

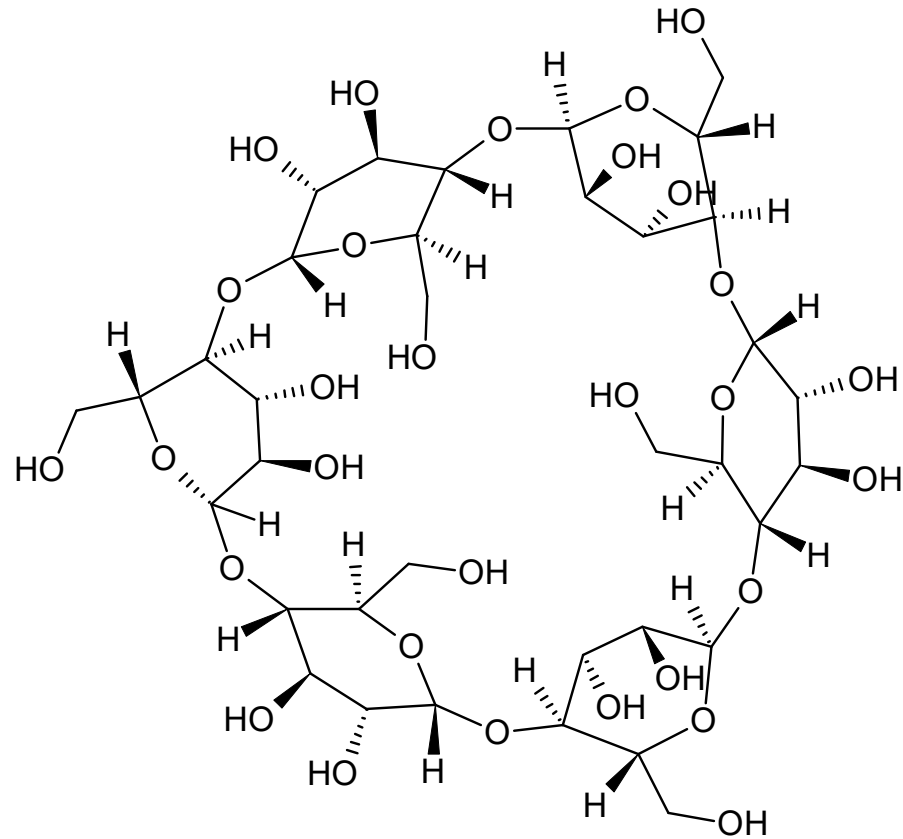
Fyzikálně-chemické parametry ovlivňující účinek léčiv

Rozpustnosti, lipofilita, hydrofobicita

Rozpustnost ve vodě

- nutná pro uvolnění LČ z pevné lékové formy do obsahu GIT, transport LČ tělními tekutinami
- pro *p.o.* podání stačí malá – v GIT se vytváří nasycený roztok, látka se kontinuálně vstřebává přes mukózní vrstvu a rozpuštění pokračuje, dokud se LČ nevstřebá (2 dynamické rovnováhy: LF – tekutina GIT; tekutina GIT – mukóza (→ krevní plazma))
- podobně *i.m.* a *s.c.* podání (postupné uvolňování z “depa” ve svalu či pod kůží)
- pro *i.v.* podání však nutná dostatečná rozpustnost (proto tvorba solí, hydrofilních proléčiv, inkorporace do dutiny α -cyklodextrinu (alfadexu) apod.)
- vyjadřuje se např. v g/100 ml vody, g/l vody, mmol/l vody apod. (nezaměňovat s koncentrací – jedná se zpravidla o množství vztažené na objem čistého rozpouštědla, nutno však zdroj studovat pozorně); relativní přesně definované vyjadřování rozpustnosti viz ČL

Alfadex



alfadex

α -cyklodextrin, cyklohexaamylosa, cyklo- α -(1 \rightarrow 4)-D-hexaglukopyranosid

Rozpustnost v lipidech

- nutná pro průnik LČ bariérami organismu (membránami)
- hydrofobní interakce se rovněž uplatňují při vazbě LČ na receptor nebo aktivní místo enzymu
- absolutní rozpustnost v lipidech či lipofilním rozpouštědle se stanovuje zřídka; její znalost může mít význam např. technologický (kupř. salicylová kys. je nerozpustná ve vazelíně, pro její solubilizaci lze použít ricinový olej)
- častěji se vyjadřuje (hydro)lipofilita, hydrofobicita

Lipofilita, hydrofobicita látky

- pojmy téměř synonymní
- vyjadřují “afinitu” látky k vodné či lipidové fázi na jejich rozhraní
- kvantifikace lipofility – nejběžněji rozdělovací koeficient P , nejčastěji jako $\log P$, aby mezi hodnotami pro jednotlivé látky nebyl rozdíl několika řádů

