵ [$\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$]): 453 (5800)

λ_{em} [nm]: 570

λ_{ex} [nm]: 453

Wydajność kwantowa fluorescencji otrzymanego związku w DMSO wynosiła 0,20.

Przykład 4.

9-hydroksy-5H-benzo[a]fenoksazyno-5-on otrzymano postępując analogicznie jak w przykładzie 1.

Następnie 0,053 części otrzymanego 9-hydroksy-5H-benzo[a]fenoksazyno-5-onu rozpuszczono w 1,9 częściach bezwodnego N,N-dimetyloformamidu, po czym dodano 0,029 części węgla potasu i całość mieszano w temperaturze pokojowej w atmosferze argonu przez 5 minut. Do tak przygotowanego roztworu dodano 0,068 części estru pinakolowego kwasu 4-bromometylofenyloboronowego i całość mieszano w temperaturze 60°C w atmosferze argonu przez 35 minut, przy zastosowaniu pola mikrofalowego o zmiennej mocy 10–300 W. Po ochłodzeniu do temperatury pokojowej mieszaninę reakcyjną rozcieńczono 16 częściami octanu etylu. Fazę organiczną przemyto kolejno 15 częściami nasyconego roztworu chlorku amonu, 15 częściami wody i 15 częściami nasyconego roztworu chlorku sodu. Rozpuszczalnik odparowano pod zmniejszonym ciśnieniem. Surowy produkt oczyszczono na drodze chromatografii kolumnowej stosując jako eluent mieszaninę dichlorometanu/metanolu 20 : 1 (v/v).

Otrzymano 0,038 części związku (wydajność 40%) o wzorze 1, w którym R_1 i R_2 oznaczały atom wodoru, a R_3 oznaczało grupę estru pinakolowego kwasu boronowego, w postaci pomarańczowego proszku o temperaturze topnienia $195\text{--}197^\circ\text{C}$.

Widmo ^1H NMR oraz widmo masowe ES otrzymanego związku w pełni potwierdziły jego budowę:

^1H NMR (250 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ 1,35 (s, 12H), 5,20 (s, 2H), 6,43 (s, 1H), 6,87 (d, $J = 2,6$ Hz, 1H), 6,99 (dd, $J_1 = 8,8$ Hz, $J_2 = 2,7$ Hz, 1H), 7,45 (d, $J = 8,1$ Hz, 2H), 7,71–7,78 (m, 3H), 7,86 (d, $J = 8,1$ Hz, 2H), 8,30 (dd, $J_1 = 6,7$ Hz, $J_2 = 2,3$ Hz, 1H), 8,69 (dd, $J_1 = 6,8$ Hz, $J_2 = 2,2$ Hz, 1H)

MS (ES): m/z 480,1996 ($[\text{M}+\text{H}]^+$)

Przykład 5.

Przygotowano roztwór wyjściowy próbnika przez rozpuszczenie 0,0048 części związku o wzorze 1, w którym R₁ i R₂ oznaczały atom wodoru, a R₃ oznaczało grupę estru pinakolowego kwasu boronowego, oznaczonego jako BOR-POX2, w 7,85 częściach acetonitrylu.

Przygotowano także roztwór wyjściowy nadtlenu wodoru przez dodanie do 0,017 części perhydrolu 9,983 części wody.

Następnie z przygotowanych roztworów wyjściowych sporządzono kompozycje o następującym składzie:

- 0,150 ml roztworu wyjściowego próbnika BOR-POX2,
- 0,150 ml acetonitrylu,
- 0–30 µl roztworu wyjściowego nadtlenu wodoru.

