



Středoškolská technika 2009

Setkání a prezentace prací
středoškolských studentů na ČVUT

**SYNTÉZA LÁTKY 44Bu,
POTENCIÁLNÍHO ANTAGONISTY BETA-ADRENERGNIÍCH
RECEPTORŮ**

Tereza Sokopová
Gymnázium, Brno-Řečkovice, T. Novákové 2, SEXTA B
621 00 Brno

Název oboru: Chemie

Konzultant:

Mgr. Petr Mokrý, Ph.D

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Brno 2009

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala Mgr. Petru Mokrému, Ph.D. a Mgr. Michalu Kuňákovi, Ph.D. za odborné vedení, vstřícný přístup a cenné připomínky, které mi během vypracování mé práce poskytovali.

Prohlašuji, že jsem svou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Petra Mokrého, Ph.D. a veškerou použitou literaturu a jiné informační zdroje uvádím v seznamu literatury.

V Brně, dne 22.2.2009

.....

Podpis autora

Anotace

V současné době dochází k dynamickému vývoji mnohých terapeutických prostředků, které svými účinky ovlivňují srdce a jeho činnost. Příkladem takovýchto látek jsou beta-blokátory, které obsazují beta-adrenergní receptory v srdci, brání tak jejich stimulaci beta-sympatomimetiky a tím zabraňují zvýšené aktivitě srdce, která není u některých onemocnění vhodná. Díky svým účinkům se používají při léčbě závažných onemocnění kardiovaskulárního systému, jako je například angina pectoris nebo hypertenze. Existuje celá řada β -blokátorů, které mají ovšem různé nevýhody a nežádoucí vedlejší účinky. Podle dosavadních měření má nově syntetizovaná látka 44Bu výrazně menší negativní dopad na srdeční frekvenci, naopak má příznivý antidisrytmický a bradykardický účinek oproti jiným beta-blokátorům.

Seznam odborných výrazů

- ¹ hypertenze – vysoký krevní tlak
- ² rezistence – odolnost
- ³ regrese – ústup
- ⁴ hypertrofická – zvětšená, zbytnělá
- ⁵ tachykardie – abnormální zrychlení srdeční činnosti
- ⁶ hypertyreóza – zvýšená funkce štítné žlázy
- ⁷ vazodilatancia – léčiva rozšiřující cévy
- ⁸ glaukom – zelený oční zákal
- ⁹ feochromocytom – nádor vycházející z tkáně dřeně nadledvin nebo sympatických ganglií.
Zvýšenou produkcí katecholaminů (zejména adrenalinu) vzniká hypertenze a zvyšuje se bazální metabolismus (základní látková výměna)
- ¹⁰ nauzea – nepříjemný pocit slabosti a nevolnosti, často předchází zvracení
- ¹¹ bradykardie – zpomalení srdeční činnosti
- ¹² parestézie – spontánní nebo vyvolané abnormální vjemy – svědění, mravenčení,...
- ¹³ obstrukce – uzavření průsvitu dutého orgánu
- ¹⁴ hypoglykémie – snížení hladiny krevního cukru
- ¹⁵ systémová hypotenze – systémové snížení krevního tlaku
- ¹⁶ atrioventrikulární blokáda – porucha převodu vzruchu v srdci ze síní na komory
- ¹⁷ astma bronchiale - záchvaty dušnosti, vznikající náhlým zúžením průdušek
- ¹⁸ bronchospasmus – křeč svalstva průdušek s následným zúžením jejich průsvitu
- ¹⁹ supraventrikulární tachykardie – vzniká ve stěnách komor, představuje ještě rychlejší tepovou frekvenci a nepravidelný rytmus
- ²⁰ fibrilace – mihání
- ²¹ flutter – třepetání
- ²² ouabain – též strofantin G, je kardiotonický glykosid, který má pozitivně inotropní účinek

1. Obsah

1. Obsah	1
2. Úvod a cíle práce	2
2.1. Úvod	2
2.2. Cíle práce	3
3. Teoretická část	4
3.1. Srdce	4
3.2. Adrenalin	6
3.3. Adrenergní blokátory	7
3.4. Beta-blokátory	7
3.5. Účinky	8
3.6. Terapeutické užití	8
3.7. Nežádoucí účinky	9
3.8. Dělení beta-adrenolytik	10
3.9. Antagonisté beta-adrenergních receptorů s ultra krátkým účinkem	11
3.10. Esmolol	12
4. Experimentální část	13
4.1. Látka 44Bu	13
4.2. Syntéza látky 44Bu	13
4.3. Schéma syntézy	14
4.4. Postup syntézy	15
4.5. Základní vlastnosti finální sloučeniny	19
4.6. Metodika	19
4.6.1. Teplota tání	19
4.6.2. Chromatografie na tenké vrstvě	19
4.6.3. $^1\text{H-NMR}$ a $^{13}\text{C-NMR}$ Spektroskopie	19
4.6.4. Interpretace NMR spekter	20
4.7. Testování látky 44Bu	22
5. Diskuze	25
6. Závěr	27
7. Seznam použité literatury	28
8. Přílohy	29

2. Úvod a cíle práce

2.1. Úvod

Častý výskyt onemocnění kardiovaskulárního systému v lidské populaci vede k jejich intenzivnímu výzkumu a tudíž i k dynamickému vývoji vhodných terapeutických prostředků.

Mezi nejrozšířenější choroby srdce a cév patří vysoký krevní tlak nebo angina pectoris, způsobená nedostatečným prokrvením srdečního svalu vlivem zúžení koronárních cév.

Světové statistiky uvádějí, že je hypertenzí postiženo více než 20% dospělé populace v civilizovaných zemích a jen asi třetina z postižených pacientů se správně léčí.

Náplní práce je příprava látky ze skupiny antagonistů beta-adrenergických receptorů s ultrakrátkým účinkem. Konkrétně jsem se zabývala syntézou látky 44Bu, která by v budoucnu mohla být, vzhledem ke své chemické struktuře, využitelná právě při léčbě kardiovaskulárních onemocnění.

Práce je rozdělena na dvě části: teoretickou a praktickou. Teoretická část se zabývá popisem stavby srdce a jeho fungováním, vysvětlením pojmu beta-blokátor, jeho historie, rozdělení, účinky a využití. Praktická část popisuje postup přípravy sloučeniny 44Bu a potvrzení její struktury a čistoty. Finální částí práce bylo experimentální ověření účinnosti látky 44Bu na laboratorních zvířatech a vyhodnocení jejího účinku a negativních vlivů.

2.2. Cíle práce

- Syntéza látky 44Bu – hydrochloridu 3-butylamino-2-hydroxypropylesteru kyseliny 4-butyloxykarbonylaminobenzoové
- Ověření struktury a čistoty připravené sloučeniny pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC), $^1\text{H-NMR}$ a $^{13}\text{C-NMR}$ spektroskopie
- stanovení teploty tání připravené látky

3. Teoretická část

3.1 Srdce

Srdce je ústředím celé cévní soustavy, neboť všechny krevní cévy jsou na něho buď přímo, nebo nepřímo napojeny. Pracuje jako kombinovaná sací a tlaková pumpa, která zabezpečuje proudění krve do celého těla. Jedná se o nepárový, dutý, svalnatý orgán červenohnědé barvy. Srdce dospělého jedince váží asi 270–320 g. Základní rozměry jsou ovlivněny řadou činitelů, jako je věk, pohlaví, zdravotní stav, atd.

Srdce je uloženo ve středním mezihrudí, větší část je vlevo od střední čáry, pravá hranice srdce leží za pravou hranou prsní kosti. Tvarově je připodobňováno ke kuželi.

Je tvořeno čtyřmi dutinami – dvě síně a dvě komory, které dále rozdělujeme na pravé a levé. Tak jako mnoho čerpadel závisí také srdce na řadě samostatně pracujících chlopní. V pravém srdci to jsou plicní (pulmonální) a trojcípá (trikuspidální) chlopeň; v levém aortální a dvojcípá (mitrální) chlopeň. Tyto čtyři chlopně se automaticky otvírají a zavírají, aby krev mohla proudit do komor a z komor vždy jen jedním žádaným směrem. Do pravé předsíně vstupují horní a dolní dutá žíla, do levé předsíně plicní žíly. Z pravé komory vystupuje plicní kmen, z levé komory srdečnice (aorta).

Srdeční stěna se skládá ze tří vrstev: endokardu, myokardu a epikardu.

Endokard = nitroblána srdeční

- tenká, hladká, vazivová blána, která vystýlá všechny dutiny srdeční a přechází také na srdeční chlopně.

Myokard = svalovina srdeční

- hlavní vrstvou stěny srdeční

- svalovina předsíní je relativně slabá, naopak svalovina komor je mnohem silnější.

Ke svalovině srdeční patří také shluky vysoce specializovaných buněk, které mají schopnost vytvářet elektrické impulsy a převádět je z jednoho srdečního oddílu do druhého, takže přispívají ke koordinaci činnosti jednotlivých částí srdce.

Epikard = přisrdečník

- tenká, hladká, průhledná, vazivová blána

- pokrývá povrchovou vrstvu myokardu, probíhají zde kmeny tepen, žil a nervů srdce.

Činnost srdce se dá charakterizovat dvěma ději, které se projevují pravidelným, rytmickým střídáním stahu (systoly) a ochabnutím (diastoly).

S každým srdečním úderem se obě síně společně stáhnou a naplní komory krví. Pak se stáhnou komory. Tyto posloupné řady kontrakcí závisí na důmyslném elektrickém časovacím systému, který je zprostředkován tzv. převodním srdečním systémem, tvořeným speciální svalovou tkání.