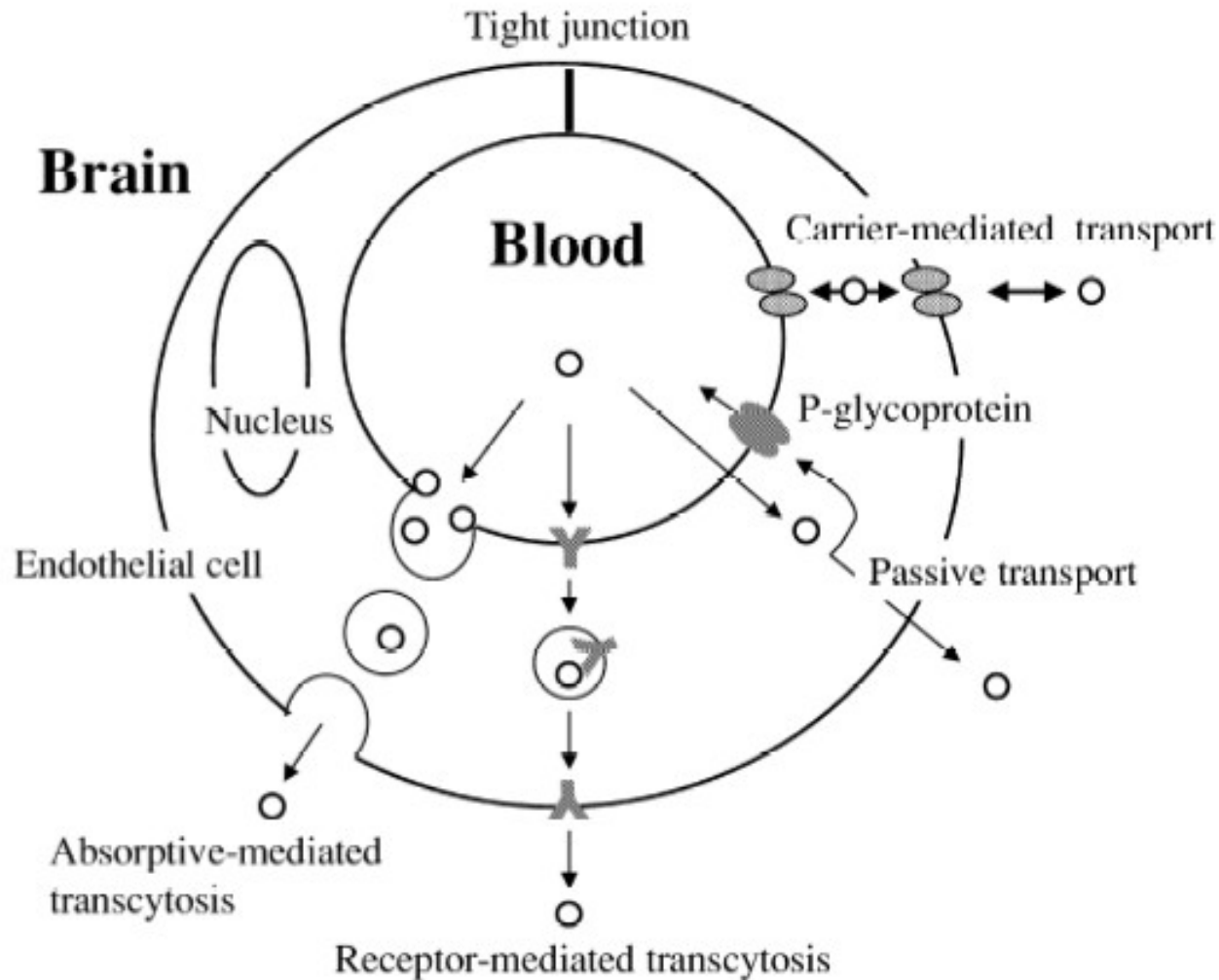
$$P = \frac{C_L}{C_V}$$

C_L , C_V – **rovnovážné** koncentrace v lipidové a vodné fázi; lipidy zpravidla nahrazeny vhodným org. rozpouštědlem

- používané soustavy: oktanol/voda (oktanol “mimikuje” vlastnosti biomembrán), ve farmacii, resp. farm. chemii nejčastější, tisíce hodnot publikovány; chloroform/voda, cyklohexan/voda ...; pro kyseliny a báze zpravidla nastaveno pH vodné fáze (silná kyselina, zásada, pufr)
- způsob stanovení: vytřepávání v dělicí nálevce (nebo jiné vhodné nádobě), v ideálním případě až do rovnováhy (nutno stanovit), zpravidla ale jen po omezenou, předem definovanou dobu; pak $\log P'$ (zdánlivý rozdělovací koeficient); poměry objemů fází nutno volit dle předpokládaného $\log P$ tak, aby koncentrace v jedné z fází byla zvolenou analytickou metodou stanovitelná
- u disociovatelných látek (kyseliny, báze) je nejlipofilnější nedisociovaná forma – viz dále

Příklady vlivu lipofility na průnik bariérami organismu

- hematoencefalická bariéra: pro látky pronikající pasivní difuzí optimum $\log P_{o/v}$ 1,5 až 2,7 s maximem 2,1



Hematoencefalická bariéra (řez mozkovou kapilárou)

Bukální, střevní a kožní bariéra

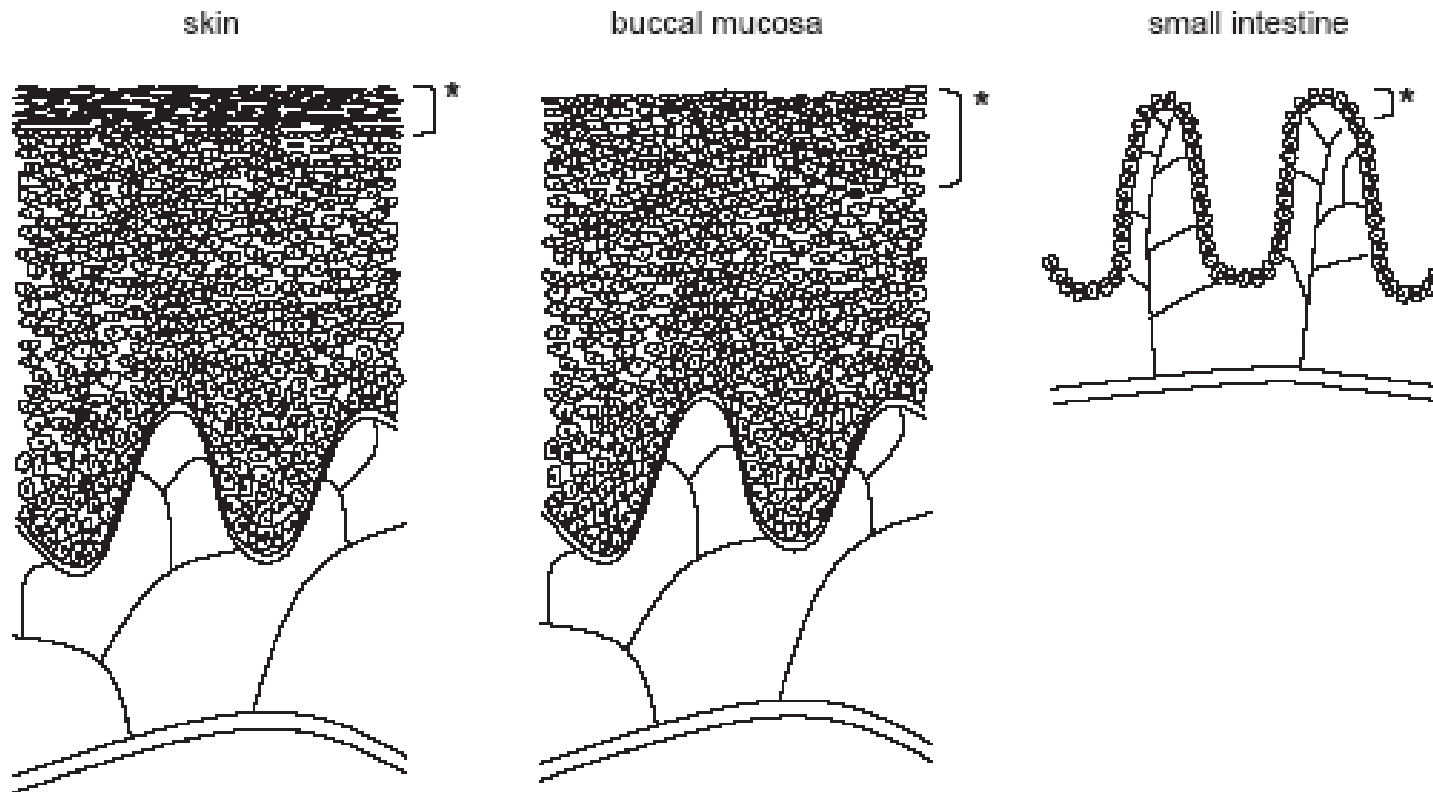
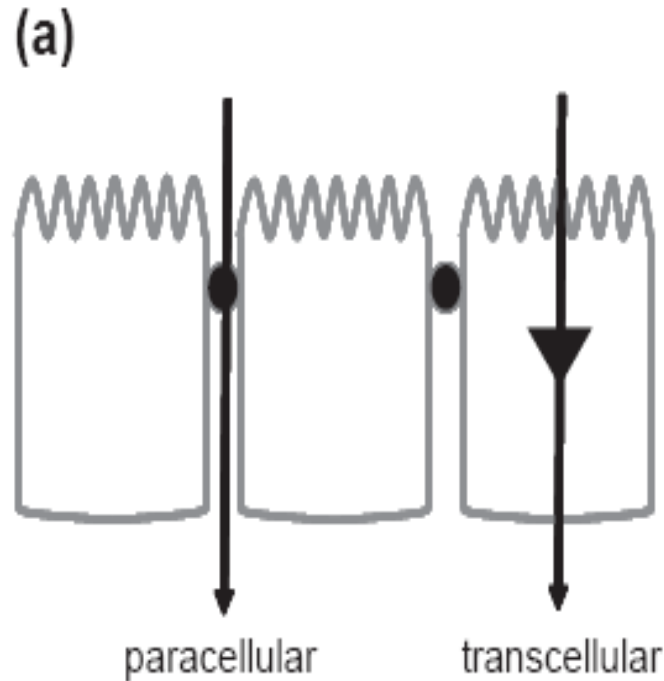


Fig. 1. A structural comparison of the skin, buccal mucosa, and small intestine. The skin and buccal mucosa are covered by a stratified squamous epithelium, whereas the surface of the small intestine consists of a simple columnar epithelium. The region associated with the barrier properties of each tissue is highlighted by the asterisk. This diagram is not drawn to scale.

