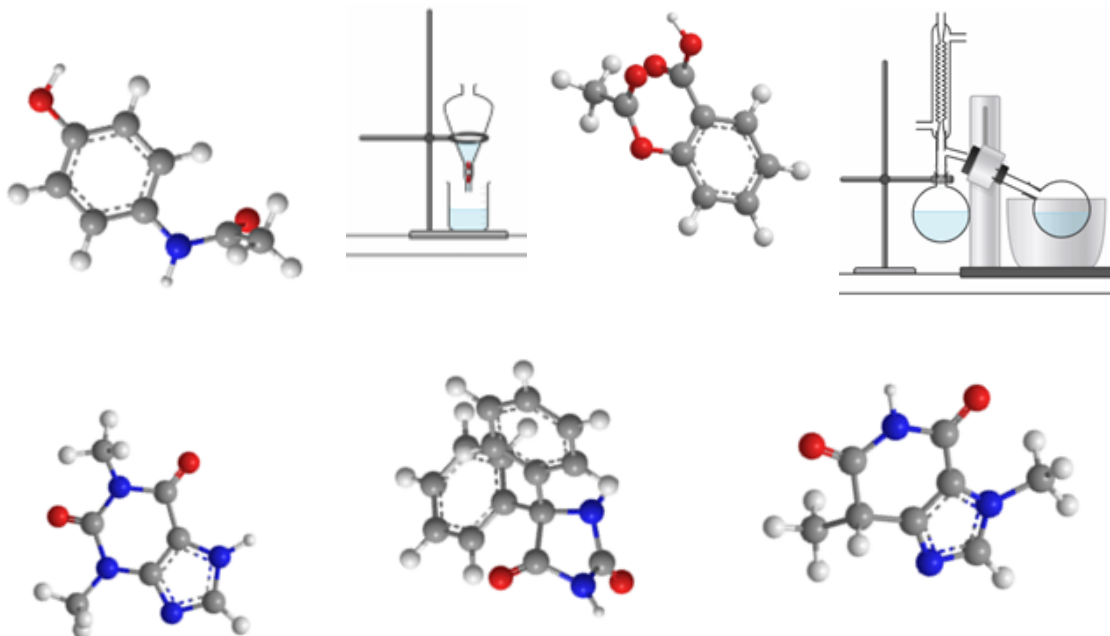


UNIVERZITA SV. CYRILA A METODA V TRNÁVE  
FAKULTA PRÍRODOPÝCH VIED



Peter Pemeček

# LABORATÓRNE CVIČENIA Z MEDICÍNSKEJ CHÉMIE



Trnava 2024

UNIVERZITA SV. CYRILA A METODA V TRNAVE  
FAKULTA PRÍRODNÝCH VIED



Peter Nemeček

# **LABORATÓRNE CVIČENIA Z MEDICÍNSKEJ CHÉMIE**

Trnava 2024

## LABORATÓRNE CVIČENIA Z MEDICÍNSKEJ CHÉMIE

**Autor:** Mgr. Peter Nemeček, PhD.

**Recenzenti:** doc. Ing. Jozef Sokol, CSc.  
Ústav chémie a environmentálnych vied, FPV, UCM Trnava

doc. Ing. Dáša Kružlicová, PhD.  
Katedra farmaceutickej analýzy a nukleárnej farmácie,  
Farmaceutická fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave

Publikácia bola schválená Edičnou radou Univerzity sv. Cyrila a Metoda v Trnave a vedením Fakulty prírodných vied v Trnave ako vysokoškolské skriptá.

© Univerzita sv. Cyrila a Metoda v Trnave

© Mgr. Peter Nemeček, PhD.

Všetky práva vyhradené. Toto dielo ani jeho časť nemožno reprodukovať bez súhlasu majiteľa práv.

Za jazykovú a štylistickú úpravu zodpovedá autor.

**Grafická úprava:** Mgr. Peter Nemeček, PhD.

**Vydavateľ:** Univerzita sv. Cyrila a Metoda v Trnave  
Fakulta prírodných vied

**Vydanie:** prvé, 2024

ISBN 978-80-572-0434-3

# Obsah

PREDSLOV	4
BEZPEČNOST PRÁCE V CHEMICKOM LABORATÓRIU	5
VYBRANÉ ANALYTICKÉ METÓDY PODĽA EURÓPSKEHO LIEKOPISU	10
KLINČEKOVÝ OLEJ A EUGENOL	14
PURÍNOVÉ ALKALOIDY	21
KYSELINA ACETYLSALICYLOVÁ	30
PARACETAMOL (ACETAMINOFÉN)	37
BENZOKAÍN	42
FENYTOÍN	50

## Predslov

Vývoj liečiv, ako aj kontrola ich bezpečnosti a kvality je dlhodobo diskutovanou a stále aktuálnou témou. Liečivá syntetického pôvodu sú súčasťou nášho každodenného života už viac než sto rokov. História nám ukázala nielen ich prínosy pri liečbe rôznych zdravotných problémov, ale aj úskalia ich vedľajších účinkov, zneužitia, nejasného mechanizmu účinkovania, či možnej toxicity ich prímiesí.