Převodní systém je pro činnost srdce mimořádně významný, protože jeho poruchy vyvolávají těžké změny srdečního rytmu a souhry předsíní a komor.

Regulace srdeční činnosti

Základní regulace srdeční činnosti vychází z tzv. sinusového (sinoatriálního) uzlu, který leží v horní části pravé síně při ústí horní duté žíly. V tomto uzlu vznikají vzruchy, které jsou postupně převáděny na svalovinu celého srdce a určují tak srdeční rytmus. Impulsy jdou ze sinoatriálního uzlu přes obě síně a způsobí jejich kontrakci. Další uzel, zvaný síňokomorový (atrioventrikulární), je v místě spojení síně a komor a převádí impulsy ke kontrakci dolů svazkem vodivých vláken, zvaným Hisův svazek v mezikomorové přepážce. Po průchodu svazkem se impulsy rozšíří na komory a způsobí jejich stažení (kontrakci), časově zpožděnou za kontrakcí síní.

Sinoatriální uzel má tedy funkci srdečního udavatele kroku (pacemakeru), v němž vznikají samovolně v pravidelných intervalech vzruchy, které se odtud šíří na ostatní oddíly srdce a vyvolávají postupně jejich stah.

Činnost srdce je pod neustálým vlivem sympatických a parasympatických nervů. Tato vlákna ovlivňují řadu parametrů srdeční činnosti:

- 1) frekvence – chronotropní vliv
- 2) stažlivost (kontraktilita) – inotropní vliv
- 3) vodivost- rychlost vedení vzruchu – dromotropní vliv
- 4) dráždivost – bathmotropní vliv

Sympatikus má uvedené účinky kladné – při dráždění se zrychlí frekvence, zvětší se síla srdečních stahů, zkrátí se doba převodu vzruchu a zvýší se dráždivost.

Všechny uvedené účinky sympatiku jsou zprostředkovány vazbou mediátoru, tj. noradrenalinu, na tzv. beta-receptory v buněčné membráně. Ovlivňovat tyto funkce lze pomocí látek, které tyto receptory blokují (beta-blokátory) nebo dráždí (izoprenalin)

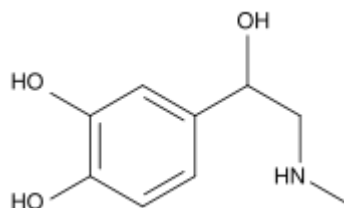
Parasympatikus má na srdce vliv zhruba opačný – zpomalení nebo úplné zastavení tepu a převodu vzruchu, zpomalení frekvence, zmenšení síly srdečních kontrakcí, snížení dráždivosti. Jako mediátor funguje acetylcholin, jeho účinek lze blokovat atropinem.

Adrenalin a noradrenalin působí na srdce stejně jako dráždění sympatiku a má především inotropní účinek.

3.2. Adrenalin (též epinefrin)

Jedná se o hormon vznikající ve dřeni nadledvin a vylučovaný zejména při zátěžových situacích nebo emocích. Působí jako sympatomimetikum = adrenergní látka, což je látka, která napodobuje účinky podráždění sympatického nervového systému. Znamená to, že pokud je adrenalin zachycen receptorem určitého orgánu, podporuje jeho činnost. Např. u srdce vyvolává rozšíření svalových cév, zrychluje srdeční činnost, zvyšuje sílu srdeční kontrakce. Dále působí např. na hladkou svalovinu průdušek - rozšiřuje jejich průsvit a zlepšuje tak ventilaci plic; rozšiřuje zornice, takže do nich vstupuje více světla, aktivuje potní žlázy. Pro své účinky je používán k resuscitaci.

Strukturní vzorec adrenalinu:



3.3 Adrenergní blokátory

Neboli sympatolytika (také antagonisté adrenergních receptorů, anti-adrenergika, adrenolytika) jsou farmaka, která blokují adrenergní reakce. Jsou to nejen látky působící na adrenergní receptory přímo, ale i látky působící nepřímo, ovlivněním dějů v nervovém zakončení. V cílových orgánech existují dva základní typy adrenergních receptorů – alfa (α) a beta (β). Stejně rozdělujeme látky podle toho, jestli přednostně blokují alfa nebo beta receptory.

Pojem receptor zavedli již v r. 1905 vědci Ehrlich a Langley, ale až v roce 1948 byly objeveny receptory alfa a beta. Významný objev beta-sympatolytik je připisován britskému farmakologovi Jamesi W. Blackovi. Po dlouhou dobu bylo nejasné, proč adrenalin způsobuje kontrakci jedněch, ale relaxaci jiných útrobních svalů (např. kontrakci arterií nebo myokardu, ale relaxaci bronchů nebo uteru). Až do r. 1948 byl pouze vysloven předpoklad existence dvou rozdílných typů adrenergních receptorů nazvaných α a β . Black začal hledat látku, která by blokovala β -receptory, a tím snížila nároky myokardu na kyslík a tak mohla mírnit bolesti u anginy pectoris. V r. 1964 se mu podařilo vyvinout propranolol, první klinicky dobře použitelný blokátor β -adrenergních receptorů, který se stal prototypem pro další vývoj. Od 70. let užívají β -adrenolytika pacienti s hypertenzí nebo po infarktu myokardu. Další výzkumy vedly posléze k objevu β_2 -receptorů v bronších a dále k objevu selektivních β_2 -mimetik, která se stala důležitými bronchodilatancií.

Ve své práci jsem se zabývala syntézou látky, která vykazuje beta-adrenolytický účinek, proto se dále budu zabývat pouze antagonisty beta-adrenergních receptorů.

3.4 Beta-blokátory

Beta-sympatolytika (syn. beta-adrenolytika, antagonisté β -adrenergních receptorů, beta-blokátory) obsazují β -adrenergní receptory a brání jejich stimulaci β -sympatomimetiky. Význam mají především kardioselektivní β_1 -sympatolytika.

3.5 Účinky

Působením beta-blokátorů dochází k omezení fyziologického vlivu sympatiku na srdeční činnost. β -blokátory antagonizují pozitivně inotropní (síla srdeční kontrakce), pozitivně chronotropní (zpomalena srdeční frekvence) a dromotropní (rychlost převodu elektrických impulsů srdcem) účinky adrenergní stimulace a snižují spotřebu O_2 myokardem. Srdeční výdej nemusí být podáváním beta-sympatolytik významně ovlivněn, protože při snížení srdeční frekvence je zvýšen tepový objem.

3.6 Terapeutické užití

1) **Antihypertenziva** – beta-blokátory jsou výhodné pro dlouhodobou terapii hypertenze¹. Přesný mechanismus antihypertenzivního působení beta-blokátorů není znám; některá novější betalytika snižují krevní tlak výrazným snížením periferní rezistence² bez ovlivnění srdečního výdeje. Velkou nevýhodou neselektivních beta-blokátorů při léčení hypertenze je jejich nepříznivý vliv na spektrum plasmatických lipidů. Prognosticky velmi příznivé je naopak to, že dochází k postupné regresi³ hypertrofické⁴ levé srdeční komory.

2) **Antiarytmika** – beta-sympatolytika se používají u supraventrikulárních arytmií různého původu a také u tachykardie⁵ provázející hypertyreózu⁶.

3) **Angina pectoris** – snížením spotřeby O_2 myokardem a snížením srdečního výkonu se sníží frekvence záchvatů a spotřeba koronárních vazodilatancí⁷. Podávání beta-sympatolytik také snižuje výskyt nebo rozsah infarktu myokardu.

4) **Další indikace:** glaukom⁸ (zelený oční zákal) - lokální aplikace, feochromocytom⁹, prevence migrény, léčba tremorů (třes).

3.7 Nežádoucí účinky

Přestože beta-adrenolytika patří mezi dobře snášená léčiva, ojediněle se mohou vyskytnout i nežádoucí vedlejší účinky, a to většinou na počátku léčby. Nejčastěji se objevuje nauzea¹⁰, zvracení, únava, závratě, poruchy periferní cirkulace (chladné končetiny), bradykardie¹¹ a parestézie¹². Dále obstrukce¹³ dýchacích cest, otok v oblasti kotníků, poruchy potence, hypoglykémie¹⁴.

Absolutní kontraindikace je přecitlivělost na konkrétní látku, systémová hypotenze¹⁵, atrioventrikulární blokáda¹⁶, astma bronchiale¹⁷. Dále dochází ke kontraindikacím při hypoglykemických stavech, poruchách periferního prokrvení, v těhotenství a při laktaci.

K závažným nežádoucím reakcím vede náhlé vysazení beta-blokátorů. Např. při léčbě hypertenze vede vysazení k prudkému a výraznému zvýšení krevního tlaku. Proto nemají být beta-blokátory nikdy vysazovány najednou.

3.8 Dělení beta-adrenolytik

Beta-adrenolytika se dělí podle selektivity k beta-adrenergním receptorům a podle přítomnosti vnitřní sympatomimetické aktivity (VSA nebo ISA). Látky s VSA nevyvolávají tak výraznou bradykardii jako látky bez VSA.