Przygotowane kompozycje rozcieńczono do objętości 1,5 ml za pomocą buforu fosforanowego o pH 7,4 (0,1 M). Po 24 godzinach inkubacji próbek w temperaturze pokojowej wykonano analizy chromatograficzne przygotowanych próbek za pomocą chromatografu firmy Shimadzu z detektorem DAD (model SPD-M20A); kolumna Kinetex CoreShell (C 18) firmy Phenomenex (100 mm × 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 potwierdził powstawanie produktu utlenienia próbnika BOR-POX2 nadtlaniem wodoru, tj. związku o wzorze 4, oznaczonego jako OH-POX, a tym samym potwierdził zastosowanie próbnika do detekcji reaktywnych form tlenu – nadtlenu wodoru, za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją diodową – fig. 1 rysunku przedstawiają chromatogramy (detektor DAD 450 nm) zarejestrowane po 24 godzinach inkubacji próbnika BOR-POX2 (100 µM) z nadtlaniem wodoru (0–300 µM) w środowisku o pH 7,4 (MeCN : bufor fosforanowy 0,1 M, pH 7,4; 1 : 4, v/v).

Przykład 6.

Roztwór wyjściowy próbnika przygotowano przez rozpuszczenie 0,0048 części związku o wzorze 1, w którym R₁ i R₂ oznaczały atom wodoru, a R₃ oznaczało grupę estru pinakolowego kwasu boronowego, oznaczonego jako BOR-POX2, w 7,85 częściach acetonitrylu.

Roztwór wyjściowy nadtlenu wodoru przygotowano przez dodanie do 0,017 części perhydrolu 9,983 części wody.

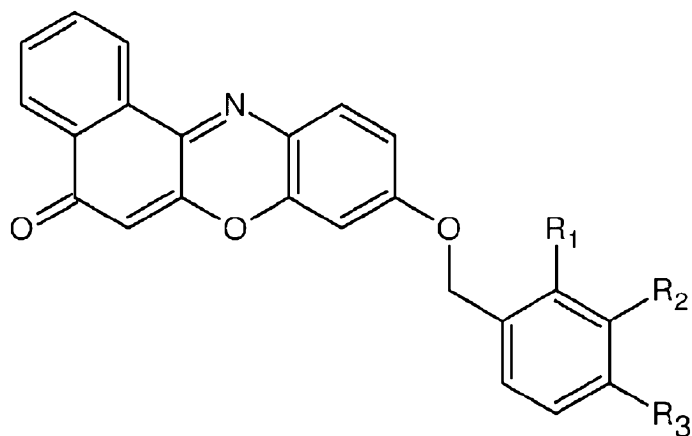
Następnie z przygotowanych roztworów wyjściowych sporządzono kompozycje o następującym składzie:

- 0,06 ml roztworu wyjściowego próbnika BOR-POX2,
- 0,54 ml acetonitrylu,
- 0–6 µl roztworu wyjściowego nadtlenu wodoru.

Przygotowane kompozycje rozcieńczono do objętości 3 ml za pomocą buforu fosforanowego o pH 7,4 (0,1 M). Po 24 godzinach inkubacji próbek w temperaturze pokojowej, zarejestrowano widma absorpcyjne (spektrofotometr V-670 firmy Jasco) i widma emisyjne (spektrofluorymetr FLS-920 firmy Edinburgh) badanych kompozycji. Przeprowadzony eksperyment potwierdził batochromowe przesunięcie maksimum pasma absorpcji i emisji oraz znaczny wzrost intensywności fluorescencji z maksimum emisji zlokalizowanym przy ok. 620 nm po reakcji z nadtlaniem wodoru, a tym samym potwierdził zastosowanie związku o wzorze 1, w którym R₁ i R₂ oznaczały atom wodoru, a R₃ oznaczało grupę estru pinakolowego kwasu boronowego, jako kolorymetrycznego i fluorescencyjnego próbnika do detekcji reaktywnych form tlenu – nadtlenu wodoru, – fig. 2 rysunku przedstawiają widma absorpcyjne próbnika BOR-POX2 (20 µM) zarejestrowane po 24 godzinach inkubacji z nadtlaniem wodoru (0–60 µM) w środowisku o pH 7,4 (MeCN : bufor fosforanowy 0,1 M, pH 7,4; 1 : 4, v/v) oraz fig. 3 rysunku przedstawiają widma absorpcyjne próbnika BOR-POX2 (20 µM) zarejestrowane po 24 godzinach inkubacji z nadtlaniem wodoru (0–60 µM) w środowisku o pH 7,4 (MeCN : bufor fosforanowy 0,1 M, pH 7,4; 1 : 4, v/v).