Toto skriptum sa zaoberá vybranými látkami, využívanými ako liečivá, resp. účinnými látkami v nich. Sumarizuje najmä základné informácie, históriu a aplikácie pri liečbe ochorení. Okrem týchto informácií obsahuje každá kapitola postup izolácie z prírodných zdrojov, alebo postup chemickej syntézy so všetkými potrebnými podkladmi: postupom práce, výpočtami, reakčnými schémami, nákresmi aparátúr, postupmi overenia a čistenia produktov. Každá z hlavných kapitol obsahuje aj vybrané časti príslušných článkov Európskeho Liekopisu. Skriptum je určené primárne pre študentov prvého ročníka magisterského štúdia Aplikovaná chémia so zameraním na biomedicínsku chémiu, avšak niektoré liekopisné skúšky možno inkorporovať ako laboratórne práce do ďalších predmetov.

autor

# Bezpečnosť práce v chemickom laboratóriu

BEZPEČNOSTNÉ A PREVÁDZKOVÉ PREDPISY PRE PRÁCU V CHEMICKOM LABORATÓRIU:

V predpisoch bezpečnosti práce v chemickom laboratóriu sa vychádza z normovaných literárnych zdrojov: STN 01 8003 (novelizovaná 2015).

V laboratóriách je dovoľené vykonávať len práce dané náplňou cvičenia alebo vychádzajúce z náplne činnosti diplomovej práce, aj to pod stálym dozorom eventuálne so súhlasom učiteľa. Laboratórne práce sa vykonávajú v miestnostiach zariadených podľa platných predpisov a vybavených zariadeniami, ktoré zodpovedajú platným bezpečnostným predpisom.

Z laboratórií musí byť bezpečný únik. Únikové cesty a manipulačné priestory v laboratóriách musia byť stále voľné.

Laboratórium je vybavené lekárničkou s pomôckami a prostriedkami prvej pomoci.

Laboratórium je vybavené dostatočným počtom vhodných hasiacich prístrojov. Hasiaci prístroj je umiestnený na viditeľnom a ľahko dostupnom mieste.

Každý pracovník musí byť oboznámený s obsluhou hasiacich prístrojov, so spôsobom privolania protipožiarnej pomoci a so spôsobom činností pri vzniku nebezpečných situácií.

Vstup do laboratória je povolený len v pracovnom odevu. Pokiaľ si to charakter práce vyžaduje, je nutné použiť ochranné okuliare. Ak si to vyžaduje charakter práce, musí pracovník pri práci používať ďalšie ochranné pomôcky (rukavice, štíty, zástery).

V chemických laboratóriách je zakázané jesť. Laboratórne nádoby sa nesmú používať k jedeniu, pitiu a k prechovávaniu potravín. Potraviny ani nápoje sa nesmú uchovávať v chladničkách, mrazničkách a podobných zariadení určených pre laboratórne použitie.

V laboratóriách musí byť udržiavaná čistota a poriadok. Zariadenie, prístroje a náradie musí byť udržiavané v práceschopnom a bezpečnom stave. Laboratórne nádoby, pracovný stôl a odev udržiujeme v čistote.

Zariadenia, prístroje a náradie sa musia po skončení práce odovzdať čisté, zbavené zvyšku chemikálií a zdraviu škodlivých látok.

Po skončení práce sa vykoná kontrola všetkých použitých zariadení. Kontroluje sa uzatvorenie všetkých prívodov energie, hlavne plynu, elektrických spotrebičov, vody.

Do vodovodných odpadov je zakázané vylievat' rozpúšťadla, jedy, výbušné látky, koncentrované kyseliny, hydroxidy a také látky resp. ich roztoky, ktoré pri styku s vodou, kyselinami a hydroxidmi uvoľňujú jedovaté alebo dráždivé plyny.

Odpadové kvapaliny a rozpúšťadla, ktoré nemožno regenerovať sa uskladňujú na určenom mieste v čitateľne označených nádobách (nebezpečný odpad- splashky, chloroform, éter, a pod.).

Olejové temperačné kúpele sa musia pri zahrievaní chrániť pred stykom s vodou. Ak vnikne do olejového kúpeľa voda (obsah kúpeľa vypení a môže dôjsť k požiaru) je nutné hneď prerušiť zahrievanie a kúpeľ vymeniť.

Na odsávanie agresívnych plynov musí byť v chemickom laboratóriu nainštalovaný digestor. Vetranie chemických laboratórií musí byť prispôsobené prácam, ktoré sa v laboratóriách vykonávajú a nesmú narušovať účinnosť digestorov podľa ON 910971.

## PRÁCA S CHEMIKÁLIAMI, HORĽAVINAMI, KYSELINAMI A HYDROXIDMI

### PRÁCA S CHEMIKÁLIAMI:

Skoro všetky chemikálie sú viac či menej toxické. Rozdeľujeme ich do dvoch podskupín:

1. na látky zdraviu škodlivé, ktoré pri vniknutí do organizmu spôsobujú jeho väčšie resp. menšie poškodenie, ale obyčajne nespôsobujú smrť;
2. na jedy, ktoré na rozdiel od prvej podskupiny po vniknutí do organizmu i v malých dávkach spôsobujú ťažké poškodenie organizmu, ktoré môže skončiť smrťou poškodeného.

