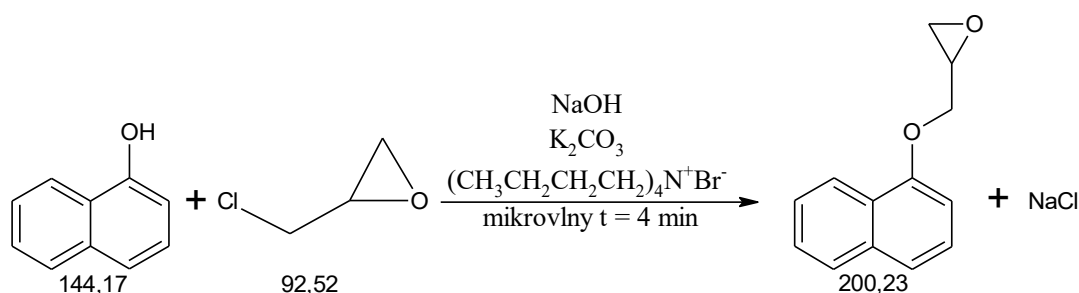
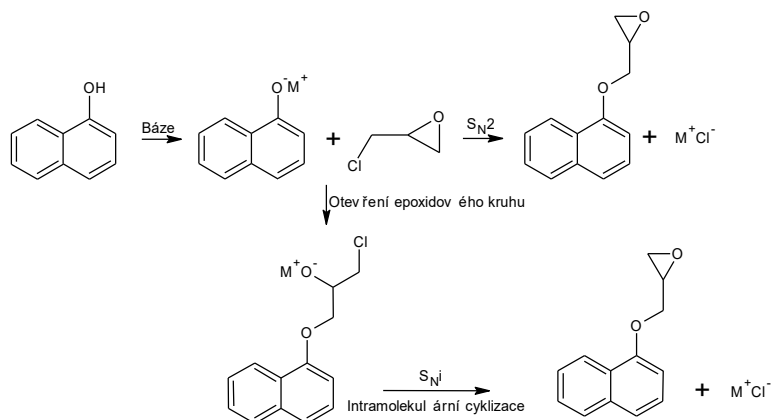


Úloha 1: Příprava propranololu a série jeho analogů pro jednoduchou QSAR studii

1a: Příprava 2-[(naftalen-1-yloxy)methyl]oxiranu v mikrovlnném reaktoru



Chemikálie:

1-naftol	[144,17]	10 mmol	1,45 g	
NaOH (mikropelety)	[40,00]	10 mmol	0,40 g	
K ₂ CO ₃	[138,21]	40 mmol	5,53 g	
Tetrabutylammonium bromid	[322,37]	2 mmol	0,33 g	
Epichlorhydrin	[92,52]	15 mmol	1,19 ml	ρ = 1,183 g/cm ³

Do aparatury (obr. 1.) přidáme 1-naftol (10 mmol), mikropelety hydroxidu sodného (10 mmol), bezvodý uhličitán draselný (40 mmol) a tetrabutylammonium bromid (2 mmol). Vzniklá směs se míchá při laboratorní teplotě po dobu 2-3 minut v mikrovlnném reaktoru.

Následně přidáme (15 mmol) epichlorhydrinu a mikrovlnný reaktor se nastaví na E=500 W, reakční čas na 4 minuty a teplota na 116 °C. Míchání je mechanické (dle obr. 2.).



obr. 1

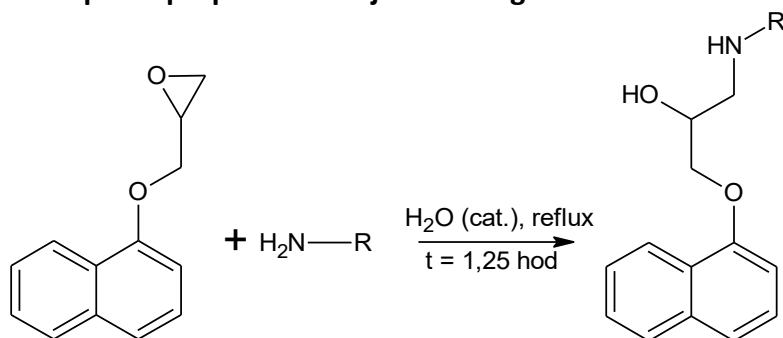


obr. 2

Po ochlazení reakční směsi na laboratorní teplotu se přidáme 50 ml destilované vody. Reakční směs vytřepeme do diethyletheru 3x25 ml. Organické extrakty diethyletheru se spojí a vytřepou roztokem hydroxidu sodného (1,3 g NaOH na 15 ml H₂O). Následně se etherická vrstva protřepe s 3x15ml destilované vody. Vysušíme síranem hořečnatým. Roztok diethyletheru zahustíme na rotační odparce do sucha. Vzniká látka je olejové konzistence a žlutohnedé barvy.