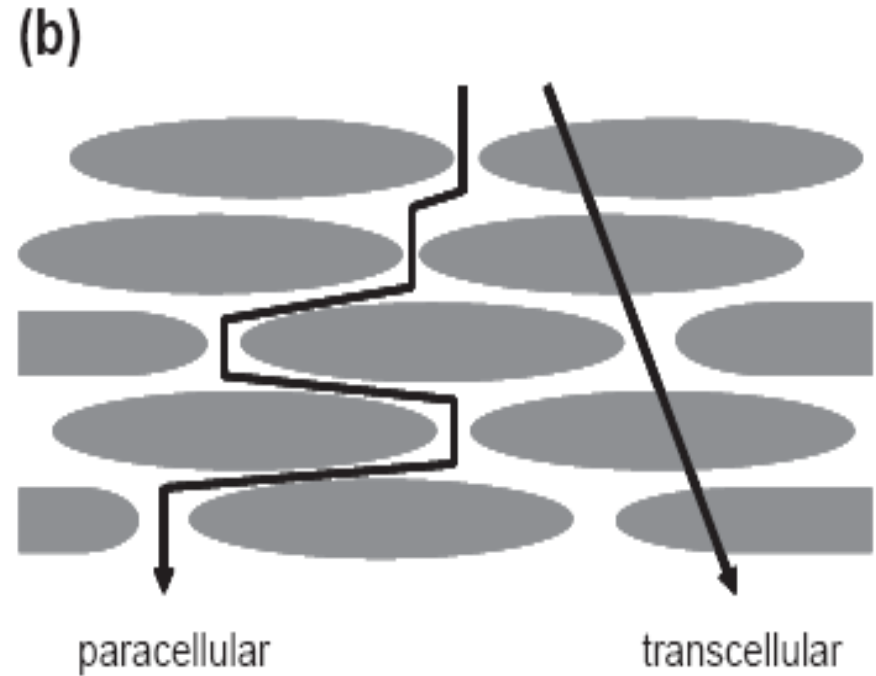
Srovnání stavby kůže, sliznice dutiny ústní a tenkého střeva

- kůže a mukóza ústní dutiny jsou kryty vrstevnatým dlaždicovým epitelem, povrch tenkého střeva jen jednoduchým cylindrickým epitelem
- mukóza ústní dutiny je na některých místech keratinizována, kůže všude (*stratum corneum*); průnik přes keratinizovanou vrstvu vyžaduje zvýšenou lipofilitu

Transportní cesty léčiv přes mukózní sliznici ve srovnání se sliznicí tenkého střeva



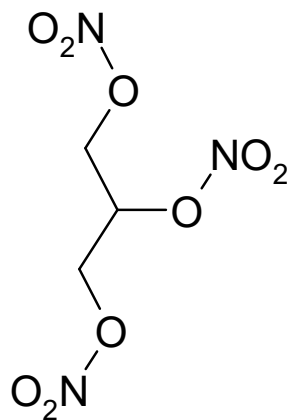
střevo



mukóza

- paracelulární cestou pronikají sloučeniny rel. hydrofilní, trancelulární hydrofobní; u mukózy nutná větší lipofilita

Léčiva spontánně pronikající kožní bariérou do krevního oběhu

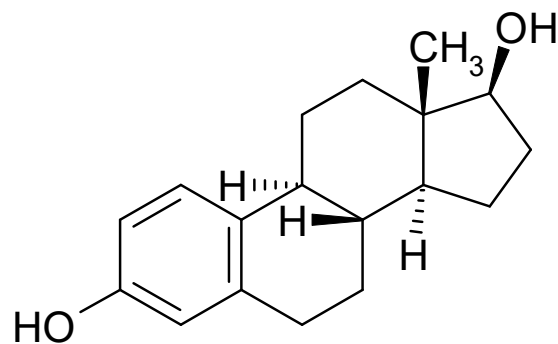


glycerol-trinitrát

log P = 1,62

- též bukálně

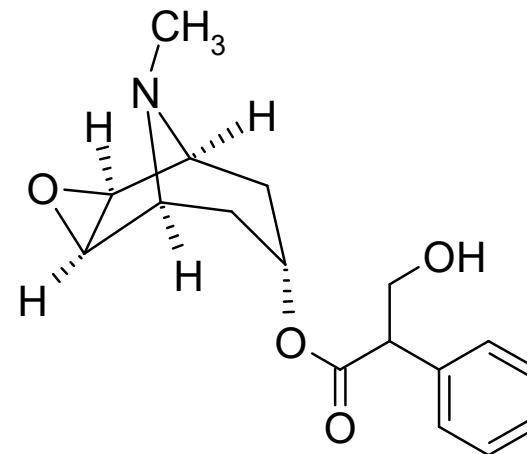
Nitroglycerin-Slovakofarma orm tbl buc



estradiol

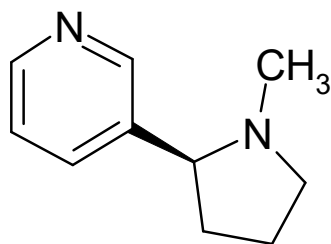
log P = 4,01

Climara drm emp tdr



skopolamin

log P = 0,98

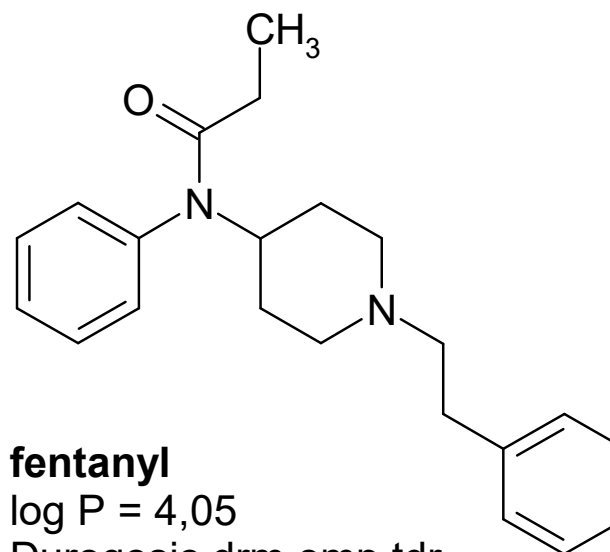


nikotin

log P = 1,17

Nicopatch drm emp tdr

- též bukálně



fentanyl

log P = 4,05

Durogesic drm emp tdr

- též bukálně

Effentora orm tbl buc

Acidobazické vlastnosti

- velká část LČ slabé kyseliny nebo baze
- síla kyseliny nebo baze kvantifikována disociační konstantou K_a , K_b , často jako $pK = -\log K$

Pro kyseliny



$$K_a = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]}$$

$$pK_a = -\log K_a = -\log[H^+] - \log \frac{[A^-]}{[HA]}$$

$$pK_a = pH - \log \frac{[A^-]}{[HA]} \quad \text{Hendersonova-Hasselbachova rovnice}$$

$$\log \frac{[A^-]}{[HA]} = pH - pK_a$$

$$\frac{[A^-]}{[HA]} = 10^{(pH - pK_a)} \quad \text{pak platí pro poměr disociované a nedisociované formy}$$