Toxicita jedov a látok zdraviu škodlivých závisí na ich chemickom zložení, množstve, vstupe do organizmu, dĺžke expozície, na ich fyzikálnych vlastnostiach (hlavne na rozpustnosti v telových tekutinách) a tiež na dispozičných faktoroch jednotlivca.

Poznáme tri vstupy toxických látok do organizmu:

1. dýchacie cesty;
2. tráviaci trakt;
3. pokožku.

V študentskom laboratóriu je zakázané pracovať s jedmi. Pred nebezpečenstvom otravy chemickými látkami sa chránime nasledujúcimi preventívnymi opatreniami:

- pred začiatkom vlastných prác sa dôkladne oboznámime s fyzikálnymi a chemickými vlastnosťami (vrátane toxicity) používaných látok;
- tuhé chemikálie a látky ako je tuhý CO<sub>2</sub> neberieme nikdy do rúk, ale pre ich naberanie používame k tomu určené nádoby, resp. použijeme rukavice;
- po práci si vždy umyjeme ruky;
- s plynmi a kvapalinami pracujeme v digestóriu s účinným vetraním, prípadne používame ochrannú masku;
- pri práci so žieravinami si chránime ruky gumovými rukavicami;
- v laboratórnych nádobách, ktoré bežne používame, nikdy neskladujeme potraviny a nápoje;
- dbáme na dokonalé utesnenie aparatúry;
- pri pipetovaní agresívnych a jedovatých kvapalín používame výhradne bezpečnostné pipety a nasávame pomocou balónika alebo injekčnou striekačkou.

Ďalšie zásady, ktoré je potrebné dodržiavať pri práci s chemikáliami:

- pri všetkých operáciách s látkami v otvorených nádobách a skúmavkách musí byť ústie nádoby odvrátené od osoby ktorá s ňou manipuluje ako aj od iných pracovníkov;
- látky, ktorých rozpúšťaním sa uvoľňuje teplo, musia sa rozpúšťať po častiach za stáleho chladenia a miešania.

### PRÁCA S HORĽAVINAMI

Veľkú opatrnosť je treba dodržať pri práci s horľavinami. Niektoré horľaviny majú značnú prchavosť už pri laboratórnej teplote. Zahriatím sa vyparovanie zväčšuje a vznikajú vysoko výbušne zmesi pár so vzduchom. Pary horľaviny sú obyčajne ťažšie ako vzduch, preto sa vyskytujú pri zemi. Ak prilievame horľavinu do nádoby na stole, rozširujú sa pary po laboratórnom stole a môžu sa zapáliť od plameňa, ktorý je od miesta prelievania dosť vzdialený. Pri prelievaní horľavín je nutné všetky zdroje otvoreného plameňa uzavrieť.

Pri destilácii nízkovriacej horľaviny sa musí kontrolovať prietok vody chladičom a odstrániť z okolia aparatury všetky iné horľaviny do bezpečnej vzdialenosti.

Horľaviny nikdy nezahrievame priamym plameňom, používame vodné kúpele alebo elektrické tepelné hniezda.

Pri práci s horľavinami používame vždy okuliare alebo štít, do blízkosti aparatury si pripravíme hasiaci prístroj, ktorého použitie musíme dobre ovládať. Starostlivo skontrolujeme jednotlivé časti aparatury, či náhodou nie sú poškodené.

Zvyšky horľavín nikdy nevylievame do výlevky, ale do nádob špeciálne k tomu určených.

Fľaše s horľavinami sa plnia len do 3/4 objemu. Ak sa naplní fľaša väčším množstvom horľaviny, vzniká vo fľaši pretlak v dôsledku už zmienenej veľkej prchavosti pár, ktorá môže "vyraziť" zátku resp. vo výnimočných prípadoch aj roztrhnúť fľašu. Fľaše s horľavinami prenášame so zvýšenou opatrnosťou, nikdy nedržíme fľašu za jej hrdlo.

Skladovanie horľavín I. a II. triedy v sklenených alebo iných rozbitných nádobách s obsahom nad 5 litrov nie je v laboratóriu dovolené. Väčšie množstvo sa môže skladovať len v skladoch k tomuto účelu určených a viditeľne označených.

#### PRÁCA S KYSELINAMI A HYDROXIDMI

Kyseliny a hydroxidy sú silno leptajúce látky. Už malé kvapky spôsobujú na pokožke popáleniny a vážne poškodzujú oči.

Kyseliny a hydroxidy prelievame vždy za použitia lievika a fľašu držíme tak, aby sme nepoškodili označenie fľaše. Pri nalievaní používame vždy ochranné rukavice!

Pri riedení kyselín nalievame vždy kyselinu do vody - nikdy nie naopak!

Rozliatu kyselinu dusičnú neodstraňujeme pilinami, handrami ani inými organickými látkami a nečistíme ňou nádoby, ktoré sú znečistené organickými látkami - hrozí nebezpečenstvo búrlivých reakcií, vznik nitróznych plynov a samovznietenia. Rozliatu kyselinu splachujeme vodou, prípadne neutralizujeme (hydroxidom resp. soľou) a až potom používame piliny, handry a pod. rovnako postupujeme pri likvidácii iných rozliatych žieravín. Pokiaľ dôjde k rozliatiu väčšieho množstva, používame pri likvidácii gumové rukavice.

