

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

VZTAHY MEZI STRUKTUROU A RETENČNÍM
CHOVÁNÍM DERIVÁTŮ BENZOXAZINU

Diplomová práce

Studijní obor: Klinická a toxikologická analýza

Praha 2006

Vojtěch Vágner

Prohlášení

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

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

V Praze, 1. května 2006.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Karl' or similar, with a long horizontal flourish extending to the right.

Obsah

	Seznam použitých zkratk a symbolů	4
1	Teoretický úvod	6
1.1	Cíl práce	6
1.2	Vliv substituentů na fyzikálně-chemické vlastnosti látek	6
1.2.1	Vliv substituentů na chromatografické chování látek	7
1.2.2	Vliv substituentů v molekulové absorpční spektroskopii v ultrafialové oblasti	9
1.3	Benzoxaziny	10
1.3.1	Uplatnění benzoxazinů ve farmacii	12
1.3.2	Studované deriváty benzoxazinu	13
2	Experimentální část	16
2.1	Studované látky	16
2.2	Použité chemikálie	16
2.3	Použité metody měření a zpracování dat	16
2.3.1	Molekulová absorpční spektrometrie v UV oblasti	16
2.3.2	Kapalinová chromatografie	17
2.4	QSPR, regresní a statistické výpočty	17
3	Výsledky a diskuse	19
3.1	Studium vlivu substituentů na molekulová absorpční spektra derivátů benzoxazinu v ultrafialové oblasti	19
3.2	Studium vlivu substituentů na retenční chování derivátů benzoxazinu	24
3.2.1	Naměřená data	24
3.2.2	QSRR analýza naměřených dat	31
3.2.2.1	Korelace kapacitního poměru s hydrofobními substituentovými π konstantami	31
3.2.2.2	Korelace kapacitního poměru s rozdělovacím koeficientem oktanol-voda	34
4	Závěr	37
	Literatura	41

Seznam použitých zkratk a symbolů

a	směrnice lineární regrese <i>nebo</i> regresní koeficient v rovnici (3.1)–(3.9)	
A	absorbance	
b	úsek vytčený lineární regresí na ose y <i>nebo</i> regresní koeficient v rovnici (3.1)–(3.9)	
c	molární koncentrace <i>nebo</i> regresní koeficient v rovnici (3.1)–(3.9)	[mol dm ⁻³]
d	úsek v rovnici (3.1)–(3.9)	
e	regresní koeficient v rovnici (3.10)–(3.18)	
f	regresní koeficient v rovnici (3.10)–(3.18)	
F	hodnota F-testu	
$F_{\alpha,n}$	kritická hodnota F-testu pro n měření na hladině významnosti α	
F_m	průtoková rychlost mobilní fáze	[ml min ⁻¹]
g	úsek v rovnici (3.10)–(3.18)	
k	rovnovážná nebo rychlostní konstanta substituovaného derivátu <i>nebo</i> kapacitní poměr	
k^0	rovnovážná nebo rychlostní konstanta nesubstituovaného derivátu	
P_X	rozdělovací koeficient substituovaného derivátu	
P_H	rozdělovací koeficient nesubstituovaného derivátu	
n	počet měření <i>nebo</i> počet stupňů volnosti	
P	rozdělovací koeficient oktanol-voda	
QSAR	Quantitative structure-activity relationships	
QSPR	Quantitative structure-property relationships	
QSRR	Quantitative structure-retention relationships	
r	korelační koeficient	
s_y	směrodatná odchylka lineární regrese	

t	čas <i>nebo</i> teplota	[s] [°C]
t_R	retenční čas	[s]
t_M	mrtvý retenční čas	[s]
UV	ultrafialová oblast spektra	
w	objemový zlomek	
α	hladina významnosti	
λ	vlnová délka	[nm]
π	substituentová konstanta	

1 TEORETICKÝ ÚVOD

1.1 CÍL PRÁCE

Cílem předkládané diplomové práce je kvantifikace vztahů mezi strukturou různě substituovaných derivátů benzoxazinu a retenčním časem těchto derivátů ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii. Význam tohoto vztahu je dán předpokladem, že znalost retenčního chování biologicky aktivních látek lze využít při predikci jejich biologické účinnosti. To je možné především díky tomu, že hydrofobicita látek je klíčovou vlastností pro pohyb látky mezi biologickými kompartmenty (vodným/lipidovým) – tím je určeno pravděpodobné místo účinku, možnost kumulace a způsob, jakým může organismus látku eliminovat.

Předkládaná práce věnuje pozornost nově syntetizovaným derivátům benzoxazinu, u nichž byl *in vitro* prokázán antimykobakteriální účinek; jedná se tedy o potenciální antituberkulotika a antileprotika. V první části práce byl studován vliv substituentů na absorpční molekulová spektra derivátů v ultrafialové oblasti. Druhá část práce se zabývá studiem retenčních vlastností benzoxazinů a nalezením kvalitativních vztahů mezi jejich strukturou a hodnotou kapacitního poměru.

1.2 VLIV SUBSTITUENTŮ NA FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÉ VLASTNOSTI LÁTEK

Fyzikálně-chemické vlastnosti chemických sloučenin jsou jednoznačně určeny jejich strukturou. Rozhodující podíl na tom nese základní kostra molekuly, nezanedbatelný příspěvek k celkovým vlastnostem látky pak přinášejí nejrůznější substituenty. Změnou jejich polohy či druhu pak lze dosáhnout významné změny ve fyzikálně-chemickém, potažmo biologickém působení sloučeniny. Tento fakt lze využít při studiu vztahů mezi strukturou a chemickým chováním látek. K tomuto účelu byla vyvinuta tzv. QSPR analýza (angl. Quantitative Structure-Property Relationships)¹. Jedná se o statistickou

metodu zpracování většího množství kvantitativních experimentálních dat, která umožňuje vyvinout matematický model vztahů mezi strukturou a chemickými vlastnostmi sloučeniny a získané poznatky pak aplikovat v obecnější rovině. Pomocí této metody lze předvídat chemické chování i u nově syntetizovaných látek.

Základ metodě QSPR dal v roce 1935 Louis Plack Hammett, který kvantitativně popsal vliv substituentů na vztah struktury a reakčních vlastností molekuly. Učinil tak rovnicí

$$\log k = \log k^{\circ} + \rho\sigma \quad (1.1)$$

kde k je rovnovážná nebo rychlostní konstantou substituované látky, k° je rovnovážná nebo rychlostní konstantou nesubstituovaného derivátu, ρ je empirická konstanta charakterizující danou reakci nebo rovnováhu a σ je empirická Hammettova substituentová konstanta, popisující elektronový efekt substituentu (kladné hodnoty přísluší elektrofilním substituentům, záporné hodnoty pak substituentům nukleofilním). Hammett tedy zavedl přímé používání energetických konstant ke korelaci chemických vlastností s elektronovými efekty substituentů. Jiné typy substituentových konstant navrhl Taft, Swain-Lupton a další.

1.2.1 Vliv substituentů na chromatografické chování látek

Důležitým parametrem, jenž určuje chemické chování látek, stejně jako jejich chování v biologickém systému, je hydrofobicita, vyjádřená konstantou rozdělovacího koeficientu oktanol-voda P a konstantou hydrofobicity π . Jde o experimentální konstanty, vyjadřující kvantitativně lipofilitu látky, resp. substituentu.

Rozdělovací koeficient oktanol-voda² je důležitou veličinou pro předpovídání biologické účinnosti zkoumané látky, neboť zhruba kvantifikuje teoretickou prostupnost látky biologickými lipofilními membránami, podobnými přibližně svou strukturou oktanolu. Lipofilita je rovněž toxikologicky významným faktorem pro predikci možné kumulace látky v tukových tkáních a je taktéž určující pro způsob eliminace. Ačkoliv existují i jiné konstanty, charakterizující biologickou účinnost molekul v souvislosti s hydrofobicitou, je standardně používanou právě rozdělovací koeficient oktanol-voda.

Dnes, coby výsledek dlouhodobého výzkumu a statistických výpočtů, existují matematické postupy, jak teoreticky poměrně spolehlivě odhadnout hodnotu P pouze na základě znalosti molekulové struktury látky³. Rozdělovací koeficient P je definován jako poměr rovnovážných koncentrací látky mezi nevodnou a vodnou fází. Této rovnováhy se účastní pouze nedisociovaná forma molekul; je tedy zřejmé, že hodnota rozdělovacího koeficientu závisí na pH prostředí a při odhadu jeho hodnoty je nutné tento faktor zohlednit.

Substituentová konstanta hydrofobicity π , charakterizující příspěvek daného substituentu k celkové hydrofobicitě molekuly, je podobně jako Hammettova σ konstanta substituentovou termodynamickou konstantou, jež je lineárně závislá na změně Gibbsovy energie. Konstantu hydrofobicity π lze vypočítat ze vztahu

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

kde P_H je rozdělovací koeficient oktanol/voda pro nesubstituovanou látku a P_X je rozdělovací koeficient oktanol/voda pro substituovaný derivát. Za standard s $\pi = 0$ byl položen vodík. Kladných hodnot konstanty π tedy nabývají ty substituenty, které mají větší hydrofobní efekt, než vodík, záporných hodnot konstanty π pak hydrofilnější látky. Známe-li tedy P_H pro základní skelet molekuly, můžeme pomocí π konstant dopočítat lipofilní parametry pro různě substituované deriváty.

Vhodným nástrojem ke studiu hydrofobních vlastností biologicky aktivních organických látek je především vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Studium problematiky kvantifikace vztahů mezi strukturou a retenčními vlastnostmi sloučenin (QSRR) se věnoval zejména Kaliszan⁴. Pomocí HPLC byly nalezeny korelace mezi retenčními vlastnostmi sloučenin a parametry lipofility. Zjistilo se, že mezi kapacitním poměrem k a rozdělovacím koeficientem oktanol-voda, resp. konstantou hydrofobicity π existuje 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.

Výzkum, zaměřený na hledání vhodné stacionární fáze, zajišťující lineární závislost mezi $\log k$ a $\log P$, prozatím ukázal coby nejvhodnější stacionární fázi C_{18} silikagel⁵.

1.2.2 Vliv substituentů v molekulové absorpční spektroskopii v ultrafialové oblasti

Molekulová absorpční spektrometrie v ultrafialové oblasti se zabývá měřením a interpretací elektronových spekter molekul látek, absorbujících elektromagnetické záření v rozsahu vlnových délek 200–380 nm.

Absorpce záření je spojena s přechodem molekul látky z nižší energetické hladiny na hladinu vyšší. Rozdíl mezi těmito energetickými hladinami (excitační energie) závisí na chemické struktuře molekuly. Je-li excitační energie v rozmezí 200 až 600 kJ mol^{-1} , látka může absorbovat v ultrafialové oblasti spektra. Absorpce záření v UV oblasti je způsobena přechody vazebných elektronů v molekule z molekulových orbitalů σ nebo π , případně nevazebných elektronů n , do antivazebných orbitalů σ^* nebo π^* . U organických látek, které obsahují aromatické komponenty, nebo systém dvojných vazeb, se setkáváme nejčastěji s intramolekulárním elektronovým přenosem π – π^* nebo n – π^* . Přechody π – π^* jsou charakteristické pro sloučeniny s násobnými vazbami (např. skupina $C=C$ má λ_{max} přibližně 170 nm, skupina $C=O$ zhruba 166 nm). U látek s konjugovanými dvojnými vazbami dochází k posunu absorpčního pásu k delší vlnové délce a ke zvýšení jeho intenzity. Čím je konjugovaný systém delší, tím více se maximum absorpce posouvá k delším vlnovým délkám. Tyto přechody jsou významné u aromatických sloučenin. Pokud se v molekule nachází větší počet kondenzovaných nenasycených jader, pak je energie přechodu natolik nízká, až se projeví absorpcí elektromagnetického záření ve viditelné oblasti spektra. Je-li v molekule kromě dvojných vazeb s nimi v konjugaci i atom s volným elektronovým párem (např. N, O, S), pak dochází i k energeticky méně náročnému přechodu n – π^* . Tyto látky vykazují absorpční maximum při vyšších vlnových délkách, než u přechodu π – π^* (např. $\lambda_{\text{max}}(C=O) = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{max}}(C=N) = 300 \text{ nm}$)⁶.

