

PŮVODNÍ PRÁCE

Syntéza a HPLC enantioseparácia nových derivátov 3-alkoxy-4-hydroxyfenylalkanónov typu potenciálnych α/β-blokátorov

Synthesis and HPLC enantioseparation of novel derivatives of 3-alkoxy-4-hydroxyphenylalkanones of a potential α/β-blocker type

Ružena Čižmáriková • Ladislav Habala • Jindra Valentová • Dana Šmátralová

Došlo 26. februára 2021 / Prijato 9. apríla 2021

Súhrn

V predkladanej práci bola reakciou 3-alkoxy-4-hydroxyfenylalkanónov s 2-chlórmetyloxiránom a v nasledujúcom stupni s heterocyklickými amínnimi (pyrrolidínom, azepánom, 4-metylpirazínom a 2-methoxyfenylpirazínom) syntetizovaná séria siedmych derivátov s heteroaminopropanolovým reťazcom. Uvedené zlúčeniny boli pripravené vo forme racemátov. Čistota pripravených látok bola potvrdená chromatografiou na tenkej vrstve a boli u nich zmerané UV, IČ a ^1H NMR spektrá. Enantioseparácia bola uskutočnená pomocou HPLC na chirálnej kolóne Chiralpak AD založenej na tris(3,5-dimetylfenyl)karbamáte. Účinnosť enantioseparácie bola sledovaná v závislosti od zloženia mobilnej fázy (hexán : etanol : metanol : etyletanamín) a od štruktúry pripravených látok. Enantiosepáracia na základnú líniu sa dosiahla u všetkých látok v mobilných fázach A (78 : 11 : 11 : 0,1 v/v/v/v) a B (80 : 10 : 10 : 0,1 v/v/v/v), s faktorom selektivity v rozmedzí 1,07 – 1,42 a rozlišením v rozmedzí 0,76 – 5,47. V mobilnej fáze so zvýšeným obsahom hexánu nedochádzalo k enantioseparácii piperazínových derivátov.

Kľúčové slová: 3-alkoxy-4-hydroxyphenylalkanóny • beta-blokátory • enantioseparácia • HPLC • Chiralpak AD

Summary

The present paper reports the synthesis of a series of seven compounds with a hetero aminopropanol chain. The compounds were prepared by the conversion of 3-alkoxy-4-hydroxyphenyl alkanones

with 2-chloromethyl oxirane and subsequent reaction of the products with heterocyclic amines (pyrrolidine, azepane, 4-methylpiperazine and 2-methoxyphenyl piperazine). The target compounds were synthesized in the form of racemates. The purity of the products was confirmed by thin layer chromatography and their IR, UV-VIS and ^1H -NMR spectra were recorded. Enantioseparation of the racemic products was accomplished by HPLC on a Chiralpak AD chiral chromatographic column with tris(3,5-dimethylphenyl) carbamate as the chiral selector. The efficiency of enantioseparation was determined in relation to the composition of the mobile phase (hexane : ethanol : methanol : ethylethanamine) and to the structure of the prepared compounds. Baseline separation was achieved with all compounds using mobile phases A (78 : 11 : 11 : 0,1 v/v/v/v) and B (80 : 10 : 10 : 0,1 v/v/v/v), with selectivity factor ranging from 1.07 to 1.42 and resolution from 0.76 to 5.47. The mobile phase containing a higher amount of hexane did not allow for successful enantioseparation of the piperazine derivatives.

Key words: 3-alkoxy-4-hydroxyphenylalkanones • beta-blockers • enantioseparation • HPLC • Chiralpak AD

Úvod

Racemické deriváty s arylaminopropanolovým reťazcom je možné pripraviť niekoľkými metódami vo viačerých reakčných stupňoch. Najčastejší postup spočíva v reakcii prítomnej fenolickej skupiny s 2-chlórmetyl-oxiránom a v nasledujúcom stupni v otvorení oxiránového cyklu pomocou príslušného amínu¹⁾. Z ďalších postupov je možné použiť otvorenie oxiránového cyklu pomocou kyseliny bromovodíkovej za vzniku 3-alkoxy-1-bróm-propán-2-olov s nasledujúcou reakciou s príslušnými amínnimi²⁾. U nových derivátov propranololu sa použili reakcie s benzoylchloridom, pyridínum

chlórchromátom a n-butylchloridom pomocou esterifikácie, oxidácie, redukcie a alkylácie³⁾.

Pripravené zlúčeniny typu aryloxyaminopropanolov majú v svojej štruktúre stereogénne centrum a existujú ako (R) a (S)-enantioméry, ktoré sa líšia svojimi farmakologickými a farmakokinetickými vlastnosťami⁴⁾.

Enantiomérne čisté zlúčeniny aryloxyaminopropanolového typu sa syntetizujú pomocou stereoselektívnej reakcie prítomnej fenolickej skupiny príslušných zlúčenín s rôznymi chirálnymi prekurzormi, ako sú (*R*) a (*S*)-chlórmetyloxirány, (*S*)-glycidoltozylát, (*S*)- alebo (*R*)-2,3-O-isopropylidénglyceroltozylát, E-(2*S*,3*S*)-3-trimethylsilylglycidol a (*S*)-3-*terc*-butyl-5-fenyl-oxazolidín-5-ylmetanol. Mnohé z týchto chirálnych medziproduktov je možné pripraviť z prírodných látok, ako je D-manitol a kyselina L-askorbová^{5,6)}. Syntézu beta-blokátorov, ako sú betaxolol, metoprolol, sotalol a timolol, je možné uskutočniť použitím asymmetrickej syntézy, vrátane bioenzymatických metód⁷⁾.

V skupine aryloxyaminopropanolov enantioselektívne rozdelenie jednotlivých racemátov je možné docíliť pomocou rôznych analytických metód, ako sú HPLC, GC, CE, z ktorých najväčšie zastúpenie má HPLC s použitím priamej a nepriamej metódy. Pri priamej metóde sa používa chirálny selektor bud' v stacionárnej, alebo v mobilnej fáze. Pri nepriamej metóde dochádza k derivatizácii látok pomocou chirálnych činidiel a následnej separácii na klasických nechirálnych kolónach.

