

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

**QSPR A ELEKTROCHEMICKÁ OXIDACE
BENZOAZOLŮ**

Diplomová práce
studijního oboru analytická chemie

Praha 2007

Petra Nedvěďová

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele RNDr. Karla Nesměráka, Ph.D., a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze, 27. dubna 2007

Petra Bucháčková

Obsah

	Seznam použitých zkratk a symbolů	5
1	Úvod	7
1.1	Benzoxazoly	7
1.1.1	Chemické a fyzikální vlastnosti benzoxazolů	7
1.1.2	Benzoxazoly jako cytostatika.....	9
1.1.3	Další farmakologické využití benzoxazolů	10
1.1.4	Jiné možnosti využití benzoxazolů.....	12
1.1.5	Elektrochemické studie benzoxazolů	12
1.1.6	Chromatografické studie benzoxazolů	12
1.2	Vliv substituentů na fyzikálně-chemické chování.....	13
1.2.1	Vliv substituentů na elektrochemické chování látek	13
1.2.2	Vliv substituentů na chromatografické chování látek	14
1.3	Využití elektrochemické oxidace při studiu farmaceuticky aktivních látek... 15	
1.4	Cíl práce.....	16
2	Experimentální část	17
2.1	Studované látky	17
2.2	Použité chemikálie.....	17
2.3	Použité metody	19
2.3.1	DC voltametrie s rotující diskovou elektrodou	19
2.3.2	Cyklická voltametrie	19
2.3.3	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s UV detektorem.....	20
2.3.4	Preparativní elektrolyza.....	20
2.3.5	Kapalinová chromatografie s hmotnostním detektorem	21
2.4	QSPR, regresní a statistické výpočty.....	21

3	Výsledky a diskuze.....	23
3.1	Vliv substituentů na voltametrické chování derivátů benzoxazolu.....	23
3.2	Studium průběhu elektrochemické oxidace.....	31
3.3	Vliv substituentů na retenční chování derivátů benzoxazolu.....	32
3.4	Elektrooxidační produkty derivátů benzoxazolu.....	37
3.4.1	Příprava elektrooxidačních produktů	37
3.4.2	Identifikace produktů elektrooxidace.....	38
4	Závěr.....	39
	Literatura	42

Seznam použitých zkratk a symbolů

A	plocha elektrody <i>nebo</i> absorbance	[cm ²]
a	směrnice lineární regrese	
b	úsek lineární regrese	
c	molární koncentrace	[mol dm ⁻³]
DC	difúzí řízená voltametrie	
E	potenciál	[V]
$E_{1/2}$	půlvlnový potenciál	[V]
$E_{1/2}^{\text{exp}}$	experimentální hodnota půlvlnového potenciálu	[V]
$E_{1/2}^{\text{vyp}}$	vypočítaná hodnota půlvlnového potenciálu	[V]
$E_{\text{prac.}}$	pracovní potenciál preparativní elektrolýzy	[V]
F	hodnota F-testu	
F_m	průtoková rychlost mobilní fáze	[ml min ⁻¹]
$F_{\alpha,n}$	tabelovaná kritická hodnota F-testu pro n měření na hladině významnosti α	
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie	
I	proud <i>nebo</i> indikační konstanta	[A]
k	kapacitní poměr	
K_H	rovnovážná nebo rychlostní konstanta nesubstituovaného derivátu	
K_X	rovnovážná nebo rychlostní konstanta substituovaného derivátu	
l	délka absorbující vrstvy	[cm]
M	molární hmotnost	[g mol ⁻¹]
m	hmotnost	[g]
MS	hmotnostní spektrometrie	
m/z	hmotnost/náboj	

n	počet měření <i>nebo</i> počet vyměněných elektronů	
P	rozdělovací koeficient oktanol/voda	
P_H	rozdělovací koeficient oktanol/voda nesubstituovaného derivátu	
P_X	rozdělovací koeficient oktanol/voda substituovaného derivátu	
Q	náboj	[C]
QSAR	Quantitative structure-activity relationships	
QSER	Quantitative structure-electrochemistry relationships	
QSPR	Quantitative structure-property relationships	
r	korelační koeficient	
t	čas <i>nebo</i> teplota	[s] [°C]
t_M	mrtvý retenční čas	[s]
t_R	retenční čas	[s]
UV	ultrafialová oblast spektra	
ν	rychlost polarizace elektrody	[V s ⁻¹]
w	objemový zlomek	
λ	vlnová délka	[nm]
π	substituentová konstanta hydrofobicity	
σ	Hammettova substituentová konstanta	
ρ	Hammettova reakční konstanta	
ω	úhlová rychlost rotace elektrody	[s ⁻¹]

1 ÚVOD

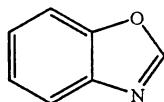
Předkládaná diplomová práce se zabývá elektrochemickým a chromatografickým studiem nově syntetizované skupiny derivátů benzoxazolu. Získané výsledky jsou pomocí QSPR analýzy použity k získání korelačních rovnic.

1.1 BENZOXAZOLY

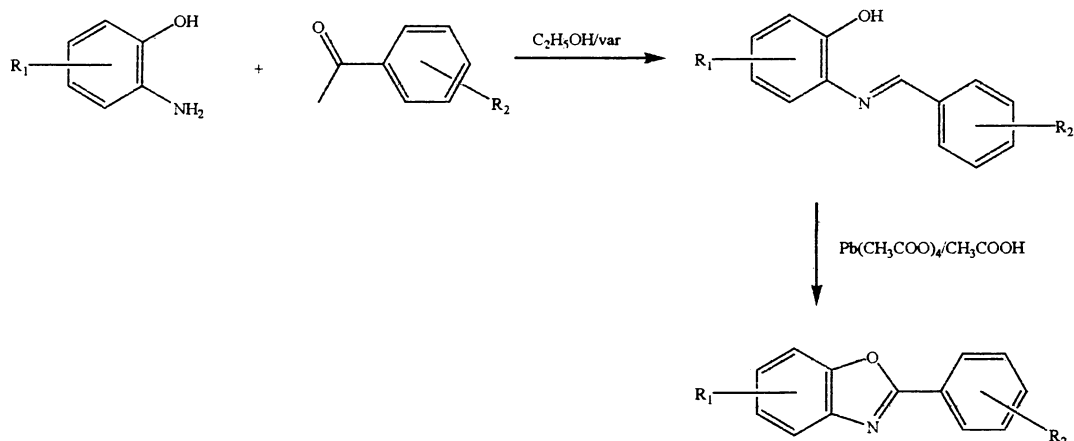
1.1.1 Chemické a fyzikální vlastnosti benzoxazolů

Deriváty benzoxazolu jsou heterocyklické sloučeniny odvozené od benzoxazolu, což je chemická sloučenina, jejímž základem je oxazol, pětičlenný kruh, který obsahuje tři atomy uhlíku a po jednom atomu kyslíku a dusíku, spojený s aromatickým jádrem (obr. 1.1). Benzoxazol je nažloutlá krystalická látka o bodu tání 29 až 30 °C. Benzoxazol je nerozpustný ve vodě, ale rozpustný v ethanolu, etheru nebo kyselině sírové¹.

Deriváty benzoxazolu je možné připravit několika způsoby, základním způsobem je metoda dehydrogenace Schiffových bází (obr. 1.2)^{2,3}.

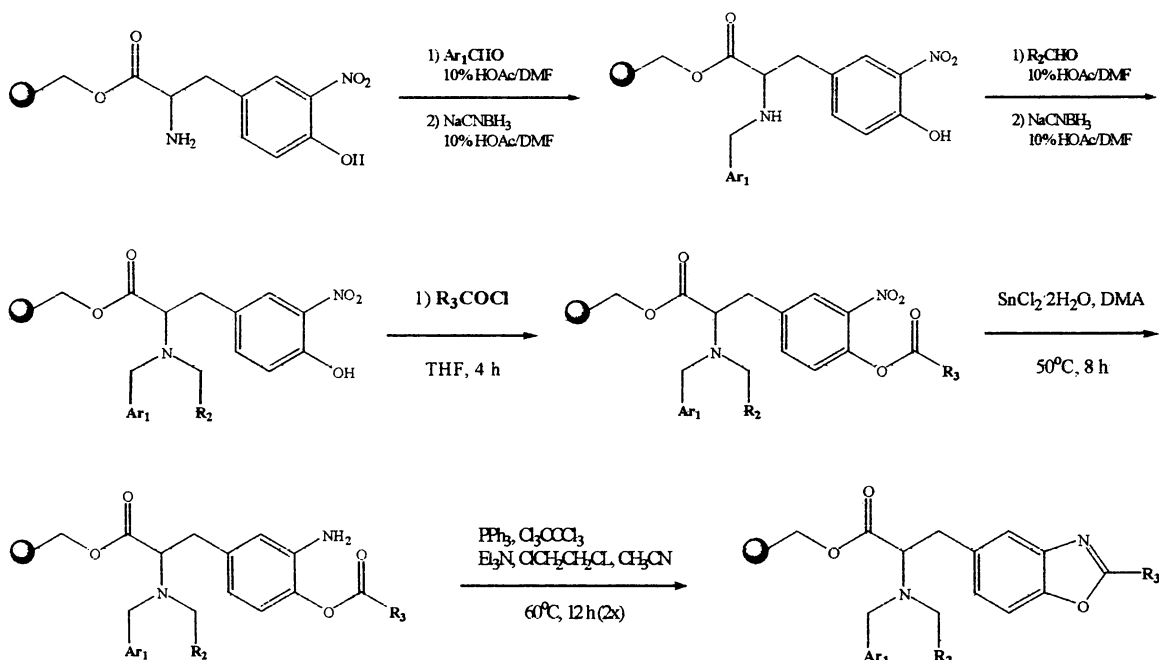


Obr. 1.1 Chemická struktura benzoxazolu



Obr. 1.2 Dehydrogenace Schiffových bází

Jinou metodou syntézy benzoxazolů je metoda využívající zakotvení 3-nitrotyrosinu na Wangově pryskyřici⁴; syntéza probíhá v pěti krocích, během kterých je primární amin převeden na amin terciární, fenol je esterifikován, nitro skupina je zredukována a nakonec dojde k zacyklení oxazolového kruhu (obr. 1.3).



Obr. 1.3 Syntéza benzoxazolů na tuhé fázi, ● Wangova pryskyřice

Další možnosti přípravy benzoxazolů jsou termolytický rozklad azidů za působení směsi kyseliny polyfosforečné a kyseliny karboxylové^{5,6} nebo fotochemická konverze 2-(benzyliden-amino)-fenolu⁷.

Většina publikovaných prací se zabývá syntézou nových derivátů benzoxazolu a jim podobných látek jako jsou benzimidazoly^{8,9} nebo benzothiazoly¹⁰, chemickým reakcím, studiím fyzikálně-chemických vlastností^{11,12}. Dále byly studovány i vlastnosti a tvorba komplexních sloučenin obsahující benzoxazolový element^{13,14}.