(Zdroj: Pchelka, B. K.; Loupy, A.; Petit, A. *Tetrahedron*, 62 (2006), 10968-10979)

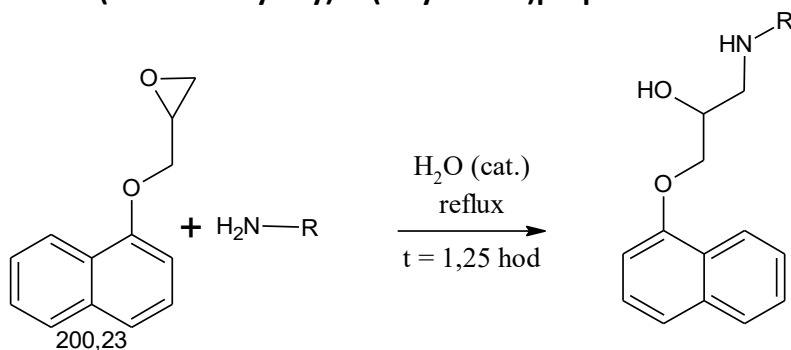
1b. Příprava propranololu a jeho analogů



Chemikálie:

2-[(naftalen-1-yloxy)methyl]oxiran	[200,23]	1,5 mmol	0,30 g
isopropylamin	[59,11]	t.v. 32-35 °C	10 ml
ethanolamin	[61,08]	t.v. 170 °C	10 ml
propylamin	[59,11]	t.v. 47-51 °C	10 ml
3-methoxypropylamin	[89,14]	t.v. 117-119 °C	10 ml
isobutylamin	[73,14]	t.v. 63 °C	10 ml
tert-butylamin	[73,14]	t.v. 43-47 °C	10 ml
sec-butylamin	[73,14]	t.v. 63 °C	10 ml
cyklopentylamin	[85,17]	t.v. 106-108 °C	10 ml
cyklohexylamin	[99,17]	t.v. 134 °C	10 ml
destilovaná voda			

Řada 1-(naftalen-1-yloxy)-3-(alkylamino)propan-2-olů



Do aparatury opatřené zpětným chladičem přidáme 0,3 g 2-[(naftalen-1-yloxy)methyl]oxiranu, 0,5 ml destilované vody, 10 ml příslušného sekundárního aminu a přivedeme k varu na dobu 1,25 hodiny. (Při přípravě 1-(naftalen-1-yloxy)-3-(ethylamino)propan-2-olu Po ochlazení na laboratorní teplotu zahustíme reakční směs do sucha na rotační vakuové odparce.

Zpracování reakční směsi:

a) Báze se vysráží přidáním 1-2ml diethyletheru a zamražením v mrazničce (9min). Následně odsajeme krystaly na předem vychlazené fritě či Büchnerově nálevce.

b) (Pro přípravu 2-hydroxyethylderivátu). Přidáme 10 ml destilované vody a 12 ml diethyletheru a vytřepeme v dělicí nálevce. Vodnou fází vytřepeme 3 x 12 ml diethyletheru. Organické fáze spojíme a vysušíme síranem hořečnatým. Přefiltrujeme přes vatu a zahustíme na rotační odparce do sucha. Báze se vysráží přidáním 1-2ml diethyletheru a zamražením v mrazničce (9min). Následně odsajeme krystaly.

Tabulka 1: Relativní molekulové hmotnosti a teploty tání bazí 1-(naftalen-1-yloxy)-3-(akylamino)propan-2-olů

R	M _r	Teplota tání [°C]
C ₂ H ₅	245,317	109-110
<i>n</i> -C ₃ H ₇	259,343	104
<i>iso</i> C ₃ H ₇	259,343	92
HO-C ₂ H ₄	261,316	84
<i>iso</i> -C ₄ H ₉	237,37	166-168
<i>terc</i> -C ₄ H ₉	237,37	[230] za rozkladu; (180-181)
<i>sec</i> -C ₄ H ₉	237,37	60
HO(CH ₂) ₂ (2-hydroxyethyl)	261,316	84
H ₃ CO(CH ₂) ₃ (3-methoxypropyl)	289,369	[148-149]
<i>cyklo</i> -C ₅ H ₉ (cyklopentyl)	285,381	(208-209)
<i>n</i> -pentyl	287,397	(148-149)
<i>cyklo</i> -C ₆ H ₁₁ (cyklohexyl)	299,407	(198-200)

Hodnoty v kulatých závorkách platí pro hydrochloridy, v hranatých pro oxaláty 1:1 (-onium hydrogenoxaláty).