- Neselektivní beta-sympatolytika bez VSA
 - do této skupiny beta-blokátorů patří např.: propranolol
- Neselektivní beta-sympatolytika s VSA
 - určitý stupeň vnitřní sympatomimetické aktivity vykazují např.: alprenolol, pindolol, bopindolol
- β_1 -sympatolytika bez VSA
 - β_1 -sympatolytika jsou kardioselektivní látky, které mají méně nežádoucích účinků než látky neselektivní, neovlivňují spektrum plazmatických lipidů. Selektivní β_1 -blokátory jsou vhodné k terapii anginy pectoris a hypertenze, zde se příznivě uplatňuje snížení plazmatické hladiny reninu (enzym produkovaný ledvinami. Aktivuje protein krevní plazmy angiotensin, který zvyšuje krevní tlak), které je zejména výrazné u metoprololu

Používané látky bez VSA: atenolol, bisoprolol, metoprolol, betaxolol, talinolol, nebivolol a též **esmolol** (kardioselektivní beta-blokátor s extrémně krátkým biologickým poločasem a krátkou dobou účinku).

- β_1 -sympatolytika s VSA

Používané látky: acebutol je vysoce kardioselektivní látka s membráno-stabilizačním účinkem a s antiarytmickou aktivitou; novější látka celiprolol má navíc vazodilatační účinek, snižuje krevní tlak při minimálním ovlivnění srdečního výdeje a to výrazným snížením periferní rezistence.

- β_2 -sympatolytika – zatím pouze experimentální význam

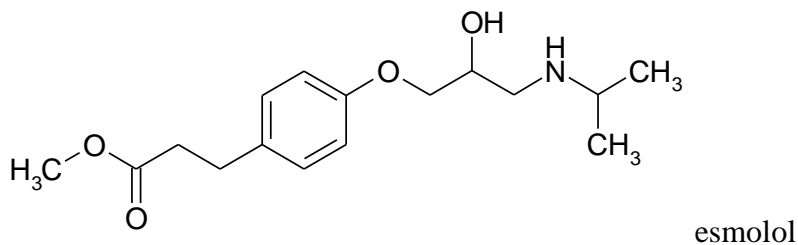
3.9 Antagonisté beta-adrenergických receptorů s ultra krátkým účinkem

U klasických beta-blokátorů se často setkáváme s řadou vedlejších účinků (bradykardie, hypotenze, bronchospasmus¹⁸) spojených s jejich dlouhodobým účinkem. Proto se vyvíjejí ultrakrátce působící beta-blokátory pro intravenózní infuzi s pouze několikaminutovým trváním farmakologického účinku. Tyto látky jsou indikovány v situacích, kdy je nutné rychlé a řízené beta-antiadrenergní působení s rychlým vymizením klinických účinků (např. při supraventrikulárních tachykardiích¹⁹, fibrilacích²⁰ a flutteru²¹ síní, akutních hypertenzních stavech a akutním infarktu myokardu). Ultrakrátkého účinku bylo dosaženo včleněním metabolicky labilní esterové funkční skupiny do původní aryloxyaminopropanolové struktury. Tato esterová vazba je v organizmu rychle hydrolyzována plazmatickými a tkáňovými esterázami za vzniku neúčinných metabolitů. Zatím jediným u nás registrovaným zástupcem této skupiny léčiv je esmolol.

3.10 Esmolol

Esmolol je kardioselektivní β_1 -blokátor s rychlým nástupem, velmi krátkým trváním účinku a žádnými významnými vlastními sympatomimetickými nebo membránostabilizujícími aktivitami v terapeutickém dávkování. Nemá schopnosti alfa blokády. Esmolol snižuje sílu a rychlost srdečních kontrakcí blokováním beta-adrenergních receptorů sympatetického nervového systému, které se nachází v srdci a dalších tělních orgánech. Esmolol je podáván nitrožilně. Je běžně používán u pacientů pro prevenci při operaci nebo při tachykardii, při léčení akutní supraventrikulární tachykardie, kde je nezbytná kontrola komorové frekvence a také při léčbě disekce (výduť) aorty.

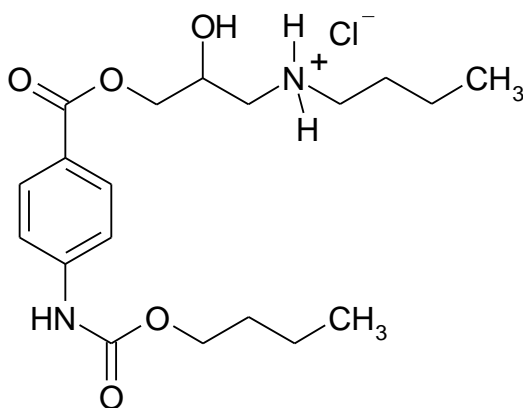
Esmolol je derivát ze skupiny aryloxyaminopropanolů mající na arylu navázanou esterovou skupinu. Krátkodobý účinek esmololu je způsoben rychlou hydrolýzou této esterové skupiny esterázami v cytosolu červených krvinek. Metabolickými produkty jsou neúčinná kyselina a metanol. Množství vyprodukovaného metanolu je stejné jako endogenní produkce (nepůsobí tedy toxicky). Poločas eliminace esmololu je 9 minut.



4. Experimentální část

4.1 Látka 44Bu

Látka **44Bu**, jejíž syntéza je náplní experimentální práce, byla připravena na Ústavu chemických léčiv FaF VFU Brno jako potencionální krátkodobě působící betalytikum. Chemicky se jedná o hydrochlorid 3-butylamino-2-hydroxypropylesteru kyseliny 4-butoxykarbonylaminobenzoové.



44Bu

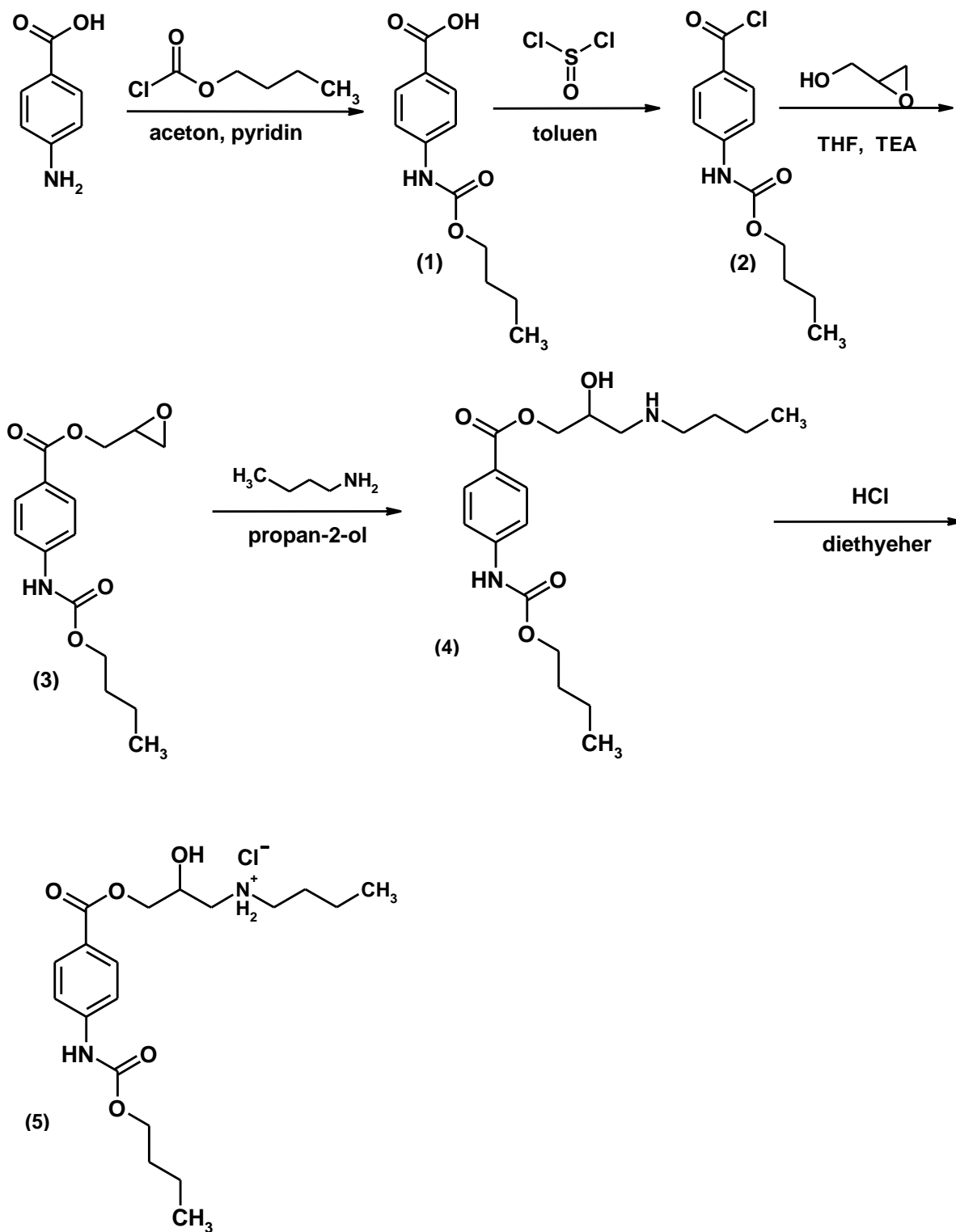
4.2 Syntéza látky 44Bu

Příprava sloučeniny 44Bu probíhala v pěti krocích.