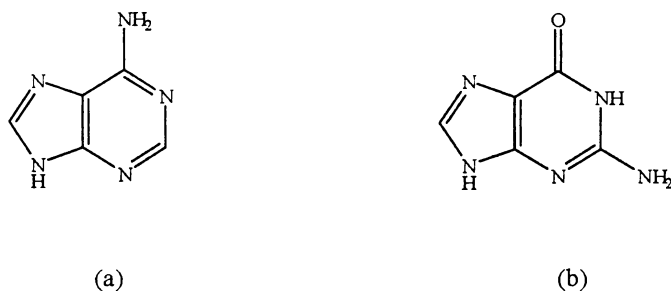
1.1.2 Benzoxazoly jako cytostatika

Nádorové bujení¹⁵ je patologický proces, při kterém v organismu vzniká tkáň, která není součástí jeho normální anatomie a nepřispívá k zajištění jeho normálních funkcí. Příčinou nádoru je vznik patologického klonu buněk odvozených od jedné buňky, ve které vznikla genetická porucha. Ta je předávána nově vzniklým buňkám tohoto patologického klonu.

Tato genetická změna má za následek změnu chování buněk patřících k nádorovému klonu a „zvýhodňuje“ nádorovou buňku oproti buňkám normálním. Většinou se nádorově transformovaná buňka častěji dělí, je pohyblivější, má změněné vztahy k okolním buňkám a k mezibuněčné hmotě, bývá odolnější na nepříznivé vlivy, např. na nedostatek kyslíku.

Nádorová transformace buňky je děj, který podmíní změnu jejího fenotypu. Faktory zapříčiňující vznik nádorového bujení mohou zasáhnout protoonkogeny, což jsou geny, které jsou fyziologicky přítomné v buňce, a mají významné funkce mnohdy související s dělením buňky, regulací buněčného cyklu, jejím růstem, či přenosem signálu do buňky.

Deriváty benzoxazolu a jim podobné heterocyklické sloučeniny jsou intenzivně studovány pro jejich potenciální chemoterapeutické účinky, bez výrazné toxicity na lidský organismus. Strukturní podobnost benzoxazolových derivátů s nukleovými bázemi adeninem a guaninem (obr. 1.4) pravděpodobně napomáhá jejich snadné interakci s biopolymery živých systémů^{16,17}. Deriváty benzoxazolů působí jako inhibitory na topoisomerasu I a topoisomerasu II, enzymy zasahující do transkripce nebo replikace DNA¹⁸.

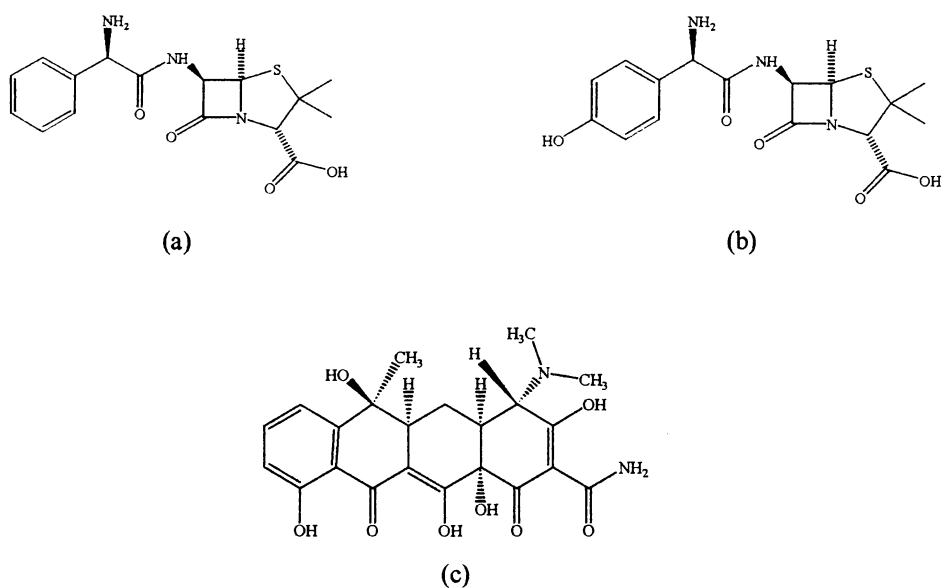


Obr.1.4 Dusíkaté báze DNA: (a) adenin, (b) guanin.

1.1.3 Další farmakologické využití benzoxazolů

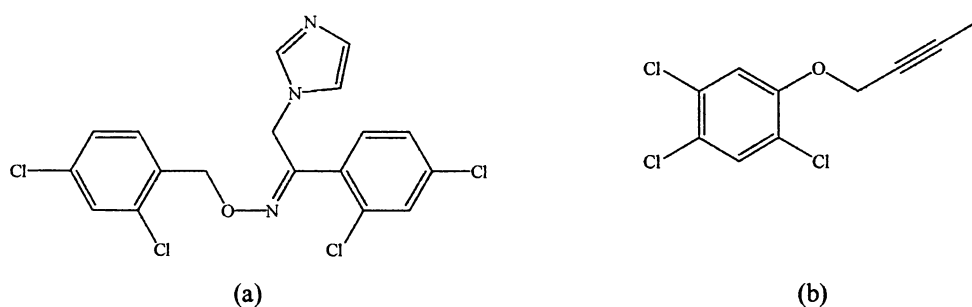
Dále jsou deriváty benzoxazolu zkoumány pro svou antimykotickou, antibiotickou, antimikrobiální, antifungální a antivirální aktivitu, jsou to anthelmintika a antagonisté histaminových receptorů. Kromě inhibice topoisomerasy I a II jsou studovány rovněž jako inhibitory HIV-I transkriptasy^{3, 16}.

Deriváty benzoxazolu byly testovány na inhibiční aktivitu růstu různých bakterií. Byly použity Gram-pozitivní bakterie *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis* a *Bacillus subtilis*, jako Gram-negativní bakterie byly pro testování použity bakterie *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* a *Pseudomonas aeruginosa*. Jako srovnávací látky byly použity např. ampicilin, amoxycilin nebo tetracyklin (obr 1.5). Testované deriváty vykazovaly nižší antibakteriální aktivitu u všech Gram-pozitivních bakterií a Gram-negativních bakterií, kromě bakterie *Pseudomonas aeruginosa*, než srovnávací látky³.



Obr. 1.5 Chemická struktura: (a) ampicilinu, (b) amoxicilinu, (c) tetracyklinu.

Vybrané deriváty benzoxazolu byly testovány na houbě *Candida albicans* pro zjištění jejich antimykotických účinků³. Bylo zjištěno, že některé deriváty jako např. 5-methyl-2-(2-fluorofenyl)benzoxazol vykazují vyšší aktivity než ostatní studované látky. Proto byly tyto deriváty srovnávány se známými antimykotiky jako jsou oxikonazol a haloprogin (obr. 1.6). Tyto však vykazují větší účinnost.



Obr. 1.6 Chemická struktura: (a) oxikonazolu, (b) haloproginu.

1.1.4 Jiné možnosti využití benzoxazolů

Deriváty benzoxazolu mohou být průmyslově využity jako insekticidy a herbicidy. Dále se mohou používat jako fluorescenční barviva¹⁶. V současné době probíhá výzkum fotosensitivních derivátů benzoxazolu, které se uplatní v mikroelektronickém průmyslu. Především se počítá s využitím polymerních benzoxazolových derivátů pro výrobu polovodičových součástek. Polybenzoxazoly jsou tepelně stabilní, téměř nehořlavé, chemicky inertní, velmi se svými vlastnostmi podobají polyimidům¹⁹.

1.1.5 Elektrochemické studie benzoxazolů

Benzoxazoly jsou poměrně nově syntetizovanou skupinou látek, proto není publikováno mnoho prací, které by se zabývaly jejich elektrochemickými vlastnostmi. Dosud bylo studováno převážně elektrochemické chování komplexů benzoxazolů jako například ruthenium-2-(2-hydroxyfenyl)-benzoxazol komplexu²⁰ nebo jiných komplexů obsahujících benzoxazolový element^{21, 22}.

1.1.6 Chromatografické studie benzoxazolů

Benzoxazoly jako nově syntetizovaná skupina látek jsou v současné době intenzivně studovány i z chromatografického hlediska. Nejčastěji se publikované práce zabývají separací benzoxazolů a jim podobných látek na chirální stacionární fázi na bázi celulosy²³ nebo amylosy²⁴.

1.2 VLIV SUBSTITUENTŮ NA FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÉ CHOVÁNÍ LÁTEK

Struktura sloučeniny jednoznačně determinuje její fyzikálně-chemické vlastnosti. V mnoha případech lze druhem, či polohou substituentu na základním skeletu molekuly tyto vlastnosti ovlivňovat. Této skutečnosti se využívá při studiu vztahů mezi strukturou a chemickým chováním sloučenin. Pro tento účel se používá tzv. OSPR analýzy (Quantitative structure-property relationships). Jejím cílem je pomocí zpracování kvantitativních experimentálních a teoretických dat matematickou modelací dospět k obecnějším závěrům mezi strukturou a vlastnostmi látek. Pomocí této metody je možné předvídat chemické chování a vlastnosti nově syntetizovaných sloučenin. Základ této metodě dal roku 1935 L. P. Hammett, který kvantifikoval vliv substituentů pomocí rovnice popisující vztah mezi strukturou a vlastnostmi látky^{25, 26}

$$\log K_x = \log K_H + \rho\sigma \quad (1.1)$$

kde K_H je rovnovážná nebo rychlostní konstanta nesubstituovaného derivátu, K_x rovnovážná nebo rychlostní konstanta substituovaného derivátu, ρ je empirická konstanta charakterizující reakci, je nezávislá na substituentu a σ je empirická Hammettova substituentová konstanta, která popisuje elektronový efekt substituentu (kladné hodnoty σ přísluší elektrofilním substituentům, záporné hodnoty pak substituentům nukleofilním). Přínosem tedy bylo přímé použití polárních konstant σ ke korelaci chemických vlastností s elektronovými efekty substituentů²⁷. Jiné typy substituentových konstant byly navrženy v pracích např. Swain-Luptona²⁸ a jiných.

1.2.1 Vliv substituentů na elektrochemické chování látek

V elektrochemii je situace obdobná. I zde můžeme nalézt zákonitosti vlivu struktury na elektrochemické chování látek. Bylo odvozeno, že změny chování polarografických vln souvisejí s různými posuny elektronů v molekule vlivem rozdílného chemického charakteru substituentů. Ukázalo se, že mezi půlvlnovými potenciály a Hammettovými

konstantami existuje obvykle přímý lineární vztah. Problematikou věnující se vlivu substituentů v organické polarografii se mimo jiné podrobně zajímal Zuman ve své monografii²⁹. V současné době se pro hodnocení vlivu substituentů na elektrochemické chování látek používá systému QSER (Quantitative structure-electrochemistry relationships)³⁰. V literatuře můžeme nalézt úzké korelace mezi konstantami substituentů a půlvlnovými potenciály³¹. To vede ke snaze definovat vztahy mezi elektrochemickými vlastnostmi a biologickou aktivitou chemických látek³². Najít korelace mezi chemickou strukturou a biologickou, respektive farmaceutickou aktivitou, by mohlo znamenat detailně předvídat chování chemických sloučenin. Tato skutečnost by radikálně zredukovala obsáhlé série mnohdy náhodně zkušných látek, což by mělo obrovský význam zejména při vývoji nových léčiv.