(Zdroj: Sayyed, Ilyas A. et al.; *Tetrahedron*; vol 61; nb 11 (2005); p 2831-2838)

2. Jednoduchá QSAR studie: závislost aktivity β-adrenolytik - analogů propranololu na jejich lipofilitě

Hledáme rovnici ve tvaru

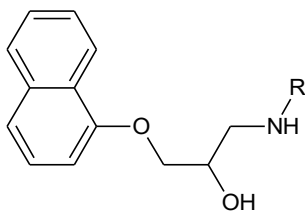
$$A = f(\text{lipofilita}).$$

Konkrétně hledáme lineární regresí rovnici ve tvaru

$$A = a \cdot \text{Par} + b,$$

kde A je aktivita, vyjádřená jako % inhibice tachykardie navozené isoprenalinem u anestetizovaných koček přepočtené na dávku $1 \mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Par je parametr vyjadřující lipofilitu a a a b jsou regresní koeficienty.

Pro každou z níže uvedených variant úlohy sestavíme následující tabulku:



R	aktivita A [%·μmol ⁻¹ ·kg ⁻¹ ·min ⁻¹]	Par
ethyl	208,519	
<i>n</i> -C ₃ H ₇ (propyl)	739,128	
<i>iso</i> -C ₃ H ₇ (isopropyl)	6744,331	
<i>terc</i> -C ₄ H ₉ (<i>terc.</i> -butyl)	9448,530	
<i>sec</i> -C ₄ H ₉ (<i>sek.</i> -butyl)	2952,396	
<i>iso</i> -C ₄ H ₉ (isobutyl)	278,848	
HO(CH ₂) ₂ (2-hydroxyethyl)	1045,264	
H ₃ CO(CH ₂) ₃ (3-methoxypropyl)	649,999	
<i>cyklo</i> -C ₅ H ₉ (cyklopentyl)	1512,657	
<i>n</i> -pentyl	64,771	
<i>cyklo</i> -C ₆ H ₁₁ (cyklohexyl)	201,521	

(Aktivity přepočteny dle Crofther A.F., Smith L.H., J. Med. Chem. 11, 1009 – 1013 (1968))

Jednotlivé možné lipofilní parametry

Logaritmus rozdělovacího koeficientu

$\log P = \log c_{\text{org}}/c_{\text{voda}}$

- ve farmacii nejčastěji soustava oktanol/voda
- používá se experimentálně stanovený (vytřepávání), častěji vypočtený různými algoritmy (viz přednáška farm. chemie, popř. MZVL)

log D (logaritmus distribučního koeficientu) je definován stejně jako log P, používá se však u disociovatelných látek (kyseliny/baze/amfotery) a platí pro konkrétní hodnotu pH, tj. pro konkrétní poměr disociované a nedisociované formy

Retenční parametry: mají-li charakterizovat lipofily, využívá se chromatografie na reverzní fázi, tj. taková, kde stacionární fáze je lipofilní, mobilní hydrofilní. Typicky jde o silikagel, jehož hydroxylové skupiny jsou etherifikovány dlouhými alkylovými, např. oktadecylovými řetězci (C18 fáze)

Pro TLC se využívá parametr R_m :

$$R_m = \log\left(\frac{1}{R_f} - 1\right)$$

U HPLC (RP-HPLC) je běžný kapacitní faktor $\log k'$

$$\log k' = \log\left(\frac{t_r - t_0}{t_0}\right),$$

kde t_r je retenční čas studované látky a t_0 mrtvý retenční čas, tj. retenční čas látky, která se na koloně nezadržuje (NaN_3 , NaNO_2 , aceton...)

S řadou aktivit a řadou parametrů provedeme regresní analýzu metodou lineární regrese.