Dosazení pro ibuprofen v krevní plazmě

$$pK_a = 4,91 \quad pH = 7,4$$

$$\frac{[A^-]}{[HA]} = 10^{(7,4-4,91)} = 10^{2,49} = 309,03 \Rightarrow 309,03 : 1 \Rightarrow \frac{309,03}{310,03} = 0,9968 = 99,68\%$$

Pro báze



$$K_b = \frac{[BH^+]}{[B][H^+]}$$

$$pK_b = -\log \frac{[BH^+]}{[B]} - \log \frac{1}{[H^+]} = -\log \frac{[BH^+]}{[B]} - (0 - \log[H^+])$$

$$pK_b = -\log \frac{[BH^+]}{[B]} - pH$$

Hendersonova-Hasselbachova rovnice

- častěji se u bází uvádějí pK_a konjugované kyseliny, pro něž platí

$$pK_a + pK_b = 14$$

- potom čím vyšší pK_a , tím je báze silnější
- pro podíl disociované a nedisociované formy báze pak platí

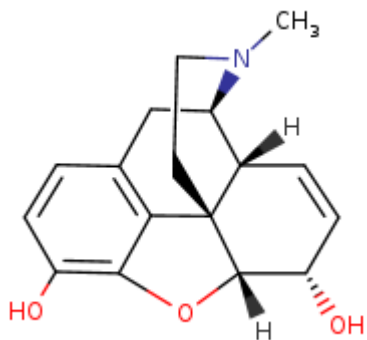
$$\frac{[BH^+]}{[B]} = 10^{(pK_a - pH)}$$

Příklad – výpočet podílu disociované formy morfinu v žaludku

pH = 1

$pK_a = 7,87$

$$\frac{[BH^+]}{[B]} = 10^{(7,87-1)} = 7413102,413 \Rightarrow 7413102,413:1 \Rightarrow \frac{7413102,413}{7413103,413} = 0,999999865 = 99,9999865 \%$$

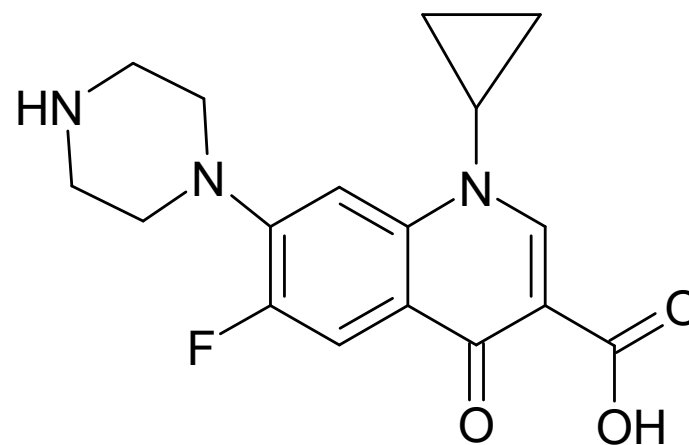


Vztah disociace a lipofility

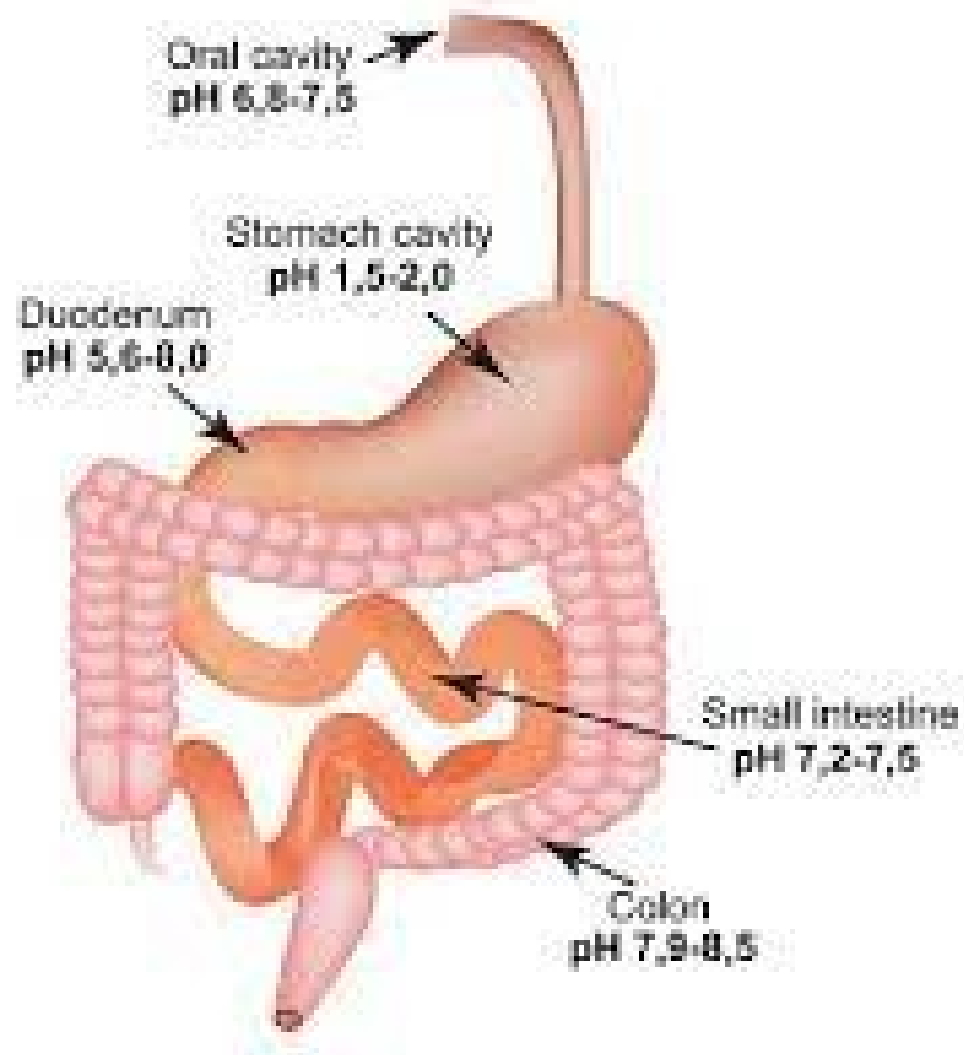
- nejlipofilnější forma je nedisociovaná
- látky procházejí bariérami včetně sliznice GIT nejlépe v nejlipofilnější formě
- \Rightarrow z kyselého prostředí žaludku se lépe vstřebávají kyseliny, z bazického prostředí tenkého střeva base
- distribuční koeficient D, častěji log D** je log P při daném pH, charakterizuje tedy látku z hlediska lipofility a acidobazických vlastností zároveň