1.2.2 Vliv substituentů na chromatografické chování látek

Dalším parametrem určujícím chemické chování látek je lipofilita vyjádřená konstantou rozdělovacího poměru oktanol/voda (P) a konstantou hydrofobicity (π). Jedná se převážně o experimentální konstanty popisující látku, respektive substituent z hlediska lipofility. Podobně jako σ je i π konstanta termodynamickou substituentovou konstantou lineárně závislou na změně Gibbsovy energie. Lze ji vypočítat z následujícího vztahu

$$\pi = \log P_x - \log P_H \quad (1.2)$$

kde P_H je rozdělovací koeficient oktanol/voda nesubstituovaného derivátu a P_x je rozdělovací koeficient oktanol/voda pro substituovaný derivát. Obecně bývá jako míra lipofility brán právě rozdělovací koeficient P , který ukazuje poměr koncentrací látky rozpuštěné v oktanolu a ve vodě. Za standard s $\pi = 0$ byl určen vodík. Z toho vyplývá, že kladné hodnoty π konstanty nabývají ty substituenty, které mají větší hydrofobní efekt než vodík, záporných hodnot π konstanty pak ty, jež mají efekt nižší. Známe-li tedy P_H pro nesubstituovaný základní skelet, můžeme pomocí π konstanty dopočítat lipofilní parametry pro všechny substituenty ze zkoumané série.

Pro studium hydrofobních vlastností biologicky aktivních organických sloučenin je vhodným nástrojem především vysokoúčinná kapalinová chromatografie³³. Studium této problematiky se věnoval zejména Kalistan³⁴. Pomocí HPLC byly nalezeny korelace mezi retenčními charakteristikami a parametry lipofility. Zjistilo se, že mezi kapacitním poměrem k a rozdělovacím koeficientem, respektive konstantou π je lineární vztah

$$\log P = a \log k + b \quad (1.3)$$

$$\log \pi = a \log k + b \quad (1.4)$$

kde a je směrnice a b úsek této závislosti.

Dosavadní výzkum byl v této oblasti zaměřen převážně na hledání vhodné stacionární fáze, která by zajišťovala lineární závislost mezi $\log k$ a $\log P$. Nejlepších výsledků bylo dosaženo na C₁₈ silikagelu³⁵.

1.3 VYUŽITÍ ELEKTROCHEMICKÉ OXIDACE PŘI STUDIU FARMACEUTICKY AKTIVNÍCH LÁTEK

Do širokého spektra analytických metod používaných při studiích farmaceuticky aktivních látek patří i elektrochemie. Využívá se nejen při analýzách léčiv, či jejich metabolitů, ale zároveň se uplatňuje jako modelová technika při simulaci biologických redox reakcí situovaných převážně do lipidových buněčných membrán³⁶. Z důvodu nepolárního charakteru prostředí biologických membrán se tyto modelové reakce provádějí v nevodném prostředí (acetonitril, dimethylformamid). Výhodou nevodného prostředí bývá i větší stálost reakčních produktů, což umožňuje jejich bližší studium. V mnoha případech bývají právě tyto produkty odpovědné za terapeutický efekt.

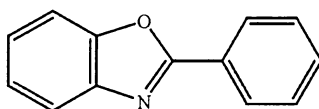
Elektrochemie může poskytnout celou řadu informací o charakteru oxidačního resp. redukčního děje (reverzibilita, počty vyměněných elektronů atd.), který je podobný enzymatickým redox přeměnám v biologických membránách. Výsledky modelových elektrochemických oxidací farmaceuticky aktivních látek pak mohou poskytnout řadu informací o možném průběhu a mechanismu biologické oxidace. Této skutečnosti je využíváno v elektrofarmakologii, což je obor využívající analogie některých elektrochemických a metabolických dějů.

1.4 CÍL PRÁCE

Cílem předkládané diplomové práce je studium fyzikálně-chemických vlastností a elektrochemické oxidace série nově syntetizovaných derivátů 2-fenylbenzoxazolu (obr. 1.7).

První část práce se zabývá studiem vlivu substituentů na voltmetrické a chromatografické chování studovaných derivátů.

Druhá část práce je zaměřena na studium reakčního mechanismu elektrochemické oxidace studovaných derivátů.



Obr 1.7 Chemická struktura 2-fenylbenzoxazolu

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 STUDOVANÉ LÁTKY

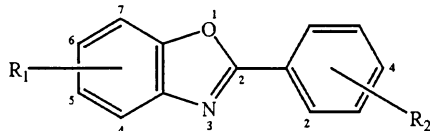
Studované deriváty 2-fenylbenzoxazolu byly syntetizovány³⁷ na katedře farmaceutické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity v Ankaře (Turecko). Totožnost a čistota byly stanoveny elementární analýzou, měřením bodu tání a nukleární magnetickou rezonancí. Přehled studovaných látek je podán v tab. 2.1 (str. 18).

2.2 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE

Jako prostředí pro elektrochemické a chromatografické studium byl použit acetonitril čistoty pro HPLC (Sigma Aldrich) s maximálním obsahem vody 0,02 obj.%.

Jako základní elektrolyt byl použit chloristan sodný pro HPLC (Fluka), vysušený ve vakuové sušárně a uchovávaný v exsikátoru nad oxidem fosforečným. Pro extrakci elektrooxidačních produktů byl použit chloroform pro HPLC (Sigma Aldrich). Ostatní použité chemikálie byly analytické čistoty: aceton (Lachema Neratovice, ČR), argon (Linde-Technoplyn, ČR) dusičnan stříbrný (Fluka).

Tab. 2.1 Struktury a molární hmotnosti studovaných 2-fenylbenzoxazolu



derivát	R ₁		R ₂		M g mol ⁻¹
	poloha	substituent	poloha	substituent	
1			4	-OCH ₃	225,26
2			4	-Br	274,12
3	5	-CH ₃	4	-F	227,25
4	5	-NO ₂			240,23
5	5	-NH ₂	4	-Br	289,14
6			4	-CH ₃	209,26
7	5	-NO ₂	4	-OC ₂ H ₅	284,29
8	6	-CH ₃	2,4	-Cl ₂	278,14
9	6	-NH ₂	4	-F	228,24
10	5	-NH ₂	4	-F	228,24
11	6	-NH ₂	4	-C ₂ H ₅	238,31
12	6	-NO ₂	4	-C ₂ H ₅	268,29
13	5	-NO ₂	4	-C ₂ H ₅	268,29
14	6	-NO ₂	4	-Br	318,12
15	6	-NO ₂	4	-F	258,22
16	5	-NO ₂	4	-F	258,22
17	6	-NO ₂	4	-C(CH ₃) ₃	296,35
18	5	-NH ₂			210,25
19	6	-NO ₂			240,23
20	5	-Cl	4	-Cl	264,11
21	5	-Cl	4	-C ₂ H ₅	257,73

2.3 POUŽITÉ METODY

2.3.1 DC voltametrie s rotující diskovou elektrodou

Měření bylo realizováno na přístroji Eko-Tribo Polarograf (Polaro-Sensors, ČR) se sběrem dat softwarem Polar Pro v. 5.1 (Polaro Sensors, ČR) a probíhalo v třídílné polarografické nádobce. Použité zapojení bylo tříelektrodové. Jako pracovní elektroda byla použita rotující disková platinová elektroda o ploše $13,986 \text{ mm}^2$, rychlost rotace elektrody byla 1226 ot min^{-1} a rychlost polarizace 10 mV s^{-1} . Jako pomocná pracovní elektroda byl použit platinový plíšek o ploše $0,72 \text{ cm}^2$. Obě elektrody byly ponořené do základního elektrolytu tvořeného $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ chloristanem sodným v acetonitrilu. Referentní elektroda byla tvořena stříbrným plíškem o ploše $4,8 \text{ cm}^2$ ponořeným do roztoku $0,01 \text{ mol dm}^{-3}$ dusičnanu stříbrného v 1 mol dm^{-3} roztoku chloristanu sodného v acetonitrilu. Referentní elektroda byla od měřicího prostoru oddělena meziprostorem, který byl naplněn $0,5 \text{ mol dm}^{-3}$ roztokem chloristanu sodného v acetonitrilu. Obsah měřicího prostoru byl před každým měřením 5 minut probubláván argonem. Měření probíhalo za laboratorní teploty $22 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$.

Ze získaných polarogramů byly pomocí derivace vypočítány hodnoty půlvlnových potenciálů $E_{1/2}$.

2.3.2 Cyklická voltametrie

Měření bylo realizováno na přístroji Eko-Tribo Polarografu (Polaro-Sensors, ČR) se sběrem dat softwarem Polar Pro v. 5.1 (Polaro-Sensors, ČR) a probíhalo v třídílné polarografické nádobce, popsané v kapitole 2.3.1. Jako pracovní elektroda byla použita stacionární platinová elektroda o ploše $13,986 \text{ mm}^2$. Ostatní podmínky, referentní i pomocná elektroda byly popsány výše v kapitole 2.3.1.

2.3.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s UV detektorem

Měření bylo realizováno na kapalinovém chromatografu HP 1090 L (Hewlett-Packard) na koloně Rx C-18 ZORBAX délky 150 mm, průměru 4,6 mm a velikosti zrn 5 μm . Průtok mobilní fáze kolonou byl nastaven na hodnotu 0,8 ml min⁻¹. Detekce byla spektrofotometrická a probíhala při vlnové délce 235 nm. K nástřiku vzorků byl použit ventil Rheodyne s dávkovací smyčkou o objemu 10 μl . Měření bylo realizováno za laboratorní teploty 24 ± 1 °C.

Mobilní fází byla směs acetonitrilu a vody o objemovém zlomku acetonitrilu 0,70 a 0,75. Roztoky studovaných derivátů o koncentraci $1 \cdot 10^{-4}$ mol dm⁻³ byly připraveny v acetonitrilu. Stanovení mrtvého retenčního času kolony bylo provedeno nástřikem thiomocoviny ($c = 1$ mg dm⁻³). Získané chromatogramy byly vyhodnoceny pomocí programu CSW 32.

Kapacitní poměr k byl vypočítán ze vztahu

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (2.1)$$

kde t_R je retenční čas daného derivátu [s] a t_M je mrtvý retenční čas thiomocoviny [s].