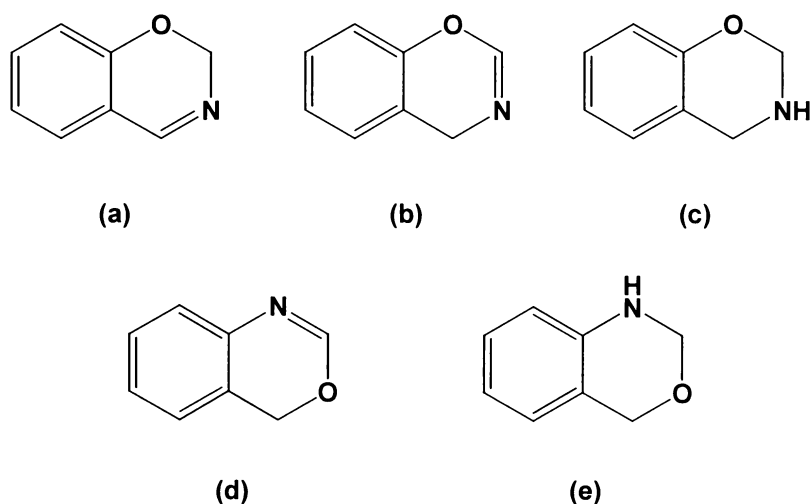
Závislostí mezi chemickou strukturou molekul látky a jejím spektrofotometrickým chováním⁷ se poprvé zabýval zakladatel teorie chemické struktury organických látek A. M. Butlerov. Mimo jiné si všiml skutečnosti, že některé skupiny mají přímý vliv na spektrofotometrické chování látky, na kterou jsou vázány. Přítomnost

elektrodonorových či elektrofilních substituentů v organických sloučeninách může vyvolat nejen posun absorpčního pásu k vyšším vlnovým délkám (bathochromní efekt) nebo nižším vlnovým délkám (hypsochromní efekt), ale i snížení (hypochromní efekt) či naopak zvýšení (hyperchromní efekt) intenzity absorpce. Vliv je podstatný zejména tehdy, je-li substituent blízko chromoforu a nejvíce se projeví, dojde-li ke konjugaci chromoforu a substituentu.

Mezi elektrodonorové substituenty patří např. hydroxyskupina $-OH$, methyl skupina $-CH_3$ nebo aminoskupina $-NH_2$, jež jsou nositeli snadno pohyblivých elektronů, které se neúčastní vazby s jinými atomy. Tyto substituenty vyvolávají především hypsochromní a hypochromní efekt. Mezi elektrofilní substituenty patří např. nitroskupina $-NO_2$, karbonylová skupina $-CO$ nebo halogenidy $-F$, $-Cl$, $-Br$, které k sobě přitahují elektrony. Výsledkem zavedení těchto substituentů je převážně bathochromní a hyperchromní efekt.

1.3 BENZOXAZINY

Benzoxaziny jsou bicyklické heterocyklické organické látky, vznikající Mannlichovou kondenzací fenolu, formaldehydu a aminu. Poprvé je připravil W. J. Burke roku 1949⁸. Struktura samotného benzoxazinu sestává z oxazinového kruhu s anelovaným benzenovým jádrem. Existují dvě základní izomerní formy benzoxazinu: benzo[*e*][1,3]oxazin a benzo[*d*][1,3]oxazin, jejichž další dělení na celkem pět možných izomerních struktur odvisí od možné přítomnosti a polohy dvojně vazby na dusíku na oxazinovém kruhu (obr. 1.1).



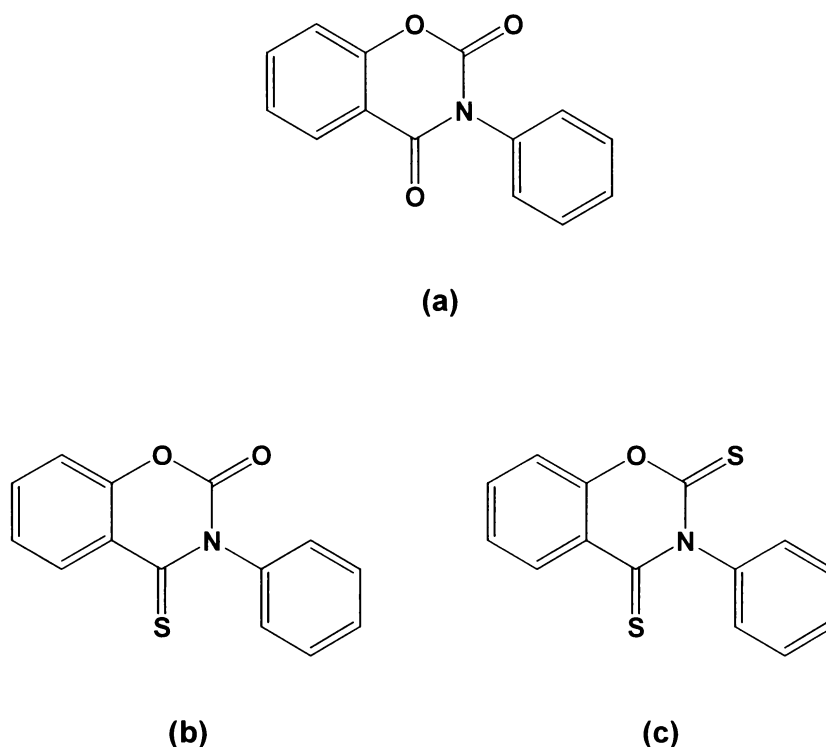
Obr.1.1 Izomerní formy benzoxazinového kruhu:

- (a) 2*H*-benzo[*e*][1,3]oxazin, (b) 4*H*-benzo[*e*][1,3]oxazin, (c) 3,4-dihydro-2*H*-benzo[*e*][1,3]oxazin,
 (d) 4*H*-benzo[*d*][1,3]oxazin, (e) 1,4-dihydro-2*H*-benzo[*d*][1,3]oxazin.

Přehled základních fyzikálně chemických vlastností, možných způsobů syntéz a spektrálních charakteristik některých základních izomerních struktur benzoxazinu uvádí ve své studii Gromachevskaya et al.⁹

Deriváty benzoxazinu jsou v technické praxi využívány k přípravě polybenzoxazinů, jež nacházejí uplatnění jako ochranné antikorozivní materiály¹⁰. Dále se uplatňují jako herbicidy¹¹ a regulátory růstu¹². Větší uplatnění nacházejí benzoxaziny ve farmacii.

Wagner a Singer¹³ připravili v roce 1962 tři druhy benzoxazinů cyklizací 2-hydroxybenzanilidu (obr. 1.2): 3-fenyl-benzo[*e*][1,3]oxazin-2,4-dion, 3-fenyl-4-thio-benzo[*e*]oxazin-2-on a 3-fenyl-benzo[*e*][1,3]oxazin-2,4-dithion. Deriváty posledních dvou sloučenin se zabývá předkládaná diplomová práce.



Obr. 1.2 Struktury 3-fenyl-benzoxazinů: (a) 3-fenyl-benzo[*e*][1,3]oxazin-2,4-dion, (b) 3-fenyl-4-thio-benzo[*e*][1,3]oxazin-2-on, (c) 3-fenyl-benzo[*e*][1,3]oxazin-2,4-dithion.

1.3.1 Uplatnění benzoxazinů ve farmacii

Vzhledem k tomu, že v poslední době opětovně stoupá ohrožení mykobakteriálními infekcemi (zejména tuberkulózou vlivem rostoucí rezistence *Mycobacterium tuberculosis* ke konvenčním antituberkulotikům), věnuje farmaceutický výzkum zvýšenou pozornost látkám potenciálně vhodným k potlačení těchto infekcí. Dosavadní studie v této oblasti ukázaly, že některé deriváty benzoxazinu vykazují velmi slibné výsledky coby antimykobakteriální činidla. Waisser et al. zkoumali v tomto ohledu (souběžně s různými deriváty pyridinu¹⁴, chinazolinu¹⁵ a příbuzných látek¹⁶) nejprve různě substituované 3-aryl-benzo[*e*][1,3]oxazin-2,4-diony. U mnohých z nich zjistili významné účinky vedoucí k potlačení růstu mykobakterií¹⁷ – látky vykázaly bakteriostatický efekt na kmeny *Mycobacterium tuberculosis* způsobující tuberkulózu, a *Mycobacterium avium* a *Mycobacterium kansasii*, jenž jsou původci některých oportunních infekcí zejména u dětí, starších lidí a jedinců s imunitním deficitem¹⁸ (např. HIV pozitivní pacienti). Poté, co autoři následně nahradili jednu nebo obě oxoskupiny atomy síry, pozorovali významné zvýšení antimykobakteriálního účinku vůči výše

popsaným kmenům¹⁹. Autoři se chemickému a mikrobiologickému testování 3-fenyl-4-thio-benzo[e][1,3]oxazin-2-onů a 3-fenyl-benzo[e][1,3]oxazin-2,4-dithionů dále věnovali a zpracovali mimo jiné řadu QSAR studií, zabývajících se teoretickou predikcí antimykobakteriálních účinků a chování dvou zmíněných skupin různě substituovaných derivátů benzoxazinu v biologickém systému²⁰. Stejně skupině látek se ve své studii věnovali i Gallegos et al²¹.

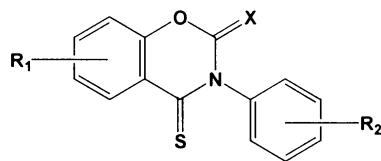
Další práce, zabývající se benzoxaziny, poukázaly též na jejich bakteriostatické¹³ imunomodulační²², neuroprotektivní²³ a další⁹ účinky.

1.3.2 Studované deriváty benzoxazinu

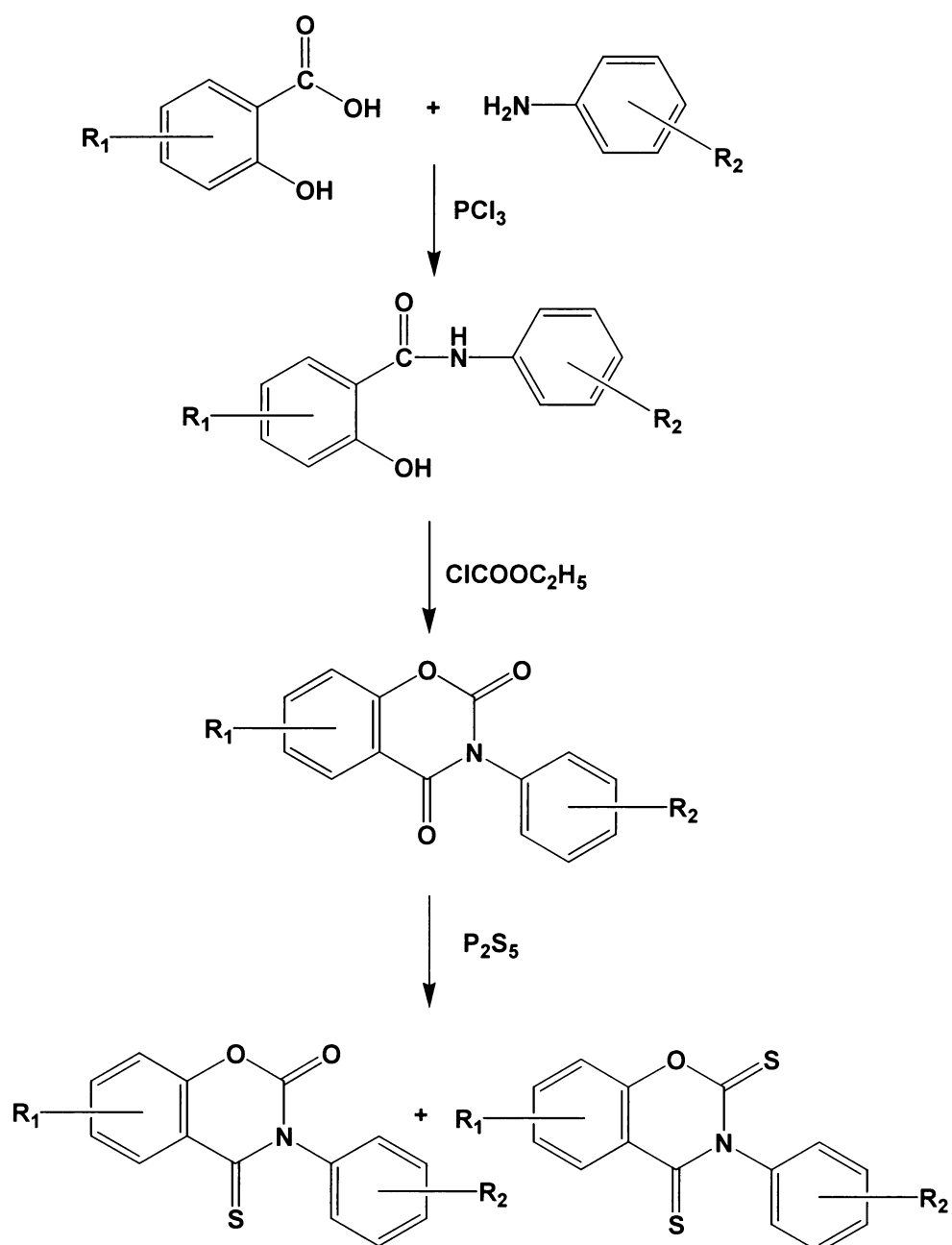
Předkládaná práce studuje retenční chování čtyřiceti nově syntetizovaných derivátů, z nichž 24 patří do skupiny benzoxazindithionů a 16 do skupiny thioxobenzoxazinonů. Deriváty se tedy od sebe navzájem liší heteroatomem v poloze 2 (kyslík nebo síra) a polohou a druhem substituentu na anelovaném benzenovém jádře a na fenylu v poloze 3. Přehled studovaných derivátů přináší tabulka 1.1. Reakční schéma přípravy těchto derivátů je uvedeno na obr. 1.3.