Pri priamej separácii ide o rozdielnú interakciu látky s povrchom chirálnej stacionárnej fázy za vzniku prechodných diastereoizomérov. Delenie ovplyvňuje zloženie mobilnej fázy, veľkosť kolóny, teplota a iné faktory.

tory. U beta-blokátorov aryloxyaminopropanolového typu bola použitá HPLC s využitím rôznych chirálnych kolón na báze β -cyklodextrínov⁸⁾, na kolónach Pikloveho typu^{9, 10)}, na báze proteínov (sérový albumín, α_1 -kyslý glykoproteín, ovomukoid)^{11, 12)}, crown-éterov^{13, 14)}, makrocyclických antibiotík (teikoplanin, vankomycin)¹⁵⁻¹⁷⁾ a polysacharidov (karbamáty celulózy a amylozy)¹⁸⁻²⁰⁾.

Experimentálna časť

Svntéza

(4-hydroxy-3-chlórmetylfenyl)alkanóny a (3-alkoxymetyl-4-hydroxyfenyl)alkanóny boli pripravené podľa metód^{21,22}. [4-(3-heteroamino-2-hydroxypropoxy)fenyl] alkanóny boli pripravené metódou²³ tak, ako je zobrazené v schéme 1.

(4-hydroxy-3-chlórmethyl-4-hydroxyfenyl)alkanón^{21, 22)}

Do sulfonačnej banky opatrennej mechanickým miešadlom, kontaktným teplomerom a lievikom sa k zmesi 0,15 mol 4-hydroxyfenylalkanónu pridá 90 cm³ koncentrovanej kyseliny chlorovodíkovej. Teplota sa udržuje pri 45 – 50 °C a v priebehu 30 minút sa do reakčnej zmesi pridáva 0,15 mol paraformaldehydu a reakčná zmes sa pri danej teplote mieša 4,5 hodiny. Vypadnutý tuhý produkt sa odsaje, premýje vodou a kryštalizuje z benzénu alebo etylacetátu. T.t. 132 – 135 °C, výťažok 75 %.

1-[4-(hydroxy)-3-(chlórmetyl)fenyl]etanón

¹H NMR (CD_3OD): δ 2,53 (s, 3H, CH_3); 4,68 (s, 2H, CH_2); 6,86 – 6,89 (d, J = 8,7 Hz, 1H, Ar-H⁵); 7,83 – 7,86 (dd, J = 2,4, J = 11,1 Hz, 1H, Ar-H⁶); 7,98 (s, 1H, Ar-H²).

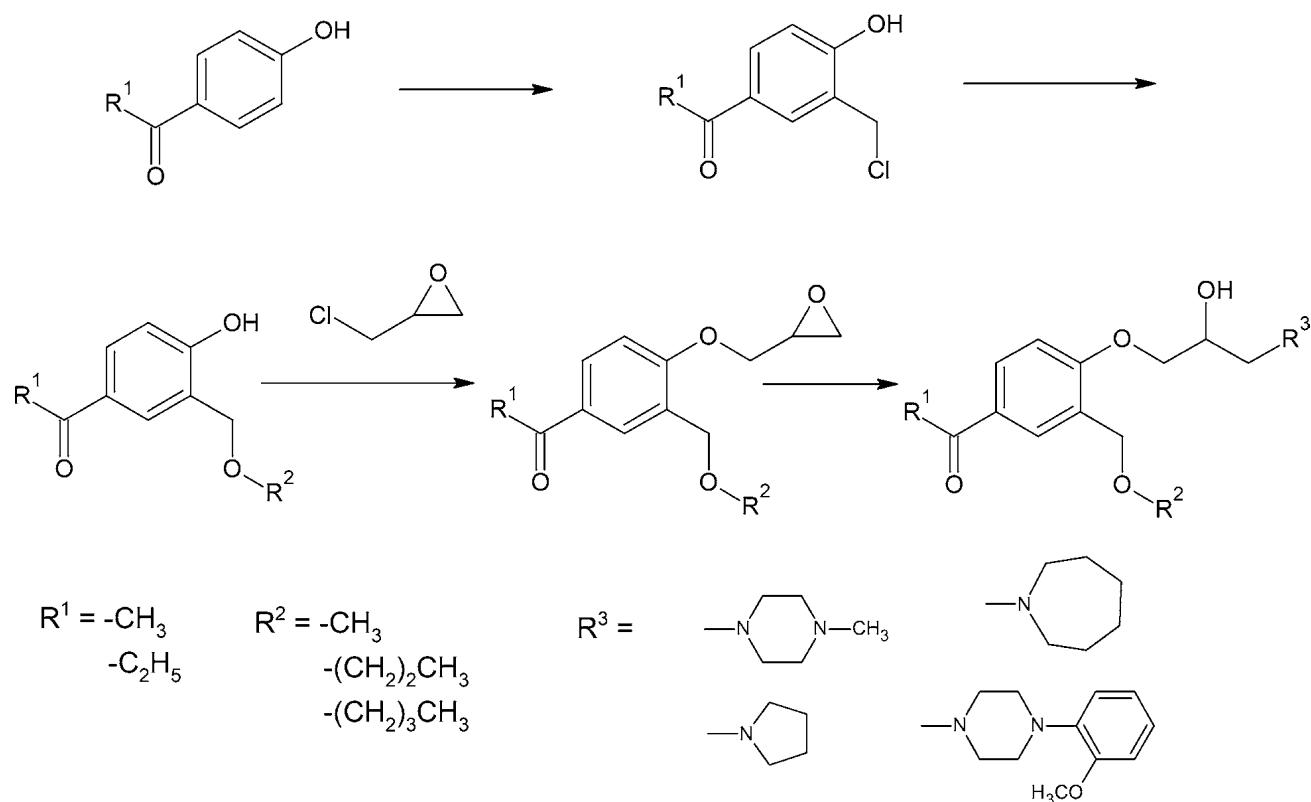


Schéma 1. Syntéza cielových zlúčenín

1-[4-(hydroxy)-3-(chlórmetyl)fenyl]propán-1-ón

¹H NMR (CD_3OD): δ 1,10 – 1,15 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H, CH_3); 2,53 – 2,57 (q, $J = 7,2$ Hz, 2H, CH_2CH_3); 4,68 (s, 2H, CH_2Cl); 6,85 – 6,89 (d, $J = 9,4$, 1H, Ar-H⁵); 7,82 – 7,85 (dd, $J = 2,4$, $J = 11,2$ Hz, 1H, Ar-H⁶); 7,99 (s, 1H, Ar-H⁷).