Pri rozpúšťaní tuhého hydroxidu nenalievame vodu na hydroxid, ale sypeme hydroxid do vody. Niektoré kvapaliny, obzvlášť hydroxidy pri zahrievaní často vystrekujú vplyvom utajeného varu. Tomuto javu sa dá predísť tým, že do varnej nádoby vhodíme pred zahrievaním niekoľko varných kamienkov (pemza, sklenené guľôčky), ktoré odolávajú účinkom zahrievanej látky a ktorú tiež neznečisťujú.

#### PRÁCA S HORĽAVÝMI PLYNMI

Laboratória je zakázané zahrievať priamym plameňom. Zapálené horáky (kahany) nie je dovolené nechať bez dozoru. Ak prenikne plameň dovnútra kahanu alebo dôjde k "uleteniu" plameňa, je potreba okamžite uzavrieť prívod plynu a kahan opraviť alebo vymeniť. •Pri zistení poruchy na plynovej inštalácii alebo na spotrebiči sa musí príslušný úsek ihneď uzavrieť! • Unikanie plynu z poškodenej inštalácie sa zisťuje penovými roztokmi. Nikdy sa nesmie používať priamy plameň.



## PRÁCA S TECHNICKÝMI PLYNMI

Na prepravu, manipuláciu, prácu a skladovanie ocelových fliaš so stlačenými skvapalnenými alebo pod tlakom rozpustenými plynmi platí norma V 718/2002.

Pri doprave je nutné chrániť ocelové fliaše s plynmi pred nárazom (veľké fliaše prenášajú stále dve osoby). Ventily fliaš musia byť pri tom dobre uzatvorené a musia mať ochranné klobúčiky. Fliaše, ktoré spadnú (plné alebo prázdne) je nutné vyradiť z prevádzky a viditeľne označiť. Nesmú byť používané tlakové fliaše, ktoré sú nejako poškodené alebo prejdenu skúšobnou dobou (je vyrazená na fliaši).

Fliaše s poškodenými a netesnými ventilmi musíme hneď vyradiť z prevádzky a nahlásiť dodávateľovi.

Na pracovisku (v laboratóriu), musia byť fliaše zaistené proti pádom remeňmi, reťazami a podobne, ktoré sú umiestnené na pevne zabudovanom zariadení (stena, digestor, laboratórny stôl a pod.).

Ocelové fliaše nesmú byť umiestnené v blízkosti tepelných zdrojov. Vzdialenosť ocelevej fliaše od horiaceho plameňa musí byť najmenej 3 m.

Laboratória, v ktorých sa tlakové fliaše používajú, musia mať na dverách z chodby viditeľne označenú tabuľku s udaním používaného plynu. Rovnako sklad fliaš musí byť viditeľne označený.

V laboratóriách smú byť uložené v blízkosti pracoviska najviac 2 zásobné fliaše rovnakého druhu plynu, ak sú zaistené tak, aby nepovolané osoby s nimi nemohli manipulovať. Pri väčšom počte pracovísk v budove nesmie celkový počet fliaš rovnakého druhu plynu prekročiť 15 kusov (prepočítané na fliašu po 40 litroch). Je zakázané skladovať a uchovávať fliaše naplnené plynom v priestoroch voľne prístupných, napr. na schodiskách, chodbách, v priechodoch, prejazdoch, a pod.

Tlakové fliaše plynov ťažších ako vzduch nesmú byť skladované v priestoroch pod úrovňou terénu (pivnice, šachty).

Z horiaceho pracoviska je nutné odstrániť najprv ocelové fliaše s plynmi.

Plyny sa smú z fliaš vypúšťať len cez redukčný ventil, určený pre daný plyn a označený príslušnou farbou.

Študentom je zakázané manipulovať s tlakovými fliašami (prenášanie, a pod.).

## USKLADŇOVANIE CHEMIKÁLIÍ

- Chemikálie musia byť skladované v nádobách vhodného materiálu podľa NV 355/2006, väčšinou zo skla označených presným názvom a musia byť uzatvorené. Uzávery a zátky sa musia voliť podľa povahy obsahu nádoby. Popis nádoby musí byť trvalý. Ak nie je popis dostatočne čitateľný, je vhodné chemikáliu zničiť.
- Látky, ktoré reagujú so sklom, sa musia skladovať buď v kovových alebo v umelohmotných nádobách. Možno je tiež použiť sklenené nádoby parafinované vo vnútri.
- Látky, ktoré sa rozkladajú účinkom svetla sa skladujú v nádobách z nepriehľadných materiálov alebo v nádobách z tmavého skla.
- Nádoby s kvapalinami sa musia chrániť pred priamymi slnečnými lúčmi a pred priamym teplom.
- Alkalické kovy musia byť skladované pod vrstvou vysokovracieho nereaktívneho rozpúšťadla, ako napríklad petrolej, parafínový olej, a pod.