Vlastní syntéza (obr. 1) vycházela z kyseliny 4-aminobenzové jež reagovala v prostředí acetonu s butylchlorformiátem na kyselinu 4-butoxykarbonylaminobenzoovou (1). Ta byla převedena na chlorid (2) pomocí thionylchloridu. Reakcí chloridu s 2,3-epoxypropan-1-olem byla připravena epoxysloučenina (3), která reagovala v následujícím kroku syntézy s *n*-butylaminem za vzniku báze finální sloučeniny (4). Výsledná látka byla pomocí etherického chlorovodíku převedena na hydrochlorid (5).

4.3 Schéma syntézy

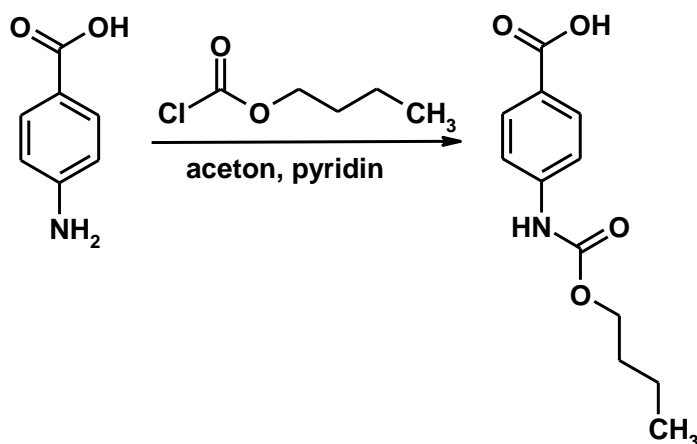
Obr. 1: Schéma syntézy



4.4. Postup syntézy

1. krok syntézy – příprava kyseliny 4-butoxykarbonylaminoobenzoové (1):

Reakční schéma:

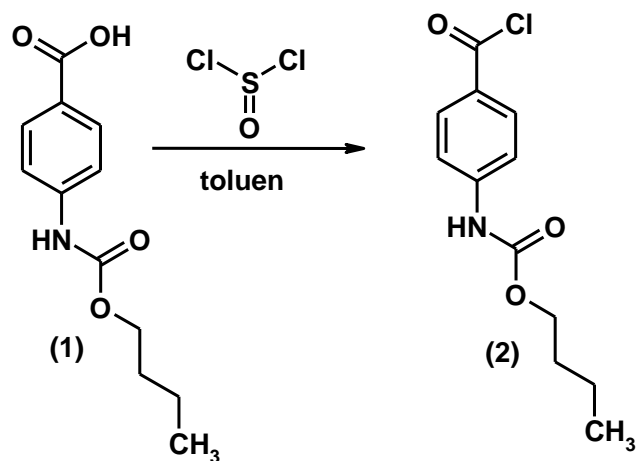


Pracovní postup:

K roztoku 4-aminobenzeové kyseliny (0,1 mol) v acetonu (100 ml) a pyridinu (0,1 mol) se po kapkách přidával butylchlorformiát (0,1 mol). Reakční směs byla zahřívána k varu 1,5 hodiny. Poté se odpařila do sucha a promyla vodou. Surová kyselina byla překrystalizována z ethanolu. Výsledné látky vzniklo 60 gramů, což představuje 69,4 % výtěžek reakce.

2. krok syntézy – příprava chloridu kyseliny 4-butoxykarbonylaminobenzoové (2):

Reakční schéma:

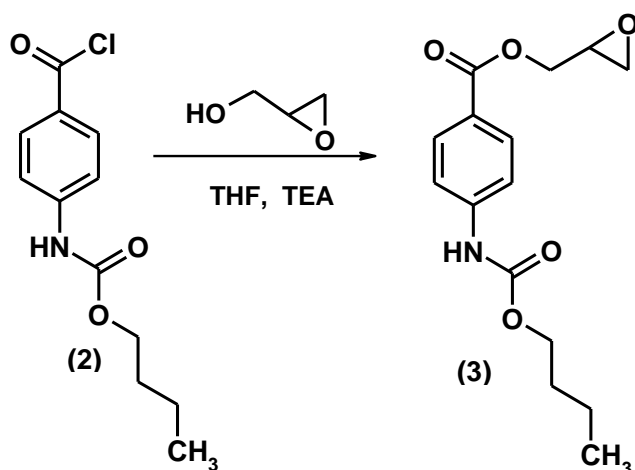


Pracovní postup:

K suspenzi kyseliny (1) (0,1 mol) v toluenu se pomalu přidal thionylchlorid (0,2 mol). Vzniklá směs se refluxovala 2 hodiny, poté se ochladila a nechala stát přes noc v lednici. Vykryštalizovaný chlorid byl odsán na Büchnerově nálevce, byl promyt petroletherem a poté byl rekrystalizován z toluenu. Výsledné látky vzniklo 60,8 gramu. Výtěžek reakce byl 92,8 %.

3. krok syntézy – příprava 2,3-epoxypropyl-4-butoxykarbonylaminobenzoátů (3):

Reakční schéma:

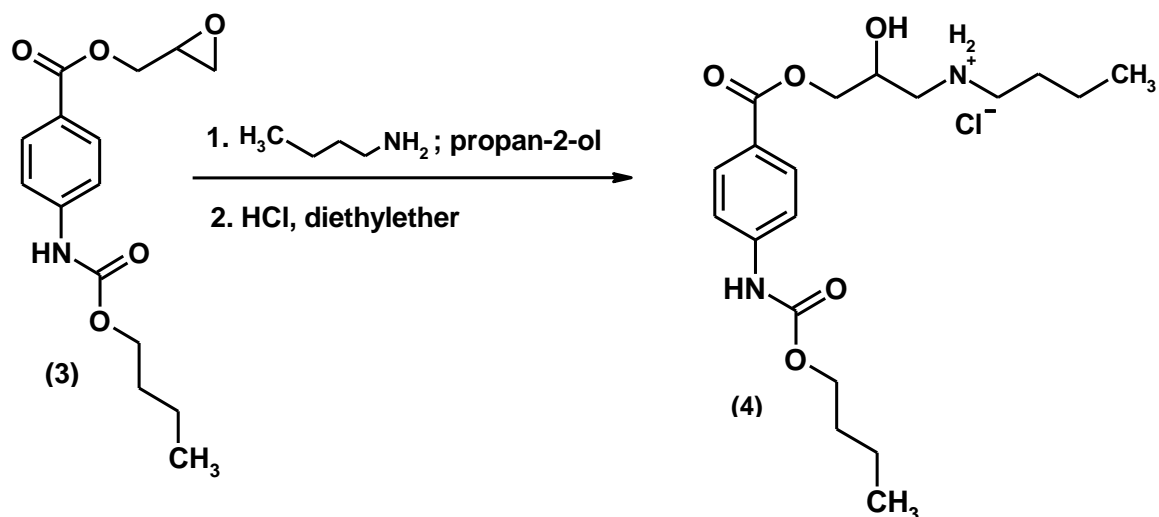


Pracovní postup:

Do tříhrdlé baňky byl přidán tetrahydrofuran (20 ml), 7,78 ml 2,3-epoxypropanolu (0,2 mol) a 16,26 ml triethylaminu (0,2 mol) (slouží k vychytávání vznikajícího chlorovodíku). Vzniklá směs byla ochlazena na 0°C. Za stálého míchání se ke směsi přikapával roztok chloridu (2) (0,2 mol) v tetrahydrofuranu (80 ml) tak, aby teplota směsi byla mezi 0-5 °C. (Bylo použito 30 g chloridu.). Poté byla reakční směs míchána 3 hodiny při laboratorní teplotě. Vyloučený triethylamoniumchlorid byl oddělen od reakční směsi filtrací a filtrát byl odpařen do sucha. Výsledná epoxysloučenina (3) byly překrystalizována z propan-2-olu. Výsledné látky vzniklo 24 g. Výtěžek reakce byl 69,75 %.

4. krok syntézy – příprava 3-butylamino-2-hydroxypropylesteru kyseliny 4-butoxy-karbonylaminoobenzové a jeho hydrochloridu (4):

Reakční schéma:



Pracovní postup:

K suspenzi epoxysloučeniny (3) (0,02 mol, 8 g) v isopropylalkoholu (150 ml) se přidal *n*-butylamin (0,03 mol, 2,1 ml) a směs se zahřívala při teplotě varu reakční směsi po dobu 4-5 hodin. Po oddestilování rozpouštědla za mírného vakua byla získána báze ve formě viskózní kapaliny (x g). Odparek byl rozpuštěn v acetonu a povařen s kyselinou fumarovou (0,015 mol, 1,72 g). Vzniklé krystaly byly odsáty. Získaný fumarát byl převeden zpět na bázi rozpuštěním ve vodě a přidáním nasyceného roztoku NaHCO_3 . Vznikající báze byla vytřepána do chloroformu. Chloroformový roztok se vysušil sušidlem (MgSO_4), poté se chloroform odpařil za sníženého vakua. Vzniklá báze se rozpustila v diethyletheru a přidal se roztok etherického chlorovodíku. Krystaly vzniklého hydrochloridu se odsály a rekrystalizovaly z propan-2-olu.

4.5. Základní vlastnosti finální sloučeniny

Pracovní označení	Sumární vzorec	Mr	t_f [°C]	R_F^*
44Bu	$C_{19}H_{31}O_5N_2Cl$	402,92	176-178	0,37

* chloroform : methanol 1:1

4.6. Metodika

4.6.1. Teplota tání

Teploty tání byly stanoveny na Koflerově bloku (HMK Franz Küstner). Látky byly před stanovením sušeny po dobu 24 hod. v exsikátoru nad P_2O_5 při tlaku 10 kPa (membránová vývěva KNF Laboport) a laboratorní teplotě. Naměřené hodnoty nebyly korigovány.