(3-alkoxymetyl-4-hydroxyfenyl)alkanóny^{20, 21}

Do sulfonačnej banky opatrenej mechanickým miešadlom, kontaktným teplomerom sa k 0,12 mol (4-hydroxy-3-chlórmetyl-4-hydroxyfenyl)alkanónu pridá 100 cm³ suchého alkoholu (metanol, propán-1-ol, bután-1-ol). Pri teplote 40 – 50 °C sa k reakčnej zmesi v priebehu 1 hodiny pridáva 19,2 g (0,23 mol) hydrogénuhlíčitanu sodného. Po oddestilovaní alkoholu sa olejovitý zvyšok kryštalizuje z hexánu alebo cyklohexánu.

Spektrálne charakteristiky sú uvedené v prácach^{21, 22}.

1-[3-(alkoxymetyl)-4-(2,3-epoxypropoxy)fenyl]alkanóny

V trojhrdlovej banke opatrenej miešadlom, zábrusným teplomerom a chladičom sa nechá reagovať 4 hodiny pri teplote 50 – 55 °C zmes 0,15 mol 1-(3-alkoxymetyl-4-hydroxyfenyl)alkanónu, 0,17 mol epichlórhydrínu a suspenzie 0,16 mol 85 % KOH. Reakciou vzniknutý KCl sa odsaje a epichlórhydrín sa oddestiluje za zniženého tlaku. Zvyšok po destilácii sa vyextrahuje do dietyléteru alebo etylacetátu a pridá sa ako sušidlo MgSO_4 . Po odfiltrovaní sušidla a oddestilovaní dietyléteru alebo etylacetátu sa olejový zvyšok použije v ďalšom reakčnom stupni.

1-[3-(alkoxymetyl)-4-(3-heteroamino-2-hydroxypropoxy)fenyl]alkanóny

Vo varnej banke opatrenej spätným chladičom sa v prostredí alkoholu zahrieva 0,08 mol [3-(alkoxymetyl)-4-(2,3-epoxypropoxy)fenyl]alkanónu a 0,16 mol heteroamínu (pyrolidín, azepán, 4-metylpirerazín a 2-metoxyfenylpirerazín) 2 – 4 hodiny pri teplote 30 °C a potom ešte 4 – 5 hodín za varu. Pri syntéze bázy substituovanej metoxyfenylpirerazínom sa ako alkohol použil propán-1-ol, ktorý má vyššiu teplotu varu ako etanol. Po ukončení zahrevania sa etanol, resp. propán-1-ol, oddestiluje a ku zvyšku po destilácii sa pridá voda. Produkt sa extrahuje do etylacetátu a vyusuší sa nad K_2CO_3 . Finálna látka získaná vo forme bázy sa po oddestilovaní etylacetátu kryštalizuje z vhodného rozpúšťadla (hexánu, cyklohexánu). Príprava soli sa uskutoční tým, že do éterického roztoru bázy sa pridáva éterický roztok bezvodej kyseliny fumarovej až do kvantitatívneho vyzrážania soli, ktoré je indikované ukončením tvorby zákalu. Vyzrážaná soľ v pomere báza : kyselina 2 : 1 sa prekryštalizuje z etylacetátu alebo propán-1-olu.

Teplota topenia syntetizovaných látok bola stanovená pomocou Koflerovho bloku (HMK, Franz Küstner, Nemecko) a je nekorigovaná. Čistota pripravených zlúčenín bola overená chromatografiou na tenkej vrstve (TLC) za použitia silikagélových platničiek Silufol® UV 254 (Merck) a dvoch mobilných fáz – etylacetát/ety-

letánamín 9/1 v/v a u látok III, V–VII propán-1-ol/etyl-etánamín 9,5/0,5 v/v.

Na detekciu pod UV svetlom bol použitý prístroj Spectroline CM-10 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA).

Infračervené spektrá boli namerané *reflexnou* technikou s ATR nástavcom s ZnSe kryštálm na spektrofotometri Nicolet 6700 (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Ultrafialové spektrá boli merané spektrofotometrom GENESYS 10S v oblasti vlnových dĺžok 200 – 400 nm. Koncentrácie meraných roztokov báz a solí pripravených aryloxyaminopropanolov v metanole boli približne 0,2 mol · m⁻³.

¹H-NMR spektrá boli namerané na prístroji Varian Gemini 2000 Spectrometer (Varian Inc., Palo Alto, USA) s pracovnou frekvenciou 300 MHz pre ¹H NMR. Ako vnútorný štandard bol použitý tetrametylksilán. Na rozpustenie vzoriek boli použité deuterované rozpúšťadlá: chloroform, metanol, DMSO, voda. Chemické posuny sú vyjadrené v ppm (Δ). Multiplicita signálov je vyjadrená ako: s – singlet, d – dublet, dd – dublet dubletu, t – triplet, q – kvartet, m – multiplet.

Elementárna analýza bola nameraná na prístroji FLASH 2000 Organic Elemental Analyzer (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA).

Separácia látok na kolóne s polysacharidovou stacionárnu fázou bola uskutočnená na HPLC systéme AGILENT 1200 (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA) – autosampler, kvartérna pumpa, odplyňovač, DAD detektor, programová analýza dát softvérom Agilent ChemStation pre LC systém. Ako stacionárna fáza bola použitá chirálna amylózová fáza Chiralpak AD (0,46 × 25cm) 5 µm. Mobilná fáza bola zmesou hexánu, etanolu, metanolu a etyletanáminu v rôznom pomere. Látky boli zriedené metanolom na približnú koncentráciu 0,1 mg · ml⁻¹. HPLC rozpúšťadlá boli získané od firmy Merck (Darmstadt, Nemecko).