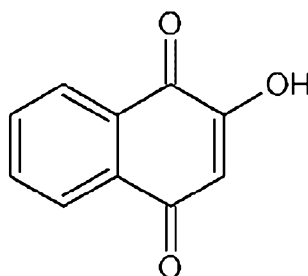
Zastrzeżenia patentowe

1. Związki, pochodne 5H-benzo[a]fenoksazyno-5-onu, o wzorze 1,



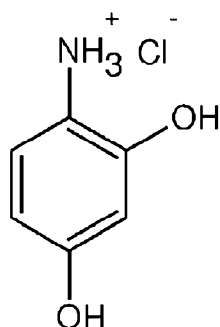
Wzór 1

- w którym R₁, R₂ i R₃ oznaczają niezależnie od siebie atom wodoru, grupę nitrową, boronową, grupę estrową kwasu boronowego.
2. Sposób otrzymywania związków o wzorze 1, określonych w zastrzeżeniu 1, **znamienny tym**, że 2-hydroksy-1,4-naftochinon o wzorze 2,



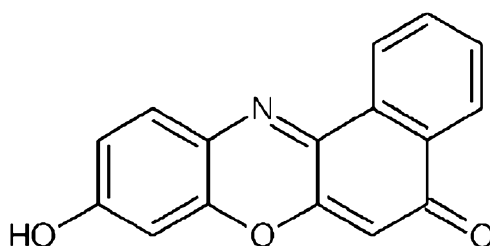
Wzór 2

poddaje się reakcji z chlorowodorkiem 4-aminorezorcyny o wzorze 3,



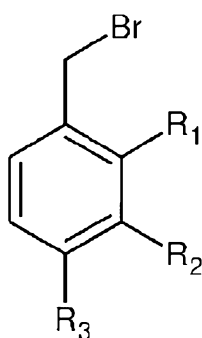
Wzór 3

przy stosunku molowym substratów 1 : 1, w środowisku kwasu octowego o stężeniu 80% użytego w ilości 57 moli na 1 mol substratów, w atmosferze gazu obojętnego, w temperaturze 80–150°C w czasie 15–45 minut, z wykorzystaniem pola mikrofalowego o mocy 10–300 W, a produkt tej reakcji, 9-hydroksy-5H-benzo[a]fenoksazyno-5-on o wzorze 4,



Wzór 4

po oczyszczeniu na drodze chromatografii kolumnowej, poddaje się reakcji z pochodną (bromometylo)benzenu o wzorze 5,



Wzór 5

- w którym R_1 , R_2 i R_3 oznaczają niezależnie od siebie atom wodoru, grupę nitrową, boronową, grupę estrową kwasu boronowego, przy stosunku molowym substratów 1 : 1,3, w środowisku bezwodnego N,N-dimetyloformamidu, w obecności węglanu metalu alkalicznego, takiego jak węglan sodu, węglan potasu lub węglan cezu, użytego w ilości 1,3 mola na 1 mol związku o wzorze 4, w atmosferze gazu obojętnego, w temperaturze 50–80°C w czasie 15–90 minut, z wykorzystaniem pola mikrofalowego o mocy 10–300 W, po czym odfiltrowuje się produkt finalny, który przemywa się wodą, lub uzyskaną mieszaninę poreakcyjną rozcieńcza się octanem etylu, fazę organiczną przemywa się kolejno nasyconym roztworem octanu amonu, wodą oraz nasyconym roztworem chlorku sodu, a następnie usuwa się rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem, zaś surowy produkt oczyszcza się na drodze chromatografii kolumnowej.
3. Zastosowanie związków o wzorze 1, w których R_1 , R_2 i R_3 oznaczają niezależnie od siebie grupę boronową lub grupę estru pinakolowego kwasu boronowego jako kolorymetrycznych i fluorescencyjnych próbników do detekcji reaktywnych form tlenu i azotu, zwłaszcza nadtlenku wodoru, kwasu chlorowego(I) lub nadtlenoazotynu.
 4. Zastosowanie według zastrz. 3, **znamiennie tym**, że polega na reakcji próbника z nadtlenkiem wodoru, kwasem chlorowym(I) lub nadtlenoazotynem, użytymi w ilości 1–300% molowych w stosunku do ilości próbника, w środowisku mieszaniny acetonitrylu i 0,1 M wodnego roztworu buforu fosforanowego użytych w stosunku objętościowym 1 : 4, o pH 5,7–8,0, w czasie inkubacji do 1440 minut.