4.6.2. Chromatografie na tenké vrstvě

Průběh reakcí a čistota připravených látek se sledovala pomocí chromatografie na tenké vrstvě (TLC) na deskách Merck s detekcí UV zářením při vlnové délce 254 nm (UV-lampa Camag). Čistota finálních sloučeniny byla hodnocena ve vyvíjecí soustavě methanol : chloroform 1:1. Vzorek látky byl nanášen jako 2% methanolický roztok kapilárou na komerční hliníkové fólie se zakotveným silikagelem (DC-Alufolien Kieselgel 60 F_{254} Merck). Vyvíjecí dráha byla 10 cm. Hodnota R_F byla určena jako poměr vzdálenosti, kterou urazí skvrna stanovované látky ku vzdálenosti, kterou urazí čelo rozpouštědla.

4.6.3. 1H -NMR a ^{13}C -NMR Spektroskopie

NMR spektra byla naměřena na FT-NMR spektrometru Varian Gemini-2000, 1H -NMR spektra při 200 MHz a ^{13}C -NMR spektra při 50 MHz. Vzorky byly měřeny v roztoku $DMSO-d_6$, který byl zároveň použit jako vnitřní standard (signál 1H -2,5 ppm, ^{13}C -39,5 ppm). ^{13}C -NMR spektra byla měřena také metodou APT (attached proton test), která napomáhá přiřazování signálů jednotlivým uhlíkovým atomům. APT metoda umožňuje odlišit CH_2 - a $>C<$ od CH_3 - a CH - skupin, kdy C_H a C_{H_3} uhlíková jádra dávají pozitivní signály a kvartérní a C_{H_2} uhlíková jádra dávají negativní signály. Naměřená spektra byla interpretována porovnáním spekter podobných sloučenin z internetové databáze SDBS.

4.6.4. Interpretace NMR spekter

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, rf. TMS):

$\delta =$

10,10 (s, 1H, -NH-)

9,09 a 8,81 (bs, 2H, $-\text{NH}_2^+$ -)

7,94 (d, $J=8,8$, 2H, $-\text{H}^1$)

7,62 (d, $J=8,8$, 2H, $-\text{H}^2$)

5,94 (s, 1H, -OH)

4,26-4,15 (m, 3H, $-\text{OCH}_2\text{CHOHCH}_2-$)

4,10 (t, $J=6,4$, 2H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$)

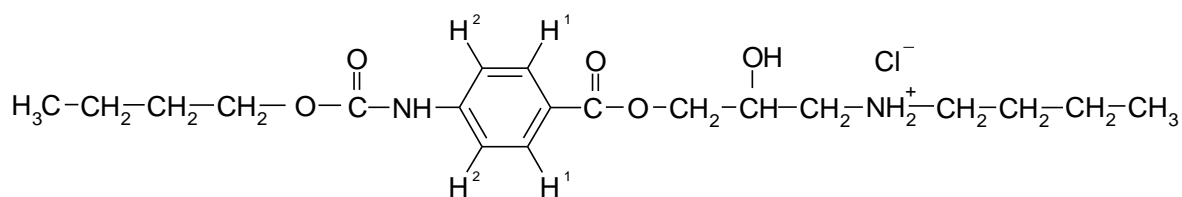
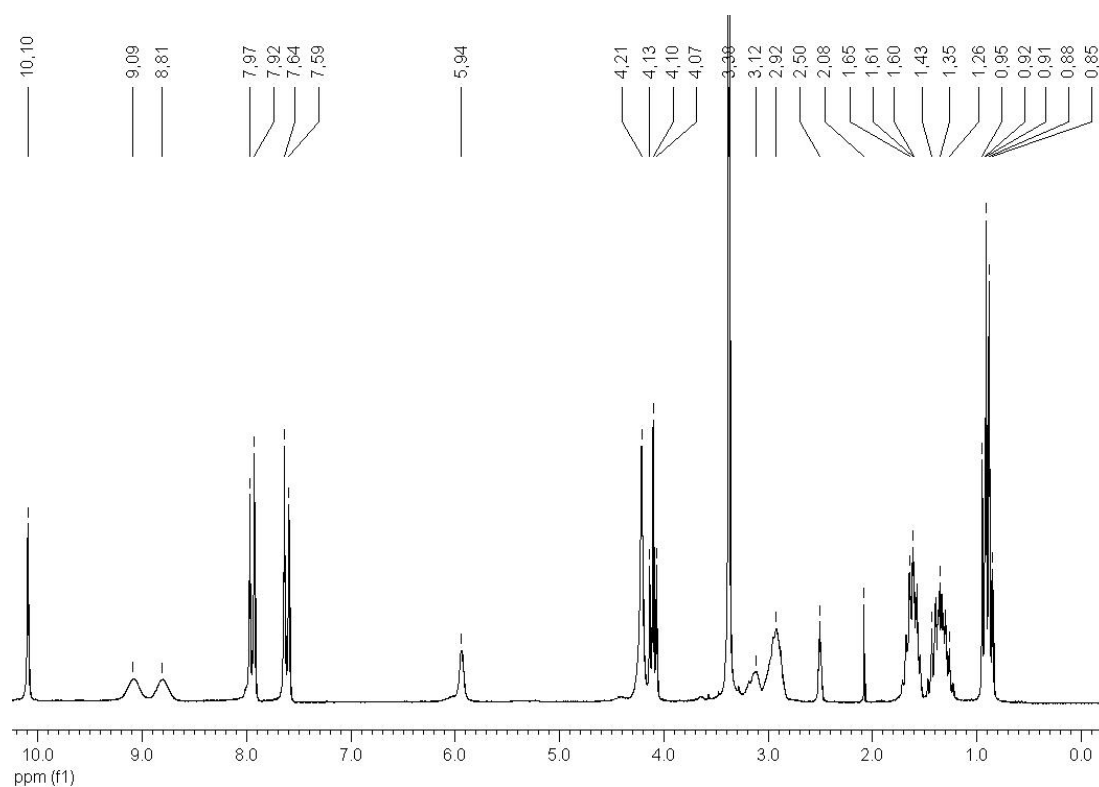
3,18-2,82 (m, 4H, $-\text{OCH}_2\text{CHOHCH}_2-$ + $-\text{NH}_2^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$)

1,71-1,54 (m, 4H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ + $-\text{NH}_2^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$)

1,47-1,23 (m, 4H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ + $\text{NH}_2^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$)

0,95-0,85 (m, 6H, $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ + $-\text{NH}_2^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$)

Grafický záznam $^1\text{H-NMR}$ spektra:

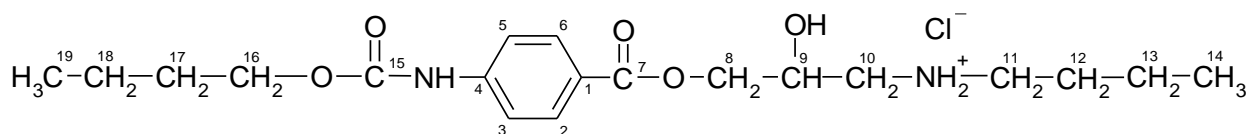
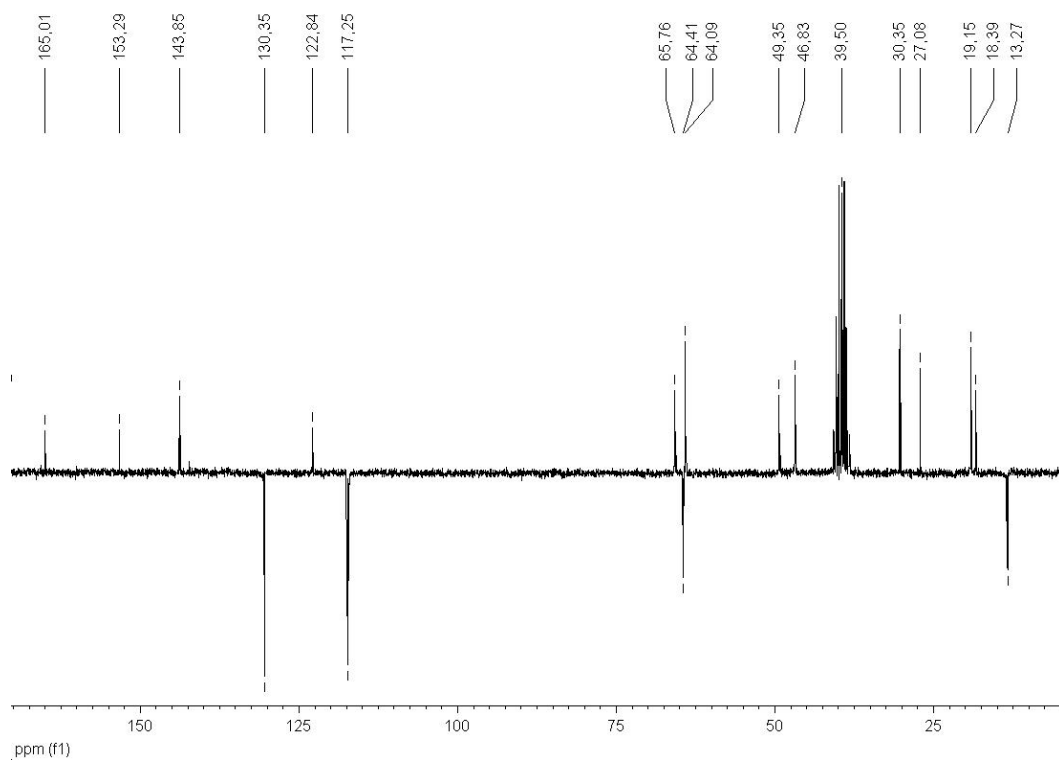