Podmienky chromatografickej analýzy

Chirálna stacionárna fáza: tris(3,5-dimetylfenylkarbamát)amylóza (Chiralpak AD)

Mobilné fázy: hexán : etanol : metanol : etyletanámín v pomere:

78 : 11 : 11 : 0,1 v/v/v/v

80 : 10 : 10 : 0,1 v/v/v/v

85 : 7,5 : 7,5 : 0,1 v/v/v/v

95 : 2,5 : 2,5 : 0,1 v/v/v/v

Priekopek mobilnej fázy: 0,8 ml/min

Teplota kolóny: 25 °C

Dávkovaný objem: 20 µl

Detekcia: DAD detektor pri vlnovej dĺžke 265 nm ± 8 nm

Stanovené chromatografické parametre:

retenčný čas: t_1 , t_2 kapacitné faktory: $k_1 = (t_1 - t_0) / t_0$

$k_2 = (t_2 - t_0) / t_0$

faktor selektivity: $\alpha = k_2 / k_1$

rozlišovací faktor: $Rs = 2 (t_2 - t_1) / (w_1 + w_2)$

šírka píku: w_1 , w_2

Tab. 1. Pripravené zlúčeniny

Látka	R ¹	R ²	R ³
	I CH ₃	(CH ₂) ₃ CH ₃	—N—Cyclohexyl
	II CH ₃	(CH ₂) ₃ CH ₃	—N—Cycloheptyl
	III CH ₃	(CH ₂) ₂ CH ₃	—N—Cyclohexyl-N-CH ₃
	IV CH ₂ CH ₃	CH ₃	—N—Cyclohexyl
	V CH ₂ CH ₃	CH ₃	—N—Cyclohexyl-N-CH ₃
	VI CH ₂ CH ₃	CH ₃	—N—Cyclohexyl-N—(4-methylmethoxy)phenyl
	VII CH ₂ CH ₃	(CH ₂) ₂ CH ₃	—N—Cyclohexyl-N—(4-methylmethoxy)phenyl

I. (2RS)-bis-{1-[3-(4-acetyl-2-butoxymethylfenoxy)-2-hydroxypropyl]pyrrolidinium}fumarát

Výtažok: 68 %; m.p. 124 – 125 °C (etylacetát); R_f: 0,62; IČ (cm⁻¹): 3414 (vOH), 1700 (vC=O), 1601 (vC=C), 1264 (vArOalk); UV (CH₃OH, ε v m² · mol⁻¹): λ₁ 222 log ε₁ 3,57, λ₂ 272 log ε₂ 3,59; ¹H-NMR (CDCl₃): δ 0,93 (t, J = 7,4 Hz 3H, CH_{3,alk}⁴), 1,41 – 1,46 (m, 2H, CH_{2,alk}³), 1,56 – 1,64 (m, 2H, CH_{2,alk}²), 2,06 – 2,11 (m, 4H, 2×CH₂pyr^{3,4}), 2,56 (s, 3H, COCH₃), 3,41 (m, 6H, CH₂N, 2×CH₂pyr^{2,5}), 3,54 (t, J = 7,4 Hz, 2H, CH_{2,alk}¹), 4,54 (s, 2H, Ar-CH₂O), 6,66 (s, 2H, CH^{fum}), 6,84 (d, J = 8,9 Hz, 1H, Ar-H³), 7,80 – 7,86 (d, J = 9,3 Hz 1H, Ar-H³), 7,95 – 7,98 (dd, J = 9,4, 1,4 Hz, 1H, Ar-H⁵); fumarát C₄₄H₆₆O₁₂N₂, M_r 844,48; Anal. vypočítané %C 62,54 %H 8,11 %N 6,63 nájdené %C 62,33 %H 8,41 %N 6,51.

IV. (2RS)-bis-{1-[3-(2-methoxyme-4-propanoylfenoxy)-2-hydroxypropyl]pyrrolidinium}fumarát

Výtažok: 66 %; m.p. 110 – 113 °C (etylacetát); R_f: 0,64; IČ (cm⁻¹): 3438 (vOH), 1678 (vC=O), 1602 (vC=C), 1256 (vArOalk); UV (CH₃OH, ε v m² · mol⁻¹): λ₁ 220 log ε₁ 3,19, λ₂ 270 log ε₂ 3,20; ¹H NMR (DMSO-d₆): δ 1,17 (t, J = 7,5 Hz, 3H, COCH₂CH₃), 2,05 – 2,09 (m, 4H, CH₂pyr^{3,4}), 3,01 (q, J = 7,1 Hz, 2H, COCH₂CH₃), 3,29 – 3,11 (m, 6H, NCH₂, CH₂pyr^{2,5}), 3,57 (s, 3H, OCH₃), 4,12 (d, J = 7,3 Hz, 2H, OCH₂CH), 4,33 – 4,35 (m, 1H, OCH₂CH), 4,60 (s, 2H, ArCH₂), 6,66 (s, 2H, CH^{fum}), 7,07 (d, J = 9,2 Hz, 1H, Ar-H⁵), 7,95 – 8,01 (m, 2H, Ar-H^{2,6}); fumarát C₄₀H₅₈N₂O₁₂, M_r 758,89; Anal. vypočítané %C 63,31 %H 7,70 %N 3,63 nájdené %C 63,05 %H 7,42 %N 3,40.

V. (2RS)-bis-{1-[3-(2-methoxymethyl-4-propanoylfenoxy)-2-hydroxypropyl]-4-metylpirazinium}fumarát

Výtažok: 68 %; m.p. 173 – 174 °C; R_f: 0,34; IČ (cm⁻¹): 3338 (vOH), 1678 (vC=O), 1603 (vC=C), 1267 (vArOalk); UV (CH₃OH, ε v m² · mol⁻¹): λ₁ 220 log ε₁ 3,67, λ₂ 270 log ε₂ 3,20; ¹H NMR (CDCl₃): δ 1,17 (t, J = 7,5 Hz, 3H, COCH₂CH₃), 2,22 (s, 3H, CH₃-N_{pip}), 3,93 (q, J = 7,1 Hz, 2H, COCH₂CH₃), 2,84 (m, 4H, CH₂pip^{3,5}), 3,56 (s, 3H, OCH₃), 3,63 (m, 2H, CH₂N_{pip}), 4,15 (m, 4H, CH₂pip^{2,6}), 4,16 – 4,28 (m, 3H, CH₂CHOH), 4,54 (s, 2H, ArCH₂), 6,55 (s, 2H, CH^{fum}), 7,27 (d, J = 9,0 Hz, 1H, Ar-H⁴), 7,47 (s, 1H, Ar-H²), 7,49 (t, J = 7,5 Hz, 1H, Ar-H⁶), 7,64 (d, J = 9,1 Hz 1H, Ar-H⁵); fumarát C₄₂H₆₄O₁₂N₄, M_r 816,46; Anal. vypočítané %C 61,75 %H 7,90 %N 6,86 nájdené %C 61,42 %H 7,71 %N 6,62.