Dosavadní studie se těmito derivátům věnovaly zejména z hlediska elektrochemie²⁴. Nesměrák et al.²⁵ popsali vliv substituentů na půlvolné potenciály stejných derivátů, jimiž se zabývá tato studie. Autoři dále zkoumali proces jejich elektrochemické oxidace coby model možné biotransformace zkoumaných sloučenin. Chromatografickému chování benzoxazinů se ve své diplomové práci věnovala Horká²⁶ a v bakalářské práci Baborová²⁷, avšak pouze v tenkovrstvém uspořádání. Cílem předkládané diplomové práce je tedy zejména doplnění spektra poznatků, které by vedly k dalšímu potenciálnímu využití studovaných derivátů benzoxazinu coby antimykobakteriálních agens.

Tab. 1.1 Přehled struktur studovaných derivátů benzoxazinu.



derivát	X	R ₁	R ₂	derivát	X	R ₁	R ₂
1	O	7-OCH ₃		21	S	7-OCH ₃	4-Cl
2	O	7-OCH ₃	4-F	22	S	7-OCH ₃	3-F
3	O	7-OCH ₃	4-Br	23	S	7-OCH ₃	3-Cl
4	O	7-OCH ₃	3-F	24	S	7-OCH ₃	4-CF ₃
5	O	7-OCH ₃	3-Cl	25	S	7-OCH ₃	3,4-Cl ₂
6	O	7-CH ₃	4-CH ₃	26	S	7-CH ₃	4-CH ₃
7	O	6-CH ₃	4-CH ₃	27	S	6-CH ₃	4-CH ₃
8	O		4-Br	28	S		4-Br
9	O	6-OCH ₃	4-CH ₃	29	S	6-OCH ₃	4-CH ₃
10	O	6-OCH ₃	4-F	30	S	6-OCH ₃	
11	O	6-OCH ₃	4-Br	31	S	6-OCH ₃	4-F
12	O	6-OCH ₃	4-Cl	32	S	6-OCH ₃	4-Br
13	O	6-OCH ₃	3-F	33	S	6-OCH ₃	4-Cl
14	O	6-OCH ₃	4-CN	34	S	6-OCH ₃	3-F
15	O	6-Cl		35	S	6-OCH ₃	3-Cl
16	O	6-Cl	3-Cl	36	S	6-OCH ₃	4-CF ₃
17	S	7-OCH ₃	4-CH ₃	37	S	6-OCH ₃	3,4-Cl ₂
18	S	7-OCH ₃		38	S	6-OCH ₃	4-CN
19	S	7-OCH ₃	4-F	39	S	6-Cl	
20	S	7-OCH ₃	4-Br	40	S	6-Cl	3-Cl



Obr. 1.3 Reakční schéma přípravy sírných derivátů benzoxazinu

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 STUDOVANÉ LÁTKY

Studované deriváty benzoxazinu byly syntetizovány¹⁹ na Katedře anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové. Totožnost a čistota byly stanoveny elementární analýzou, měřením bodu tání a nukleární magnetickou resonancí. Přehled studovaných látek je podán v tab. 1.1.

2.2 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE

Jako prostředí pro spektrofotometrická i chromatografická měření byl použit acetonitril čistoty pro HPLC (Chromasolv, Riedel de Haën) s obsahem vody nižším než 0,02 obj.%. Ke stanovení mrtvého retenčního času byla použita thiomocovina, p. a. (Sigma Aldrich). Byla používána deionizovaná voda připravená na Milli-Q Water Purification System (Millipore, USA).

2.3 POUŽITÉ METODY MĚŘENÍ A ZPRACOVÁNÍ DAT

2.3.1 Molekulová absorpční spektrometrie v UV oblasti

Spektra studovaných derivátů v UV oblasti byla měřena na spektrofotometru HP 8453 (Hewlett Packard) s diodovým polem. Pro eliminaci chyb měření byly nejprve připraveny zásobní roztoky studovaných derivátů o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ mol dm^{-3} v acetonitrilu. Z nich byly ke spektrofotometrickému měření ředěním acetonitrilem připraveny roztoky o výsledné koncentraci $1 \cdot 10^{-5}$ mol dm^{-3} , které byly spektrofotometrovány v křemenné kyvetě o měrné tloušťce 1 cm v rozsahu vlnových délek 220–400 nm.

2.3.2 Kapalinová chromatografie

K měření retenčních časů t_R derivátů benzoxazinu byl použit vysokoúčinný kapalinový chromatograf HP 1090 L (Hewlett Packard), kolona RxC-18 ZORBAX délky 150 mm o průměru 4,6 mm, o velikosti zrn modifikovaného silikagelu 5 μm . Průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,8 ml min^{-1} . K injektáži byl použit ventil Rheodyne s nástřikovou smyčkou o objemu 10 μl . Detekce byla spektrofotometrická při 340 nm; tato hodnota byla určena coby univerzálně použitelná po předchozím změření ultrafialových spekter studovaných vzorků (druhé absorpční maximum studovaných látek).

Mobilní fázi byla směs acetonitrilu a vody v poměru postupně 9:1, 8:2 a nakonec 7:3. Stanovení mrtvého retenčního času t_M bylo provedeno nástřikem roztoku thiomochoviny ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$). Získané chromatogramy byly vyhodnoceny pomocí programu CSW 32 (DataApex, ČR).

Kapacitní poměr k byl vypočítán ze vztahu

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

kde t_R je je retenční čas daného derivátu (s) a t_M je mrtvý retenční čas thiomochoviny (s).

2.4 QSPR, REGRESNÍ A STATISTICKÉ VÝPOČTY

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

Substituentové konstanty hydrofobicity π konstanty byly převzaty z tabulek Hansche, Lea a Hoekmana²⁸. U látek s více substituenty v molekule byly substituentové konstanty získány součtem substituentových konstant jednotlivých substituentů²⁹. QSPR výpočty byly provedeny v programu QSAR-PC:PAR (Biosoft, UK).

Naměřená data byla zpracována běžnými statistickými postupy^{30,31}. Výsledky spektrofotometrického a chromatografického měření jsou mediány z 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 97 (Microsoft Corporation, USA).

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

3.1 STUDIUM VLIVU SUBSTITUENTŮ NA MOLEKULOVÁ ABSORPČNÍ SPEKTRA DERIVÁTŮ BENZOXAZINU V ULTRAFIALOVÉ OBLASTI

Byla změřena UV spektra studovaných derivátů benzoxazinu, a vyhodnocena příslušná absorpční maxima (tab. 3.1).

Bylo zjištěno, že všechny deriváty vykazují v oblasti 200–400 nm dvě hlavní absorpční maxima při vlnových délkách přibližně 275 nm a 340 nm. První z absorpčních maxim, při 275 nm, lze podle porovnání s literárním údaji³² ztotožnit s π - π^* přechodem konjugovaného systému tvořeného aromatickým kruhem a heterocyklem.

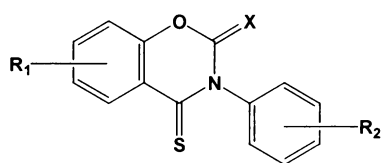
Vzhledem ke skutečnosti, že se v molekule vyskytují tři strukturní obměny (heteroatom v poloze 2, substituent na benzoxazinovém jádře a substituent na fenylu vázaném na dusíku v poloze 3), které mohou mít vzájemně protisměrné působení, bylo možné vliv substituentů charakterizovat pouze kvalitativně.

Záměna kyslíkového heteroatomu v poloze 2 za síru vede ke zvýšení absorpce obou hlavních absorpčních maxim (hyperchromní efekt), zároveň se ve spektru objevuje nové maximum při přibližně 300 nm (obr. 3.1).

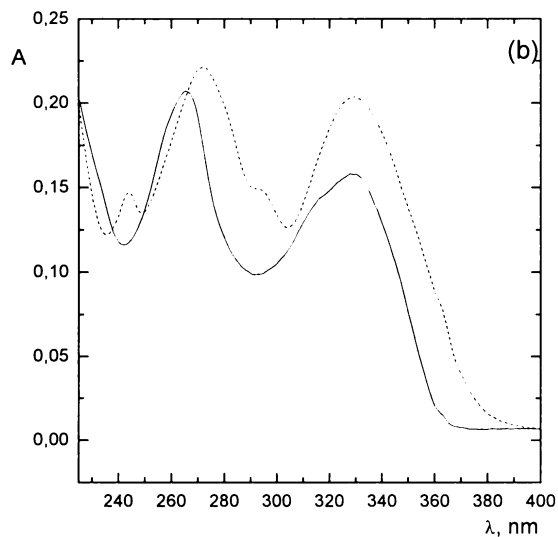
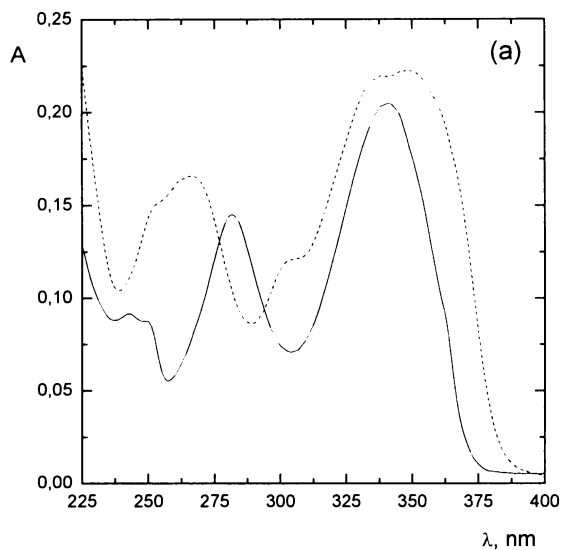
Substituce elektrofilním substituentem na fenylu vázaném na dusíku benzoxazinového kruhu vede ke zvýšení absorpce obou absorpčních maxim (hyperchromní efekt; obr. 3.2). Bathochromní efekt, charakteristický pro tento druh substituentů, nebyl u studovaných derivátů benzoxazinu pozorován.

Vliv substituce na benzenovém jádře benzoxazinového kruhu bylo možné kvalitativně charakterizovat pouze pro methoxyskupinu, jejíž přítomnost vede ke zjemnění struktury druhého absorpčního maxima při 340 nm (obr. 3.3).