^{13}C -NMR (50 MHz, DMSO- d_6 , rf. DMSO- d_6 ;

APT):

$\delta =$	64,08 (C ¹⁶)
165,01 (C ⁷)	49,35 (C ¹⁰)
153,29 (C ¹⁵)	46,83 (C ¹¹)
143,85 (C ⁴)	30,34 (C ¹²)
130,35 (C ² + C ⁶)	27,07 (C ¹⁷)
122,84 (C ¹)	19,15 (C ¹³)
117,24 (C ³ + C ⁵)	18,39 (C ¹⁸)
65,76 (C ⁸)	13,35 (C ¹⁴)
64,40 (C ⁹)	13,27 (C ¹⁹)

Grafický záznam ^{13}C -NMR spektra:



4.7. Testování látky

Látka 44Bu již byla podrobena základnímu farmakologickému testování. Výsledky hodnocení antidisrytmické účinnosti v pokusech *in vivo* na morčatech ukázaly, že daná látka statisticky významně antagonizovala poruchy srdečního rytmu indukované ouabainem²². Při aplikaci testované látky anestetovaným zvířatům v čase nástupu disrytmie byly získány vyšší statisticky významné hodnoty, než při sledování ochranného účinku těchto látek, kdy byl podáván kontinuálně roztok ouabainu až po pěti minutách po aplikaci testovaných sloučenin. Toto zjištění by mohlo poukazovat na krátkodobé působení testovaných sloučenin.

Vliv látky 44Bu na změny srdeční frekvence byl testován v pokusech *in vivo* na normotenzních laboratorních potkaních. Byl zaznamenán statisticky prokazatelný krátkodobý bradykardický účinek. K nejvýraznějšímu snížení docházelo v první minutě po intravenózní aplikaci. Statisticky významný pokles srdeční frekvence byl zaznamenán do 14. minuty po aplikaci. V porovnání s jinými antagonisty β -adrenergických receptorů s krátkým účinkem testovaná sloučenina vykazovala velice krátký efekt na změnu srdeční frekvence, která se vracela na původní hodnotu do 18 minut od intravenózní aplikace. U esmololu je uváděn návrat srdeční frekvence do výchozího stavu do 30 min po infuzi.

Dále byl testován v pokusech *in vivo* na laboratorních potkaních bradykardický účinek na modelu isoprenalinem indukované tachykardie a byl zjišťován vztah mezi dávkou a farmakologickým účinkem a byl porovnán s účinkem krátkodobě působícího antagonisty β -adrenergických receptorů esmololem. Nástup účinku byl u látky 44Bu i esmololu ve všech testovaných dávkách velice rychlý. Statisticky významný pokles srdeční frekvence vůči kontrole byl zaznamenán již v momentu intravenózní aplikace, s výjimkou nejnižší dávky látky 44Bu. Zatímco u esmololu se zvyšující dávkou zvyšuje i účinek látky na srdeční frekvenci, u látky 44Bu docházelo k maximálnímu poklesu srdeční frekvence po aplikaci dávky $1,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ a další zvyšování této dávky již nevedlo k signifikantnímu zvýšení účinku látky. Hodnoty změn srdeční frekvence v čase u jednotlivých testovaných látek jsou zaznamenány v tabulkách č. 1 a 2, grafické znázornění změn pak na grafech č. 1 a 2.

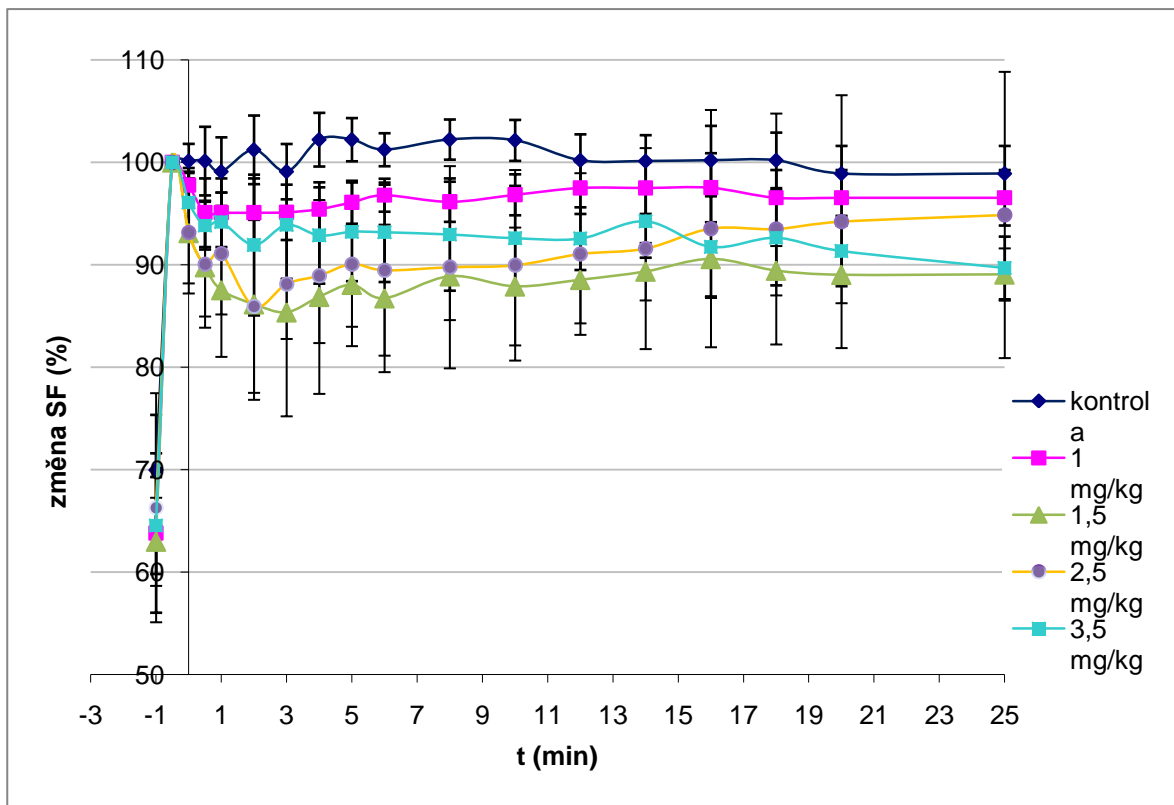
Tab.č. 1: Vliv látky 44Bu na srdeční frekvenci

Časový úsek	Průměrná hodnota SF (%) ± směrodatná odchylka				
	kontrola	1,0 mg.kg ⁻¹	1,5 mg.kg ⁻¹	2,5 mg.kg ⁻¹	3,5 mg.kg ⁻¹
Poč. SF	69,97 ± 5,39	63,83 ± 7,78	62,97 ± 4,30	66,30 ± 11,18	64,56 ± 4,73
SF po ISO	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00
aplikace	100,13 ± 3,64	97,78 ± 1,68	93,10 ± 4,91	93,17 ± 5,96	96,08 ± 2,89
30. s	100,13 ± 4,35	95,09 ± 3,35	89,77 ± 4,81	90,08 ± 6,21	93,83 ± 2,33
1. min	99,10 ± 4,35	95,09 ± 3,35	87,53 ± 6,51	91,10 ± 5,94	94,18 ± 2,89
2. min	100,20 ± 6,45	95,09 ± 3,35	86,15 ± 9,32	85,94 ± 8,43	91,94 ± 6,87
3. min	99,10 ± 4,35	95,13 ± 2,70	85,36 ± 10,14	88,14 ± 5,37	93,90 ± 5,26
4. min	101,23 ± 5,81	95,44 ± 2,62	86,87 ± 9,46	88,94 ± 6,57	92,87 ± 4,70
5. min	99,10 ± 4,35	96,10 ± 2,11	88,05 ± 5,98	90,08 ± 6,12	93,23 ± 4,82
6. min	102,22 ± 5,87	96,80 ± 1,61	86,73 ± 7,20	89,47 ± 8,33	93,18 ± 4,85
8. min	102,22 ± 5,87	96,16 ± 1,96	88,88 ± 4,27	89,77 ± 9,87	92,96 ± 5,48
10. min	101,24 ± 6,60	96,84 ± 2,00	87,89 ± 5,75	89,96 ± 9,30	92,60 ± 5,11
12. min	102,23 ± 8,58	97,51 ± 2,54	88,53 ± 4,24	91,06 ± 7,89	92,56 ± 3,06
14. min	102,15 ± 7,75	97,51 ± 2,54	89,34 ± 2,81	91,59 ± 9,81	94,25 ± 3,55
16. min	100,20 ± 7,17	97,53 ± 3,37	90,57 ± 3,62	93,54 ± 11,58	91,75 ± 4,95
18. min	100,12 ± 6,13	96,55 ± 2,71	89,43 ± 2,41	93,50 ± 11,27	92,64 ± 4,64
20. min	100,20 ± 7,17	96,55 ± 2,71	89,02 ± 2,76	94,22 ± 12,34	91,35 ± 3,43
25. min	98,90 ± 6,56	96,55 ± 2,71	89,06 ± 2,55	94,87 ± 13,97	89,70 ± 3,06