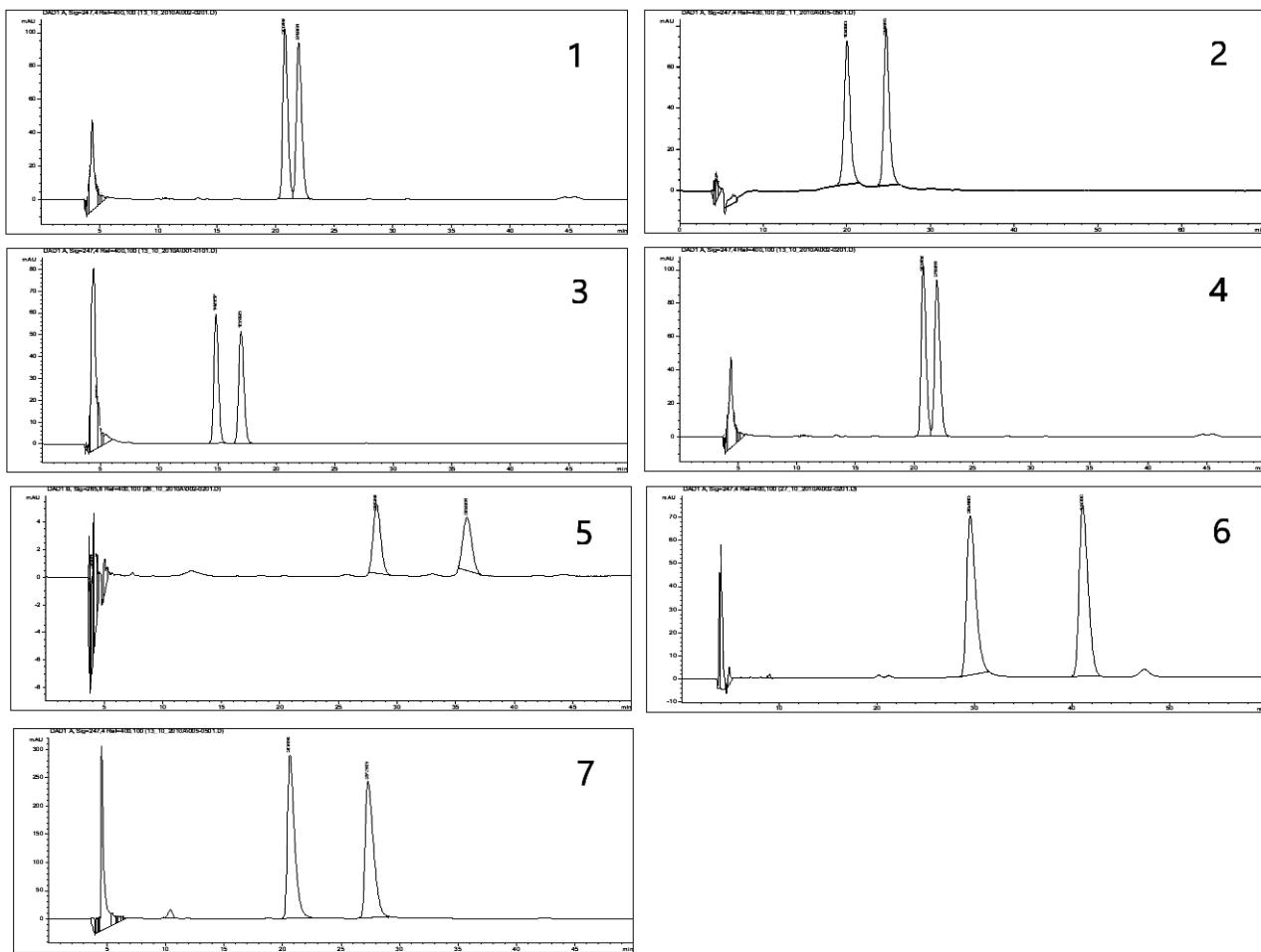
VI. (2RS)-bis-{1-[3-(2-methoxymethyl-4-propanoylfenoxy)-2-hydroxypropyl]-4-(2-methoxyfenyl)piperazinium}fumarát

Výtažok: 69 %; m.p. 163 – 165 °C (propán-2-ol); R_f: 0,50; IČ (cm⁻¹): 3491 (vOH), 1677 (vC=O), 1601 (vC=C), 1241 (vArOalk);

UV (CH_3OH , ϵ v $\text{m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$): λ_1 206 log ϵ_1 3,61, λ_2 268 log ϵ_2 3,30; ^1H NMR (DMSO- d_6): δ 1,18 (t, 7,4 Hz, 3H, COCH_2CH_3), 2,94 (q, J = 7,0 Hz, 2H, COCH_2CH_3), 2,60 – 2,95 (m, 10H, CH_2N , CH_2 pip^{2,3,5,6}), 3,47 (s, 3H, CH_2OCH_3), 3,78 (s, 3H, ArOCH₃), 4,01 – 4,12 (m, 3H, CH₂CHOH), 4,52 (s, 2H, ArCH₂), 6,50 (s, 2H, CH^{fum}), 6,86 – 6,97 (m, 4H, pip-Ar), 6,88 – 6,93 (m, 5H, ArH^{3'}, ArH^{4'}, ArH^{5'}, ArH^{6'}, ArH⁶), 7,12 (d, J = 9,3 Hz, 1H, ArH⁵), 7,89 – 7,92 (m, 2H, ArH^{2,6}), 7,91 – 7,96 (m, 1H, ArH²); fumarát $C_{54}\text{H}_{76}\text{O}_{14}\text{N}_4$, M_r 1005,22; Anal. vypočítané %C 66,52 %H 7,62 %N 5,57 nájdené %C 66,42 %H 7,51 %N 5,68.