2.3.4 Preparativní elektrolýza

Produkty elektrochemické oxidace byly připraveny preparativní elektrolýzou. Pro elektrolýzu bylo použito 5 mg vzorku. Elektrolýza probíhala ve skleněné nádobce H-typu. Použité zapojení bylo tříelektrodové. Pracovní a pomocná elektroda byla realizována pomocí Fischerovy velkoplošné platinové elektrody, obě elektrody byly ponořeny do základního elektrolytu tvořeného 0,1 mol dm⁻³ chloristanem sodným v acetonitrilu. Pracovní a pomocná elektroda byly od sebe odděleny meziprostorem, který byl vyplněn 0,5 mol dm⁻³ roztokem chloristanu sodného v acetonitrilu. Referenční elektroda byla realizována stříbrným drátem ponořeným do 0,01 mol dm⁻³ roztoku

dusičnanu stříbrného a 1 mol dm⁻³ roztoku chloristanu sodného v acetonitrilu a od pracovního prostoru byla oddělena meziprostorem s 0,5 mol dm⁻³ roztokem chloristanu sodného v acetonitrilu. Zdrojem napětí byl Potenciostat/Galvanostat Model 273 (EG&G Princeton Applied Research). Elektrolýza probíhala za intenzivního míchání a za laboratorní teploty. Elektrolýza trvala 1,5 hodiny.

Elektrolyzát byl následně odpařen do sucha na vakuové rotační odparce s vodní lázní o teplotě 70 °C a třikrát extrahován chloroformem. Extrakt byl opětovně odpařen na vakuové rotační odparce s vodní lázní o teplotě 35 °C.

2.3.5 Kapalinová chromatografie s hmotnostním detektorem

Produkty elektrochemické oxidace studovaných látek byly analyzovány metodou HPLC-MS. Separace byla prováděna na kapalinovém chromatografu Agilent 1100 na koloně Watrex WRP-18, délky 250 mm, průměru 4 mm a velikosti zrn 7 μm. Eluce probíhala s mobilní fází acetonitril:voda v poměru 7:3 při průtokové rychlosti 0,6 ml min⁻¹. Detekce probíhala při 254 nm a zároveň byla naměřena hmotnostní spektra na hmotnostním detektoru Bruker Esquire 3000 s ionizací elektrosprejem.

2.4 QSPR, REGRESNÍ A STATISTICKÉ VÝPOČTY

Substituentové Hammettovy σ konstanty a Swain-Luptonovy konstanty byly převzaty z tabulek³⁸, hydrofobní π konstanty byly převzaty z publikace³⁹. U látek s více substituenty v molekule byly substituentové konstanty získány součtem substituentových konstant jednotlivých substituentů⁴⁰. Regresní výpočty byly provedeny v programu QSAR-PC:RAR (Biosoft, UK).

Výpočty hodnot rozdělovacích koeficientů oktanol-voda byly provedeny pomocí modulu PrologP programu Pallas 2.0 (CompuDrug, USA).

Odhad možných metabolitů studovaných látek byl proveden pomocí modulu MetabolExpert v programu Pallas 3.1 (CompuDrug, USA).

Naměřená data byla zpracována běžnými statistickými postupy^{41,42}. Prezentované výsledky sériových měření jsou mediány nejméně tří měření. Lineární závislosti dvou proměnných byly zpracovány metodou lineární regrese s vyhodnocením příslušných

odchylek a korelačních koeficientů. Výpočty byly realizovány pomocí softwarových programů Microcal Origin 6.0 (Microcal Software, USA) a Microsoft Excel 2003 (Microsoft Corporation, USA).

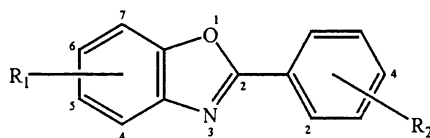
3 VÝSLEDKY A DISKUSE

3.1 VLIV SUBSTITUENTŮ NA VOLTAMETRICKÉ CHOVÁNÍ DERIVÁTŮ BENZOXAZOLU

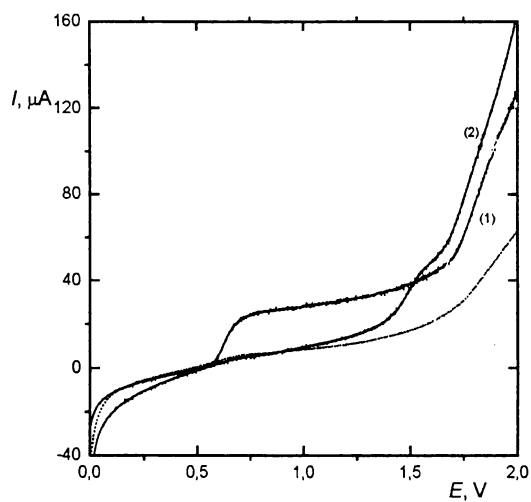
Vliv substituentů na voltametrické chování studovaných derivátů 2-fenylbenzoxazolu byl studován metodou DC voltametrie. Všechny studované deriváty poskytovaly v prostředí $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ chloristanu sodného v acetonitrilu jednu anodickou vlnu. Hodnoty půlvlnových potenciálů některých studovaných derivátů obsahujících nitro skupinu nebylo možno kvalitativně vyhodnotit (deriváty **4**, **14–16** a **19**), protože ležely na hranici potenciálového okna použitého základního elektrolytu. Naměřené hodnoty půlvlnových potenciálů zachycuje tab. 3.1 (str. 24).

Hodnoty půlvlnového potenciálu studovaných derivátů 2-fenylbenzoxazolu závisely na struktuře derivátu (obr. 3.1; str. 25). Deriváty obsahující amino skupinu (deriváty **5**, **9–11** a **18**) poskytovaly anodickou vlnu v oblasti kolem $0,6 \text{ V}$, ostatní deriváty poskytovaly anodickou vlnu s půlvlnovým potenciálem zhruba o 1 V vyšším.

Tab. 3.1 Struktury, Hammettovy a Swain-Luptonovy substituentové konstanty a půlvlnové potenciály anodické vlny studovaných derivátů benzoxazolu v 0,1 mol dm⁻³ chloristanu sodném v acetonitrilu ($c = 5 \cdot 10^{-4}$ mol dm⁻³, $A = 13,986$ mm², $v = 10$ mV s⁻¹, $\omega = 1226$ ot min⁻¹, měřeno proti Ag/0,01 mol dm⁻³ AgNO₃/0,1 mol dm⁻³ NaClO₄)



derivát	R ₁			R ₂			E _{1/2}				
	poloha	substituent	σ _{R1}	\mathcal{F}_{R1}	\mathcal{R}_{R1}	poloha	substituent	σ _{R2}	\mathcal{F}_{R1}	\mathcal{R}_{R1}	V
1			0,00	0,00	0,00	4	-OCH ₃	-0,27	0,29	-0,56	1,490
2			0,00	0,00	0,00	4	-Br	0,23	0,45	-0,22	1,650
3	5	-CH ₃	-0,07	0,01	-0,18	4	-F	0,06	0,45	-0,39	1,530
5	5	-NH ₂	-0,16	0,08	-0,74	4	-Br	0,23	0,45	-0,22	0,625
6			0,00	0,00	0,00	4	-CH ₃	-0,17	0,01	-0,18	1,630
7	5	-NO ₂	0,71	0,65	0,13	4	-OC ₂ H ₅	-0,24	0,26	-0,50	1,305
8	6	-CH ₃	-0,17	0,01	-0,18	2,4	-Cl ₂	0,60	0,84	-0,38	1,560
9	6	-NH ₂	-0,66	0,08	-0,74	4	-F	0,06	0,45	-0,39	0,580
10	5	-NH ₂	-0,16	0,08	-0,74	4	-F	0,06	0,45	-0,39	0,620
11	6	-NH ₂	-0,66	0,08	-0,74	4	-C ₂ H ₅	-0,15	0,00	-0,15	0,560
12	6	-NO ₂	0,78	0,65	0,13	4	-C ₂ H ₅	-0,15	0,00	-0,15	1,785
13	5	-NO ₂	0,71	0,65	0,13	4	-C ₂ H ₅	-0,15	0,00	-0,15	1,755
17	6	-NO ₂	0,78	0,65	0,13	4	-C(CH ₃) ₃	-0,20	-0,02	-0,18	1,855
18	5	-NH ₂	-0,16	0,08	-0,74			0,00	0,00	0,00	0,615
20	5	-Cl	0,37	0,42	-0,19	4	-Cl	0,23	0,42	-0,19	1,850
21	5	-Cl	0,37	0,42	-0,19	4	-C ₂ H ₅	-0,15	0,00	-0,15	1,590



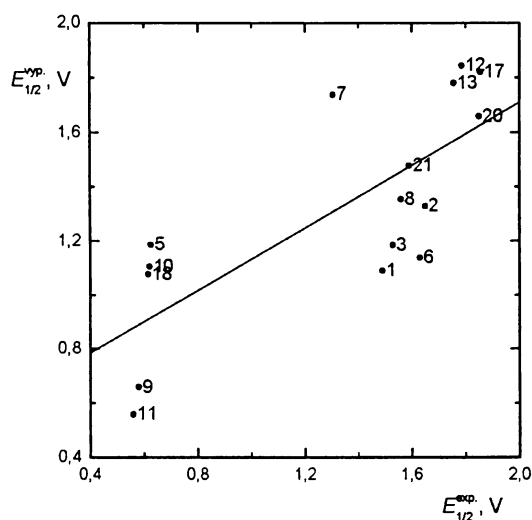
Obr. 3.1 DC voltametrie (1) 2-(4-bromfenyl)-5-benzoxazylamin (derivát **5**) a (2) 2-(4-methoxyfenyl)benzoxazolu (derivát **1**) v $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ chloristanu sodném v acetonitrilu (tečkovaná křivka). ($c = 4 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $A = 13,986 \text{ mm}^2$, $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$, $\omega = 1226 \text{ ot min}^{-1}$, měřeno proti $\text{Ag}/0,01 \text{ mol dm}^{-3} \text{ AgNO}_3/0,1 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaClO}_4$)

Vliv substituentů na voltametrické chování studovaných derivátů benzoxazolu byl kvantifikován pro půlvolný potenciál oxidační vlny se substituentovými Hammettovými σ konstantami. Pomocí programu QSAR-PC:PAR byla provedena korelační analýza vztahu mezi naměřenými hodnotami půlvolných potenciálů a příslušných substituentových konstant. Byla nalezena následující korelační rovnice:

$$E_{1/2} = 0,893\sigma_{R1} + 0,478\sigma_{R2} + 1,219 \quad (3.1)$$

$$n = 16, r = 0,760, s_y = 0,359, F = 8,91 > F_{2;13;0,01} = 6,7$$

Vzájemnou korelaci mezi změřenými a vypočítanými hodnotami půlvolných potenciálů podle rovnice (3.1) zachycuje obr. 3.2.