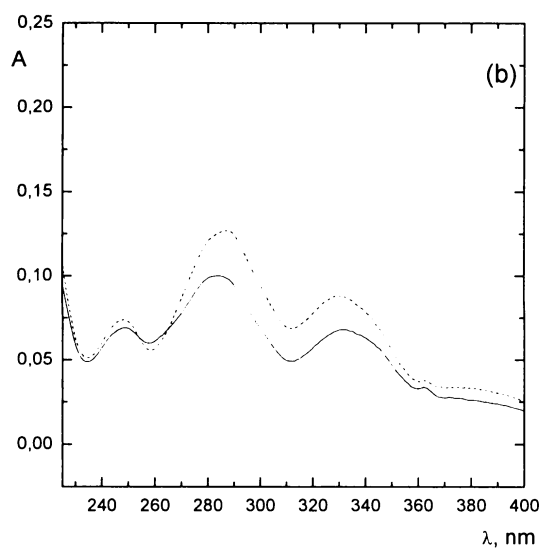
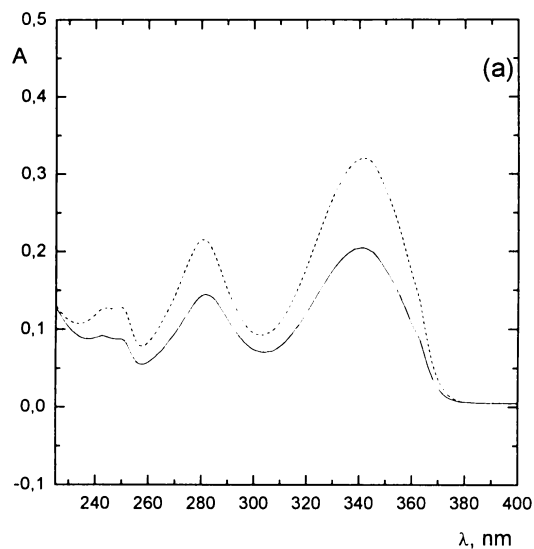
Tab. 3.1 Struktury a vlnové délky hlavních absorpčních maxim studovaných derivátů benzoxazinu



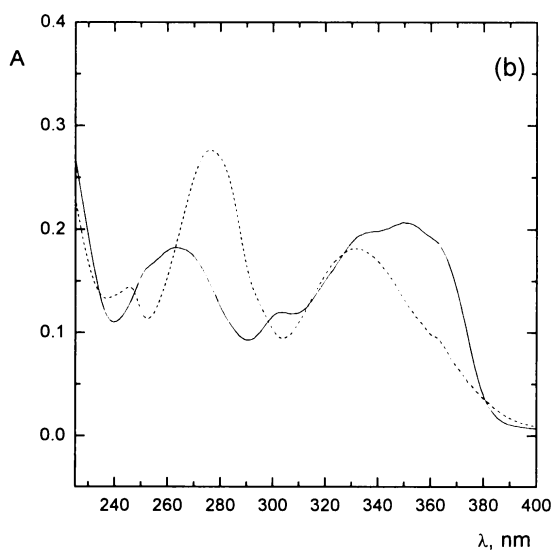
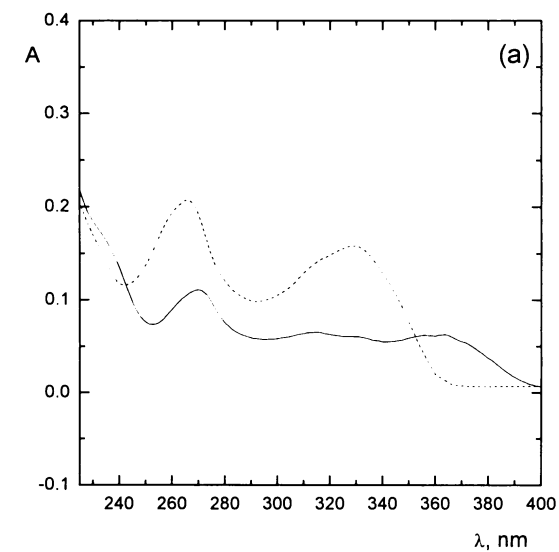
derivát	X	R ₁	R ₂	$\lambda_{\max 1}$ nm	$\lambda_{\max 2}$ nm
1	O	7-OCH ₃		282	341
2	O	7-OCH ₃	4-F	281	342
3	O	7-OCH ₃	4-Br	281	342
4	O	7-OCH ₃	3-F	280	340
5	O	7-OCH ₃	3-Cl	281	342
6	O	7-CH ₃	4-CH ₃	272	332
7	O	6-CH ₃	4-CH ₃	268	338
8	O		4-Br	266	328
9	O	6-OCH ₃	4-CH ₃	271	364
10	O	6-OCH ₃	4-F	270	313
11	O	6-OCH ₃	4-Br	270	313
12	O	6-OCH ₃	4-Cl	270	315
13	O	6-OCH ₃	3-F	271	314
14	O	6-OCH ₃	4-CN	273	327
15	O	6-Cl		265	339
16	O	6-Cl	3-Cl	266	339
17	S	7-OCH ₃	4-CH ₃	265	339
18	S	7-OCH ₃		265	348
19	S	7-OCH ₃	4-F	267	350
20	S	7-OCH ₃	4-Br	259	349
21	S	7-OCH ₃	4-Cl	259	350
22	S	7-OCH ₃	3-F	267	350
23	S	7-OCH ₃	3-Cl	267	351
24	S	7-OCH ₃	4-CF ₃	268	351
25	S	7-OCH ₃	3,4-Cl ₂	265	351
26	S	7-CH ₃	4-CH ₃	272	332
27	S	6-CH ₃	4-CH ₃	277	333
28	S		4-Br	272	329
29	S	6-OCH ₃	4-CH ₃	285	331
30	S	6-OCH ₃		287	331
31	S	6-OCH ₃	4-F	287	331
32	S	6-OCH ₃	4-Br	287	330
33	S	6-OCH ₃	4-Cl	287	331
34	S	6-OCH ₃	3-F	287	329
35	S	6-OCH ₃	3-Cl	287	330
36	S	6-OCH ₃	4-CF ₃	288	330
37	S	6-OCH ₃	3,4-Cl ₂	288	327
38	S	6-OCH ₃	4-CN	289	330
39	S	6-Cl		276	333
40	S	6-Cl	3-Cl	276	331



Obr. 3.1 Vliv druhu heteroatomu v poloze 2 na UV absorpční spektra studovaných derivátů benzoxazinu ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, $l = 1 \text{ cm}$): (a) 7-methoxy-3-fenyl-4-thioxo-1,3-benzo[*e*][1,3]oxazin-2-on (derivát **1**), plná čára; 7-methoxy-3-fenyl-1,3-benzo[*e*][1,3]oxazin-2,4-dithion (derivát **18**), přerušovaná čára; (b) 3-(4-bromfenyl)-4-thioxo-1,3-benzo[*e*][1,3]oxazin-2-on (derivát **8**), plná čára; 3-(4-bromfenyl)-1,3-benzo[*e*][1,3]oxazin-2,4-dithion (derivát **28**), přerušovaná čára.



Obr. 3.2 Vliv substituce na fenylu vázaném na benzoxazinový kruh v poloze 3 na UV absorpční spektra studovaných derivátů benzoxazinu ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, $l = 1 \text{ cm}$): (a) 7-methoxy-3-fenyl-4-thioxo-1,3-benzo[*e*][1,3]oxazin-2-on (derivát **1**), plná čára; 7-methoxy-3-(3'-fluorfenyl)-4-thioxo-1,3-benzo[*e*][1,3]oxazin-2-on (derivát **4**), přerušovaná čára; (b) 3-fenyl-6-methoxy-1,3-benzo[*e*][1,3]oxazin-2,4-dithion (derivát **30**), plná čára; 3-(3'-fluorfenyl)-6-methoxy-1,3-benzo[*e*][1,3]oxazin-2,4-dithion (derivát **34**), přerušovaná čára;



Obr. 3.3 Vliv substituce na benzoxazinovém jádře na UV absorpční spektra studovaných derivátů benzoxazinu ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$, $l = 1 \text{ cm}$): (a) 3-(4-bromfenyl)-6-methoxy-4-thioxo-1,3-benzo[e][1,3]oxazin-2-on (derivát **11**), plná čára; 3-(4-bromfenyl)-4-thioxo-1,3-benzo[e][1,3]oxazin-2-on (derivát **8**), přerušovaná čára; (b) 7-methoxy-3-(3'-chlorfenyl)-1,3-benzo[e][1,3]oxazin-2,4-dithion (derivát **23**), plná čára; 6-chlor-3-(3'-chlorfenyl)-1,3-benzo[e][1,3]oxazin-2,4-dithion (derivát **40**), přerušovaná čára.

3.2 STUDIUM VLIVU SUBSTITUENTŮ NA RETENČNÍ CHOVÁNÍ DERIVÁTŮ BENZOXAZINU

3.2.1 Naměřená data

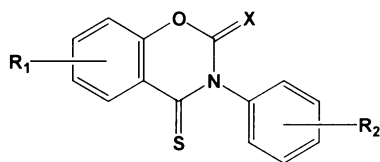
Vliv substituentů na retenční časy derivátů 4benzoxazinu byl studován metodou HPLC chromatografie na reverzní fázi C-18. Jako mobilní fáze byla použita směs acetonitril-voda s proměnlivým složením acetonitrilu ($w(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,90; 0,80 \text{ a } 0,70$). Byly naměřeny retenční časy studovaných derivátů a vypočítány příslušné kapacitní poměry (tab. 3.2).

Bylo zjištěno, že s klesajícím obsahem acetonitrilu v mobilní fázi dochází ke zvyšování retenčního času studovaných derivátů, jak je pro vybrané deriváty znázorněno na obr. 3.4 a obr. 3.5.

Záměna kyslíkového heteroatomu v poloze 2 za síru vede ke zvýšení retenčního času stejně substituovaného derivátu, jak plyne z tab. 3.2 a je pro vybrané dvojice derivátů znázorněno na obr. 3.6 a obr. 3.7.

Retenční čas derivátů benzoxazinu je ovlivňován i substituenty na fenylu vázaném na dusíku benzoxazinového kruhu a na benzenovém jádře benzoxazinového kruhu. Příklady změn retenčních časů pro různě substituované deriváty jsou uvedeny na obr. 3.8 a obr. 3.9 (změna substituce na fenylu), na obr. 3.10 a na obr. 3.11 (změna substituce na benzenovém jádře benzoxazinového kruhu).

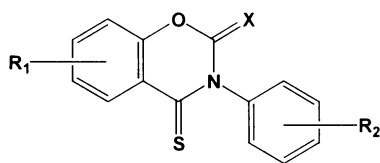
Tab. 3.2 Struktury, indikátorové konstanty (definovány jako $I = 1$ pro $X = O$ a $I = 0$ pro $X = S$), hydrofobní substituentové konstanty, logaritmy rozdělovacího koeficientu oktanol-voda, retenční časy a kapacitní poměry studovaných derivátů benzoxazinu při HPLC na koloně Rx C-18 ZORBAX ($150 \times 4,6$ mm), mobilní fáze acetonitril-voda ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol dm^{-3} , $F_m = 0,8$ $\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$, $\lambda = 340$ nm, $t_M(w(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,90) = 101$ s, $t_M(w(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,80) = 95$ s, $t_M(w(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,70) = 90$ s, nástřík 10 μl)



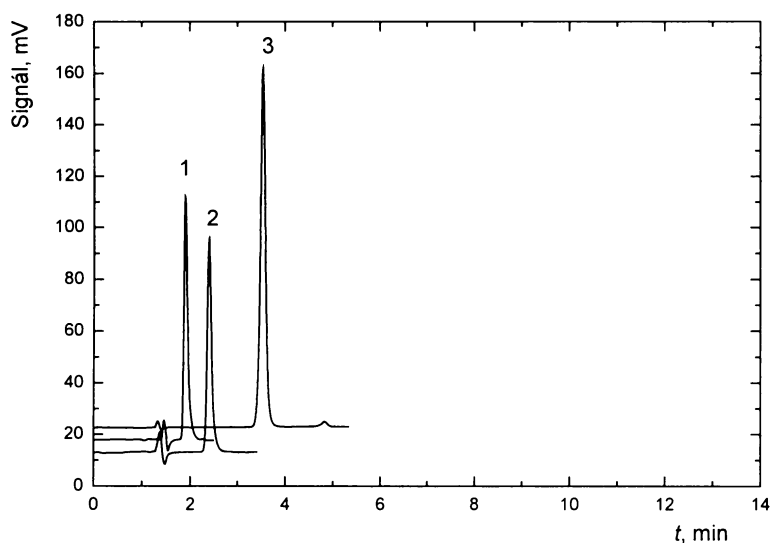
derivát	X	R ₁	R ₂	I	π_{R1}	π_{R2}	log P	w(CH ₃ CN) = 0,90		w(CH ₃ CN) = 0,80		w(CH ₃ CN) = 0,70	
								t_R , s	k	t_R , s	k	t_R , s	k
1	O	7-OCH ₃		1	-0,02	0,00	2,55	116	0,15	144	0,52	199	1,22
2	O	7-OCH ₃	4-F	1	-0,02	0,31	2,70	115	0,14	146	0,54	210	1,33
3	O	7-OCH ₃	4-Br	1	-0,02	0,86	3,44	127	0,26	175	0,85	289	2,21
4	O	7-OCH ₃	3-F	1	-0,02	0,31	2,81	115	0,14	146	0,54	237	1,64
5	O	7-OCH ₃	3-Cl	1	-0,02	0,71	3,33	123	0,22	165	0,75	263	1,93
6	O	7-CH ₃	4-CH ₃	1	0,56	0,56	3,47	122	0,21	156	0,64	284	2,16
7	O	6-CH ₃	4-CH ₃	1	0,56	0,56	3,36	132	0,31	179	0,89	291	2,23
8	O		4-Br	1	0,00	0,86	3,38	127	0,26	169	0,78	265	1,94
9	O	6-OCH ₃	4-CH ₃	1	-0,02	0,00	2,88	122	0,21	160	0,69	246	1,73
10	O	6-OCH ₃	4-F	1	-0,02	0,31	2,60	114	0,13	144	0,52	211	1,35
11	O	6-OCH ₃	4-Br	1	-0,02	0,86	3,33	127	0,26	174	0,84	288	2,20
12	O	6-OCH ₃	4-Cl	1	-0,02	0,71	3,17	124	0,23	168	0,78	271	2,01
13	O	6-OCH ₃	3-F	1	-0,02	0,31	2,70	115	0,14	145	0,53	213	1,37
14	O	6-OCH ₃	4-CN	1	-0,02	-0,57	2,36	95	-0,06	129	0,36	175	0,95
15	O	6-Cl		1	0,71	0,00	3,22	130	0,29	177	0,87	275	2,05
16	O	6-Cl	3-Cl	1	0,71	0,71	4,00	144	0,43	216	1,29	385	3,28

Tabulka 3.2 pokračuje na následující straně.