VII. (2RS)-bis-{1-[3-(4-propanoyl-2-propoxymethylfenoxyl)-2-hydroxypropyl]-4-(2-metoxyfenyl)piperazinium}fumarát

Výtažok: 72 %; m.p. 163 – 165 °C (propán-2-ol); R_f: 0,54; IČ (cm⁻¹): 3444 (vOH), 1681 (vC=O), 1601 (vC=C), 1236 (vArOalk); UV (CH_3OH , ϵ v $\text{m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$): λ_1 206 log ϵ_1 3,68, λ_2 270 log ϵ_2 3,30; ^1H NMR (DMSO- d_6): δ 0,95 (t, J = 7,3 Hz, 3H, CH₃alk³), 1,61 – 1,68 (m, 2H, CH₃alk²), 1,21 (t, 3H, J = 7,1 Hz, COCH₂CH₃), 2,90 – 2,97 (m, 2H, COCH₂CH₃), 2,66 – 2,91 (m, 10H, CH₂N, pip^{2,3,5,6}H), 3,18 (s, 3H, CH₂OCH₃), 3,53 (t, J = 7,5 Hz, 2H, CH₃alk¹), 3,70 (s, 3H, ArOCH₃), 4,02 – 4,08 (m, 3H, CH₂CHOH), 4,55 (s, 2H, ArCH₂), 6,88 – 6,93 (m, 5H, ArH^{3'}, ArH^{4'}, ArH^{5'}, ArH^{6'}, ArH⁶), 7,12 (d, J = 9,0 Hz, 1H, ArH⁵), 7,91 – 7,96 (m, 2H, ArH^{2,6}); fumarát $C_{58}\text{H}_{80}\text{O}_{14}\text{N}_2$, M_r 1057,30; Anal. vypočítané %C 65,89 %H 7,63 %N 5,30 nájdené %C 65,69 %H 7,33 %N 5,60.



Obr. 1. Chromatografický záznam: (1) látky I na CHIRALPAC AD v mobilnej fáze C, (2) látky II na CHIRALPAC AD v mobilnej fáze D, (3) látky III na CHIRALPAC AD v mobilnej fáze C, (4) látky IV na CHIRALPAC AD v mobilnej fáze C, (5) látky V na CHIRALPAC AD v mobilnej fáze C, (6) látky VI na CHIRALPAC AD v mobilnej fáze B, (7) látky VII na CHIRALPAC AD v mobilnej fáze C

Výsledky a diskusia

Látky I–VII (viď schéma 1) boli pripravené overenou 5-stupňovou syntézou zo 4-hydroxyfenylalkanónov. Ich chlórmetyláciou s paraformaldehydom a kyselinou chlorovodíkovou pripravené (4-hydroxy-3-chlórmetylfenyl)alkanóny s príslušným alkoholom (metanolom, propán-1-olom a bután-1-olom) poskytujú (3-alkoxymetyl-4-hydroxyfenyl)alkanóny. Tieto sú hlavnými medziproduktami na naviazanie aminopropanolového reťazca reakciou s 2-chlórmetyloxiránom a v nasledujúcom stupni s príslušným amínom (pyri-

dínom, azepánom, 4-metylpirazínom a 2-metoxyfenylpirazínom).

Získané bázy vo forme viskózneho oleja s kyselinou fumarovou poskytovali fumaráty ako biele kryštallické látky v pomere báza : kyselina fumarová 2 : 1 a s výtažkom v rozmedzí 60 – 70 %. Ich čistota bola kontrolovaná chromatografiou na tenkej vrstve s mobilnou fázou etylacetát/etylétanámín, resp. propán-1-ol/etylétanámín. U pripravených fumarátov boli zmerané IČ, UV, a NMR spektrá. V IČ spektrách boli identifikované charakteristické pásy valenčných vibrácií pre funkčné skupiny: v_{as} (OH) 3414 – 3492 cm⁻¹,

Tab. 2. Chromatografické parametre pri podmienkach A, B, C, D

Podmienky	A			B			C			D		
Číslo látky	k_1	α	R_s									
I	1,2	1,13	0,83	1,32	1,12	0,76	1,71	1,13	1,45	0,25	1,72	1,88
II	1,1	1,15	0,83	1,18	1,24	2,43	1,49	1,24	2,02	5,45	1,28	3,22
III	1,49	1,19	1,44	1,67	1,19	1,27	2,95	1,19	2,55		nd	
IV	3,1	1,07	0,83	3,34	1,07	1,05	6,6	1,31	4,4		nd	
V	3,98	1,33	4,13	4,76	1,31	2,96		nd			nd	
VI	5,57	1,45	5,01	6,64	1,45	4,08		nd			nd	
VII	2,92	1,41	3,21	3,3	1,42	5,47	4,52	1,4	5,14		nd	

nd – nedeliteľná

$\nu(C=O)$ 1662 – 1681 cm⁻¹; $\nu(C=C)ar$ 1601 – 1603 cm⁻¹; 1236 – 1267 cm⁻¹.

V UV spektrách pripravených zlúčenín sú prítomné dve absorpcné maximá, pri vlnových dĺžkach v rozmedzí 206 – 222 nm a 262 – 274 nm, s $\log \epsilon = 3,19 - 3,68$, zodpovedajúce $\pi - \pi^*$ -prechodom.

V ¹H-NMR spektrách pre vodíky metylénovej skupiny substituovaného alkoxymetylu (methoxy, propoxy a butoxy) singletové signály s posunom okolo 4,5 ppm. Vodíky propán-2-olového reťazca sú v spektrách prítomné ako multipletové signály s posunmi okolo 4,0 (ArOCH₂), 4,3 (CH) a 2,4 až 2,5 ppm (CH₂N). Methoxy skupina naviazaná na aromatický kruh, 2-methoxyphenylpiperazínový substituent je v spektrách prítomná ako singlet s posunom okolo 3,8 ppm. Piperazínové vodíky sú prítomné ako multipletové signály s posunmi 2,7 – 2,8 ppm. Interakčné konštanty tripletu a kvartetu propionylovej skupiny sú v zhode s konštantami v propiofenóne²⁴. V NMR spektrách dokazuje pomer báza : kyselina fumarová 2 : 1 dianión kyseliny fumarovej prítomný ako singlet s posunom 6,66 ppm, podobný singletu kyseliny fumarovej²⁵. Substitúciou jedného vodíka v kyseline fumarovej, akým je napr. monoethylfumarát, sa *trans* vodíky prejavujú ako dublet²⁶.

Signály vodíkov na aromatickom jadre sú v oblasti 6,7 – 8,0 ppm. Interakčné konštanty aromatických vodíkov korešpondujú s konštantami trisubstituovaných benzénových derivátov²⁷ ako aj s konštantami iných betablokátorov²⁸.