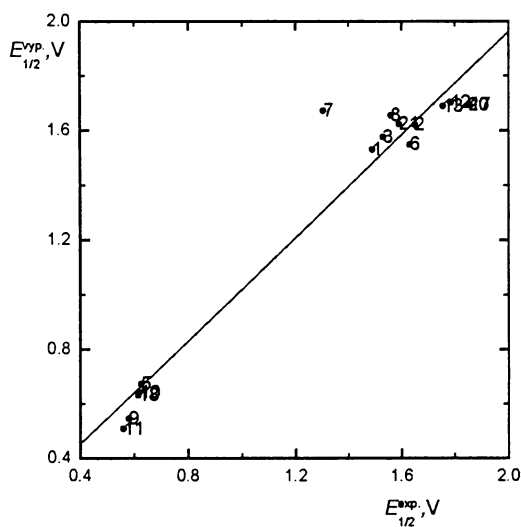
Obr. 3.2 Korelace mezi naměřenými hodnotami půlvolných potenciálů studovaných derivátů benzoxazolu a hodnotami půlvolných potenciálů vypočítaných z rovnice (3.1) $r = 0,760$ (číslice u jednotlivých bodů odpovídají číslům derivátů).

Neuspokojivá hodnota korelačního koeficientu vedla k tomu, že byla provedena další korelační analýza, ve které byla zahrnuta indikační konstanta I , indikující přítomnost aminoskupiny ve struktuře derivátu (vliv aminoskupiny je velmi dobře patrný z obr. 3.2). Indikační konstanta nabývá hodnoty $I = 1$ pro derivát obsahující ve struktuře aminoskupinu, pokud derivát aminoskupinu neobsahuje nabývá konstanta hodnoty $I = 0$. Získaná korelační rovnice je:

$$E_{1/2} = 0,193 \sigma_{R1} + 0,182 \sigma_{R2} - 0,917 I \quad (3.2)$$

$$n = 16, r = 0,971, s_y = 0,137, F = 66,44 > F_{(3; 12; 0,01)} = 5,95$$

Vzájemnou korelaci mezi změřenými a vypočítanými hodnotami půlvlnových potenciálů podle rovnice (3.2) zachycuje obr. 3.3.



Obr. 3.3 Korelace mezi naměřenými hodnotami půlvlnových potenciálů studovaných derivátů benzoxazolu a hodnotami půlvlnových potenciálů vypočítaných z rovnice (3.2) $r = 0,971$ (číslice u jednotlivých bodů odpovídají číslům derivátů).

Zavedením indikační konstanty I byla nalezena velmi uspokojivá korelační rovnice popisující vliv substituentů na hodnotu anodického půlvolného potenciálu studovaných benzoxazolů. Vzhledem k tomu, že indikační konstanta I je konstantou empirickou, byla provedena korelační analýza mezi půlvolným potenciálem a Swain-Luptonovými substituentovými konstantami. Z vypočítané korelační matice (tab. 3.2) je patrné, že dominantní vliv na půlvolný potenciál má substituent vázaný na benzoxazolovém jádře.

Tab. 3.2 Korelační matrice analýzy vztahu mezi anodickým půlvolným potenciálem derivátů benzoxazolu a Swain-Luptonovými substituentovými konstantami.

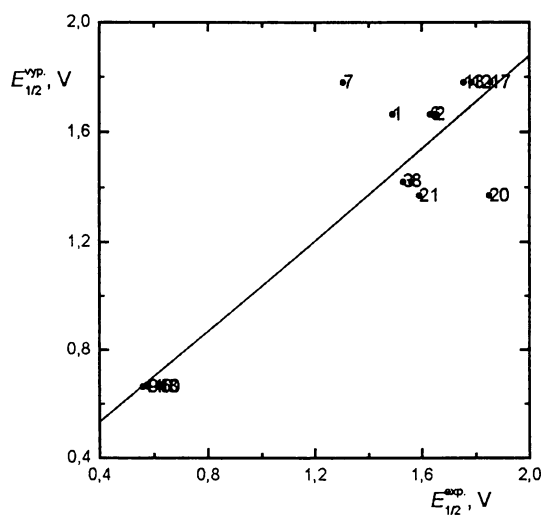
	$E_{1/2}$	\mathcal{F}_{R1}	\mathcal{R}_{R1}	\mathcal{F}_{R2}	\mathcal{R}_{R2}
$E_{1/2}$	1,000				
\mathcal{F}_{R1}	0,471	1,000			
\mathcal{R}_{R1}	0,921	0,548	1,000		
\mathcal{F}_{R2}	-0,112	-0,485	-0,202	1,000	
\mathcal{R}_{R2}	0,030	0,212	-0,123	-0,587	1,000

Byla vypočítána korelační rovnice mezi anodickým půlvlnovým potenciálem a Swain-Luptonovými konstantami pro substituent vázaný na benzoxazolový kruh

$$E_{1/2} = 1,342R_{R1} - 0,089F_{R1} + 1,663 \quad (3.3)$$

$$n = 16, r = 0,922, s_y = 0,200, F = 36,93 > F_{2,13,0,01} = 6,7$$

Vzájemnou korelaci mezi změřenými a vypočítanými hodnotami půlvlnových potenciálů podle rovnice (3.3) zachycuje obr. 3.4.



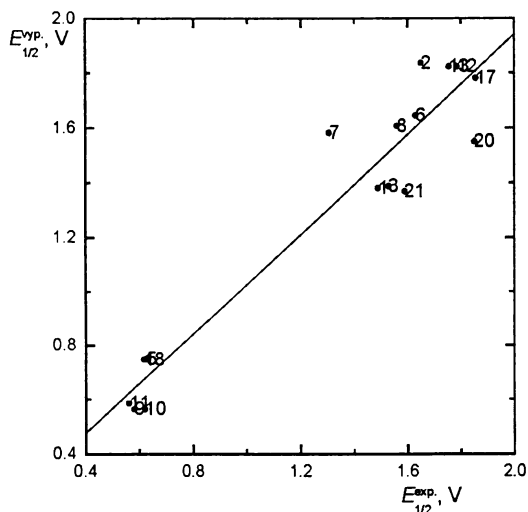
Obr. 3.4 Korelace mezi naměřenými hodnotami půlvlnových potenciálů studovaných derivátů benzoxazolu a hodnotami půlvlnových potenciálů vypočítaných z rovnice (3.3) $r = 0,922$ (čísllice u jednotlivých bodů odpovídají číslům derivátů).

Korelační koeficient rovnice (3.3) nedosahuje velikosti korelačního koeficientu rovnice (3.2), proto byla vypočítána další korelační rovnice zahrnující rovněž Swain-Luptonovy konstanty substituentu vázaném na fenyllovém kruhu

$$E_{1/2} = 1,463\mathcal{P}_{R1} - 0,059\mathcal{F}_{R1} + 1,089\mathcal{P}_{R2} + 0,535\mathcal{F}_{R2} + 1,835 \quad (3.4)$$

$$n = 16, r = 0,957, s_y = 0,174, F = 30,03 > F_{4,11;0,01} = 5,67$$

Vzájemnou korelaci mezi změřenými a vypočítanými hodnotami půlvolných potenciálů podle rovnice (3.4) zachycuje obr. 3.5.

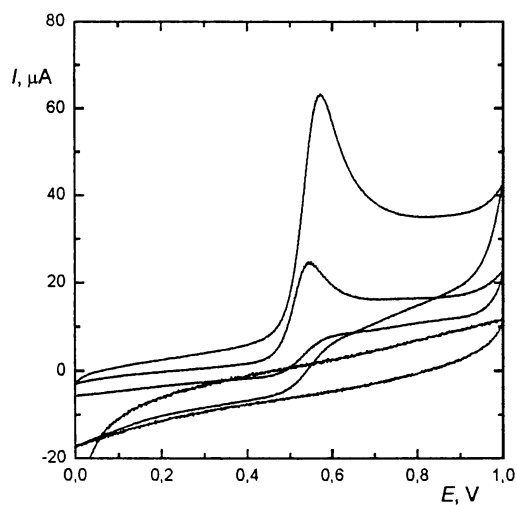


Obr. 3.5 Korelace mezi naměřenými hodnotami půlvolných potenciálů studovaných derivátů benzoxazolu a hodnotami půlvolných potenciálů vypočítaných z rovnice (3.4) $r = 0,957$ (čísllice u jednotlivých bodů odpovídají číslům derivátů).

Z hodnot statistických charakteristik vypočítaných korelačních rovnic plyne, že nejsprávněji zachycuje vztah mezi strukturou studovaných benzoxazolů a jejich anodickým půlvolným potenciálem rovnice (3.2). Z příslušných regresních koeficientů rovnic (3.1) a (3.4) rovněž plyne, že na anodický půlvolný potenciál studovaných derivátů mají dominantnější vliv substituenty vázané na benzoxazolový kruh.

3.2 STUDIUM PRŮBĚHU ELEKTROCHEMICKÉ OXIDACE

Reverzibilita elektrooxidace studovaných derivátů benzoxazolu byla studována pomocí cyklické voltametrie. V celé sérii studovaných derivátů byl v rozmezí rychlosti polarizace elektrody $10\text{--}3000\text{ mV s}^{-1}$ sledován hlavní anodický pík bez katodického protějšku (obr. 3.6). Z naměřených hodnot je patrné, že oxidace probíhá irreversibilně.



Obr. 3.6 Cyklický voltamogram 2-(4-ethylfenyl)-5-benzoxazylaminu (derivát 11) v prostředí $0,1\text{ mol dm}^{-3}$ chloristanu sodného v acetonitrilu (tečkovaná křivka). ($c = 5 \cdot 10^{-4}\text{ mol dm}^{-3}$, $A = 13,986\text{ mm}^2$, (1) $\nu = 20\text{ mV s}^{-1}$, (2) $\nu = 150\text{ mV s}^{-1}$, měřeno proti $\text{Ag}/0,01\text{ mol dm}^{-3}\text{ AgNO}_3/0,1\text{ mol dm}^{-3}\text{ NaClO}_4$)

3.3 Vliv substituentů na retenční chování derivátů benzoxazolu

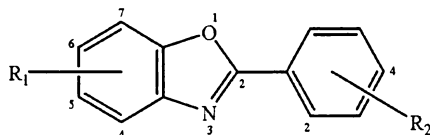
Byl studován vliv substituentů na retenční časy derivátů benzoxazolu při HPLC chromatografii na reverzní fázi C-18. Jako mobilní fáze byla použita směs acetonitril-voda s proměnlivým složením acetonitrilu ($w(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,70$ a $0,75$). Byly naměřeny retenční časy studovaných derivátů a vypočítány příslušné kapacitní faktory (tab. 3.3; str. 33).

Bylo zjištěno, že s rostoucím obsahem acetonitrilu v mobilní fázi dochází ke snižování retenčního času studovaných derivátů, jak je znázorněno na obr. 3.7 (str. 34).