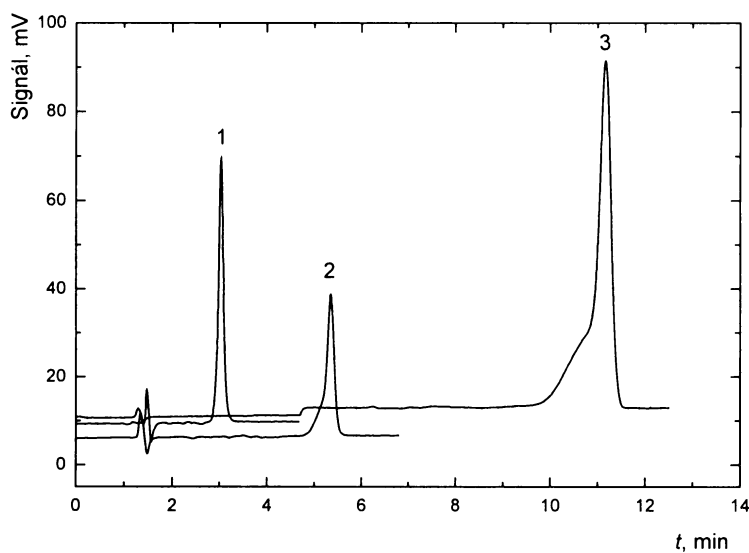
Pokračování tabulky 3.2 z předchozí strany.



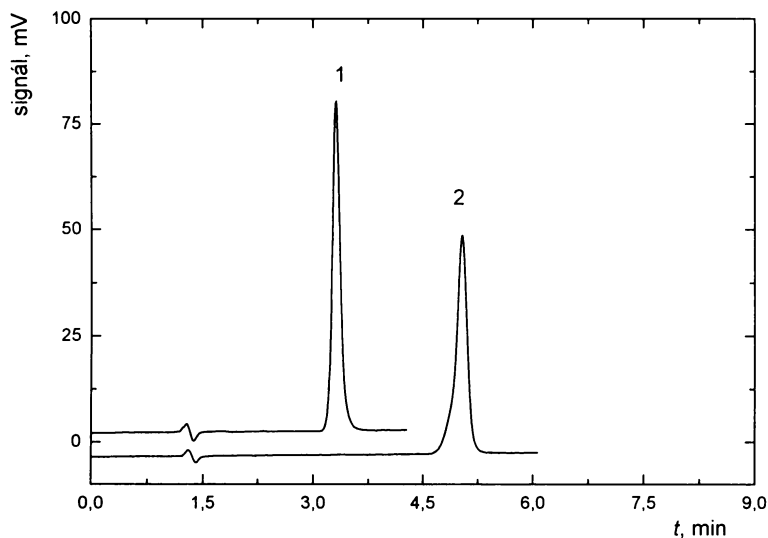
derivát	X	R ₁	R ₂	I	π _{R1}	π _{R2}	log P	w(CH ₃ CN) = 0,90		w(CH ₃ CN) = 0,80		w(CH ₃ CN) = 0,70	
								t _R , s	k	t _R , s	k	t _R , s	k
17	S	7-OCH ₃	4-CH ₃	0	-0,02	0,56	3,33	144	0,42	220	1,32	383	3,25
18	S	7-OCH ₃		0	-0,02	0,00	2,89	133	0,32	185	0,95	302	2,35
19	S	7-OCH ₃	4-F	0	-0,02	0,31	3,04	135	0,33	190	1,01	323	2,59
20	S	7-OCH ₃	4-Br	0	-0,02	0,86	3,78	155	0,54	248	1,62	479	4,33
21	S	7-OCH ₃	4-Cl	0	-0,02	0,71	3,62	152	0,50	236	1,50	445	3,95
22	S	7-OCH ₃	3-F	0	-0,02	0,31	3,15	132	0,31	188	0,99	327	2,64
23	S	7-OCH ₃	3-Cl	0	-0,02	0,71	3,67	148	0,47	227	1,40	419	3,66
24	S	7-OCH ₃	4-CF ₃	0	-0,02	1,49	4,05	143	0,42	229	1,42	459	4,10
25	S	7-OCH ₃	3,4-Cl ₂	0	-0,02	1,42	4,32	180	0,79	316	2,34	663	6,37
26	S	7-CH ₃	4-CH ₃	0	0,56	0,56	3,81	155	0,54	248	1,62	456	4,07
27	S	6-CH ₃	4-CH ₃	0	0,56	0,56	3,70	155	0,54	246	1,60	462	4,13
28	S		4-Br	0	0,00	0,86	3,72	154	0,52	235	1,48	434	3,82
29	S	6-OCH ₃	4-CH ₃	0	-0,02	0,56	3,22	144	0,43	216	1,28	382	3,24
30	S	6-OCH ₃		0	-0,02	0,00	2,79	133	0,32	184	0,95	301	2,34
31	S	6-OCH ₃	4-F	0	-0,02	0,31	2,94	132	0,31	188	0,98	322	2,58
32	S	6-OCH ₃	4-Br	0	-0,02	0,86	3,67	157	0,55	251	1,65	485	4,39
33	S	6-OCH ₃	4-Cl	0	-0,02	0,71	3,51	151	0,50	238	1,52	447	3,97
34	S	6-OCH ₃	3-F	0	-0,02	0,31	3,04	133	0,31	190	1,00	322	2,58
35	S	6-OCH ₃	3-Cl	0	-0,02	0,71	3,57	148	0,47	228	1,41	423	3,70
36	S	6-OCH ₃	4-CF ₃	0	-0,02	1,49	3,95	124	0,23	227	1,40	452	4,02
37	S	6-OCH ₃	3,4-Cl ₂	0	-0,02	1,42	4,21	181	0,79	321	2,39	670	6,44
38	S	6-OCH ₃	4-CN	0	-0,02	-0,57	2,70	118	0,17	154	0,63	241	1,67
39	S	6-Cl		0	0,71	0,00	3,56	156	0,54	242	1,55	448	3,98
40	S	6-Cl	3-Cl	0	0,71	0,71	4,34	179	0,77	312	2,30	640	6,11



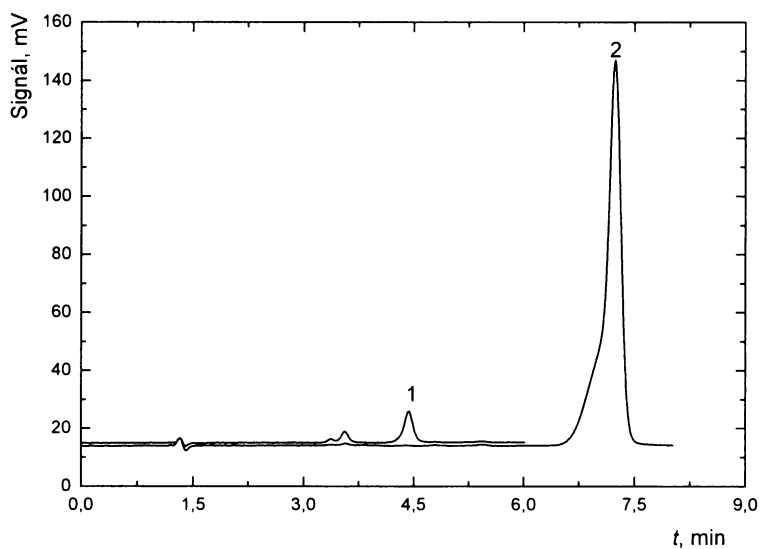
Obr. 3.4 Vliv složení mobilní fáze na retenční čas 3-(4-fluorofenyl)-6-methoxy-4-thioxo-benzo[e][1,3]oxazin-2-onu (derivát **10**) při HPLC na koloně RxC-18 ZORBAX ($150 \times 4,6$ mm). Složení mobilní fáze acetonitril-voda: (1) $w(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,90$, (2) $w(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,80$, (3) $w(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,70$. ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $F_m = 0,8 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, $\lambda = 340 \text{ nm}$, $t_M(w(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,90) = 101 \text{ s}$, $t_M(w(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,80) = 95 \text{ s}$, $t_M(w(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,70) = 90 \text{ s}$, nástřik $10 \mu\text{l}$).



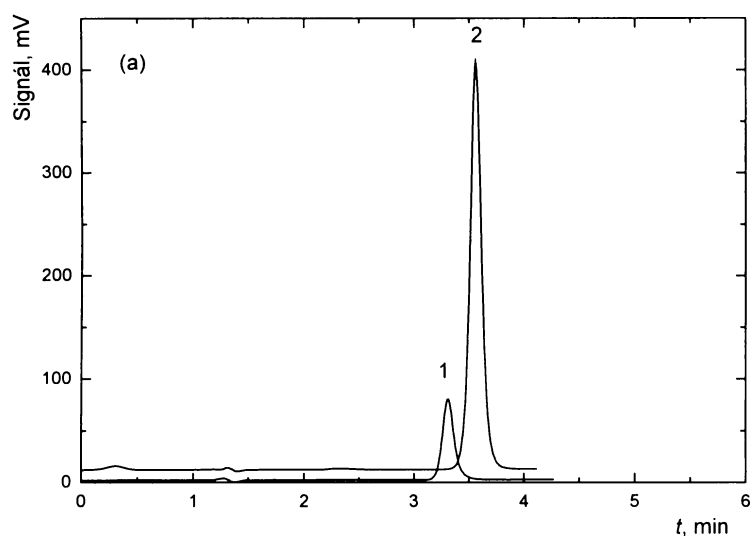
Obr. 3.5 Vliv složení mobilní fáze na retenční čas 3-(3,4-dichlorofenyl)-6-methoxy-benzo[e][1,3]oxazin-2,4-dithionu (derivát **37**) při HPLC na koloně RxC-18 ZORBAX ($150 \times 4,6$ mm). Složení mobilní fáze acetonitril-voda: (1) $w(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,90$, (2) $w(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,80$, (3) $w(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,70$. ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $F_m = 0,8 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, $\lambda = 340 \text{ nm}$, $t_M(w(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,90) = 101 \text{ s}$, $t_M(w(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,80) = 95 \text{ s}$, $t_M(w(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,70) = 90 \text{ s}$, nástřik $10 \mu\text{l}$).



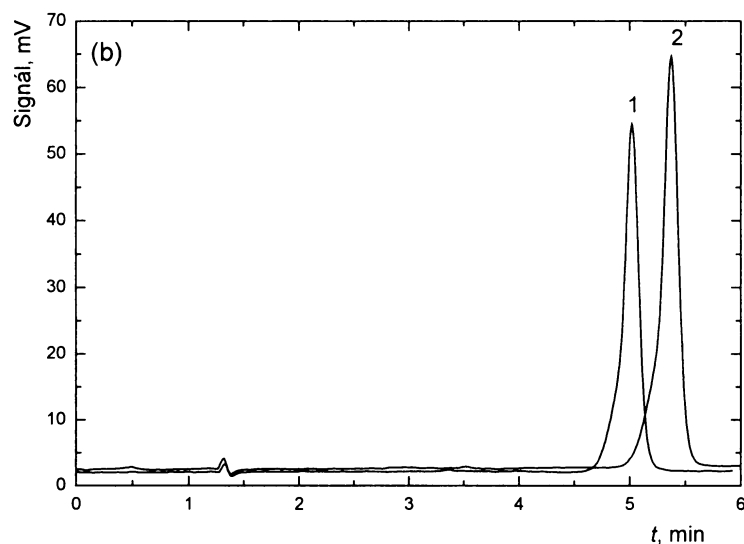
Obr. 3.6 Vliv druhu heteroatomu v poloze 2 na retenční čas (1) 7-methoxy-3-fenyl-4-thioxo-benzo[e][1,3]oxazin-2-onu (derivát **1**), (2) 7-methoxy-3-fenyl-benzo[e][1,3]oxazin-2,4-dithionu (derivát **18**) při HPLC na koloně RxC-18 ZORBAX (150 × 4,6 mm), mobilní fáze acetonitril-voda $w(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,70$ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $F_m = 0,8 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, $\lambda = 340 \text{ nm}$, $t_M = 90 \text{ s}$, nástřik $10 \mu\text{l}$).