Můžeme použít vhodný statistický software, pro nejjednodušší provedení postačí i MS Excel nebo OpenOfficeCalc. Lipofilní parametr zadáváme vždy jako proměnnou nezávislou (x), aktivitu jako závislou (y).

Postup při výpočtu v Excelu

- data aktivit a lipofilit vedle sebe do dvou sloupců tabulky
- vybrat obdélník 2 x 4 buňky jinde, než jsou vstupní data
- zvolit funkci LINREGRESE (lineární regrese)
- vybrat sloupec lipofilit jako data x
- sloupec aktivit jako data y
- zadat B = pravda, Stat = pravda
- “provést výpočet”(OK)
- v levé horní rohové buňce vybraného obdélníku se objeví hodnota a; stisk F2 a následně CTRL+ SHIFT + ENTER
- objeví se požadovaná data: $y = ax + b$; r^2 ... druhá mocnina lineárního korelačního koeficientu; s_y ... směrodatná odchylka odhadu, F ... hodnota Fischer-Snedecorova testu; rozmístění hodnot jako v následující tabulce:

a	b
S_a	S_b
r^2	s_y
F	d_f

Na základě výsledku regresní analýzy sestavíme výslednou rovnici ve tvaru

$$A = a \cdot \text{Par} + b$$

a uvedeme hodnoty n (počet dat), r, r^2 a F. Pokud je $r \geq 0,5$, můžeme závislost A na Par považovat za lineární. Pokud je $r < 0,5$, můžeme provést transformaci aktivity (např. $\log A$, $\log 1/A$...) a zkusit

regresní analýzu znovu. Nebo lze použít regresní modely vyššího řádu, např. model 2.řádu by měl obecný tvar

$$A = a \cdot \text{Par}^2 + b \cdot \text{Par} + c,$$

to však již vyžaduje speciální statistický software. Pokud není závislost nalezena, je třeba volit jiné typy parametrů (elektronové, sterické, solvatační energie, molekulové povrchy). Parametry je též možné kombinovat, vhodná může být např. kombinace jednoho parametru lipofilního a jednoho elektronového, lze přidat i parametr sterický. To ovšem vyžaduje multilineární regresi (MLR) a speciální statistický software.

(Srovnej též Beneš L., Farsa, O.: Farmaceutická chemie. Návody pro praktikum. VFU Brno 2007, str- 38 – 55; Beneš L., Farsa O.: Farmaceutická chemie (Farmakochemie). Úvod do studia chemických léčiv. VFU Brno 2005, str. 83 -89.)

Zadání konkrétních úloh

1. varianta: log k' z HPLC na reverzní fázi vs. aktivita

Kolona C18, mobilní fáze methanol:voda 1:1, průtok 0,6 ml/min, UV detektor, $\lambda=254$ nm, nástřík 10 μ l (objem dávkovací smyčky). Připravit roztoky všech látek o koncentraci 0,01 mg/ml v mobilní fázi (do odměrných baněk), též roztok KNO_3 stejné koncentrace pro změření t_0 . Každou látku nastříknout dvakrát, vypočítat průměrné t_r . Vypočítat log k' , seřadit do tabulky, provést lineární regresi, vyhodnotit. Bude-li závislost lineární a bude-li k dispozici derivát, u něhož aktivita není uvedena, dopočítat z regresní rovnice jeho aktivitu.

2.varianta: TLC na reverzní fázi C18

Mobilní fáze methanol:voda 1:1. Látky rozpustit v ethanolu na roztoky o přibl. koncentraci 0,1 mg / ml, nanést na start, vyvíjet do konce dráhy (9 cm), pod lampou (254 nm) detekovat a obkreslit skvrny, vypočítat R_f a R_m , provést lineární regresi, vyhodnotit. Bude-li závislost lineární a bude-li k dispozici derivát, u něhož aktivita není uvedena, dopočítat z regresní rovnice jeho aktivitu.

3.varianta: TLC na reverzní fázi silikagel impregnovaný silikonovým olejem

Chromatografické desky obdrží studenti již naimpregnované. Mobilní fáze methanol:voda 1:1. Látky rozpustit v ethanolu na roztoky o přibl. koncentraci 0,1 mg / ml, nanést na start, vyvíjet do konce dráhy (9 cm), pod lampou (254 nm) detekovat a obkreslit skvrny, vypočítat R_f a R_m , provést lineární regresi, vyhodnotit. Bude-li závislost lineární a bude-li k dispozici derivát, u něhož aktivita není uvedena, dopočítat z regresní rovnice jeho aktivitu.