Příklad – ciprofloxacin

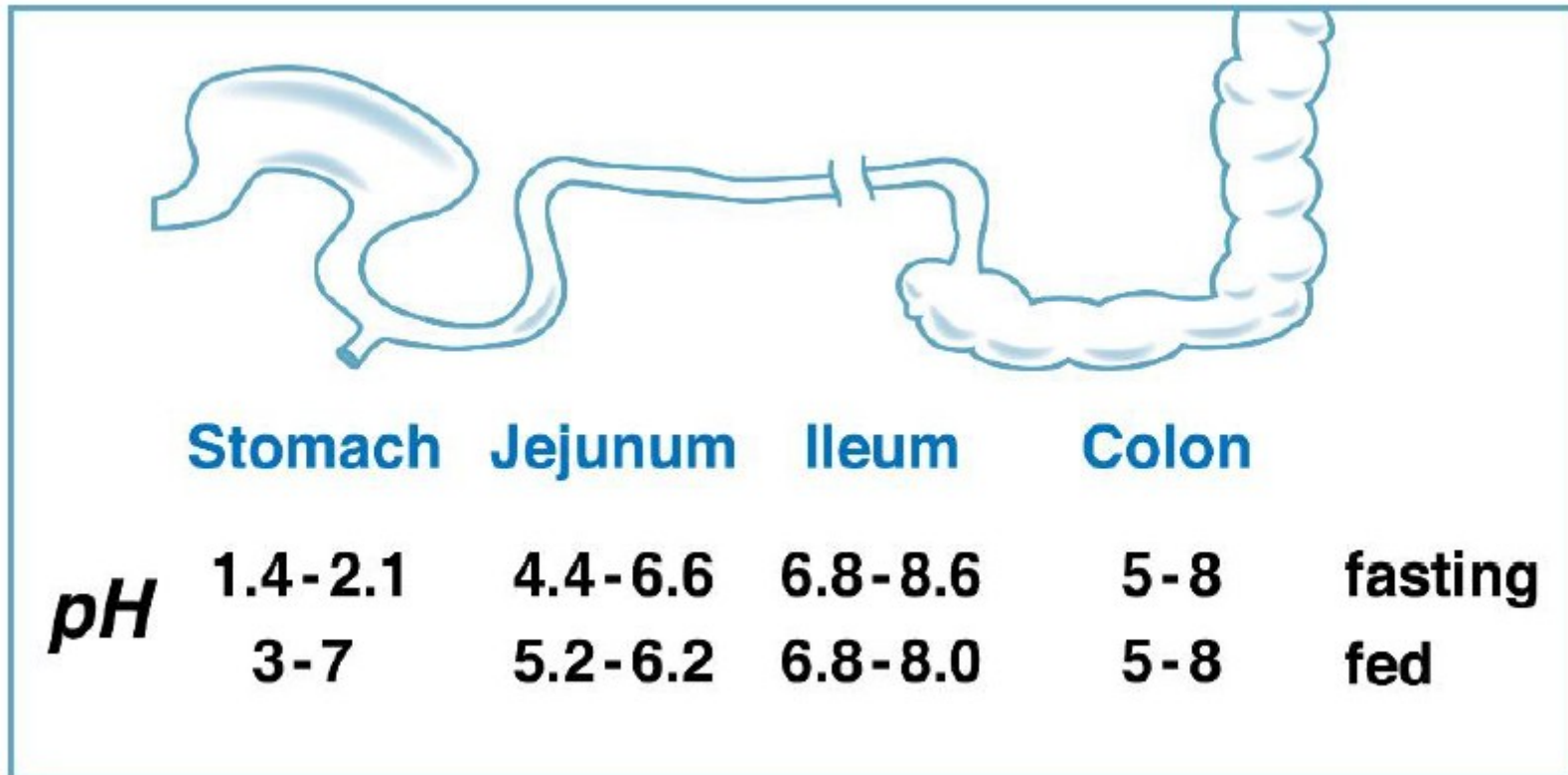
logD	-1.80	pH 1	(28)
		Temp: 25 °C	
logD	-1.79	pH 2	(28)
		Temp: 25 °C	
logD	-1.78	pH 3	(28)
		Temp: 25 °C	
logD	-1.75	pH 4	(28)
		Temp: 25 °C	
logD	-1.54	pH 5	(28)
		Temp: 25 °C	
logD	-1.07	pH 6	(28)
		Temp: 25 °C	
logD	-0.85	pH 7	(28)
		Temp: 25 °C	
logD	-0.95	pH 8	(28)
		Temp: 25 °C	
logD	-1.47	pH 9	(28)
		Temp: 25 °C	
logD	-2.14	pH 10	(28)



pH of the gastrointestinal tract



pH v jednotlivých částech GITu na lačno a po jídle



QSAR = QUANTITATIVE STRUCTURE – ACTIVITY
RELATIONSHIPS

KVANTITATIVNÍ VZTAHY MEZI (CHEMICKOU) STRUKTUROU A
(BIOLOGICKOU) AKTIVITOU

Hledáme vztah, v němž je biologická aktivita funkcí struktury, resp. parametrů, které se strukturou souvisejí

$$A = f(\text{struktura})$$

2 základní přístupy QSAR

- **regresní analýza** – hledá matematický popis funkce, většinou s použitím lineární apod. regrese
- **empirické metody** – hledají pouze extrémy (maxima a minima) dané funkce

Regresní analýza

hledá rovnici ve tvaru $A = a_0 + a_1x_1 + a_2x_2 + \dots + a_nx_n$,

kde A je biologická aktivita, x jsou parametry vyplývající ze struktury sloučeniny, a_n jsou regresní koeficienty (a_0 ...absolutní člen), získané výpočtem. V případě tzv. **Hanschovy metody** jsou x fyzikálně-chemické parametry vyplývající ze struktury, v případě tzv. **Free-Wilsonova** přístupu parametry x vyjadřují přítomnost nebo nepřítomnost určitého substituentu nebo strukturního fragmentu v molekule.

Hanschova metoda regresní analýzy

$$A = a_0 + a_1 x_1 + a_2 x_2 + \dots + a_n x_n$$

A ... kvantifikovaná **biologická aktivita**, často v převrácené hodnotě a/nebo logaritmovaná k zajištění linearity vztahu

Příklady:

1/MIC ... převrácená hodnota minimální inhibiční koncentrace u antimikrobních látek

log ED₅₀ ... logaritmus dávky, která navodí požadovaný efekt u 50 % testovaných subjektů

log LD₅₀ ... parametr akutní toxicity; logaritmus dávky, která usmrtí 50 % zvířat, na nichž testování probíhá

IC₅₀ ... koncentrace studované látky(efektoru), která sníží aktivitu enzymu na 50 % původní hodnoty

Ki... konstanta charakterizující afinitu látky k aktivnímu místu enzymu nebo k receptoru

log BB ... vyjadřuje schopnost látky pronikat HEB

... atd.

a₀ ... a_n ... **regresní koeficienty** tj. koeficienty získané výpočtem za použití např. lineární regrese

“Klasické” strukturní parametry $x_1 \dots x_n$

- hydrofobní
- elektronové
- sterické

a) **Hydrofobní parametry** - v rovnici často v kvadratickém tvaru – vyjadřují poměr rozpustnosti látky ve vodě a v lipidech; mají pro účinek často zásadní význam, zejména pro průnik bariérovými systémy organismu; např. **log P(oktanol/voda)**, **log P(cyklohexan/voda)** aj., parametr R_m z rozdělovací TLC na tzv. reverzní fázi (stacionární fáze lipofilní, mobilní fáze hydrofilní):

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

dále logaritmus tzv. **kapacitního faktoru log k'** z rozdělovací chromatografie plynové (GC) nebo vysokoúčinné kapalinové (HPLC)

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

kde t_r je retenční čas dané látky a t_0 je tzv. mrtvý retenční čas, tj. retenční čas látky, která se na koloně nezadržuje (např. u HPLC na reverzní fázi s oktadecylovaným silikagelem se pro stanovení t_0 používá dusitan sodný nebo aceton).

(Hanschův) **lipofilní parametr** π – pro řady (série) látek, obsahující na stejném strukturním fragmentu (nejčastěji benzenovém jádře) různé substituenty

$$\pi = \log \frac{P_X}{P_H} = \log P_X - \log P_H$$

kde P_x je rozdělovací koeficient substituované látky a P_H rozděl. koeficient látky nesubstituované.