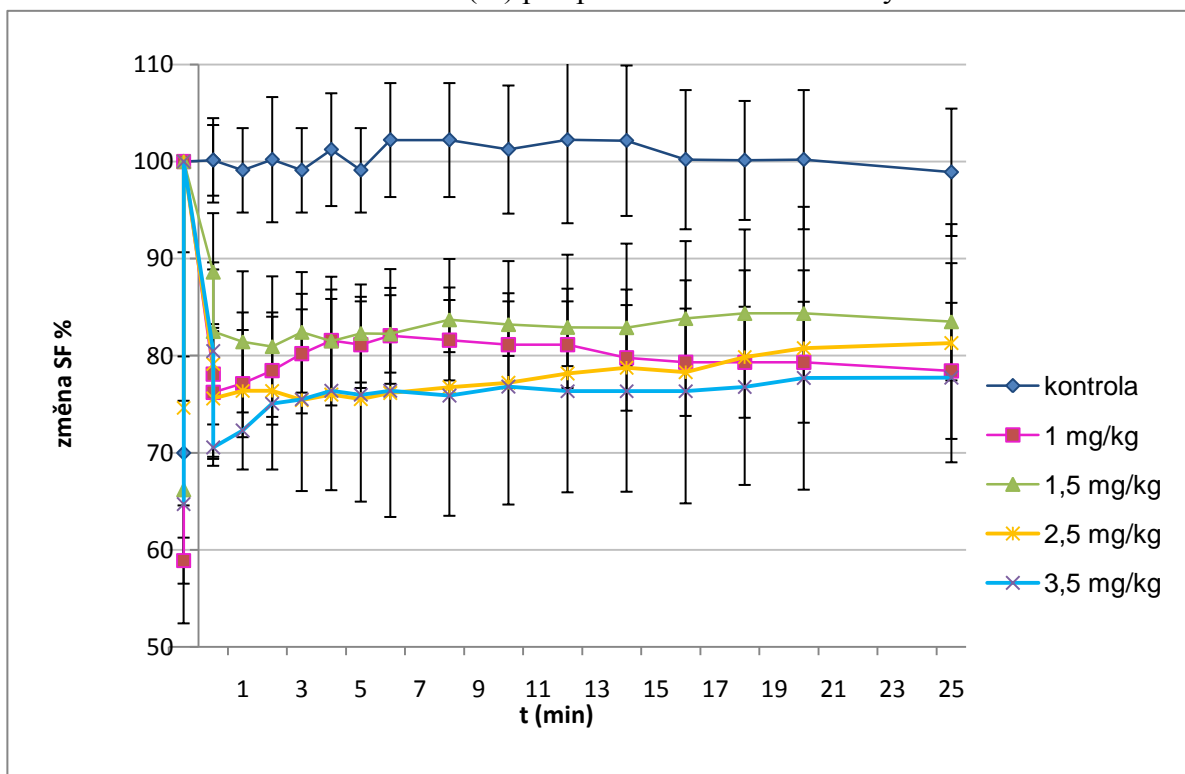
Tab.č. 2: Vliv esmololu na srdeční frekvenci

Časový úsek	Průměrná hodnota SF (%) ± směrodatná odchylka				
	kontrola	1,0 mg.kg ⁻¹	1,5 mg.kg ⁻¹	2,5 mg.kg ⁻¹	3,5 mg.kg ⁻¹
Poč. SF	69,97 ± 5,39	58,89 ± 2,37	66,18 ± 13,75	74,62 ± 16,04	64,71 ± 6,85
SF po ISO	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00
aplikace	100,13 ± 3,64	78,09 ± 5,17	88,61 ± 6,08	79,14 ± 10,48	80,47 ± 5,98
30. s	100,13 ± 4,35	76,23 ± 6,64	82,49 ± 6,40	75,60 ± 6,23	70,55 ± 3,28
1. min	99,10 ± 4,35	77,13 ± 5,52	81,43 ± 7,27	76,37 ± 8,09	72,30 ± 2,80
2. min	100,20 ± 6,45	78,46 ± 5,56	80,94 ± 7,24	76,37 ± 8,09	75,05 ± 1,72
3. min	99,10 ± 4,35	80,22 ± 6,16	82,41 ± 6,21	75,42 ± 9,36	75,51 ± 2,32
4. min	101,23 ± 5,81	81,57 ± 5,25	81,51 ± 6,63	76,00 ± 9,85	76,38 ± 2,40
5. min	99,10 ± 4,35	81,14 ± 4,46	82,29 ± 5,05	75,52 ± 10,55	75,97 ± 2,38
6. min	102,22 ± 5,87	82,05 ± 4,94	82,25 ± 3,99	76,16 ± 12,77	76,38 ± 2,38
8. min	102,22 ± 5,87	81,60 ± 4,14	83,70 ± 3,33	76,74 ± 13,23	75,88 ± 2,83
10. min	101,24 ± 6,60	81,14 ± 4,46	83,21 ± 3,23	77,21 ± 12,54	76,82 ± 2,92
12. min	102,23 ± 8,58	81,14 ± 4,46	82,92 ± 3,99	78,17 ± 12,24	76,34 ± 3,95
14. min	102,15 ± 7,75	79,78 ± 5,44	82,89 ± 3,93	78,77 ± 12,78	76,34 ± 3,95
16. min	100,20 ± 7,17	79,33 ± 5,53	83,83 ± 3,94	78,30 ± 13,51	76,34 ± 3,95
18. min	100,12 ± 6,13	79,33 ± 5,72	84,35 ± 4,45	79,85 ± 13,16	76,77 ± 4,93
20. min	100,20 ± 7,17	79,33 ± 6,23	84,35 ± 4,45	80,77 ± 14,57	77,71 ± 6,02
25. min	98,90 ± 6,56	78,44 ± 7,01	83,50 ± 6,04	81,29 ± 12,27	77,74 ± 5,63

Graf č. 1: Změna srdeční frekvence (%) po aplikaci látky **44Bu** v různých koncentracích



Graf č.2: Změna srdeční frekvence (%) po aplikaci **esmololu** v různých koncentracích



5. Diskuse

Finální látka - hydrochlorid 3-butylamino-2-hydroxypropylesteru kyseliny 4-butoxykarbonylaminobenzoová – byla připravena pětistupňovou syntézou.

V prvním kroku syntézy reagovala kyselina p-aminobenzoová s butylesterem kyseliny chlormravenčí v prostředí acetonu a pyridinu za vzniku 4-butoxykarbonylaminobenzoové kyseliny. Surová kyselina se rekrystalizovala z ethanolu. Výtěžek reakce byl velmi dobrý. Pyridin se přidával do reakční směsi proto, aby vychytával vznikající chlorovodík. Vedlejším reakčním produktem byl tedy pyridiniumchlorid, který byl z reakční směsi odstraněn promytím vodou, neboť je to látka velmi dobře rozpustná ve vodě.

Následně byl připraven chlorid kyseliny 4-butoxykarbonylaminobenzoové reakcí s thionylchloridem. Rekrystalizace surového chloridu proběhla z toluenu. Odsátý chlorid kvůli své nestabilitě nebyl dále sušen, ale byl ihned nasazen do další reakce.

V třetím kroku syntézy reagoval chlorid s 2,3-epoxypropan-1-olem za vzniku epoxysloučeniny. K vychytávání vznikajícího chlorovodíku byl použit triethylamin. Vznikající triethylamoniumchlorid vypadával z reakční směsi jako bílá jemně krystalická látka a byl oddělen od reakční směsi filtrací. Dodržením reakčních podmínek (teplota, rozpouštědlo, reakční čas) bylo docíleno spolehlivého průběhu reakce s poměrně dobrým výtěžkem.

Předposledním krokem syntézy byla reakce epoxysloučeniny s *n*-butylaminem. Vzniklá surová báze měla charakter ve vodě nerozpustné olejovité kapaliny, která se velmi dobře rozpouštěla v organických rozpouštědlech, a nebylo ji možno tedy přecistit rekrystalizací. Proto byla následně převáděna na sůl.

Jelikož hydrochloridy připravené přímo ze surové báze nebyly krystalické látky a nešlo je ani překrystalizovat, byla báze převedena nejprve na fumarát. Po rekrystalizaci z acetonu byl fumarát převeden zpět na bázi rozpuštěním ve vodě a přidáním roztoku hydrogenuhličitanu sodného, následně byla vzniklá báze vytřepána do chloroformu. Po vysušení síranem hořečnatým a vakuovém odpaření rozpouštědla byla získána báze ve formě bílé krystalické látky. Po rozpuštění v diethyletheru (dichlormethanu) byla následně převedena

na hydrochlorid reakcí s etherickým roztokem plynného chlorovodíku. Vzniklá sůl byla zfiltrována a rekrytalizována z propan-2-olu. Výtěžek hydrochloridu byl však kvůli ztrátám vzniklým během převádění báze na fumarát a zpět velmi nízký.

Struktura a čistota finální sloučeniny byla sledována pomocí ^1H - a ^{13}C -NMR spektroskopie a chromatografie na tenké vrstvě. Analýza NMR spekter jednoznačně potvrdila strukturu připravené látky.

6. Závěr

Byla připravena sloučenina 44Bu (hydrochlorid 3-butylamino-2-hydroxypropylester kyseliny 4-butoxykarbonylaminobenzoové) a její struktura a čistota byla potvrzena pomocí $^1\text{H-NMR}$ a $^{13}\text{C-NMR}$ spektroskopie a tenkovrstvé chromatografie (TLC)

Látka 44Bu již byla podrobena základnímu farmakologickému testování na antidisrytmickou účinnost, změnu srdeční frekvence a bradykardický účinek.