4.varianta: TLC na fázi Al_2O_3

Vrstva oxidu hlinitého se v kontaktu s vodným alkoholem chová též jako reverzní fáze. Mobilní fáze methanol:voda 6:4. Látky rozpustit v ethanolu na roztoky o přibl. koncentraci 0,1 mg / ml, nanést na start, vyvíjet do konce dráhy (9 cm), pod lampou (254 nm) detekovat a obkreslit skvrny, vypočítat R_f a R_m , provést lineární regresi, vyhodnotit. Bude-li závislost lineární a bude-li k dispozici derivát, u něhož aktivita není uvedena, dopočítat z regresní rovnice jeho aktivitu.

5. varianta: TLC na polyamidové fázi

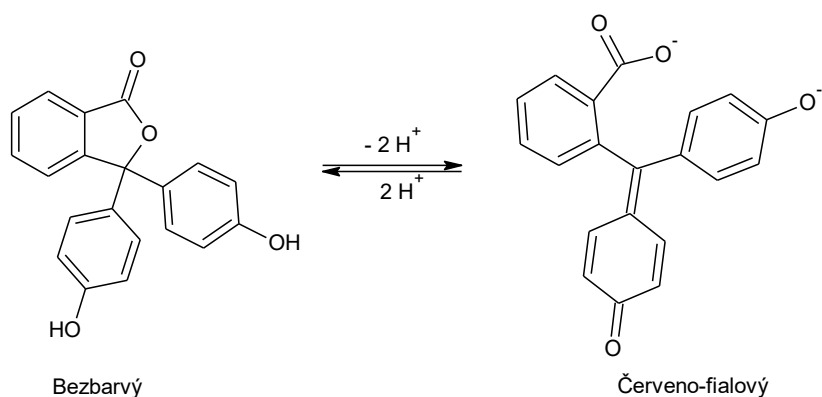
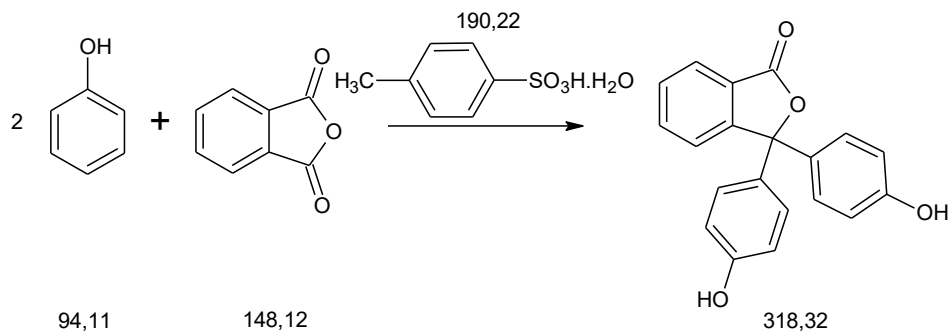
Vrstva je tvořena poly(6-aminohexanovou) kyselinou – Silon ®. Chromatografie zde probíhá rovněž rozdělovacím mechanismem, důležitá je zde však nejen lipofilita, ale i např. vodíkové vazby. Mobilní fáze methanol:voda 7:3. Látky rozpustit v ethanolu na roztoky o přibl. koncentraci 0,1 mg / ml, nanést na start, vyvíjet do konce dráhy (9 cm), pod lampou (254 nm) detekovat a obkreslit skvrny, vypočítat R_f a R_m , provést lineární regresi, vyhodnotit. Bude-li závislost lineární a bude-li k dispozici derivát, u něhož aktivita není uvedena, dopočítat z regresní rovnice jeho aktivitu.

6. varianta: logP vypočtený v Marvin Beans algoritmem VG (dle Viswanadhana, Ghose et al.), provést lineární regresi, vyhodnotit. Bude-li závislost lineární, vypočítejte logP cykloheptylderivátu a z regresní rovnice dopočítejte jeho očekávanou aktivitu.

7. varianta: logP vypočtený v ACD ChemSketch, provést lineární regresi, vyhodnotit. Bude-li závislost lineární, vypočítejte logP 2-methylcykloheptylderivátu a z regresní rovnice dopočítejte jeho očekávanou aktivitu.

8. varianta: logD vypočtený v Marvin Beans algoritmem Klop (dle Klopmana et al.), provést lineární regresi, vyhodnotit. Bude-li závislost lineární, vypočítejte logP 2-hydroxycyklohexylderivátu a z regresní rovnice dopočítejte jeho očekávanou aktivitu.