Vypočtené hydrofobní parametry

Kromě experimentálně stanovených hydrofobních parametrů se dnes stále častěji používají odhady těchto parametrů získaných výpočtem podle různých algoritmů, z nichž nejjednodušší jsou patrně výpočetní postupy pro odhad $\log P$ (oktanol/voda) součtem $\log P$ inkrementů podle **Rekera** a **Nysse**

$$\log P = \sum_i^i a_i f_i,$$

kde f_i je $\log P$ příslušného fragmentu a a_i je počet, kolikrát se tento fragment vyskytuje, nebo podle

Hansche (a Lea) vzorcem

$$\log P = \sum_i^i a_i f_i + \sum_j^j b_j f_j,$$

kde f_i je fragmentová konstanta, f_j je korekční faktor a a_i a b_j je odpovídající počet výskytů daného

parametru. Častěji se dnes ale používají složitější postupy vyžadující počítače a vhodný software, který často umožňuje i optimalizaci struktury metodami molekulové mechaniky a výpočty dalších parametrů pro výpočty QSAR (pro PC např. Molgen, HyperChem). Shoda vypočteného odhadu $\log P$, označovaného u Hanschova algoritmu **Clog P**, s experimentálně stanovenou hodnotou, bývá pro různé výpočetní postupy velmi odlišná, často však pro výpočty postačí, existuje-li lineární závislost mezi nimi.

Příklad QSAR závislosti pouze s hydrofobním parametrem
 Účinnost fenolů jako induktorů apoptozy nádorových buněk
Hansch, C. et al.: Bioorg. Med. Chem. 11, 617 (2003)

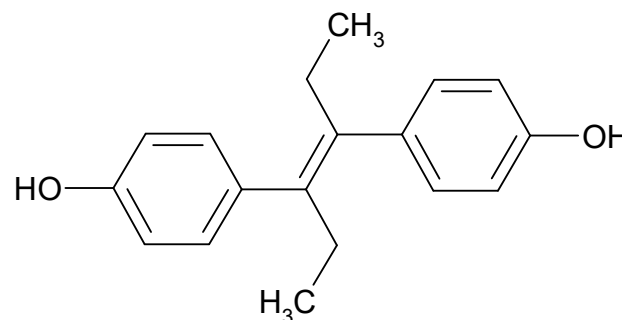
Table 1. Data for QSAR 3

Compd	Log 1/C	Pred log 1/C	Dev	Clog P
1 Estradiol	2.79	2.88	-0.09	3.78
2 4-MeO-phenol	1.27	1.41	-0.14	1.57
3 4-C ₆ H ₅ O-phenol	2.67	2.74	-0.07	3.57
4 4-CH ₂ COO-phenol ^a	3.01	1.33	1.68	1.46
5 Bisphenol A	2.84	2.81	0.03	3.67
6 4-(Me) ₃ C-phenol	2.65	2.56	0.09	3.30
7 4-CN-phenol	1.44	1.43	0.01	1.60
8 Diethylstilbestrol ^a	2.89	3.66	-0.77	4.96
9 4-I-phenol	2.08	2.29	-0.21	2.90
10 Phenol ^a	3.10	1.35	1.75	1.48
11 4-MeS-phenol ^a	2.60	1.72	0.88	2.03
12 4-C ₂ H ₅ O-phenol	2.51	2.12	0.39	2.63

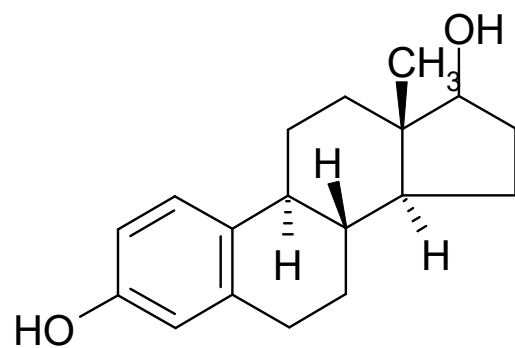
^aData points not used in deriving QSAR 3.

$$\log 1/C = 0,67(\pm 0,21)\text{ClogP} + 0.37(\pm 0.63)$$

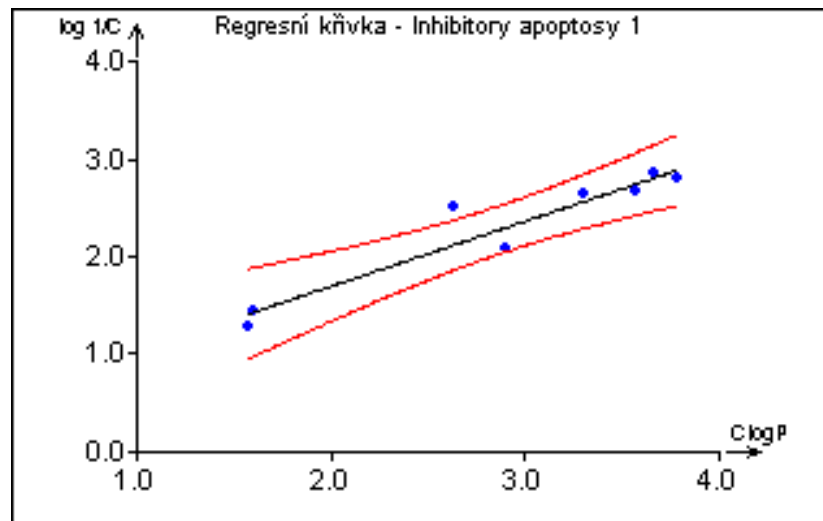
$$n = 8, r^2 = 0,910, s = 0,201, q^2 = 0,863$$



diethylstilbestrol (8)



estradiol (1)



b) Elektronové parametry

-souvisejí s elektronovým obalem molekuly

- **Hammetovy konstanty σ** - pro *m*- a *p*-substituované deriváty benzenu; vyjadřují elektrondonorové (+M, +I) nebo elektronakceptorové (-M, -I) vlastnosti substituentu; odvozené konstanty: σ_m , σ_p , σ^* , podobné Swain-Luptonovy konstanty \mathcal{F} , \mathcal{R}
- parametry ze **spekter** a jiných fyzikálních měření – chem. posuny δ z NMR, vlnová délka maxima absorbance λ_{\max} z UV-VIS spekter, vlnočeta ν výrazného absorpčního pásu v IČ spektrech, půlvlnný potenciál $E_{1/2}$ z polarografie, pK, pI (= izoelektrický bod)
- vypočtené elektronové parametry: polarita, polarizovatelnost, parciální náboj na určitém atomu

c) Sterické parametry

- vyjadřují “celkovou objemnost” molekuly nebo častěji substituentu na společném skeletu

• **van der Waalovy poloměry v_F**

Taftova sterická konstanta E_s odvozená pomocí rychlostních konstant hydrolýzy esterů alkanových kyselin