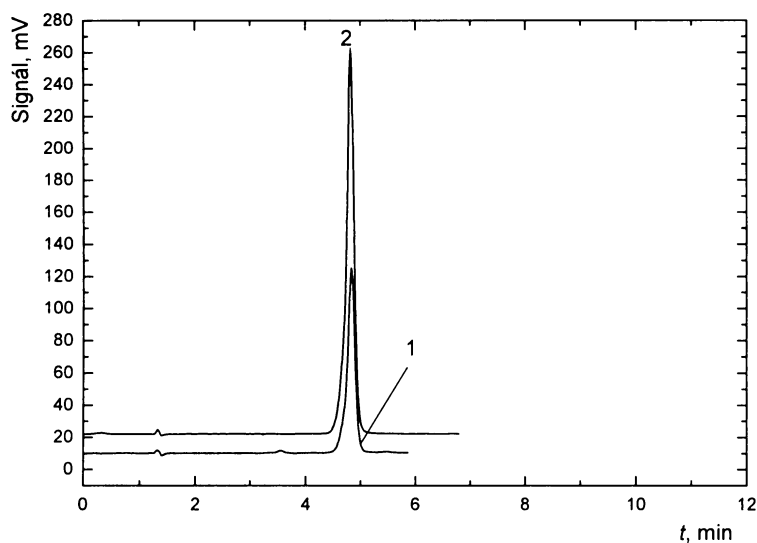
Obr. 3.7 Vliv druhu heteroatomu v poloze 2 na retenční čas (1) 3-(4-bromfenyl)-4-thioxo-benzo[e][1,3]oxazin-2-onu (derivát **8**) a (2) 3-(4-bromfenyl)-benzo[e][1,3]oxazin-2,4-dithionu (derivát **28**) při HPLC na koloně RxC-18 ZORBAX (150 × 4,6 mm), mobilní fáze acetonitril-voda $w(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,70$ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $F_m = 0,8 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, $\lambda = 340 \text{ nm}$, $t_M = 90 \text{ s}$, nástřik $10 \mu\text{l}$).



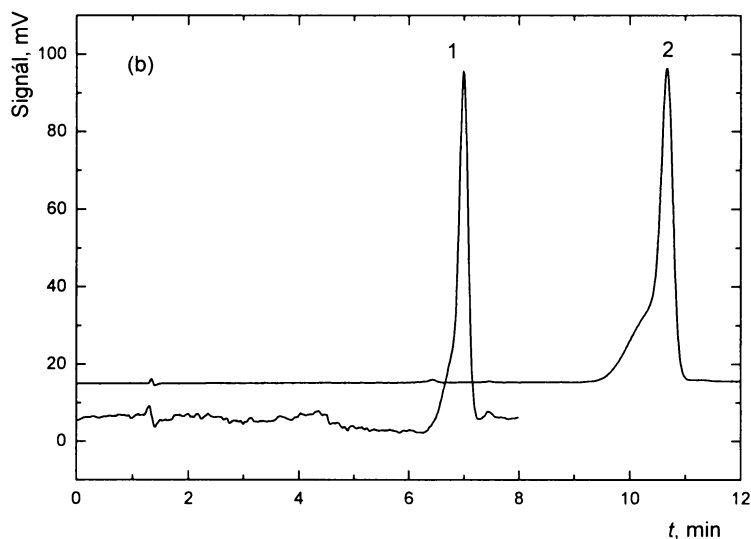
Obr. 3.8 Vliv substituentu na fenylu vázaném na benzoxazinový kruh v poloze 3 na retenční čas (1) 7-methoxy-3-fenyl-4-thioxo-1,3-benzo[*e*][1,3]oxazin-2-onu (derivát 1) a (2) 7-methoxy-3-(3'-fluorfenyl)-4-thioxo-1,3-benzo[*e*][1,3]oxazin-2-onu (derivát 4) při HPLC na koloně RxC-18 ZORBAX (150 × 4,6 mm), mobilní fáze acetonitril-voda $w(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,70$ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $F_m = 0,8 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, $\lambda = 340 \text{ nm}$, $t_M = 90 \text{ s}$, nástřik 10 μl).



Obr. 3.9 Vliv substituentu na fenylu vázaném na benzoxazinový kruh v poloze 3 na retenční čas (1) 3-fenyl-6-methoxy-1,3-benzo[*e*][1,3]oxazin-2,4-dithionu (derivát 30) a (2) 3-(3'-fluorfenyl)-6-methoxy-1,3-benzo[*e*][1,3]oxazin-2,4-dithionu (derivát 34) při HPLC na koloně RxC-18 ZORBAX (150 × 4,6 mm), mobilní fáze acetonitril-voda $w(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,70$ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $F_m = 0,8 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, $\lambda = 340 \text{ nm}$, $t_M = 90 \text{ s}$, nástřik 10 μl).



Obr. 3.10 Vliv substituentu na na benzoxazinovém jádře na retenční čas (1) 3-(4-bromfenyl)-4-thioxo-1,3-benzo[*e*][1,3]oxazin-2-onu (derivát **8**) a (2) 3-(4-bromfenyl)-6-methoxy-4-thioxo-1,3-benzo[*e*][1,3]oxazin-2-onu (derivát **11**) při HPLC na koloně RxC-18 ZORBAX (150 × 4,6 mm), mobilní fáze acetonitril-voda $w(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,70$ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $F_m = 0,8 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, $\lambda = 340 \text{ nm}$, $t_M = 90 \text{ s}$, nástřik 10 μl).



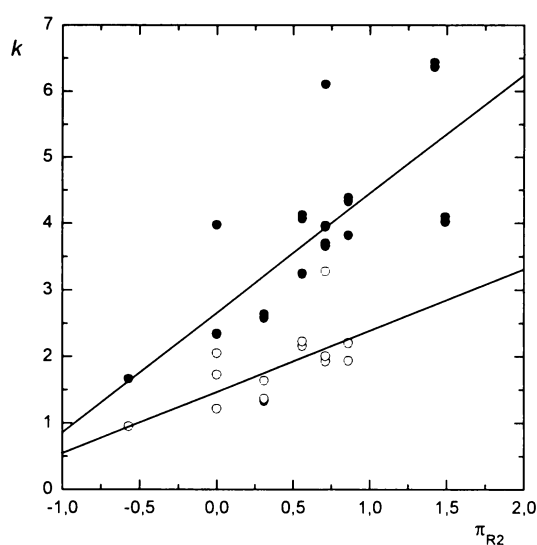
Obr. 3.11 Vliv substituentu na na benzoxazinovém jádře na retenční čas (1) 7-methoxy-3-(3'-chlorfenyl)-1,3-benzo[*e*][1,3]oxazin-2,4-dithionu (derivát **23**) a (2) 6-chlor-3-(3'-chlorfenyl)-1,3-benzo[*e*][1,3]oxazin-2,4-dithionu (derivát **40**) při HPLC na koloně RxC-18 ZORBAX (150 × 4,6 mm), mobilní fáze acetonitril-voda $w(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,70$ ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $F_m = 0,8 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, $\lambda = 340 \text{ nm}$, $t_M = 90 \text{ s}$, nástřik 10 μl).

3.2.2 QSRR analýza naměřených dat

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

3.2.2.1 Korelace kapacitního poměru s hydrofobními substituentovými π konstantami

Vzhledem k malému počtu druhu substituentů v poloze R_1 je možné graficky znázornit závislost kapacitního poměru pouze na hodnotě hydrofobní π substituentové konstanty pro substituenty v poloze R_2 (obr. 3.12). Z obrázku je patrné, že hodnota kapacitního poměru závisí rovněž na druhu heteroatomu v poloze 2.



Obr. 3.12 Závislost kapacitního poměru studovaných derivátů benzoxazinu na hodnotě hydrofobní π substituentové konstanty substituentu v poloze R_2 při HPLC na koloně RxC-18 ZORBAX (150×4,6 mm), mobilní fáze acetonitril-voda ($w(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,7$) pro deriváty 4-thio-*benzo*[*e*][1,3]oxazin-2-onu (○) a deriváty *benzo*[*e*][1,3]oxazin-2,4-dithionu (●) ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $F_m = 0,8 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, $\lambda = 340 \text{ nm}$, $t_M = 90 \text{ s}$, nástřik $10 \mu\text{l}$).

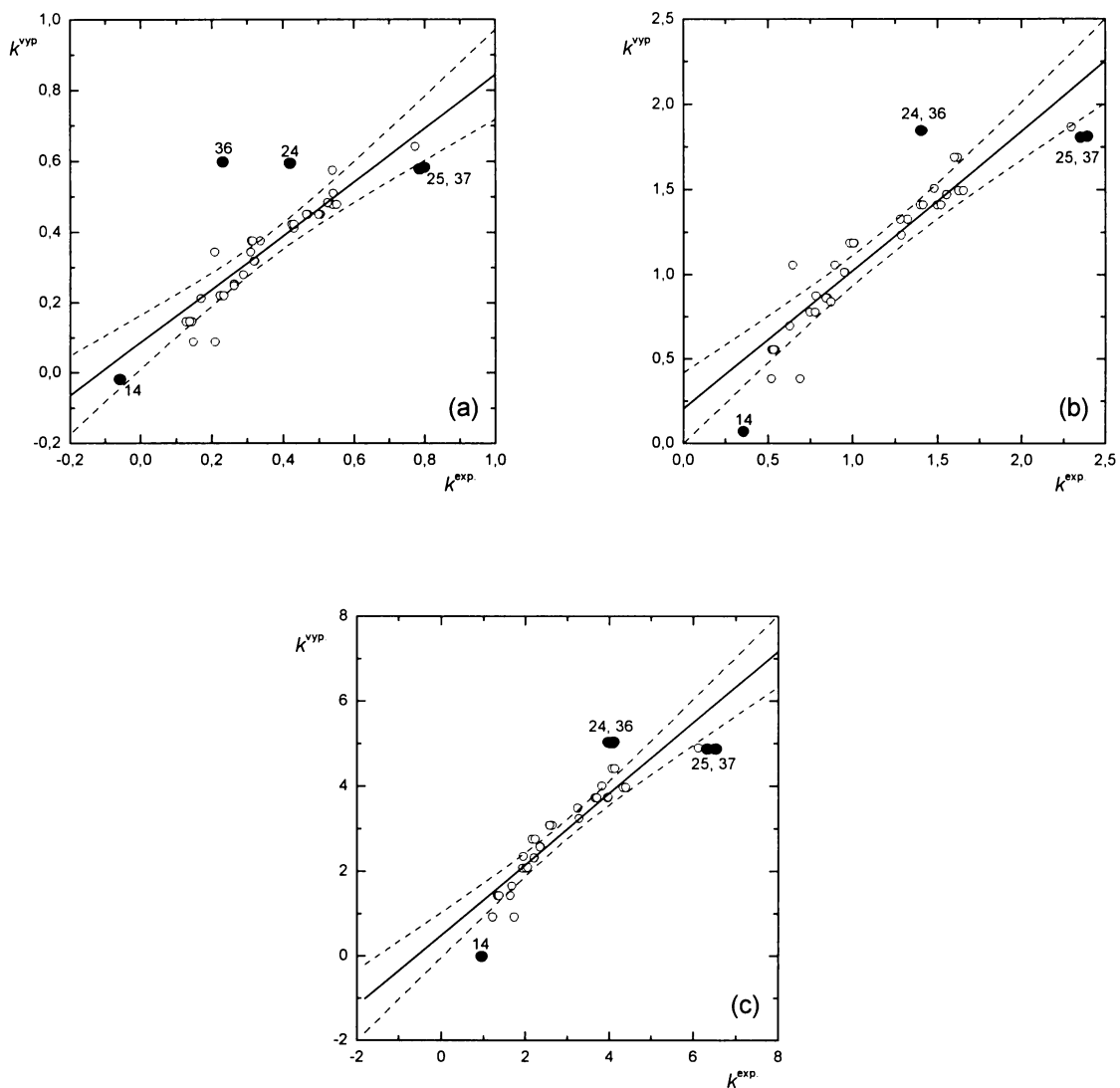
Tab. 3.3 Vypočítané korelační rovnice typu $k = a \pi_{R1} + b \pi_{R2} + c I + d$ pro studované deriváty benzoxazinu

rovnice	$w(\text{CH}_3\text{CN})$	X	a	b	c	d	r	F	$F_{\text{krit.}}$
(3.1)	0,9	O	0,203	0,173	$-^a$	0,108	0,889	24,40	6,70
(3.2)	0,9	S	0,319	0,196	$-^a$	0,312	0,720	11,28	5,78
(3.3)	0,9	O, S	0,262	0,186	-0,230	0,324	0,870	37,22	4,31
(3.4)	0,8	O	0,434	0,314	$-^a$	0,521	0,839	15,40	6,70
(3.5)	0,8	S	0,855	0,678	$-^a$	0,933	0,847	26,56	5,78
(3.6)	0,8	O, S	0,626	0,558	-0,633	1,028	0,905	54,34	4,31
(3.7)	0,7	O	1,146	0,871	$-^a$	1,330	0,903	28,70	6,70
(3.8)	0,7	S	2,180	1,981	$-^a$	2,339	0,868	32,70	5,78
(3.9)	0,7	O, S	1,601	1,623	-1,654	2,612	0,914	61,00	4,31

$-^a$ konstanta nezařazena do korelační rovnice

Pomocí programu QSAR-PC:PAR byly vypočítány příslušné korelační rovnice, které jsou spolu s odpovídajícími statistickými parametry zachyceny v tab. 3.3. Do korelačních rovnic byly zahrnuty hydrofobní substituentové π konstanty substituentu na benzoxazinovém jádře a na fenylu vázaném v poloze 3 a indikátorová konstanta I popisující druh heteroatomu v poloze 2 (definovaná jako $I = 1$ pro $X = \text{O}$ a $I = 0$ pro $X = \text{S}$).