3. Fenolftalein



Chemikálie:

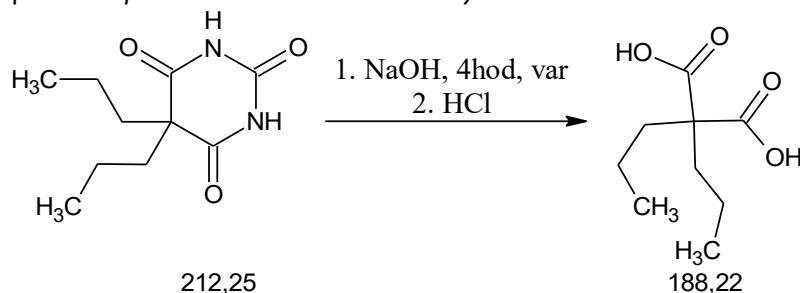
Fenol	2 mmol	190mg
Anhydrid kyseliny ftalové	1 mmol	150mg
Monohydrát kyseliny <i>p</i> -toluensulfonové	0,1 mmol	19mg
Dichlormethan		
Roztok NaOH 2 mol/l	10 g NaOH na 125 ml H ₂ O	potřeba 2ml
Roztok HCl 2 mol/l	22,07 ml HCl na 125 ml H ₂ O	potřeba 2ml

Do 10 ml vialky přidáme fenol (2 mmol), anhydrid kyseliny ftalové (1 mmol), monohydrát kyseliny *p*-toluensulfonové (0,1 mmol). Vialku umístíme na rozehrátou magnetickou míchačku o teplotě 150 °C na 5 minut. Po vychlazení na laboratorní teplotu přidáme 2 ml destilované vody. Vzniklou sraženinu odfiltrujeme pomocí Pasteurovy pipety, opatřené smotkem vaty na konci, a rozpustíme ve 2 ml 2 mol/l roztoku NaOH, vzniká červeno-fialové zabarvení. Opět pomocí Pasteurovy pipety s vatou na konci zfiltrujeme a filtrát přesuneme do čisté vialky, kde následně přidáme 2 ml roztoku 2mol/l kyseliny chlorovodíkové. Začnou se tvořit krystaly, které následně odsajeme.

(Upraveno dle Kiichi A, Nobuyoshi K. - Phenolphthalein as Organic Teaching Materials - Chemical Education Journal (CEJ), vol. 13, No. 1)

4. Valproová kyselina

4.1. Příprava 2,2-dipropylmalonové kys. [188,22] jako suroviny pro přípravu valproové kys. na praktiku -provádí laborantka do zásoby

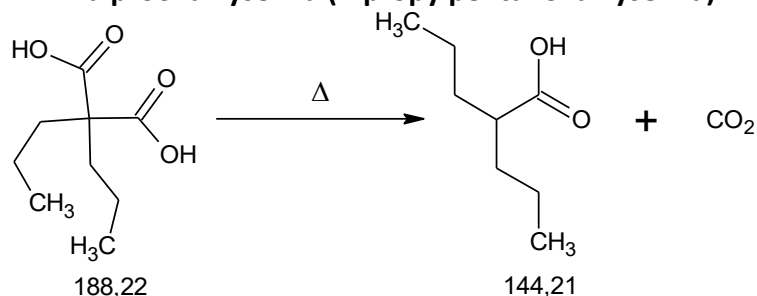


Chemikálie

5,5-dipropylbarbiturová kys.[212,25]	0,118 mol	25 g
NaOH [40]	48 g (1,2 mol) ve 100 ml vody	
HCl [36] koncentrovaná 35%	asi 125 ml	

Hydroxid rozpustit ve vodě, přidat 5,5-dipropylbarbiturovou kyselinu, za míchání zahřívát k varu pod zpět. chladičem 4 hod. Reakční směs po vychladnutí zneutralizovat konc. HCl a upravit pH na 1. Nechat vychladit v lednici. Pokud se nevyloučí pevná fáze, vytřepat 4 x 50 ml diethyletheru, výtřepky spojit, vysušit síranem sodným. (Nebo pevnou fází odsát a vysušit). Diethylether odpařit na vakuové odparce. Pevný zbytek překrystalovat z horké vody, vysušit. T.t. 158-161°C.