Aryloxyaminopropanoly obsahujú vo svojej molekule chirálne centrum na strednom uhlíku propán-2-olového spojovacieho reťazca, čo spôsobuje existenciu dvoch enantiomérnych foriem R a S. V interakcii s chirálnym prostredím, ktorým je aj ľudský organizmus (prítomnosť D-sacharidov a L-aminokyselín), tieto enantiomery môžu vykazovať rozdielnú farmakologickú, farmakokinetickú aktivitu a môžu mať aj rozdielnú toxicitu. Na podobnom princípe je založená aj priama separácia látok na chirálnej kolóne. Ide o rozdielnú interakciu látky s povrchom chirálnej stationárnej fázy za vzniku prechodných diastereozomérov. V práci použitá polysacharidová Chiraldapak AD obsahuje tris(3,5-dimetylfenylkarbamát) amylózy, ktorý sa pripravuje

reakciou hydroxylových skupín amylózy s príslušnými izokyanátmi. Vonkajšia strana vznikutej kavy je pokrytá hydrofóbnymi fenylmi a vnútorná strana je vyplnená karbamátovými zvyškami, s ktorými analyt tvorí vodíkové väzby. Separáčna účinnosť je podporená aj tvorbou inkluzívnych komplexov a $\pi - \pi^*$ -interakcií aromatických skupín separovaného racemátu a fenyramidu. Tento typ chirálnej kolóny bol použitý v predchádzajúcich prácach aj na semipreparatívne rozdelenie zlúčenín s izopropylom a *terc*-butylom na bázickom reťazci. U separovanej zlúčeniny pomocou CD bolo zistené, že izomér R sa eluuje pred S-enantiomérom²⁹.

Použité mobilné fázy boli zložené zo 70 – 90 % hekánu, doplnené zmesou metanolu a etanolu v rôznych pomeroch s malým prídavkom etyletanaminu, ktorý zabezpečuje lepšiu separáciu bez chvostovania píkov (mobilné fázy A – D). Prítomnosť alkoholov v mobilnej fáze napomáha lepšej enantioseparácií, ovplyvňuje tvorbu vodíkových väzieb a tým aj interakciu s kolónou.

Použitou chirálnej kolónou dochádza k rozdeleniu všetkých zlúčenín I–VII (tab. 1, obr. 1) v mobilných fázach A (78 : 11 : 11 : 0,1 v/v/v/v) a B (80 : 10 : 10 : 0,1 v/v/v/v) s faktorom selektivity v rozmedzí 1,07 – 1,42 a rozlišovacím faktorom v rozmedzí 0,76 – 5,47. V mobilnej fáze C dochádzalo k rozdeleniu látok s výnimkou V a VI s methoxymetylou skupinou a piperazínom v bázickej časti. Rozmedzie a bolo 1,13 – 1,40 a R_s 1,45 – 5,14. Zvýšením množstva hexánu v mobilnej fáze D sa rozdelili iba zlúčeniny I a II s pyrrolidínom a azepánom až na základnú líniu. Zlúčeniny s objemnejšími heterocyklami u látok III–VII neboli rozdelené, čo poukazuje v týchto mobilných fázach na stérické tienenie stereogénneho centra.

Štúdiom tejto separácie sa potvrdilo, že u takéhoto typu zlúčenín je vhodnejší tento typ chirálneho selektora pred chirálnymi kolónami založenými na báze makrocyclických antibiotík (vankomycínu, teikoplanínu a cyklodextrinu, v ktorých dochádzalo k rozdeleniu zlúčenín s rozvetveným alkylom na bázickom dusíku³⁰).

Aryloxyaminopropanoly sú v klinickej praxi najviac používané kvôli ich β -adrenolytickému účinku. Obmenou štruktúry v hydrofilnej časti, kde je naviazaný heterocyklický amín, prevažuje účinok na α/β receptory^{31–34} a mnohé deriváty so zabudovaným piperazínom

vykazujú antimikróbnu³⁵⁾ aktivitu a sú potenciálnymi antihypertenzívmi³⁶⁾.

Stret záujmov: žiadnen.