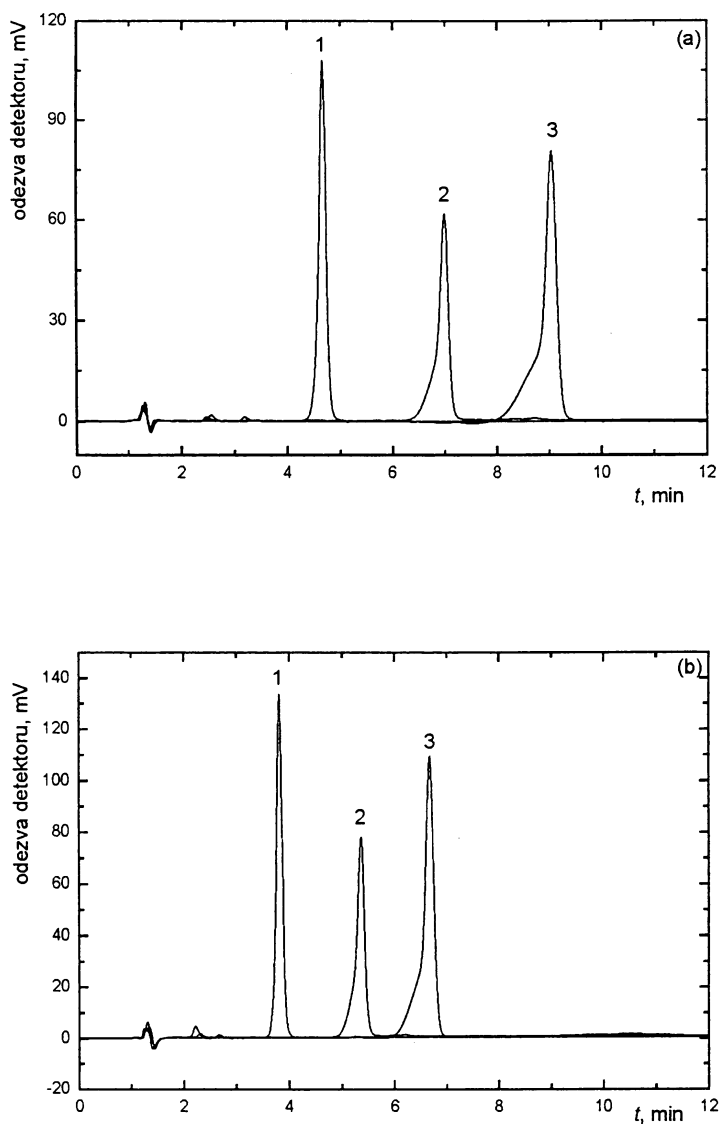
Vliv substituentů na retenční čas je demonstrován na příkladu derivátů, kterým se mění jedna funkční skupina na benzoxazolovém kruhu nebo na fenylovém kruhu (obr. 3.8; str. 35).

Tab. 3.3 Struktury, hydrofobní substituentové konstanty, logaritmy rozdělovacího koeficientu oktanol-voda, retenční časy a kapacitní poměry studovaných derivátů benzoxazolu při HPLC chromatografii na koloně Rx C-18 ZORBAX (150 × 4,6 mm), mobilní fáze acetonitril-voda.

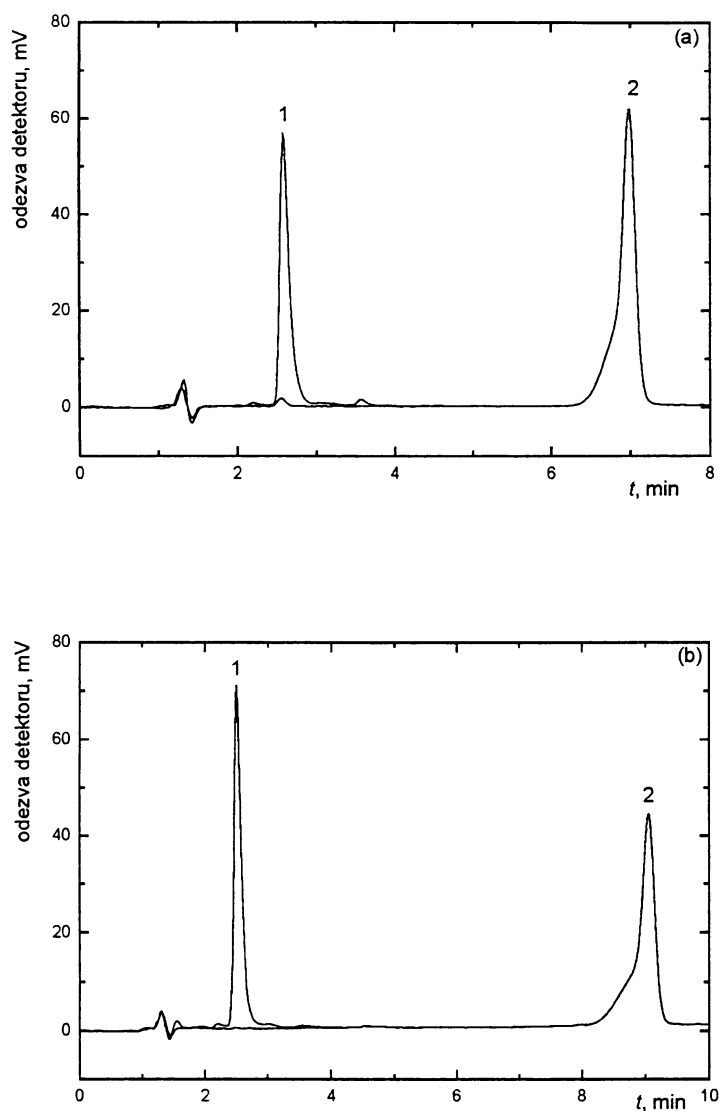
($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $F_m = 0,8 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, $t = 24 \text{ }^\circ\text{C}$, $\lambda = 235 \text{ nm}$, nástřik $10 \mu\text{l}$)



derivát	R ₁			R ₂			log P	w(CH ₃ CN)=0,70		w(CH ₃ CN)=0,75	
	poloha	substituent	π _A	poloha	substituent	π _B		t _R , s	k	t _R , s	k
1			0,00	4	-OCH ₃	-0,12	3,37	2,50	0,69	2,27	0,50
2			0,00	4	-Br	1,13	4,09	9,03	5,10	6,75	3,47
3	5	-CH ₃	0,56	4	-F	0,31	4,12	6,99	3,72	5,36	2,55
4	5	-NO ₂	0,54			0,00	3,12	4,57	2,09	3,78	1,50
5	5	-NH ₂	-1,29	4	-Br	1,13	3,19	3,90	1,64	3,41	1,26
6			0,00	4	-CH ₃	0,48	3,85	12,19	7,24	9,36	5,20
7	5	-NO ₂	0,54	4	-OC ₂ H ₅	0,03	3,66	2,16	0,46	1,99	0,32
8	6	-CH ₃	0,48	2,4	-Cl	1,62	5,19	13,92	8,41	10,25	5,79
9	6	-NH ₂	-1,63	4	-F	0,31	2,66	2,46	0,66	2,22	0,49
10	5	-NH ₂	-1,29	4	-F	0,31	2,66	2,58	0,74	2,35	0,58
11	6	-NH ₂	-1,63	4	-C ₂ H ₅	1,02	3,49	3,33	1,25	2,89	0,94
12	6	-NO ₂	0,50	4	-C ₂ H ₅	1,02	4,22	9,22	5,23	6,91	3,64
13	5	-NO ₂	0,54	4	-C ₂ H ₅	1,02	4,22	9,04	5,11	6,71	3,50
14	6	-NO ₂	0,50	4	-Br	1,13	3,92	8,23	4,56	6,23	3,18
15	6	-NO ₂	0,50	4	-F	0,31	3,40	4,71	2,18	3,78	1,54
16	5	-NO ₂	0,54	4	-F	0,31	3,40	4,65	2,14	3,72	1,50
17	6	-NO ₂	0,50	4	-C(CH ₃) ₃	1,98	4,89	14,68	8,92	10,26	5,89
18	5	-NH ₂	-1,29			0,00	3,12	2,45	0,66	2,30	0,54
19	6	-NO ₂	0,50			0,00	2,39	4,66	2,15	3,80	1,55
20	5	-Cl	1,04	4	-Cl	0,93	4,56	6,23	3,21	4,79	2,21
21	5	-Cl	1,04	4	-C ₂ H ₅	1,02	5,02	17,33	10,71	12,25	7,22



Obr. 3.7 Vliv složení mobilní fáze na retenční čas derivátů (1) 6-nitro-2-fenylbenzoxazol (derivát 19), (2) 2-(4-ethylfenyl)-5-nitrobenzoxazol (derivát 13) a (3) 2-(4-fluorfenyl)-5-methylbenzoxazol (derivát 3) při HPLC na koloně Rx C-18 ZORBAX ($150 \times 4,6$ mm), mobilní fáze (a) $w(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,70$ a (b) $w(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,75$. ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3} , $F_m = 0,8$ $\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$, $t = 24$ $^\circ\text{C}$, $\lambda = 235$ nm, nástřik 10 μl)



Obr. 3.8 Vliv substituentů na retenční časy studovaných derivátů při HPLC na koloně Rx C-18 ZORBAX (150 × 4,6 mm), mobilní fáze ($w(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,70$): (a) (1) 2-(4-fluorfenyl)-5-benzoxazylamin (derivát **11**), (2) 2-(4-fluorofenyl)-5-methylbenzoxazol (derivát **3**), (b) (1) 2-(4-methoxyfenyl)benzoxazolu (derivát **1**), (2) 2-(4-brom-fenyl)benzoxazolu (derivát **2**) ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $F_m = 0,8 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, $t = 24 \text{ }^\circ\text{C}$, $\lambda = 235 \text{ nm}$, nástřík 10 μl)

Vliv struktury na chromatografické chování studovaných skupin látek byl kvantifikován korelací kapacitního poměru s hodnotou logaritmu rozdělovacího koeficientu oktanol-voda korelací kapacitního poměru s hydrofobními substituentovými π konstantami.