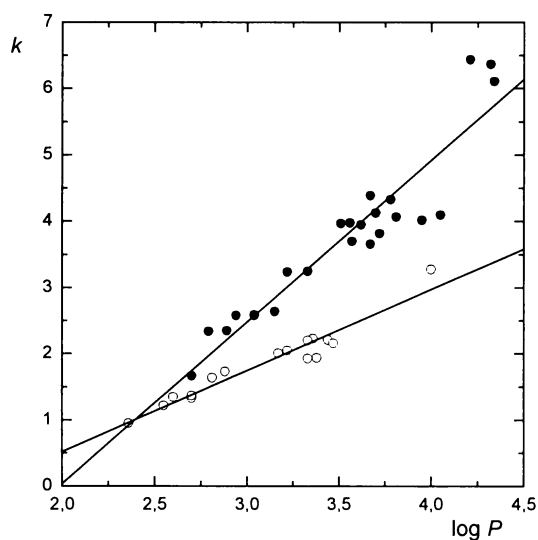
Z porovnání hodnot regresních koeficientů a a b je patrné, že větší vliv na hodnotu kapacitního poměru má substituent vázaný na benzenovém jádře benzoxazinového kruhu. Z hodnot F-testu a korelačních koeficientů plyne, že všechny vypočítané korelační rovnice jsou statisticky platné. Vzhledem k vysoké hodnotě korelačního koeficientu se jako nejvýhodnější jeví rovnice zahrnující jak vliv substituentů na benzenovém jádře a fenylu tak vliv druhu heteroatomu v poloze 2, tedy rovnice (3.3), (3.6) a (3.9). Na obr. 3.13 jsou uvedeny korelace mezi experimentálními hodnotami kapacitních poměrů a hodnotami vypočítanými z příslušných korelačních rovnic (3.3), (3.6) a (3.9). V obr. 3.13 jsou zároveň vyznačeny deriváty **14**, **24**, **25**, **36** a **37**, s extrémními hodnotami hydrofobní substituentové π_{R2} konstanty.



Obr. 3.13 Korelace mezi naměřenými hodnotami kapacitního poměru studovaných derivátů benzoxazinu a hodnotami kapacitních poměrů vypočítaných (a) z rovnice (3.3), (b) z rovnice (3.6) a (c) z rovnice (3.9) (deriváty s extrémními hodnotami π_{R2} jsou označeny čísly, přerušované linie vyznačují interval spolehlivosti na hladině 99%).

3.2.2.2 Korelace kapacitního poměru s rozdělovacím koeficientem oktanol-voda

Vzhledem k častému využití hodnot rozdělovacího koeficientu oktanol-voda pro analýzu vztahů mezi strukturou a biologickými účinky látek byla hledána korelace mezi naměřenými hodnotami kapacitního poměru a hodnotami rozdělovacího koeficientu oktanol-voda. Na obr. 3.14 je znázorněna závislost kapacitního poměru na hodnotě logaritmu rozdělovacího koeficientu oktanol-voda pro složení mobilní fáze $w(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,7$. Z obrázku je opět patrné, že hodnota kapacitního poměru závisí rovněž na druhu heteroatomu v poloze 2.



Obr. 3.14 Závislost kapacitního poměru studovaných derivátů benzoxazinu na hodnotě logaritmu rozdělovacího koeficientu oktanol-voda při HPLC na koloně RxC-18 ZORBAX (150×4,6 mm), mobilní fáze acetonitril-voda ($w(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,7$) pro deriváty 4-thioxo-benzo[e][1,3]oxazin-2-onu (○) a deriváty benzo[e][1,3]oxazin-2,4-dithionu (●) ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol dm}^{-3}$, $F_m = 0,8 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, $\lambda = 340 \text{ nm}$, $t_M = 90 \text{ s}$, nástřik $10 \mu\text{l}$).

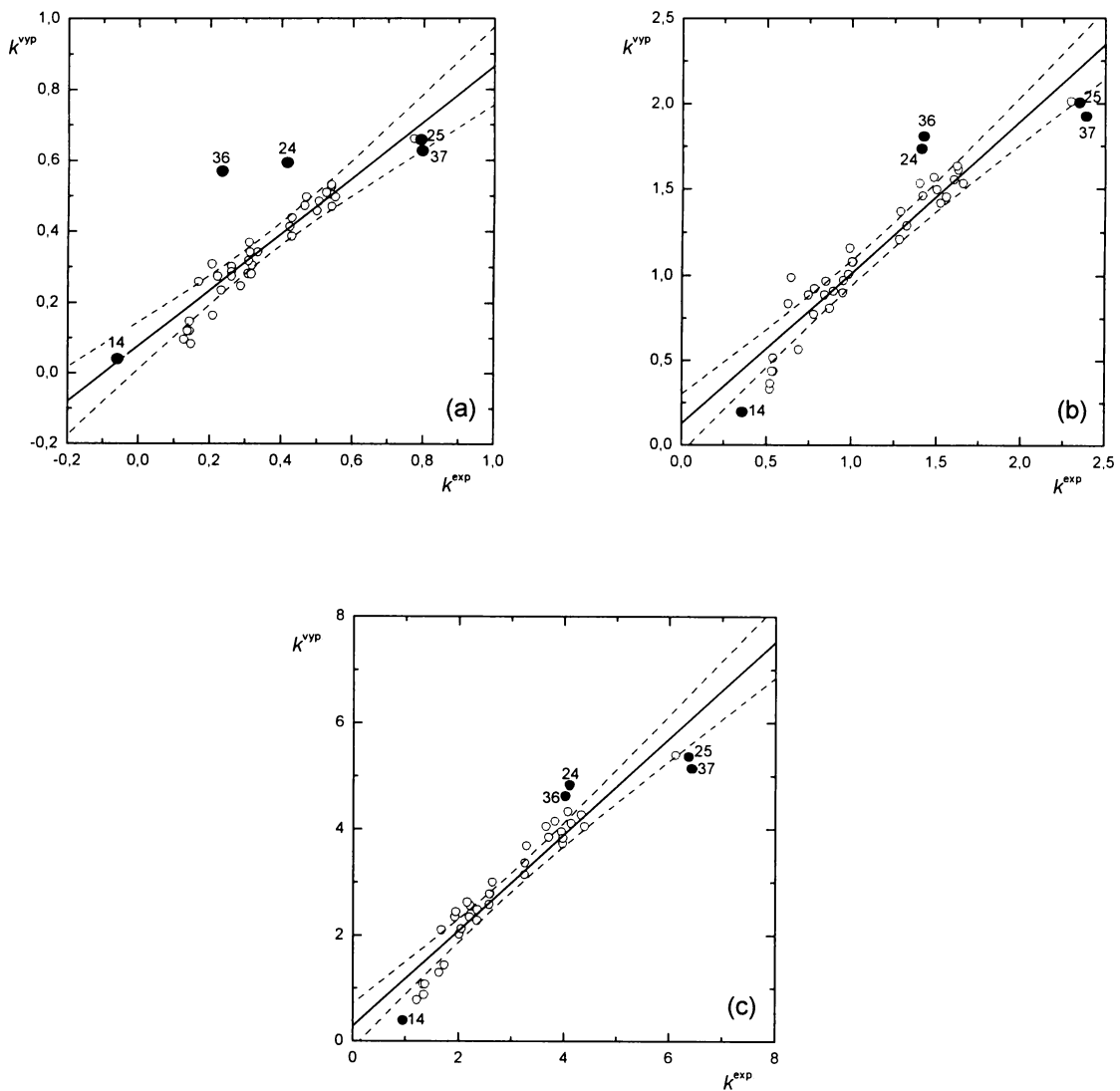
Tab. 3.4 Vypočítané korelační rovnice typu $k = e \log P + fI + g$ pro studované deriváty benzoxazinu

rovnice	$w(\text{CH}_3\text{CN})$	X	e	f	g	r	F	$F_{\text{krit.}}$
(3.10)	0,9	O	0,218	$-^a$	-0,464	0,897	57,55	8,86
(3.11)	0,9	S	0,277	$-^a$	-0,514	0,803	39,81	7,95
(3.12)	0,9	O, S	0,245	-0,139	-0,402	0,900	78,44	5,18
(3.13)	0,8	O	0,460	$-^a$	-0,707	0,913	70,05	8,86
(3.14)	0,8	S	0,861	$-^a$	-1,604	0,917	116,3	7,95
(3.15)	0,8	O, S	0,718	-0,400	-1,101	0,942	146,84	5,18
(3.16)	0,7	O	1,123	$-^a$	-1,928	0,967	200,06	8,86
(3.17)	0,7	S	2,441	$-^a$	-4,842	0,939	165,28	7,95
(3.18)	0,7	O, S	2,008	-1,022	-3,315	0,951	174,72	5,18

$-^a$ konstanta nezařazena do korelační rovnice

Pomocí programu QSAR-PC:PAR byly vypočítány příslušné korelační rovnice, které jsou spolu s odpovídajícími statistickými parametry zachyceny v tab. 3.4. Do korelačních rovnic byly zahrnuty hodnoty logaritmu rozdělovacího koeficientu oktanol-voda a indikátorová konstanta I popisující druh heteroatomu v poloze 2 (definovaná jako $I = 1$ pro $X = \text{O}$ a $I = 0$ pro $X = \text{S}$).

Z vypočítaných hodnot regresního koeficientu e plyne, že benzoxazindithiony mají vyšší hodnoty kapacitních poměrů než odpovídající stejně substituované thioxobenzoxazinony. Z hodnot F-testu a korelačních koeficientů plyne, že všechny vypočítané korelační rovnice jsou statisticky platné. Vzhledem k vysoké hodnotě korelačního koeficientu se jako nejvýhodnější jeví rovnice zahrnující jak vliv substituentů na bezenovém jádře a fenylu tak vliv druhu heteroatomu v poloze 2, tedy rovnice (3.12), (3.15) a (3.18). Na obr. 3.15 jsou uvedeny korelace mezi experimentálními hodnotami kapacitních poměrů a hodnotami vypočítanými z příslušných korelačních rovnic (3.12), (3.15) a (3.18); v obrázku jsou zároveň vyznačeny deriváty **14**, **24**, **25**, **36** a **37**, s objemnými substituenty na fenylu.



Obr. 3.15 Korelace mezi naměřenými hodnotami kapacitního poměru studovaných derivátů benzoxazinu a hodnotami kapacitních poměrů vypočítaných (a) z rovnice (3.12), (b) z rovnice (3.15) a (c) z rovnice (3.18) (deriváty s extrémními hodnotami $\log P$ jsou označeny čísly, přerušované linie vyznačují interval spolehlivosti na hladině 99%).

4 ZÁVĚR

Předkládaná diplomová práce se zaměřila na studium molekulových absorpčních spekter v UV oblasti a chromatografického chování čtyřiceti nově syntetizovaných derivátů benzoxazinu, patřících mezi potenciální antituberkulotika.

V první části práce byla naměřena molekulová absorpční spektra studovaných derivátů. Bylo zjištěno, že všechny deriváty vykazují v oblasti 200–400 nm dvě hlavní absorpční maxima při vlnových délkách přibližně 275 nm a 340 nm. Vzhledem ke skutečnosti, že se v molekule studovaných benzoxazinů vyskytují tři strukturní obměny bylo možné vliv substituentů charakterizovat pouze kvalitativně. Bylo zjištěno, že záměna kyslíkového heteroatomu v poloze 2 za síru se projeví hyperchromním efektem obou hlavních absorpčních maxim, zároveň se ve spektru objevuje nové maximum při přibližně 300 nm. Substituce elektrofilním substituentem na fenylu vázaném na dusíku benzoxazinového kruhu má rovněž za následek hyperchromní efekt obou absorpčních maxim. Vliv substituce na benzenovém jádře benzoxazinového kruhu je možné kvalitativně charakterizovat pouze pro methoxyskupinu, jejíž přítomnost vede ke zjemnění struktury druhého absorpčního maxima při 340 nm.