- Biely fosfor sa uchováva pod ochrannou vrstvou vody. Úbytok kvapaliny sa musí doplňovať!
- Látky, ktorých miešaním môže dôjsť k nebezpečnej reakcii, sa musia skladovať oddelene od ostatných chemikálií (kyseliny - hydroxidy, oxidačné činidlá - horľaviny).
- Pokiaľ niektorá z chemikálií (hlavne jedy) je zároveň horľavinou alebo výbušninou, musí byť skladovaná podľa predpisov platných ako pre jedy, tak aj pre horľaviny resp. výbušniny.
- Nádoby s agresívnymi látkami nesmú byť skladované vo väčšej výške nad zemou (podlahou) ako 165 cm.

## ***Vybrané analytické metódy podľa Európskeho liekopisu***

Kapitola 2.2 Európskeho liekopisu opisuje fyzikálne a fyzikálno-chemické metódy. Nasledovný text uvádza výber y týchto metód. Text je zamýšľaný ako doplnujúci materiál a nadväzuje na tie vybrané časti z monografií, ktoré sú uvedené v jednotlivých kapitolách predkladaného skriptu.

### ***2.2.16. Bod topenia – bezprostredná metóda***

Bezprostredný bod topenia je vyrátaný podľa nasledujúceho vzorca:

$$\frac{t_1 + t_2}{2}$$

v ktorom  $t_1$  je prvá teplota a  $t_2$  je druhá teplota, odčítaná za podmienok opísaných nižšie.

**APARATÚRA**, zariadenie pozostáva z kovového bloku, odolného voči skúšanej látke, s dobrou zahrievacou kapacitou, ako napr. mosadz s plochým a starostlivo vylešteným povrchom. Blok je pravidelne zahrievaný skrz celú svoju hmotu buď plynovým ohrevom, alebo elektrickým zahrievacím telesom. V oboch prípadoch je dôležité, aby sa teplota dala detailne regulovať. Blok má cylindrickú štrbinu, do ktorej sa dá umiestniť teplomer a ktorá podporuje stabilnú pozíciu teplomera počas kalibrácie a stanovenia bodu topenia skúšanej látky. Cylindrická štrbina je paralelná s vrchným vylešteným povrchom bloku a je od neho vzdialená 3 milimetre. Zariadenie je kalibrované pomocou vhodných látok so známym bodom topenia.

**METÓDA**, zahrejte blok vhodnou rýchlosťou na teplotu približne 10 °C pod očakávaným bodom topenia. Následne upravte rýchlosť zahrievania na približne 1 °C/min. V pravidelných intervaloch spúšťajte malé množstvá skúšanej látky, rozdrobenej na prach (a kde je to relevantné, vysušenej) – pripravenej ako pre kapilárnu metódu\* – na blok v blízkosti teplomera. Po každom spustení skúšanej látky na blok povrch bloku vyčistite. Zaznamenajte teplotu, pri ktorej sa skúšaná látka roztopí okamžite pri prvom kontakte s kovom. Zastavte zahrievanie. Počas chladenia opäť spúšťajte v pravidelných intervaloch malé množstvá skúšanej látky na blok. Po každom spustení skúšanej látky na blok povrch bloku vyčistite. Zaznamenajte teplotu, pri ktorej sa skúšaná látka prestane rozpúšťať okamžite pri prvom kontakte s kovom.

**KALIBRÁCIA ZARIADENIA**, zariadenie môže byť kalibrované pomocou porovnávacích látok pre bod topenia, ako sú napríklad WHO porovnávacie látky, alebo pomocou iných vhodných látok.

\*relevantná časť prípravy vzorky pre kapilárnu metódu: hrubé kryštály by sa nemali merať, pretože môžu vykázať nesprávne výsledky. Preto, ak je to potrebné, treba vzorku podrviť na jemný prášok. Ak nie je v príslušnej monografii predpísané inak, jemne podrvený prášok treba sušiť vo vákuu nad bezvodým silikagélom po dobu 24 hodín.

### ***2.2.27 Tenkovrstvová chromatografia***

**PRINCÍP**, tenkovrstvová chromatografia je separačná technika, pri ktorej je stacionárna fáza, pozostávajúca z vhodného materiálu, rozptýlená v pravidelnej vrstve na podpornej (platni) zo skla, kovu, alebo plastu. Roztoky analytov sú pred vyvíjaním nanosené na platňu. Separácia je založená na adsorpcii, delení (separácii), iónovej výmene, alebo na kombinácii týchto mechanizmov a deje sa migráciou (vyvíjaním) roztokov analytov v rozpúšťadle, alebo vhodnej zmesi rozpúšťadiel (mobilná fáza) cez tenkú vrstvu (stacionárna fáza).

## ZARIADENIE:

PLATNE, chromatografia sa realizuje pomocou platní, nanesených konkrétnymi materiálmi, opísanými v kapitole Reagencie. V monografiách, ktoré umožňujú použitie bežných aj vysokoúčinných platní, je veľkosť častíc silikagélu uvedená v zátvorkách () po názve reagencie (materiálu).

*Predpríprava platní*, je možné, že pred separáciou je potrebné platne premyť. Premytie je možné dosiahnuť migráciou vhodného rozpúšťadla. Platne môžu byť tiež vopred impregnované výrobcami – vyvíjaním, ponorením, alebo sprejovaním. V čase použitia môžu byť takéto platne v prípade potreby aktivované zahriatím v sušiarňi na teplotu 120 °C po dobu 20 minút.