Rysunki

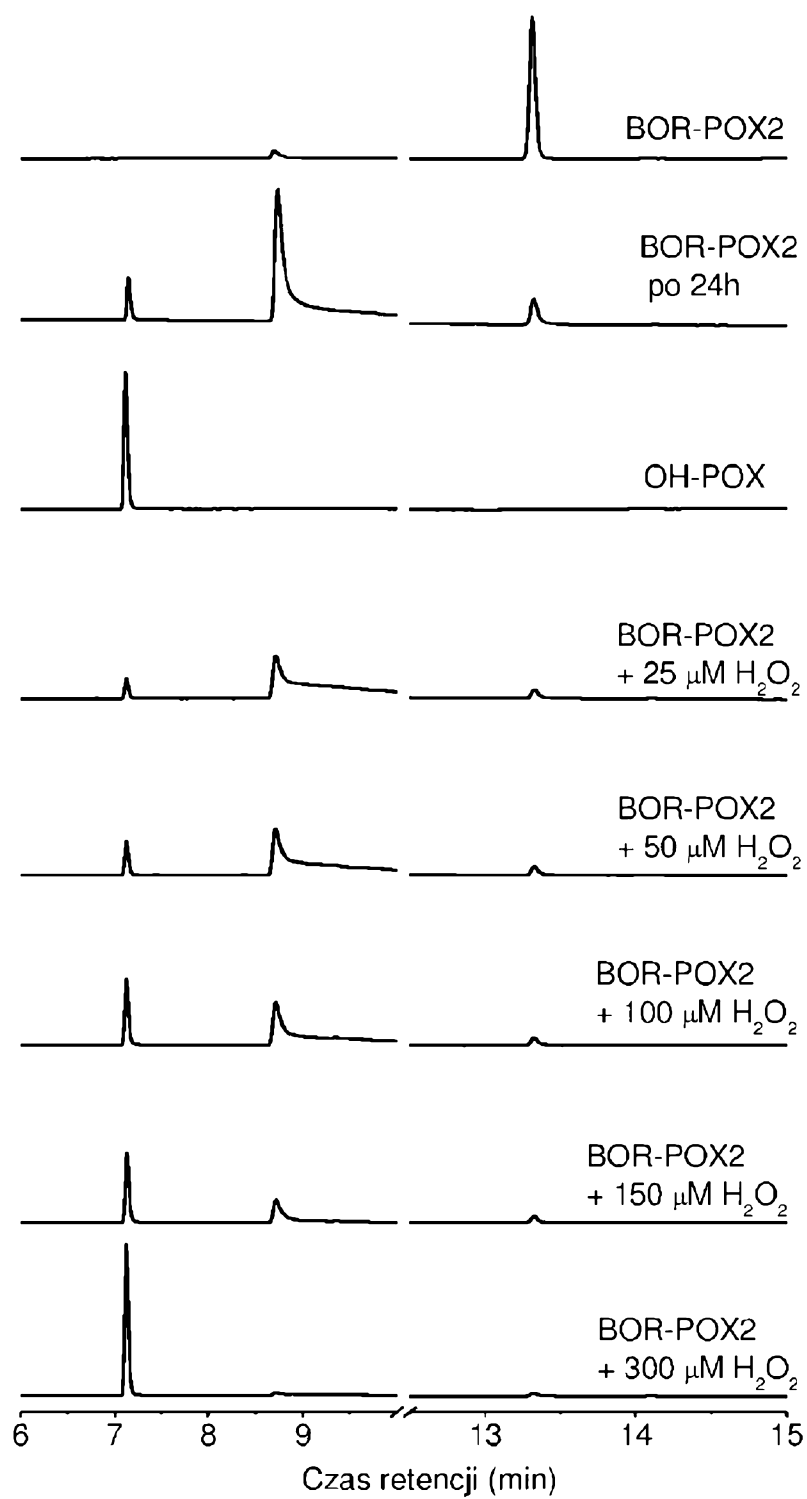


Fig. 1