V druhé části práce byly naměřeny retenční časy studovaných derivátů při HPLC chromatografii na koloně s obrácenou fází RxC18 ZORBAX v mobilní fázi acetonitril-voda s proměnlivým složením acetonitrilu ($w(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,90; 0,80 \text{ a } 0,70$). Z naměřených hodnot byly vypočítány příslušné kapacitní faktory. Pomocí QSRR analýzy byly nalezeny korelační rovnice popisující vztah mezi strukturou a hodnotou kapacitního poměru pro studované deriváty benzoxazinu. Jako strukturní deskriptory byly zvoleny hodnoty hydrofobních substituentových π konstant, dále indikátorová konstanta I popisující druh heteroatomu v poloze 2 (definovaná jako $I = 1$ pro $X = \text{O}$ a $I = 0$ pro $X = \text{S}$) a hodnota logaritmu rozdělovacího koeficientu oktanol-voda.

S využitím hydrofobních substituentových π konstant a indikátorové konstanty I byly nalezeny následující korelační rovnice pro jednotlivé použité mobilní fáze:

a) pro mobilní fázi acetonitril-voda $w(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,9$

$$k = 0,262 \pi_{R1} + 0,186 \pi_{R2} - 0,230 I + 0,324 \quad (3.3)$$

b) pro mobilní fázi acetonitril-voda $w(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,8$

$$k = 0,626 \pi_{R1} + 0,558 \pi_{R2} - 0,633 I + 1,028 \quad (3.6)$$

c) pro mobilní fázi acetonitril-voda $w(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,7$

$$k = 1,601 \pi_{R1} + 1,623 \pi_{R2} - 1,654 I + 2,612 \quad (3.9)$$

Z porovnání hodnot regresních koeficientů je patrné, že větší vliv na hodnotu kapacitního poměru má substituent vázaný na benzenovém jádře benzoxazinového kruhu. Deriváty **14**, **24**, **25**, **36** a **37**, s extrémními hodnotami hydrofobní substituentové π_{R2} konstanty (derivát **14** $\pi_{R2} = -0,57$; deriváty **24** a **36** $\pi_{R2} = 1,49$; deriváty **25** a **37** $\pi_{R2} = 1,42$) vykazují odchylky od korelační rovnice, pravděpodobně z důvodu velmi objemného substituentu (derivát **14** $R_2 = -\text{CN}$; deriváty **24** a **36** $R_2 = 4 -\text{CF}_3$; deriváty **25** a **37** $R_2 = 3,4 -\text{Cl}_2$), který velmi podstatně mění hydrofobní vlastnosti molekuly a tím i její chromatografické chování. Tyto změny pravděpodobně nestačí příslušná hydrofobní π konstanta zcela zachytit (podobná skutečnost je v literatuře popsána pro substituci nitroskupinami³³).

Vliv hydrofobicity molekuly, charakterizované pomocí vypočítané hodnoty rozdělovacího koeficientu oktanol-voda, na hodnotu kapacitního poměru bylo možno kvantifikovat následujícími korelačními rovnicemi

a) pro mobilní fázi acetonitril-voda $w(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,9$

$$k = 0,245 \log P - 0,139 I - 0,402 \quad (3.12)$$

b) pro mobilní fázi acetonitril-voda $w(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,8$

$$k = 0,718 \log P - 0,400 I - 1,101 \quad (3.15)$$

c) pro mobilní fázi acetonitril-voda $w(\text{CH}_3\text{CN}) = 0,7$

$$k = 2,008 \log P - 1,022 I - 3,315 \quad (3.18)$$

Z vypočítaných hodnot regresních koeficientů plyne, že benzoxazindithiony mají vyšší hodnoty kapacitních poměrů než odpovídající stejně substituované thioxobenzoxazinony. I v případě korelačních rovnic (3.12), (3.15) a (3.18) se projevil vliv velkého objemu substituentů na fenylu u derivátů **14**, **24**, **25**, **36** a **37**.

Vzhledem k častému použití hodnot rozdělovacího koeficientu oktanol-voda pro analýzu vztahů mezi strukturou a biologickými účinky látek (QSAR), představují rovnice (3.12), (3.15) a (3.18) možnost nahradit v těchto QSAR korelacích vypočítanou hodnotu rozdělovacího koeficientu oktanol-voda skutečně naměřenou hodnotou kapacitního poměru. Naměřené hodnoty kapacitního poměru totiž na rozdíl od vypočítaných hodnot rozdělovacího koeficientu oktanol-voda totiž reflektují skutečné chromatografické chování látek včetně případných odchylek, jak lze u studovaných derivátů benzoxazinu demonstrovat na derivátech **14**, **24**, **25**, **26** a **37**.

Literatura

1. Hansch, C.; Leo, A.: *Exploring QSAR. Vol. I – Fundamentals and Application in Chemistry and Biology*. Washington, American Chemical Society 1995.
2. Lyman, W.J.: Octanol/water partition coefficient. In: *Handbook of Chemical Property Estimation Methods. Environmental Behavior of Organic Compounds*. Eds. W. J. Lyman, W. F. Reehl, D. H. Rosenblatt. Washington, American Chemical Society 1990, p. 1–54.
3. Hansch, C.; Leo, A.: *Exploring QSAR. Vol. I – Fundamentals and Application in Chemistry and Biology*. Washington, American Chemical Society 1995. *Chapter 5. Calculation of Octanol-Water Partition Coefficients by Fragments*. p. 125–168.
4. Kalizsan, R.: *Quantitative Structure-Chromatographic Retention Relationships*. New York, Wiley 1987.
5. 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** (1978), 1364–1367.
6. Percampus, H. H.: *UV-VIS Spectroscopy and its Applications*. Berlin, Springer 1992.
7. Topsom, R. D.: Electronic substituent effects in molecular spectroscopy. In: *Progress in Physical Organic Chemistry*. Vol. 16. New York, Wiley 1987, p. 193–235.
8. Burke, W. J.; Mortenson-Glennie, E. L.; Weatherber, C.: Condensation of halophenols with formaldehyde and primary amines. *Journal of Organic Chemistry* **29** (1964), 909–912.
9. Gromachevskaya, E. V.; Kvitkovskii, F. V.; Kosulina, T. P.; Kul'nevich V. G.: 4H-3,1-Benzoxazines, their salts and dihydroderivatives. *Chemistry of Heterocyclic Compounds* **39** (2003), 137–155.

10. Srinivasan, M.: Polybenzoxazinones. In.: *Encyclopedia of Polymerization Science Engineering*. Vol. 11. Kroschwitz, J. I. (ed.). New York, John Wiley 1987, p. 635–643.
11. Myers, S. W.; Spencer, H. K.: 2-amino-4*H*-3,1-benzoxazines, e.g. 6-chloro-2-dimethylamino-4*H*-3,1-benzoxazine, are useful as herbicides. The compounds may be prepared by reacting an amine with a 2-halomethylphenyl isocyanate. *US Pat. 4164407* (1979).
12. Gromachevskaya, E. V.; Kul'nevich, V. G.; Orlov, V. M.; Chellar, N. S.; Nen'ko, N. I.; Kosulina, T. P.; Galenko-Yaroshevskii, P. A.; Murtazaeva, L. V.; Tikhonov, A. V.: 2-methyl-4,4-di-(beta-phenylethyl)-1,2-dihydro-4*H*-3,1-benzoxazinium hydrochloride showing capability to activate seed germination and enhance cereal crops productivity and a method of its synthesis. *RU Pat. 2084452* (1997).
13. Wagner, G.; Singer, D.; Weuffen, W.: Untersuchungen über 2-hydroxythiobenzamide und 2-hydroxythiobenzanilide. *Die Pharmazie* **21** (1966), 161–166.
14. Klimešová, V.; Svoboda, M.; Waisser, K.; Kaustová, J.; Buchta, V.; Král'ová, K.: Synthesis of 2-benzylthiopyridine-4-carbothiamide derivatives and their antimycobacterial, antifungal and photosynthesis-inhibiting activity. *European Journal of Medicinal Chemistry* **34** (1999), 433–440.
15. Kuneš, J.; Bažant, J.; Pour, M.; Waisser, K.; Šlosárek, M.; Janota, J.: Quinazoline derivatives with antitubercular activity. *Farmaco* **55** (2000), 725–729.
16. Kuneš, J.; Špulák, M.; Waisser, K.; Šlosárek, M.; Janota, J.: Quinoxaline derivatives as potential antitubercular agents. *Pharmazie* **55** (2000), 858–859.
17. Waisser, K.; Kubicová, L.; Klimešová, V.; Odlerová, Ž.: New group of potential antituberculotics: 3-aryl-2*H*,4*H*-benz[e][1,3]oxazine-2,4-diones. Comparison of the Topliss approach with regression analysis. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* **58** (1993), 2977–2982.
18. Bermudez, L.E.; Young, L.S.: New drug for therapy of mycobacterial infections. *Current Opinion in Infectious Diseases* **8** (1995), 428–437.

19. Waisser, K.; Gregor, J.; Dostál, H.; Kuneš, J.; Kubicová, L.; Klimešová, V.; Kaustová, J.: Influence of the replacement of the oxo function with the thioxo group on the antimycobacterial activity of 3-aryl-6,8-dichloro-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-diones and 3-arylquinazoline-2,4(1*H*,3*H*)-diones. *Farmaco* **56** (2001), 803–807.
20. Waisser, K.; Gregor, J.; Kubicová, L.; Klimešová, V.; Kuneš, J.; Macháček, M.; Kaustová, J.: New groups of antimycobacterial agents: 6-chloro-3-phenyl-4-thioxo-2*H*-1,3-benzoxazine-2(3*H*)-ones and 6-chloro-3-phenyl-2*H*-1,3-benzoxazine-2,4(3*H*)-dithiones. *European Journal of Medicinal Chemistry* **35** (2000), 733–741.
21. Gallegos, A.; Carbó-Dorca, R.; Ponec, R.; Waisser, K.: Similarity approach to QSAR. Application to antimycobacterial benzoxazines. *International Journal of Pharmaceutics* **269** (2004), 51–60.
22. Fringuelli, R.; Schiaffella, F.; Vecchiarelli, A.: Antifungal and immunomodulating activities of 1,4-benzothiazine azole derivatives: review. *Journal of Chemotherapy* **13** (2001), 9–14.
23. LARGERON, M.; LOCKHART, B.; PFEIFFER, B.; FLEURY, M. B.: Synthesis and *in vitro* evaluation of new 8-amino-1,4-benzoxazine derivatives as neuroprotective antioxidants. *Journal of Medicinal Chemistry* **42** (1999), 5043–5052.
24. Audebert P., Roche M., Pagetti J.: Electrochemical properties of some benzoxazines: conditions for electropolymerization in alkaline medium. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **383** (1995), 139–143.
25. Nesměrák K.; Němec I.; Štícha M.; Waisser K.; Palát K.: Quantitative structure-property relationships of new benzoxazines and their electrooxidation as a model of metabolic degradation. *Electrochimica Acta* **50** (2005), 1431–1437.
26. Horká, V.: *Diplomová práce*. Praha, PřF UK 2001.
27. Baborová, P.: *Bakalářská práce*. Praha, PřF UK 2002.
28. Hansch, C.; Leo, A.; Hoekman, D.: *Exploring QSAR. Vol.2 – Hydrophobic, Electronic and Steric Constants*. American Chemical Society, Washington 1995.
29. 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** (1973), 1207–1216.

30. Doerffel, K.; Eckschlager, K.: *Optimální postup chemické analýzy*. STNL, Praha 1985.
31. Miller, J.C.; Miller, J.N.: *Statistics for Analytical Chemistry. 2nd edition*. Ellis Horwood, New York 1992.
32. Gromachevskaya, E. V.; Kosulina, T. P.; Kul'nevich, V. G.: Studies on 4*H*-3,1-benzoxazines. 8. Synthesis and properties of 4*H*-3,1-benzoxazinium chlorides, *Khimiya Geterotsiklicheskikh Soedineniy* (1993), 537–541.
33. Jozwiak K.; Szumilo H.; Senczyna B.; Niewiadomy A.: RPHPLC as a tool for determining the congenericity of a set of 2,4-dihydroxythiobenzanilide derivatives. *Chromatographia* **52** (2000), 159–161.

Poděkování

Na tomto místě srdečně děkuji všem, kteří se - ať už přímo, či nepřímo - spolu se mnou podíleli na zdárném dokončení předkládané diplomové práce. Jmenovitě bych pak rád vyjádřil velký dík RNDr. Karlu Nesměrákovi, PhD., za bezchybné odborné vedení, motivaci, inspiraci a schopnost nepolevovat v práci i ve chvílích největší únavy.

V Praze, 3.5.2006

Vojtěch Vágner