CHROMATOGRAFICKÁ KOMORA s rovným dnom alebo dvojitém kanálom. Komora je z inertného a priesvitného materiálu, vhodnej veľkosti pre používané platne. Je vybavená tesne dosadajúcim krytom. Pre horizontálne vyvíjanie sú komory vybavené kanálom pre mobilnú fázu a sú vybavené nástrojom na smerovanie mobilnej fázy ku stacionárnej fáze.

MIKROPIPETY, MIKROIHLY, KALIBROVANÉ JEDNORAZOVÉ KAPILÁRY alebo iné nástroje, vhodné na správne nanesenie roztokov.

FLUORESCENČNÉ DETEKČNÉ ZARIADENIA na meranie priamej fluorescencie alebo inhibície fluorescencie.

VIZUALIZAČNÉ ZARIADENIA A REAGENCIE. Na nanášanie derivatizačných činidiel na platňu sprejovaním, ponorením, alebo vystavením výparom a (kde je to relevantné) zahrievaním pre vizualizáciu separovaných látok sú používané vhodné zariadenia a nástroje.

DOKUMENTÁCIA. Na zabezpečenie dokumentácie vizualizovaného chromatogramu môže byť použitý nástroj, ako napríklad fotografia alebo počítačový súbor.

## POSTUP

NANÁŠANIE VZORKY. Naneste predpísaný objem roztokov vo vhodnej vzdialenosti od spodného okraja a od strán platne a na čiaru, súbežnú so spodným okrajom. Medzi jednotlivými stredmi nanesených objemov v tvare okrúhlych škvŕn zachovávajte voľný priestor dĺžky najmenej 10 mm (v prípade vysokoúčinných platní 5 mm). Medzi okrajmi pruhov zachovávajte voľný priestor dĺžky najmenej 5 mm (v prípade vysokoúčinných platní 2 mm). Nanášajte roztoky postupne v dostatočne malých porciách tak, aby ste dosiahli buď škvŕny okrúhleho tvaru s priemerom 2 – 5 mm (v prípade vysokoúčinných platní 1 – 2 mm), alebo pruhy rozmerov 10 – 20 mm (v prípade vysokoúčinných platní 5 – 10 mm) krát 1 – 2 mm.

V monografiách, ktoré umožňujú použitie bežných aj vysokoúčinných platní, sú pracovné podmienky pre vysokoúčinné platne udané v zátvorkách [], nasledujúcich po podmienkach pre bežné platne.

VERTIKÁLNE VYVÍJANIE. Vysteľte steny chromatografickej komory filtračným papierom. Nalejte do komory dostatočné množstvo mobilnej fázy podľa veľkosti komory tak, aby sa filtračný papier naimpregnoval v primeranej hĺbke vzhľadom na rozmery používaných platní. Komoru zakryte krytom a nechajte saturovať pri teplote 20 – 25 °C po dobu 1 hodiny. Ak monografia neuvádza inak, chromatografická separácia sa robí v saturovanej komore. Naneste predpísané objemy roztokov tak, ako je opísané vyššie. Keď sa z nanášaných roztokov odparí rozpúšťadlo, umiestnite platňu do chromatografickej komory. Uistite sa, že platňa je umiestnená v najlepšej možnej vertikálnej pozícii a že škvŕny a pruhy sú nad povrchom hladiny

mobilnej fázy. Komoru zakryte krytom a udržiavajte ju pri teplote 20 – 25 °C, chránenú pred slnečným svetlom. Keď mobilná fáza prejde predpísanou vzdialenosťou, vymieranú medzi miestom nanášania a čelom roztoku, vyberte platňu z komory. Vysušte ju a vizualizujte chromatogramy tak, ako je predpísané.

Pre dvojrozmernú chromatografiu vysušte platňu po prvom vyvíjaní a pokračujte druhým vyvíjaním v takom smere, ktorý je kolmý na smer prvého vyvíjania.

Parametre pre vhodnosť systému sú opísané vo všeobecnej kapitole 2.2.46. *Techniky chromatografickej separácie*. Rozsah povolených úprav chromatografických podmienok je uvedený v rovnakej kapitole.

## VIZUÁLNE HODNOTENIE

**IDENTIFIKÁCIA.** Hlavná škvrna chromatogramu skúšanej látky je vizuálne porovnaná s príslušnou škvrnou v chromatograme porovnávacej látky. Pri oboch škvrnách sa hodnotí farba, veľkosť a retardačný faktor ( $R_F$ ).

Retardačný faktor ( $R_F$ ) je definovaný ako pomer vzdialenosti od miesta nanášania do stredu škvrny a vzdialenosti čela roztoku od miesta nanášania.

### 2.2.32. Strata sušením

#### PRINCÍP

Strata sušením je strata hmotnosti po sušení za definovaných podmienok, vyjadrená ako percento (m/m).

Sušenie na konštantnú hmotnosť znamená, že dve po sebe nasledujúce vážená sa vzájomne neodlišujú o viac ako 0.5 mg, pričom druhé váženie nasleduje po prvom vážení po dodatočnej dobe sušenia nie kratšej ako 30 min za podmienok predpísaných pre skúšanú látku.