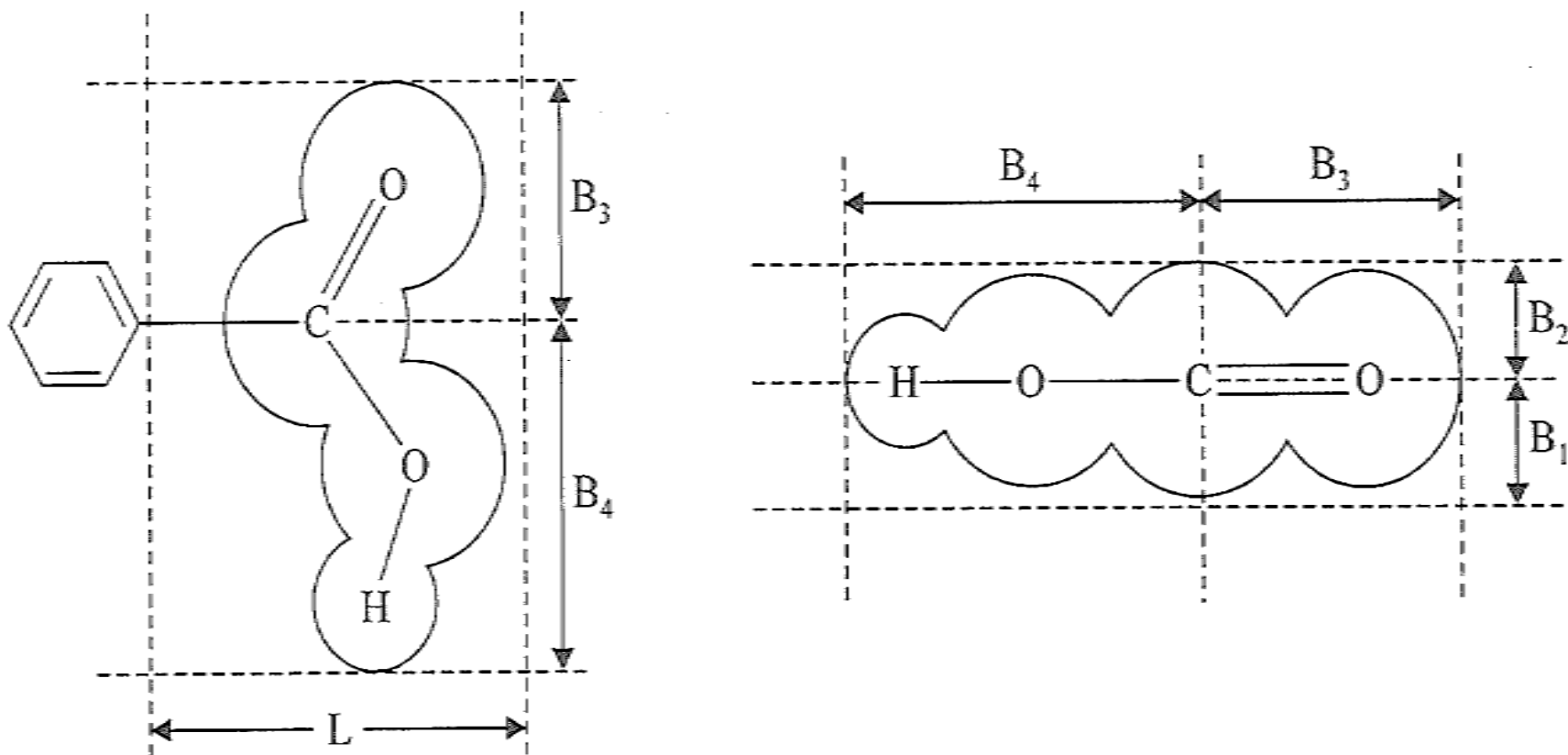
$$E_s = \log \frac{k_x}{k_h},$$

kde k_x je rychlostní konstanta hydrolýzy esteru příslušné alkanové kyseliny RCOOR' a k_h obdobná konstanta pro ester kyseliny octové CH₃COOR'- standard. E_s není čistě sterickým parametrem, zahrnuje částečně i elektronové vlivy (+I).

$E_s(\text{CH}_3) = 0$, objemnější substituenty $E_s < 0$, méně objemné $E_s > 0$

- Verloopovy sterické parametry
 - pro jednotlivé substituenty
 - odvozené (změřené) z počítačově optimalizovaných modelů molekul (Sterimol)
 - L je délka substituentu, $B_1 - B_4$ “poloměry zakřivení” substituentu (“podélné” a “horizontální”)

(Karboxylová skupina v molekule benzoové kys.)



Další parametry užívané v QSAR

>většinou vypočtené

>zahrnují často 2 i 3 typy vlivů (hydrof.+elektron.+ster.)

“Klasické”

•parachor

$$P_r = \frac{M}{d} \gamma^{(1/4)}$$

, kde γ je povrchové napětí, M molární hmotnost a d hustota.

•**molární refrakce** (= molekulární refraktivita) **MR** (též CMR); def. vztah označován Lorentzova-Lorenzova rovnice

$$MR = n^2 - \frac{1}{n^2} + \frac{2M}{d} = \frac{(n^2 - 1) M}{(n^2 + 2) d},$$

kde n je index lomu.

“Neklasické”

•**solvatační energie** – je-li pro vodu, pak **hydratační energie** ΔG_o^w

•**povrchy molekuly** různého typu – polární van der Waalsův, nepolární, přístupný vodě, dynamický polární (DPSA), topologický polární (TPSA) aj.

•**objemy molekuly** – polární, přístupný vodě aj.

Free- Wilsonova metoda regresní analýzy

- hledá závislost biologické aktivity na přítomnosti nebo nepřítomnosti určitých substituentů nebo strukturních fragmentů v molekule. Jde o vlastně o **statistickou separaci aktivity** na příspěvky určitých částí molekul, tj. předpokládá se aditivita vlivu substituentů nebo jiných částí molekuly. Metoda vede k řešení soustav rovnic o větším počtu neznámých, které se v jednoduchých případech dají řešit maticovým počtem, jinak pomocí statistických programů umožňujících multilineární regresi (MLR).
- obě metody lze též kombinovat. Část nezávislých proměnných pak vyjadřuje fyzikálně-chemické vlastnosti látek, další, nazývané „**indikátorové proměnné**“ (symbol I), udávají přítomnost nebo nepřítomnost určitých molekulových fragmentů. Indikátorových proměnných bývá obvykle malý počet, často pouze jediná.

Empirické metody QSAR

- používány s výhodou tam, kde nelze jednoduše zjistit matem. popis funkce $A = f(\text{struktura})$
- hledají pouze extrémy (maxima a/nebo minima) dané funkce; matem. popis přitom zůstává “černou skříňkou”
- při jejich aplikaci syntetik usměrňuje volbu látky k syntéze na základě biol. hodnocení látky předchozí

Optimalizace podle jednoho strukturního parametru – Fibonacciho optimalizace

Látky se seřadí podle rostoucí hodnoty strukturního parametru, u něhož se předpokládá, že aktivitu významně ovlivňuje. Počet látek musí odpovídat počtu bodů v některém z Fibonacciho intervalů (viz tab. 1), není-li tomu tak, některá z krajních látek, u nichž je malá pravděpodobnost, že by byly neúčinnější, se vypustí nebo se naopak přidá fiktivní krajní látka. K syntéze se vyberou látky, které mají v intervalu pořadí uvedené ve druhém sloupci tabulky. Provede se biologické hodnocení těchto látek a podle jeho výsledků se část intervalu od jednoho z krajních bodů směrem k méně aktivní sloučenině vyloučí. Výsledný soubor je dalším Fibonacciho intervalem. Výběr se opakuje tak dlouho, dokud se nedospěje k neúčinnější sloučenině. Metoda umožňuje podstatně snížit počet syntetizovaných a testovaných látek, např. namísto 589 látek, které by bylo nutno připravit a otestovat, abychom mezi nimi našli neúčinnější, stačí připravit a stanovit biol. aktivitu u pouhých 13 sloučenin (viz sloupec C tab. 1).