4.2. Valproová kyselina (2-propylpentanová kyselina)

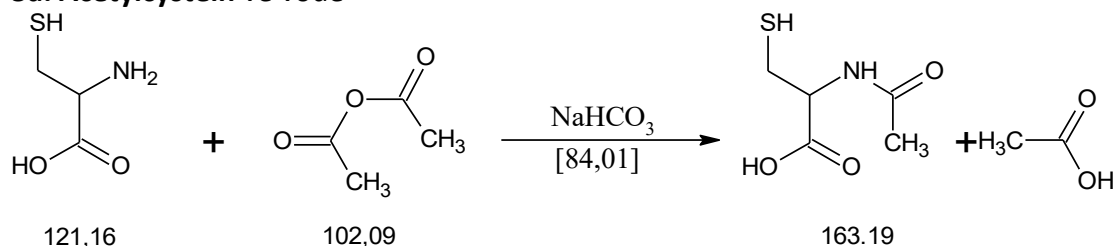


Chemikálie

2,2-dipropylmalonová kys.	2,7 mmol	0,5 g
---------------------------	----------	-------

0,5 g 2,2-dipropylmalonové kyseliny umístíme do 25 ml kapkovité baňky NZ14. Opatříme vhodným vejčitým míchadlem a připevníme kovovou svorkou ke vzdušnému chladiči (trubce) zakončenému hadičkou ze silikonové pryže se zúženou trubičkou na konci. Baňku ponoříme téměř celou do olejové lázně ve 250 ml hrnku, uchytíme ji za vzdušný chladič a na míchačce za míchání zahříváme na 200°C v lázni. Trubičku na konci chladiče čas od času zasuneme do zředěného vodného roztoku CaCl₂ ve zkumavce. Bubliny indikují únik plynu, vznik bílé sraženiny CaCO₃ prokazuje, že jde o CO₂. Jakmile únik CO₂ skončí, aparaturu necháme vychladnout. Produkt můžeme přecistit destilací za sníženého tlaku metodou ball-to-ball na zařízení Büchi B-580 (t.v. 120°C / 16 torr). Odebereme cca 20 mg k předepsané strukturální charakterizaci (¹H-NMR spektrum), zbytek přemístíme do zásobní lahve.

5a. Acetylcystein ve vodě

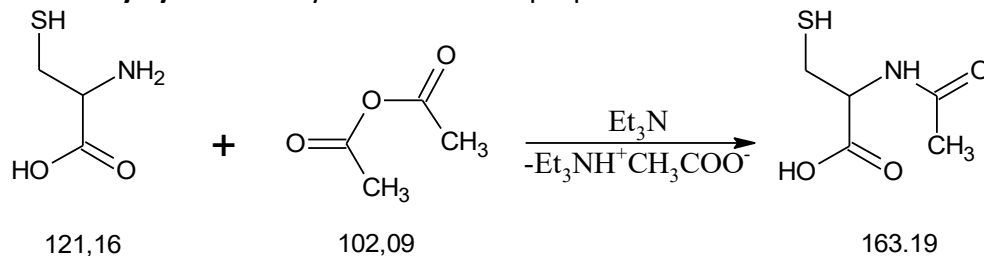


Chemikálie

Cystein	0,01 mol	1,2g	
Acetanhydrid	0,011 mol	1,12 g	1,04 ml
NaHCO ₃	0,012 mol	1,0 g	

Hydrogenuhličitan sodný rozpustit v 9 ml vody v 10 ml kádince (apolce). Přidat cystein, mícháním na mag. míchačce za lab. teploty nechat rozpustit. Přilít z pipety acetanhydrid, nechat intenzivně míchat za lab. teploty na mag. míchačce tak dlouho, až horní kapalná vrstva zmizí. *Pokud by reakce trvala déle než 60 min, míchat v lázni zahřáté na 40°C. Pokud se sraženina nevytvoří, okyselit opatrně několika kapkami kys. chlorovodíkové na pH<4 a nechat důkladně promíchat.* Současně se vytvoří sraženina (krystaly) acetylcysteinu. Směs krátce ochladit v lednici, krystaly odsát na malé Büchnerově nálevce (fritě). Na Petriho misce vysušit (max. 60°C) a změřit teplotu tání (106 - 108°C). *Případně překrystalovat z horké vody, vysušit a znovu změřit teplotu tání.* Ověření totožnosti a čistoty: TLC proti cysteinu (Silica gel Merck F₂₅₄, mobilní fáze ethylacetát : kys. octová 9:1, detekce UV 254 nm), event. IR spektrum (ATR nástavec).