Antidisrytmická účinnosti – bylo prokázáno, že při aplikaci testované látky došlo k významnému snížení disrytmie. V případě testování na protektivní účinek, byla nejprve podána látka 44Bu a poté oubain, který vyvolává disrytmii. Výsledkem bylo zjištění, že ochranný efekt naší látky se nepotvrdil (nastaly disrytmie). V druhém pokusu byla nejdříve vyvolána disrytmie oubainem a pak se podávala naše látka. Ihned po aplikaci látky se vyvolané disrytmie snižovaly. Možným vysvětlením je právě krátkodobé působení látky 44Bu, tedy v prvním případě než došlo k aplikaci oubainu (5 min po aplikaci naší látky) a vyvolání dysrytmií, se naše látka v organismu metabolizovala.

Srdeční frekvence – byl zaznamenán prokazatelný krátkodobý bradykardický účinek. Oproti ostatním β -blokátorům navíc vykazuje látka velmi krátký účinek na změnu srdeční frekvence.

Bradykardický účinek - byl zjišťován vztah mezi dávkou a farmakologickým účinkem na modelu uměle vyvolané tachykardie a byl porovnán s účinkem esmololu. Nástup účinku byl velice rychlý, významný pokles srdeční frekvence byl zaznamenán již v momentu intravenózní aplikace, s výjimkou nejnižší dávky látky 44Bu. Největšímu poklesu došlo po aplikaci dávky $1,5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ a další zvyšování již nevedlo ke zvýšení účinku látky.

7. Seznam použité literatury

1) **Bartošová L., Frydrych, M., Vaculová, G., Beránková, K., Bébarová, M., Opatřilová, R., Strnadová, V., Mokry, P., Brunclík, V., Kolevská, J., Krčmář, J., Bartošíková, L., Florian, T., Nečas, J.:** Ultrashort Bradycardic Effect of Newly Synthesized Compounds. Acta Vet. Brno 75, 183-196, 2006.

2) **Bartosova, L., Novak, F., Bebarova, M., Frydrych, M., Brunclik, V., Opatrilova, R., Kolevska, J., Mokry, P., Kollar, P., Strnadova, V., Suchy, P.:** Antiarrhythmic effect of newly synthesized compound 44Bu on model of aconitine-induced arrhythmia - Compared to lidocaine. Eur J Pharmacol 575, 127-133, 2007.

3) **Borovanský, A.** Farmaceutická chemie III, Léčiva s účinkem na vegetativní nervový systém. 1. vyd. Brno: Farmaceutická fakulta VŠVF, 1994,

3) **Dokládál, M.** Systematická anatomie. III. 2. vyd. Brno: rektorát UJEP Brno, 1978, 55-032-78

4) **Mokry P., Csöllei J., Račanská E., Tumová I., Zemanová-Durmisová M.:** Synthesis and pharmacological evaluation of novel potential ultrashort-acting β -blockers. Pharmazie 58, 18-21, 2003.

3) **Skaunic, V.** Učebnice vnitřního lékařství, 1.svazek. 4. vyd. Praha: SPN, 1985, 17-297-85

4) **Trojan, S.** Fyziologie. 1. vyd. Praha: Avicenum, 1987, 08-027-87

www.anamneza.cz

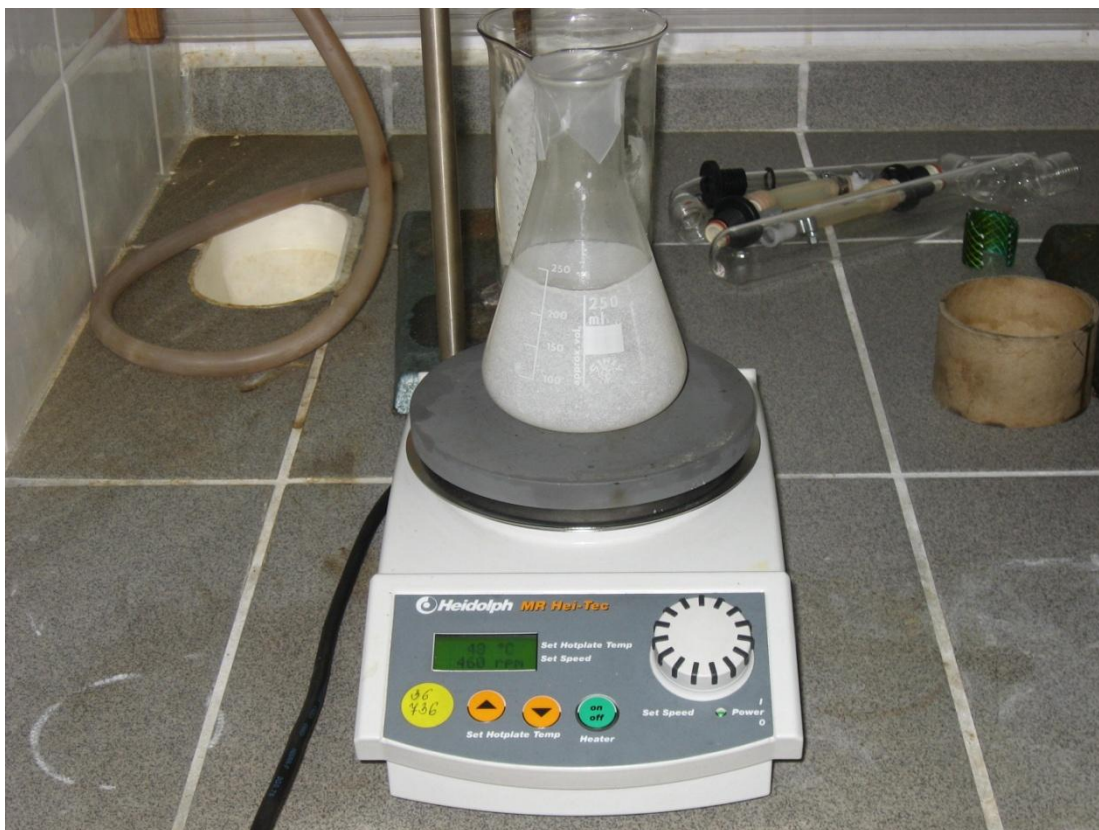
www.kst.cz

www.maxdorf.cz

www.medicabaze.cz

<http://slovník-cizích-slov.abz.cz/>

8.Přílohy



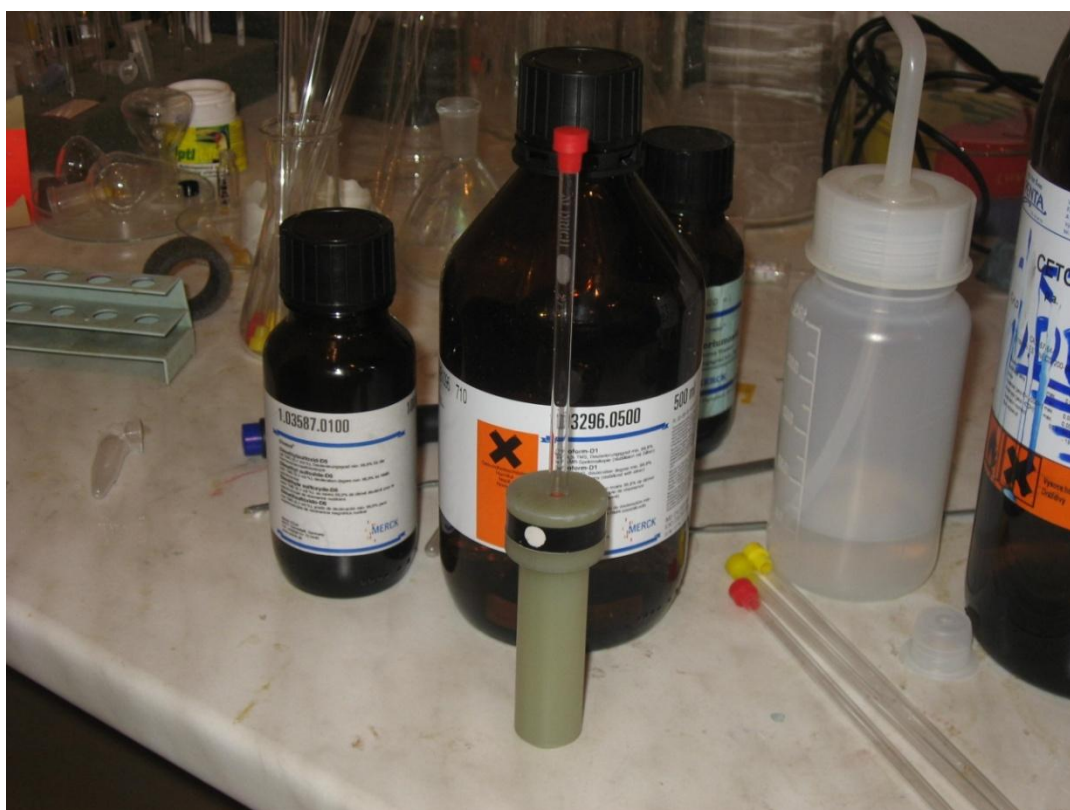
Obr. 1: Jedna z fází přípravy látky – zahřívání směsi



Obr.2: Vakuová destilace



Obr.3: Finální podoba látky 44Bu



Obr.4: Kyveta s rozpouštědlem



Obr.5: Nukleární magnetická rezonance



Obr.6: Koflerův blok – přístroj na stanovení teploty tání