Literatúra

1. Čižmáriková R., Borovanský A., Kozlovsý J., Béderová E., Dingová A. 4-(3-Alkylamino-2-hydroxypropoxy)-3-(alkoxymethyl)acetophenones. Collect. Czech. Chem. Commun. 1985; 50, 2289–2298.
2. Čižmáriková R., Račanská E., Hroboňová K., Lehotay J., Ághová Z., Halešová D. Synthesis, pharmacological activity and chromatographic separation of some novel potential β-blockers of the aryloxyaminopropanol type. Pharmazie 2003; 58, 237–241.
3. Tran V. A., Tran N. H. T., Bach L. G., Nguyen T. D., Nguyen T. T., Nguyen T. T., Nguyen T. A. N., Vo T. K., Vo T. T. T., Le V. T. Facile synthesis of propranolol and novel derivatives. J. Chem. 2020; 2020, art. no. 9597426.
4. Čižmáriková R., Habala L., Markuliak M., Valentová J. Survey of pharmacological activity and pharmacokinetics of selected β-adrenergic blockers in regard to their stereochemistry. Appl. Sci. 2019; 9, 625.
5. Čižmáriková R., Valentová J., Hutt A. J., Sedláková S. Blokátory β-adrenergických receptorov – skupina chirálnych liečív. Stereoselektívna syntéza β-blokátorov. Čes. slov. Farm. 2005; 54, 201–206.
6. Agustian J., Kamaruddin A. H., Bhatia S. Single enantiomeric β-blockers – the existing technology. Process Biochem. 2010; 45, 1587–1604.
7. Saddique F. A., Zahoor A. F., Yousaf M., Irfan M., Ahmad M., Mansha A., Khan Z. A., Naqvi S. A. R. Synthetic approaches towards the synthesis of beta-blockers (betaxolol, metoprolol, sotalol, and timolol). Turk. J. Chem. 2016; 40, 193–224.
8. Muntean D. L., Hancu G., Hajnal K., Rusu A., Ciurba A. Cyclodextrine screening for the chiral separation of beta-blocker derivatives. Rev. Chim. 2015; 66, 1019–1023.
9. Yang Y., Wang Y., Bao Z., Yang Q., Zhang Z., Ren Q. Progress in the enantioseparation of β-blockers by chromatographic methods. Molecules 2021; 26, 468.
10. Pirkle W. H., Lee W. J. Separation of the enantiomers of β-blockers using brush type chiral stationary phase derived from conformationally rigid α-amino β-lactam. Bull. Korean Chem. Soc. 2010; 31, 620–623.
11. Barbato F., Carpentiero C., Grumetto L., La Rotonda M. I. Enantioselective retention of β-blocking agents on human serum albumin and α₁-acid glycoprotein HPLC columns: Relationships with different scales of lipophilicity. Eur. J. Pharm. Sci. 2009; 38, 472–478.
12. Imre S., Ormenișan A., Tero-Vescan A., Muntean D. L., Vari C. E. HPLC enantioseparation of β-blockers on ovomucoid stationary phase. J. Chromatogr. Sci. 2016; 54, 1578–1583.
13. Adhikari S., Lee W. Chiral separation using chiral crown ethers as chiral selectors in chirotechnology. J. Pharm. Investig. 2018; 48, 225–231.
14. Hyun M. H. Development of HPLC chiral stationary phases based on (+)-(18-crown-6)-2,3,11,12-tetracarboxylic acid and their applications. Chirality 2015; 27, 576–588.
15. George N., Herz M., Aboul-Enein H. Y., Shihata L., Hanafi R. Surface design of enantiomeric HPLC separation on vancomycin and teicoplanin-based stationary phases, a tool for chiral recognition of model β-blockers. J. Chromatogr. Sci. 2019; 57, 485–494.
16. Pocrnić M., Ansorge M., Dovhunová M., Habinovec I., Tesařová E., Galić N. Chiral separation of beta-blockers by high-performance liquid chromatography and determination of bisoprolol enantiomers in surface waters. Arh. Hig. Rada Toksikol. 2020; 71, 56–62.
17. Xu B. J., Zhang D. T., Shen B. C., Xu X. Z. Enantioseparation of seven amino alcohols on teicoplanin chiral column. Chinese J. Anal. Chem. 2007; 35, 55–60.
18. Li M., Jiang Z., Di X., Song Y. Enantiomeric separation of six beta-adrenergic blockers on Chiraldak IB column and identification of chiral recognition mechanisms by molecular docking techni-que. Biomed. Chromatogr. 2020; 34, e4803.
19. Kalíková K., Martínková M., Schmid M. G., Tesařová E. Cellulose tris-(3,5-dimethylphenylcarbamate)-based chiral stationary phase for the enantioseparation of drugs in supercritical fluid chromatography: comparison with HPLC. J. Sep. Sci. 2018; 41, 1471–1478.
20. Mosiashvili L., Chankvetadze L., Farkas T., Chankvetadze B. On the effect of basic and acidic additives on the separation of the enantiomers of some basic drugs with polysaccharide-based chiral selectors and polar organic mobile phases. J. Chromatogr. A 2013; 1317, 167–174.
21. Čižmáriková R., Polakovičová M., Mišíková E. Synthesis, physicochemical properties, and conformational studies of (3-alkoxymethyl-4-hydroxyphenyl)ethanones. Chem. Pap. 2002; 56, 256–260.
22. Čižmáriková R., Markuliak M., Habala L., Valentová J., Bílková A. Synthesis, antimicrobial and antiradical activity of (3-alkoxymethyl-4-hydroxyphenyl)propan-1-ones intermediates of biological active compounds. Eur. Pharm. J. 2020; (v tlači).
23. Čižmáriková R., Némethy A., Valentová J., Hroboňová K., Bruchatá K. Synthesis and HPLC enantioseparation of derivatives of the 3-hydroxyphenylethanone. Acta Fac. Pharm. Univ. Comen. 2012; 59, 15–27.
24. ChemicalBook: Propiophenone (93-55-0) ¹H NMR. https://www.chemicalbook.com/spectrumen_93-55-0_1hnmr.htm
25. ChemicalBook: Fumaric acid (110-17-8) ¹H NMR. https://www.chemicalbook.com/SpectrumEN_110-17-8_1HNMR.htm
26. ChemicalBook: Monoethyl fumarate (2459-05-4) ¹H NMR. https://www.chemicalbook.com/SpectrumEN_2459-05-4_1HNMR.htm
27. Milata M., Sedla P., Brezová V., Gatial A., Kováčik V., Miglierini M., Stankovský Š., Šima J. Aplikovaná molekulová spektroskopie. Slovenská technická univerzita Bratislava 2008; 76.
28. Zielinsky-Pisklak M. A., Pisklak D. M., Wawer I. ¹H and ¹³C NMR characteristics of β-blockers. Magn. Reson. Chem. 2011; 49, 284–290.
29. Valentová J., Čižmáriková R., Bui T. T. T., Drake A. F., Hutt A. J. Enantiomeric resolution of novel aryloxyami-

- nopropanol derivatives with β -adrenoceptor antagonist activity on a derivatised amylose chiral stationary phase. *Chromatography* 2003; 58, 733–740.
30. **Hroboňová K., Lehotay J., Čižmáriková R., Armstrong D. W.** Study of mechanism of enantioseparation. Part I. Chiral analysis of alkylaminoderivatives of aryloxypropanols by HPLC using macrocyclic antibiotics as chiral selectors. *J. Liq. Chromatogr.* 2001; 24, 2225–2238.
31. **Huang J. J., Huang Y. J., Zhu L., Yuan M., Huang L.** Design, synthesis and α_1 -adrenoceptor blocking activity of new arylpiperazines containing acetophenone substituents. *Pharmazie* 2014; 69, 578–584.
32. **Némethy A., Vavrinec P., Vavrincová-Yaghi D., Čepcová D., Mišúth S., Králová E., Čižmáriková R., Račanská E.** Synthesis and biological evaluation of new combined α/β -adrenergic blockers. *Arch. Pharm.* 2017; 350, e201600394.
33. **Huang J. J., Zhang Z. H., He F., Liu X. W., Xu X. J., Dai L., Liu Q. M., Yuan M.** Novel naftopidil derivatives containing methyl phenylacetate and their blocking effects on α , D/1A-adrenoreceptor subtypes. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2018; 28, 547–551.
34. **Čižmáriková R., Némethy A., Habala L., Račanská E., Valentová J., Hroboňová K.** Synthesis, pharmacological activity and chromatographic enantioseparation of new heterocyclic compounds of the aryloxyaminopropanol type derived from 4-hydroxyphenylalkanones. *Monatsh. Chem.* 2018; 149, 969–976.
35. **Malík I., Csöllei J., Jampílek J., Stanzel L., Zadražilová I., Hošek J., Pospíšilová Š., Čížek A., Coffey A., O'Mahony J.** The structure–antimicrobial activity relationships of a promising class of the compounds containing the *N*-arylpiperazine scaffold. *Molecules* 2016; 21, 1274–1299.
36. **Cecchetti V., Schiaffella F., Tabarrini O., Fravolini A.** (1,4-benzothiazinyloxy)alkyl piperazine derivatives as potential antihypertensive agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2000; 10, 465–468.