Tab. 1. Fibonacciho optimalizace

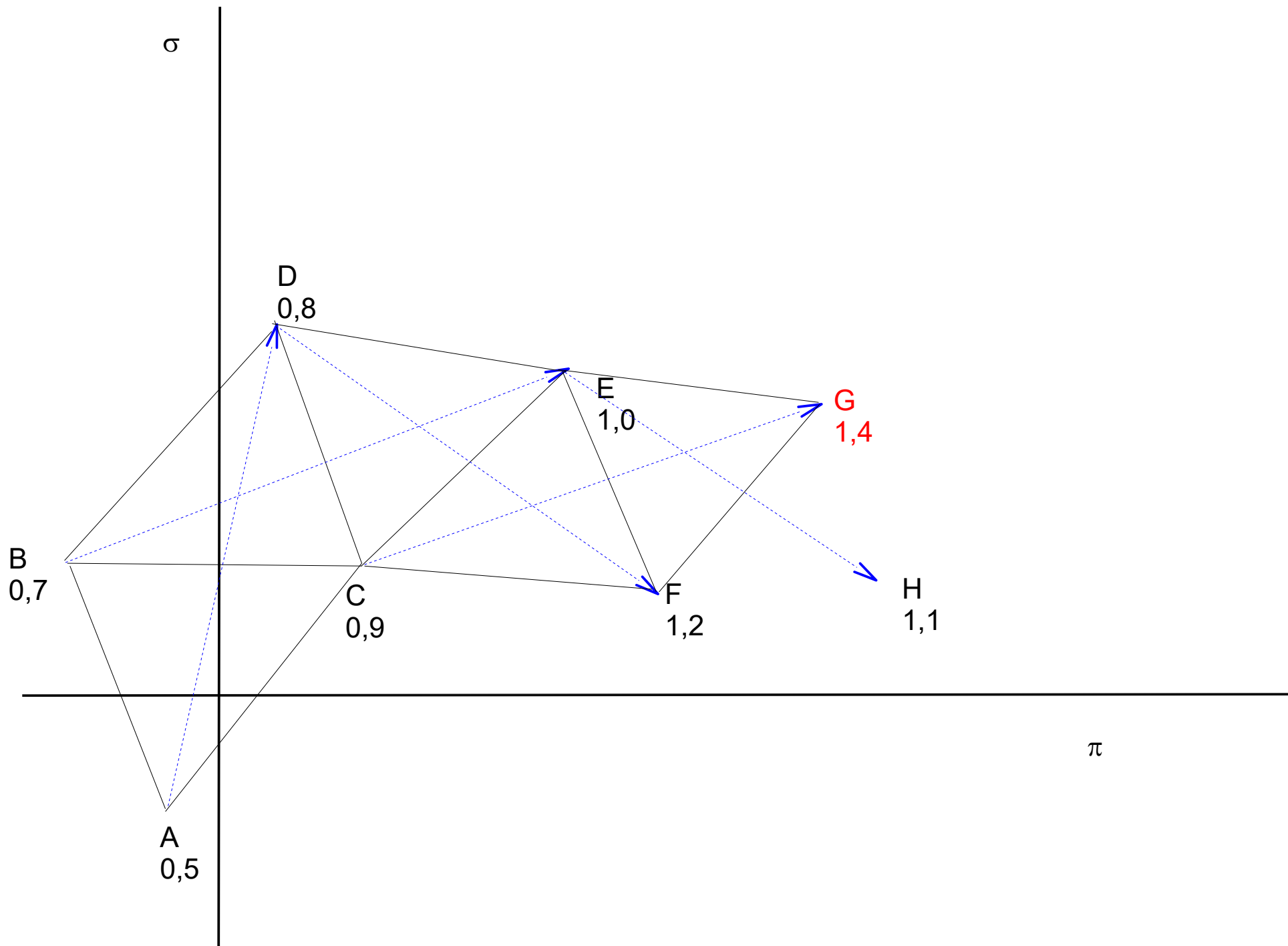
Legenda: **A ... počet látek příslušného Fibonacciho intervalu**
 B ... pořadí látek určených pro syntézu a testování v rámci intervalu
 C ... počet látek potřebný k dosažení optimalizace

A	B	C	A	B	C	A	B	C
2	1 a 2	2	20	8 a 13	6	143	55 a 89	10
4	2 a 3	3	33	13 a 21	7	222	89 a 144	11
7	3 a 5	4	54	21 a 34	8	366	144 a 233	12
12	5 a 8	5	88	34 a 55	9	589	233 a 377	13

Optimalizace podle více strukturních parametrů **Simplexová metoda**

Každou látku lze charakterizovat jako **bod v n-rozměrném prostoru**, ve kterém **biologická aktivita** je jednou souřadnicí a zbývajících $n - 1$ souřadnic představují **fyzikální a fyzikálně-chemické vlastnosti** sloučeniny, o nichž se předpokládá, že aktivitu ovlivňují. Pokud pracujeme v (klasickém) trojrozměrném prostoru, tj. optimalizujeme-li pouze dva parametry, můžeme optimalizaci provést i graficky na milimetrovém papíře. Pracujeme vlastně v průmětu do roviny vlastností. K (syntéze a) hodnocení se vyberou 3 látky, které v rovině souřadnic vlastností nejsou od sebe příliš vzdálené s jejichž souřadnice v této rovině tvoří trojúhelník, nejlépe rovnostranný. Porovnáme aktivity těchto 3 sloučenin a z bodu, patřícího látce o nejnižší aktivitě, vedeme polopřímku středem spojnice dvou bodů s vyššími aktivitami (alternativně bodem, který vznikne rozdělením této spojnice v převráceném poměru aktivit) a na ní nalezneme bod stejně vzdálený, ale opačně orientovaný, než bod s nejnižší aktivitou. Pokud tento bod neodpovídá žádné sloučenině, použijeme k hodnocení látku nejbližší. Z tohoto bodu a dvou předchozích vytvoříme další trojúhelník, který podrobíme stejnému optimalizačnímu pochodu. Postup opakujeme, dokud nacházíme látku o rostoucí aktivitě. Jakmile aktivita začne klesat, můžeme látku s dosaženou nejvyšší aktivitou považovat za optimální.

Simplexová metoda



Komentář ke schématu obměn substituentů na fenylu

Při optimalizaci podle uvedeného schématu postupujeme tak, že nejprve připravíme **nesubstituovanou sloučeninu** a její **4-chlorderivát**. Substituce chlorem sníží elektronovou hustotu v poloze 1 a zároveň zvýší lipofilitu (4-Cl: $\sigma = 0,23$; $\pi = 0,71$); je-li 4-chlorderivát aktivnější, lze lipofilitu a elektronakceptorové vlastnosti zvýšit další substitucí chlorem. Je-li 4-chlorderivát méně aktivní, můžeme předpokládat, že pokles elektronové hustoty ovlivnil aktivitu negativně, a připravíme **4-methoxyderivát**, který má lipofilitu prakticky stejnou jako nesubst. látka, el. hustota v pol. 1 je však vyšší (4-OCH₃: $\sigma = -0,27$, $\pi = 0,02$). Není-li zřetelný rozdíl mezi aktivitou nesubst. látky a 4-chlorderivátu; můžeme předpokládat, že vliv el. hustoty a lipofility působí proti sobě a zkusíme připravit **4-methylderivát** (4-CH₃: $\sigma = -0,17$, $\pi = 0,56$). Je-li u všech látek substituovaných v pol. 4 aktivita nižší než u nesubstituované látky, je zřejmé, že substituce v poloze 4 je stericky nevýhodná, a budeme připravovat látky substituované v polohách 2 a 3. V jednotlivých větvích tohoto schématu je možné postupovat dále, dokud nedojdeme ke sloučenině s maximální aktivitou.