Pro korelaci mezi kapacitním poměrem k a rozdělovacím koeficientem oktanol-voda, byly nalezeny rovnice

a) pro mobilní fázi $w(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,70$

$$k = 3,24 \log P - 8,47 \quad (3.5)$$

$$n = 21, r = 0,832, s_y = 1,733, F = 42,62 > F_{1; 19; 0,01} = 8,18$$

b) pro mobilní fázi $w(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,75$

$$k = 2,16 \log P - 5,54 \quad (3.6)$$

$$n = 21, r = 0,832, s_y = 1,191, F = 40,03 > F_{1; 19; 0,01} = 8,18$$

Pro korelaci mezi kapacitním poměrem k a hydrofobními π konstantami byly nalezeny rovnice

a) pro mobilní fázi $w(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,70$

$$k = 1,50 \pi_{R1} + 3,33 \pi_{R2} + 1,41 \quad (3.7)$$

$$n = 21, r = 0,823, s_y = 1,821, F = 18,91 > F_{2; 18; 0,01} = 6,01$$

b) pro mobilní fázi $w(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,75$

$$k = 0,99 \pi_{R1} + 2,22 \pi_{R2} + 1,04 \quad (3.8)$$

$$n = 21, r = 0,832, s_y = 1,253, F = 17,68 > F_{1; 18; 0,01} = 6,01$$

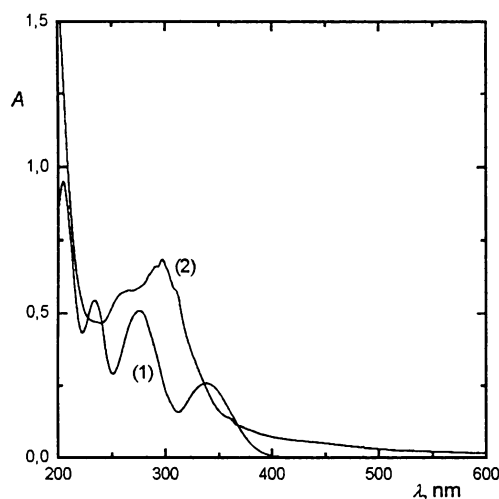
Z příslušných regresních koeficientů rovnic (3.7) a (3.8) je patrné, že větší vliv na chromatografické chování látky má substituent navázaný na fenylovém kruhu. Tuto skutečnost lze vysvětlit větší polaritou fenylového kruhu; při interakci s nepolární stacionární fází se bude tedy molekula orientovat k stacionární fázi právě fenylovým kruhem.

3.4 ELEKTROOXIDAČNÍ PRODUKTY DERIVÁTŮ BENZOXAZOLU

3.4.1 Příprava elektrooxidačních produktů

Produkt elektrochemické oxidace 2-fenyl-6-nitrobenzoxazolu (derivát **19**) byl připraven metodou preparativní elektrolýzy.

V aparatuře popsané v kapitole 2.3.4 bylo ve 40 ml $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ roztoku chloristanu sodného v acetonitrilu elektrolyzováno 5 mg derivátu **19** při potenciálu odpovídajícímu limitnímu konvektivně-difúznímu proudu oxidace ($E_{\text{prac.}} = 0,9 \text{ V}$) po dobu 120 minut. V průběhu elektrolýzy poklesl proud z hodnoty 2,5 mA na hodnotu 0,1 mA. Před i po elektrolýze derivátu **19** bylo zaznamenáno UV spektrum (obr. 3.9). Po skončení elektrolýzy byl elektrolyzát odpařen do sucha na vakuové rotační odparce, extrahován chloroformem a extrakt znovu odpařen na vakuové rotační odparce.

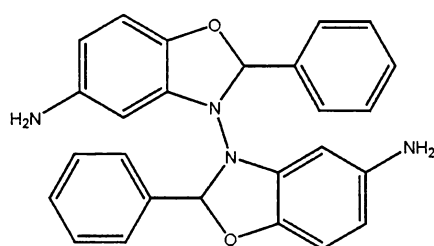


Obr. 3.9 UV spektrum 2-fenyl-6-nitrobenzoxazolu (derivát **19**):
(1) před elektrolýzou a (2) po elektrolýze. (prostředí $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$
 NaClO_4 , $l = 1 \text{ cm}$)

3.4.2 Identifikace produktů elektrooxidace

Produkty elektrooxidace derivátu **19** byly podrobeny analýze na kapalinovém chromatografu ve spojení s hmotnostním spektrometrem jako detektorem, za podmínek popsanych v kapitole 2.3.5.

Z naměřených dat je patrné, že elektrochemická oxidace studovaných derivátů benzoxazolu je velmi složitý proces. Při následné analýze produktů pomocí hmotnostní spektrometrie byla získána složitá hmotnostní spektra, která se dosud nepodařilo zcela interpretovat. Jako jeden z hlavních produktů byl nalezen produkt $m/z = 422$, pravděpodobně se jedná o N-N dimer výchozího derivátu (struktura uvedena na obr. 3.10). Tvorbě dimerů by nasvědčovalo i zvýšení intenzity absorpčních pásů v oblasti 380–500 nm, jenž je pro tvorbu dimerů charakteristické^{43, 44}.



Obr. 3.10 Chemická struktura dimeru vzniklého z 2-fenyl-6-nitro- benzoxazolu (derivát **19**)

4 ZÁVĚR

Předkládaná diplomová práce se zaměřila na QSPR studium elektrochemických a chromatografických vlastností nově syntetizovaných derivátů 2-fenylbenzoxazolu a na přípravu a pokus o identifikaci produktů jejich elektrochemické oxidace.

V první části práce byl studován vliv substituentů na anodický půlvolnový potenciál studovaných látek v prostředí acetonitrilu. Bylo zjištěno, že elektrochemicky aktivní jsou všechny studované deriváty benzoxazolu, nicméně pro několik derivátů nebylo možné pro vysokou hodnotu půlvolnového potenciálu kvalitativně tuto hodnotu stanovit. Ukázalo se, že velký vliv na hodnotu půlvolnového potenciálu má přítomnost aminoskupiny, která značně snižuje hodnotu anodického půlvolnového potenciálu. Pomocí QSPR analýzy byly nalezeny a otestovány korelační rovnice kvantifikující vliv substituentů na hodnotu anodického půlvolnového potenciálu. Jako nejvýhodnější se ukázala rovnice zahrnující kromě Hammettových σ konstant indikátorovou konstantu I zahrnující vliv aminoskupiny v molekule (definovanou jako $I = 1$ pro přítomnost aminoskupiny v molekule). Korelační rovnice popisující vztah mezi strukturou a anodickým půlvolnovým potenciálem derivátů 2-fenylbenzoxazolu má tvar

$$E_{1/2} = 0,193 \sigma_{R1} + 0,182 \sigma_{R2} - 0,917 I \quad (3.2)$$

Z příslušných regresních koeficientů rovnic (3.1) a (3.4) rovněž plyne, že na anodický půlvolnový potenciál studovaných derivátů mají dominantnější vliv substituenty vázané na benzoxazolový kruh.

Reverzibilita elektrooxidace studovaných derivátů benzoxazolu byla studována metodou cyklické voltametrie, bylo pozorováno pouze irreverzibilní chování.

Metodou RP-HPLC byl studován vliv substituentů na chromatografické chování (kapacitní poměr) derivátů benzoxazolu. Pomocí QSPR analýzy byly kromě rovnic popisujících vztah mezi kapacitním poměrem a vypočítanou hodnotou logaritmu rozdělovacího koeficientu oktanol-voda nalezeny i rovnice kvantifikující vliv substituentů na kapacitní poměr k na základě hydrofobních π konstant

a) pro mobilní fázi $w(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,70$

$$k = 1,50 \pi_{R1} + 3,33 \pi_{R2} + 1,41 \quad (3.7)$$

$$n = 21, r = 0,823, s_y = 1,821, F = 18,91 > F_{2, 18; 0,01} = 6,01$$

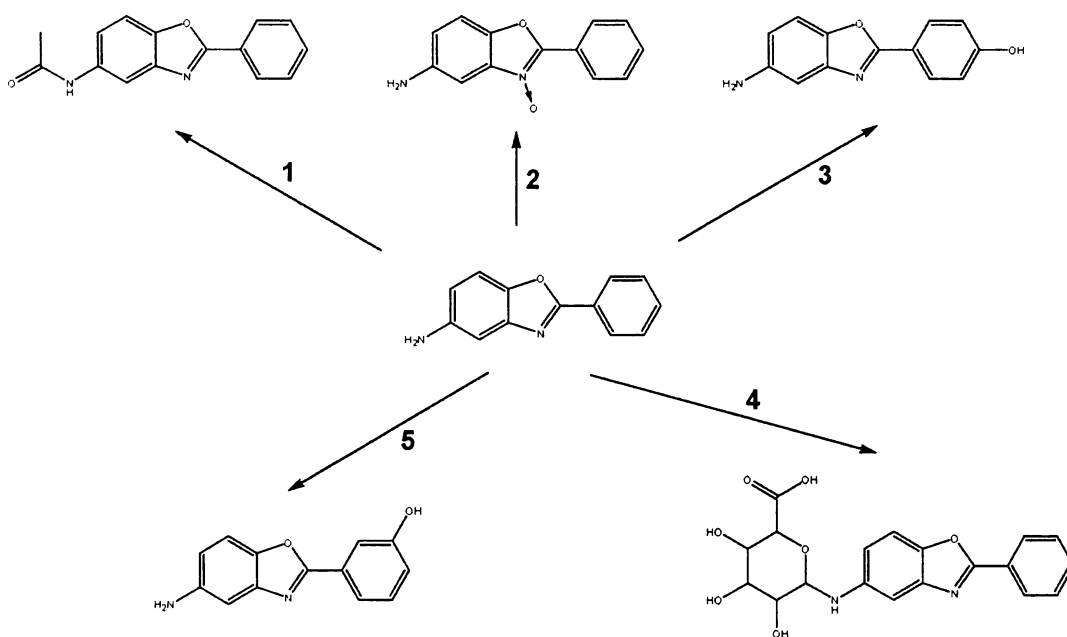
b) pro mobilní fázi $w(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,75$

$$k = 0,99 \pi_{R1} + 2,22 \pi_{R2} + 1,04 \quad (3.8)$$

$$n = 21, r = 0,832, s_y = 1,253, F = 17,68 > F_{1, 18; 0,01} = 6,01$$

Z příslušných regresních koeficientů rovnic (3.7) a (3.8) je patrné, že větší vliv na chromatografické chování látky má substituent navázaný na fenylovém kruhu. Tuto skutečnost lze vysvětlit větší polaritou fenylového kruhu; při interakci s nepolární stacionární fází se bude tedy molekula orientovat k stacionární fázi právě fenylovým kruhem.

V závěrečné části práce byly připraveny a částečně analyzovány produkty elektrooxidace vybraného 2-fenyl-6-nitrobenzoxazolu. Bylo zjištěno, že elektrooxidací vzniká několik produktů; získaná složitá hmotnostní spektra se dosud nepodařilo interpretovat. Jako jeden z hlavních produktů byl nalezen produkt $m/z = 422$, pravděpodobně se jedná o N-N dimer výchozího derivátu. Možné složení elektrooxidačních produktů lze odhadnout na základě analogie s předpověděnými metabolity programem Pallas 3.1 (obr. 4.1).



Obr. 4.1 Odhadnuté metabolické cesty 2-fenyl-6-nitrobenzoxazolu (derivát 19) pomocí programu Pallas 3.1: (1) N-acetylace, (2) N-oxidace, (3) para-hydroxylace, (4) meta-hydroxylace, (5) I. fáze biotransformace

Během oxidace studovaných derivátů benzoxazolu bude nejspíše docházet k oxidaci na dusíku benzoxazolového kruhu a ke vzniku N-oxidů. Vznik N-oxidů je typický jak při chemických oxidacích dusíkatých heterocyklických sloučenin⁴⁵, tak při oxidacích biologických (N-oxidace katalyzovaná buněčným mikrosomálním systémem⁴⁶). Jednou z možných stabilizačních reakcí N-oxidů je vznik dimerů. Vznik dimerů byl při elektrochemické oxidaci pozorován např. u elektrooxidace derivátů akridinu⁴³.