#### ZARIADENIE A VYBAVENIE

Zariadenie a vybavenie typicky pozostáva z:

- Navažovačky z vhodného inertného materiálu, ktorý sa dá dobre vysušiť na konštantnú hmotnosť; ich vnútorný priemer je dostatočne veľký na to, aby vrstva skúšanej látky nepresahovala hrúbku 5 mm.
- Analytické váhy, ktorými je možné merať zmenu hmotnosti o 0,1 mg.
- V závislosti od predpísaného postupu exsikátor, vákuový zásobník, vákuová sušiareň, alebo bežnú laboratórnu sušiareň; v každom prípade je teplota sušiarne regulovateľná na definovanú teplotu  $\pm 2$  °C; vákuové sušiarne sú vhodné, ak je tlak redukovateľný prinajmenšom na približne 2 kPa; sušiarne sú kvalifikované podľa zavedených postupov systémov kvality, napríklad použitím vhodných certifikovaných porovnávacích látok (môže byť použitá certifikovaná porovnávacia látka sodium aminosalicylate dihydrate for equipment qualification CRS).

Zariadenia, využívajúce iné spôsoby sušenia, ako sú mikrovlnné rúry, halogénové lampy, infračervené lampy, alebo zmiešané techniky, môžu byť použité za predpokladu, že ich vhodnosť pre tento účel je preukázaná.

#### POSTUP

Je odporúčané skúšku vykonávať v takom prostredí, ktoré má minimálny vplyv na meranie vzorky (napr. vhodnú vlhkosť).

Odvážte prázdnu navažovačku, ktorá bola vopred vysušená za podmienok, definovaných pre skúšanú látku po dobu najmenej 30 min. Následne odvážte navažovačku s predpísaným množstvom skúšanej látky. Vysušte na konštantnú hmotnosť, alebo po predpísanú dobu. Ak je teplota sušenia opísaná jednou hodnotou – teda nie rozpätím hodnôt, sušenie prebieha pri predpísanej teplote  $\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Ak nie je v monografii uvedené inak, použite jeden z nasledovných postupov:

- V exsikátore: sušenie prebieha nad približne 100 g molekulárneho sita R pri atmosférickom tlaku a laboratórnej teplote (*t. j.* 15 – 25  $^{\circ}\text{C}$ ).
- Vo vákuu: sušenie prebieha na približne 100 g molekulárneho sita pri tlaku nepresahujúcom 2,5 kPa, pri izbovej teplote, alebo pri teplote predpísanej v príslušnej monografii.
- V sušiarňi pri definovanej teplote: sušenie prebieha pri atmosférickom tlaku v sušiarňi s teplotou definovanou v príslušnej monografii.

Po sušení v sušiarňi nechajte navažovačku a vzorku vychladnúť na laboratórnu teplotu v exsikátore. Následne odvážte navažovačku, obsahujúcu vzorku.

Hmotnosť vzorky je rozdiel medzi hmotnosťou naplnenej navažovačky a prázdnej vysušenej navažovačky.

Strata sušením je rozdiel medzi hmotnosťou vzorky pred a po sušení, vyjadrená ako percento (rozumie sa hmotnostné).

## KLINČEKOVÝ OLEJ A EUGENOL

### VONNÉ LÁTKY

Silice, označované aj ako éterické oleje, sú zmesi prchavých látok s charakteristickým pachom (zvyčajne vôňou). V bežných rastlinných siliciach je možné identifikovať stovky rôznych organických látok, obsahujúcich výlučne atómy uhlíka, vodíka a kyslíka, pričom až na výnimky nevykazujú žiadnu toxicitu. Rastliny s typicky vysokým obsahom silíc sa označujú aj prívlastkom aromatické. Medzi typickú vlastnosť tekutých silíc patrí živičnatosť, teda postupné tuhnutie na svetle a vzduchu.

Silice majú široké spektrum biologických vlastností, využitelných pri liečbe rôznych zdravotných problémov. Používajú sa napríklad ako antitusiká (tlmia kašeľ – vňať tymianu), stomachiká (podporujú chuť do jedla – koriander, palinová vňať), diuretiká (močopudné – petržlenový koreň), karminatíva (proti plynatosti, nadúvaniu – rasca, aníz), sedatíva (na upokojenie – chmeľové šišťice, valerianový koreň) a anestetiká (na znecitlivenie – napr. pri bolesti zubov – klinčekovec). Tiež sa používajú na úpravu chute a arómy (vanilka) a ako koreniny (majorán a mnohé z tropických rastlín – napr. škoricovník). Blízky vzťah k siliciam majú okrem živíc (najznámejšia je kolofónia, pochádzajúca napr. z u nás rastúcej borovice lesnej) aj gumoživice a tekuté živice – balzamy (najznámejší je balzam peruánsky, pochádzajúci zo stromov druhu *Myroxylon balsamum*). Všetky silice pôsobia dezinfekčne a hojne sa upotrebovávajú v ľudovom liečiteľstve.