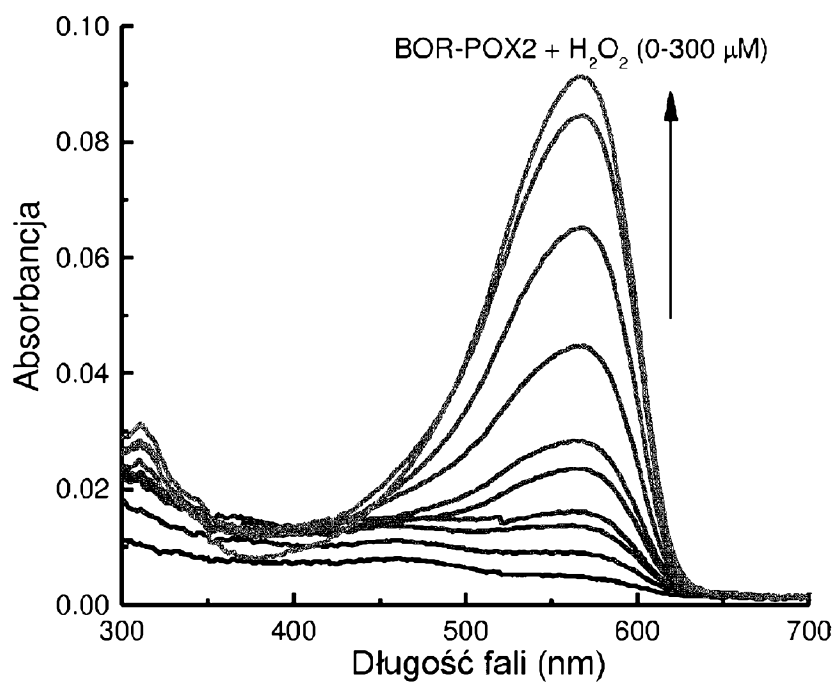


Fig. 2

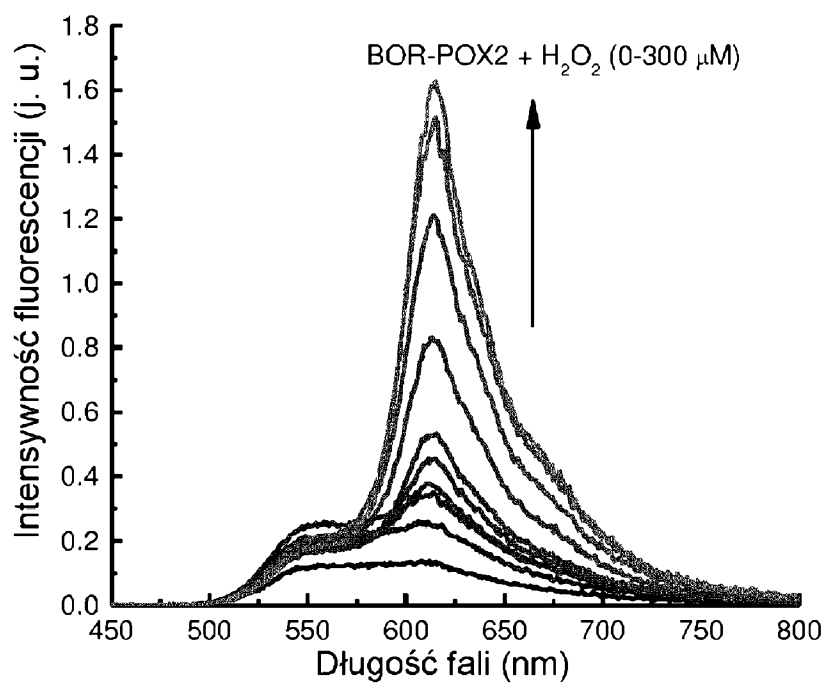


Fig. 3