Literatura

1. Badr M. Z. A., Aly M. M., Attala A. A., Mahgoub S. A.: Molecular rearrangements. Part XXXII. Thermolysis and photolysis of some hydroxylamine derivatives. *Revue Roumaine de Chimie* **36**, 1129–1134 (1991).
2. Stephens F.F., Bower J.D.: The preparation of benziminazoles and benzoxazoles from Schiff's Bases. *Journal of the Chemical Society*, 2971–2972 (1949).
3. Temiz Ö., Ören İ., Şener E., Yalçın İ., Uçartürk N.: Synthesis and microbiological activity of some novel 5- or 6-methyl-2-(2,4-disubstituted phenyl)benzoxazole derivatives. *Il Farmaco* **53**, 337–341 (1998).
4. Berne X., Wodka D., Sowin T. J.: Solid-phase synthesis of benzoxazoles from 3-nitrotyrosine. *Journal of Combinatorial Chemistry* **3**, 360–366 (2001).
5. Garner R., Mullock E. B., Suschitz H.: Syntheses of heterocyclic compounds 14. Oxazoles from pyrolysis of aryl azides in a mixture of a carboxylic and polyphosphoric acid. *Journal of the Chemical Society C-Organic* **21**, 1980–1983 (1966).
6. Hillebrand S., Segala M., Backup T., Correia R. R. B., Horowitz F., Stefani V.: First hyperpolarizability in proton-transfer benzoxazoles: computer-aided design, synthesis and study of a new model compound. *Chemical Physics* **273**, 1–10 (2001).
7. Grellmann K.H., Tauer E.: Reaction pathways for the photochemical conversion of ortho-substituted benzylideneanilines to azoles. *Journal of the American Chemical Society* **95**, 3104–3108 (1973).
8. Yalçın İ., Ören İ., Temiz Ö., Şener E.A.: QSARs of some novel isosteric heterocyclics with antifungal activity. *Acta Biochimica Polonica* **47**, 481–486 (2000).

9. Ören İ., Temiz Ö., Yalçın İ., Şener E., Akin A., Uçartürk N.: Synthesis and microbiological activity of 5(or 6)-methyl-2-substituted benzoxazole and benzimidazole derivatives. *Arzneimittel Forschung/Drug Research* **47**, 1393–1397 (1997).
10. Akbay A., Ören İ., Temiz-Arpaci Ö., Şener E.A., Yalçın İ.: Synthesis and HIV-1 reverse transcriptase inhibitor activity of some 2,5,6-substituted benzoxazole, benzimidazole, benzothiazole and oxazolo (4,5-b)pyridine derivatives. *Arzneimittel Forschung/Drug Research* **53**, 266–271 (2003).
11. Giménez R., Oriol L., Piñol M., Serrano J. L., Viñuales A. I., Fisher T., Stumpe J.: Synthesis and properties of 2-phenylbenzoxazole-based luminophores for *in situ* photopolymerized liquid-crystal films. *Helvetica Chimica Acta* **89**, 304–319 (2006).
12. Luo K., Jin J., Yang S., Li G., Jiang J.: Improvement of surface wetting properties of poly(p-phenylene benzoxazole) by incorporation of ionic groups. *Materials Science and Engineering B* **132**, 59–63 (2006).
13. Edwards P. D., Meyer E. F., Jr., Vijayalakshmi J., Tuthill P.A., Andisik A., Gomes B., Strimpler A.: Design, synthesis, and kinetic evaluation of a unique class of elastase inhibitors, the peptidyl α -ketobenzoxazoles, and the x-ray crystal structure of the covalent complex between porcine pancreatic elastase and ac-ala-pro-val-2-benzoxazole. *Journal of the American Chemical Society* **114**, 1854–1863 (1992).
14. Decken A., Gossage R.A.: Synthesis and characterisation of the first transition metal complex of zoxazolamine (2-amino-5-chlorobenzoxazole): the X-ray crystal structure determination of $[\text{ZnCl}_2(\text{g}1\text{-N-benzoxazole-2-amino-5-chlorobenzoxazole})_2]$. *Journal of Inorganic Biochemistry* **99**, 664–667 (2005).
15. Vokurka M. a kol.: *Patofyziologie pro nelékařské směry*. Praha, Karolinum 2005.
16. Vinšová J.: Biologicky aktivní benzoxazoly. *Česká a slovenská farmacie* **52**, 282–290 (2003).
17. Yalçın İ., Şener E., Özden T., Özden S., Akin A.: Synthesis and microbiological activity of 5-methyl-2-[p-substituted phenyl]benzoxazoles *European Journal of Medicinal Chemistry*. **25**, 705–708 (1990).
18. Rosypal S.: *Úvod do molekulární biologie – molekulární biologie prokaryotické buňky*. 4. vydání. Brno, Rosypal 2006.

19. Fukukawa K., Ueda M.: Recent development of photosensitive polybenzoxazoles. *Polymer Journal* **38**, 405–418 (2006).
20. Claustro I., Abate G., Sanchez E., Acquaye J. H.: Synthesis, spectroscopic and electrochemical properties of ruthenium-2-(2-hydroxyphenyl)-benzoxazole complexes. Crystal structure of [Ru(terpy)(HPB)Cl]. *Inorganica Chimica Acta* **342**, 29–36 (2003).
21. Czerwieniec R., Kapturkiewicz A., Lipkowski J., Nowacki J.: Re(I)(tricarbonyl)+ complexes with the 2-(2-pyridyl)-N-methyl-benzimidazole, 2-(2-pyridyl)-benzoxazole and 2-(2-pyridyl)benzothiazole ligands-syntheses, structures, electrochemical and spectroscopic studies. *Inorganica Chimica Acta* **358**, 2701–2710 (2005).
22. Luiza J.B.: 2-Mercaptobenzoxazole pentacyanoferrate(II/III) complexes: UV-visible, Mössbauer, electron paramagnetic resonance, electrochemistry and molecular modeling. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **15**, 10–15 (2004).
23. Danel C., Foulon C., Park Ch., Yous S., Bonte J-P., Vaccher C.: Enantiomeric resolution of new aromatase inhibitors by liquid chromatography on cellulose chiral stationary phases. *Journal of Separation Science* **28**, 428–434 (2005).
24. Danel C., Foulon C., Park Ch., Yous S., Bonte J-P., Vaccher C.: Chiral resolution of the enantiomers of new aromatase inhibitors by liquid chromatography on amylose stationary phases. *Chromatographia* **59**, 181–188 (2004).
25. Hansch C., Leo A.: *Exploring QSAR Fundamentals and Applications in Chemistry and Biology*. Washington, American Chemical Society 1995.
26. Exner O.: *Korelační vztahy v organické chemii*. Praha, SNTL/ALFA 1981.
27. Williams A.: *Free Energy Relationships in Organic and Bio-organic Chemistry*. Cambridge, Royal Society of Chemistry 2003.
28. Swain C. G., Lupton E. C.: Field and resonance components of substituent effects. *Journal of the American Chemical Society* **90**, 4328–4337 (1968).
29. Zuman P.: *Vplyvy substituentov v organickej polarografii*. Bratislava, ALFA 1970.
30. Tömpe P., Clementis G., Petneházy I., Jászay Z. M., Töke L.: Quantitative structure-electrochemistry relationships of α,β -unsaturated ketones. *Analytica Chimica Acta* **305**, 295–303 (1995).

31. Nesměrák K.: Nové možnosti elektroanalytických metod v analýze farmaceutických, biologických a environmentálních matric. In: *Možnosti inovací v elektroanalytické chemii*. J. Barek (ed.). Praha, Pražské centrum pro inovace v analytické chemii 2006, s. 136–142.
32. Novotný L., Vachálková A., Piskala A.: Potential carcinogenicity of the synthetic 1,3,6-triazine (6-azapyrimidine) nucleic acid analogues determined by DC polarography II. Nucleosides of 6-azauracil *Neoplasma* **46**, 156–160 (1999).
33. Kuchař M., Rejholec W.: *Využití kvantitativních vztahů mezi strukturou a biologickou aktivitou*. Praha, Academia 1987.
34. Kalistan R.: *Quantitative Structure-Chromatographic Retention Relationships*. New York, Wiley 1987.
35. Unger S. H., Cook J. R., Hollenberg J. S.: Simple procedure for determining octanol aqueous partition, distribution, and ionization coefficients by reversed-phase high-pressure liquid-chromatography. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **67**, 1364–1367 (1978).
36. Dryhurst G., Kadish K.M., Shceller F., Renneberg R.: *Biological Electrochemistry I*. New York, Academic Press 1982.
37. Pinar A., Yurdakul P., Yildiz I., Temiz-Arpaci O., Acan N.L., Aki-Sener E., Yalcin Y.: Some fused heterocyclic compounds as eucaryotic topoisomerase II inhibitors. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **317**, 670–674 (2004).
38. Hansch C., Leo A., Hoekman D.: *Exploring QSAR 2 – Hydrophobic, Electronic, and Steric Constants*. Washington, American Chemical Society 1995.
39. Fujita T., Iwasa J., Hansch C.: A new substituent constant, π , derived from partition coefficients. *Journal of the American Chemical Society* **86**, 5175–5180 (1964).
40. Hansch C., Leo A., Unger S.H., Kim K.H., Nikaitani D., Lien E.J.: “Aromatic” substituent constants for structure-activity correlations. *Journal of Medicinal Chemistry* **16**, 1207–1216 (1973).
41. Doerffel K., Eckschlanger K.: *Optimální postupy chemické analýzy*. Praha, SNTL 1985.

-
42. Miller J.C., Miller J.N.: *Statistics for Analytical Chemistry*, 2nd. ed. New York, Ellis Horwood 1992.
 43. Nesměrák K., Němec I., Štícha M., Němcová I., Horká V.: Structure-property relationships of thioacridines; their electrochemical oxidation as a model of metabolic degradation. *Analytical Letters* **35**, 1617–1629 (2002).
 44. Bohn P.W.: Aspects of structure and energy-transport in artificial molecular assemblies. *Annual Review of Physical Chemistry* **44**, 37–60 (1993).
 45. Kobayashi Y., Kumadaki I., Sato H., Sekine Y., Hara T.: Studies on reaction of heterocyclic-compounds 12. N-oxidation of diazabenzene and diazaphthalene. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **22**, 2097–2100 (1974).
 46. Altuntas T.G., Gorrod J.W.: Effect of various potential inhibitors, activators and inducers on the N-oxidation of isomeric aromatic diazines in vitro using rabbit liver microsomal preparations. *Xenobiotika* **26**, 9–15 (1996).