5b. Acetylcystein v ethylacetátu - mikropreparace

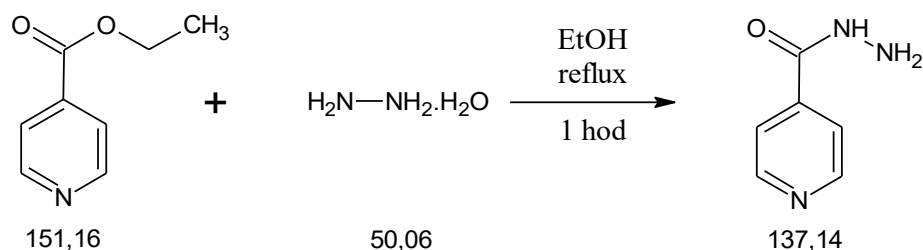


Chemikálie

Cystein	3 mmol	363mg	
Acetanhydrid	6 mmol	0,6 ml	
Triethylamin		0,85 ml	
Ethylacetát		6 ml	

Směs 3 mmol (363 mg) cysteinu, 6 mmol (0,6 ml) acetanhydridu a 6 mmol (0,85 ml) triethylaminu v 6 ml ethylacetátu je za laboratorní teploty ve vhodné baňce NZ14 (apolka, kapka, kulatá baňka), uzavřená zátkou zajištěnou svorkou, vystavena ultrazvuku po dobu 45 min (nebo, dokud se pevná fáze kompletně nerozpustí). Směs je na odparce odpařena do sucha, zbytek je rozsuspendován v ledové vodě a odsát. Překrystaluje se z horké vody, změřit teplota tání a provede TLC.

6a. Isoniazid – klasická syntéza

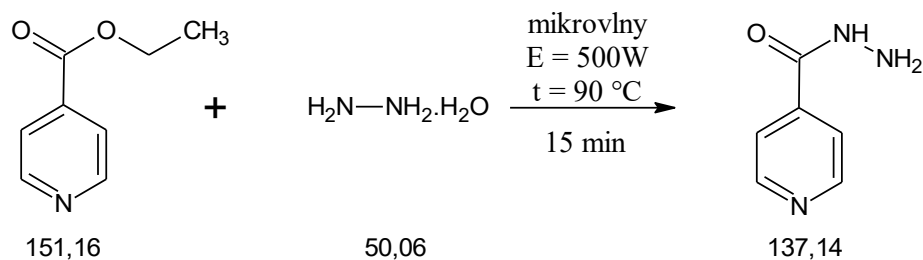


Chemikálie

Ethyl isonikotinát	0,015 mol	2,2 ml
Hydrazin monohydrát	0,028 mol	1,4 ml
Ethanol		10 ml

Do 20 ml kulaté baňky odpipetujeme 0,015 mol (2,2 ml) ethyl isonikotinátu, 0,028 mol (1,4 ml) hydrazínu monohydrátu a 10 ml ethanolu. Směs v bance opatřené magnetickým míchadlem umístíme do olejové lázně a sestavíme aparaturu opatřenou zpětným chladičem. Teplotu v lázni nastavíme na 85°C a zahříváme 1 hodinu. Po ochlazení reakční směsi na laboratorní teplotu směs zahustíme na rotační vakuové odparce. Odparek rozsuspendujeme v 10 ml diethyletheru a pevnou fází odsajeme. Změříme teplotu tání (170-173°C).

6b. Isoniazid - mikrovlnný reaktor



Chemikálie

Ethyl isonikotinát	0,015 mol	2,2 ml
Hydrazín monohydrát	0,028 mol	1,4 ml

Do 10 ml kulaté baňky odpipetujeme 0,015 mol (2,2 ml) ethyl isonikotinátu a 0,028 mol (1,4 ml) hydrazin monohydrátu. Vložíme do mikrovlnného reaktoru a sestavíme aparaturu se zpětným chladičem. Nastavíme parametry mikrovlnného reaktoru na E = 500 W, čas reakce na 15 min a teplotu, při které bude reakce probíhat na 90°C. Po ochlazení reakční směsi na laboratorní teplotu směs zahustíme na rotační vakuové odparce. Odparek rozsuspendujeme v 10 ml diethyletheru a pevnou fází odsajeme. Změříme teplotu tání (170-173°C)