Z pohľadu chemickej štruktúry možno väčšinu zložiek silíc zaradiť medzi terpény. Sú to uhľovodíky tvorené z viacerých izoprénových jednotiek (nasýtené alebo nenasýtené), ktoré sú pospájané do rôznych štruktúr. Podľa počtu obsiahnutých izoprénových jednotiek sa delia na: monoterpény (10 uhlíkových atómov), seskviterpény (15 uhlíkových atómov), diterpény (20 uhlíkových atómov) atď.

Medzi významné zložky silíc patria aj kyslíkaté deriváty terpénových uhľovodíkov, jedná sa hlavne o alkoholy, aldehydy a ketóny. Typickým predstaviteľom aromatického alkoholu je eugenol (4-allyl-2-metoxyfenol), nachádzajúci sa v klinčekovej alebo v škoricovej silici. Pre svoje overené dezinfekčné a protizápalové účinky sa používa v stomatológii.

Zo skupiny aldehydov sú v siliciach známe napr. citronelal a citral (obidva sa nachádzajú v citronelovej silici, pochádzajúcej z medovky lekárskej). Citral (prírodný je zmesou cis- a trans-izomérov) má aj priemyselné využitie, používa sa ako východisková látka pri výrobe vitamínu A.

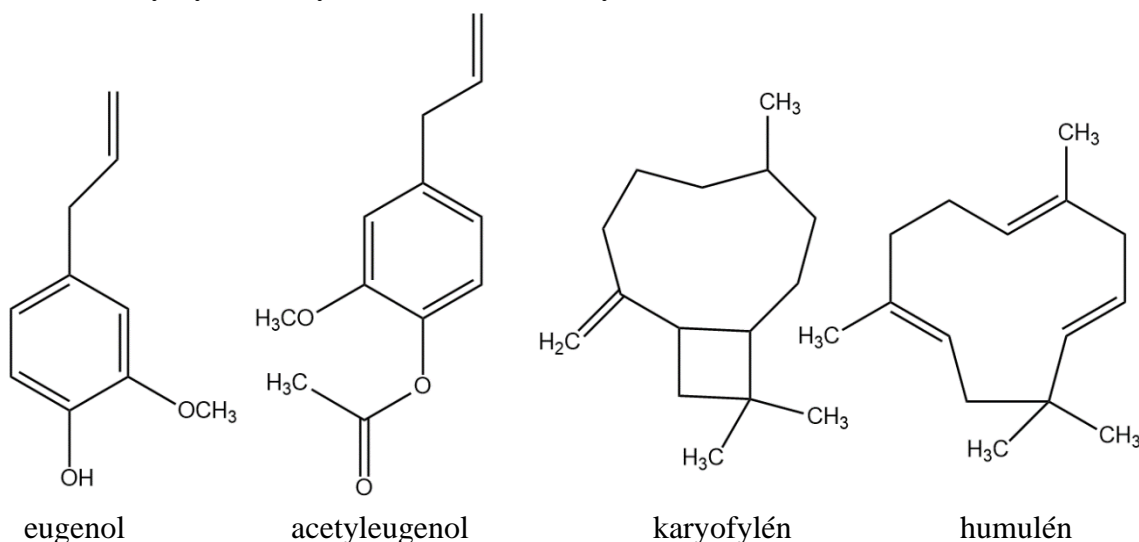
Tujón je známy monoterpén zo skupiny ketónov. Je to jedna z jedovatých silíc. Môže sa vyskytovať vo forme dvoch stereoizomérov, a to  $\alpha$ -tujón a  $\beta$ -tujón. Obsahujú ho rôzne rastliny. Triviálny názov zlúčeniny je odvodený od výskytu v tujových listoch. Tujón sa nachádza v zakázanom alkoholickom nápoji známom ako Absint. Absint sa pripravuje extrakciou zmesi rôznych rastlín, hlavne paliny pravej; avšak hlavnou zložkou silice z paliny je práve jedovatý tujón.

## SPÔSOB IZOLÁCIE SILÍC

Najčastejší spôsob izolácie silíc je destilácia podrveného rastlinného materiálu vodnou parou. V laboratórnych podmienkach sa takáto izolácia realizuje zohrievaním celých rastlín, alebo ich častí (listy, kvety, a pod.) zaliatych vodou vo varnej banke. Para sa do banky môže privádzať aj z oddeleného zdroja. Základným princípom izolácie je strhávanie silíc uvoľňujúcich sa pri zvýšenej teplote pomocou vodnej pary, ktorá sa po skondenzovaní v chladiči zachytáva. Silice sa vylúčia vo forme olejovitej vrstvy na povrchu zachyteného kondenzátu. Ďalším spracovaním kondenzátu sa táto vrstva oddelí, vysuší a prípadne prečistí (purifikuje). Pri získavaní silíc z citrusových plodov sa stále využíva aj klasický spôsob izolácie, tzv. lisovanie čerstvého oplodia za studena. Medzi najmodernejšie spôsoby získavania silíc z prírodných materiálov patrí extrakcia pomocou oxidu uhličitého v nadkritickom stave. Ten sa využíva pri extrakcii typu tuhá látka – kvapalina. Pre svoju netoxickú povahu sa nazýva i „zelené rozpúšťadlo“. Tento spôsob umožňuje izolovať napr. limonén z pomarančovej alebo citrónovej kôry a eugenol alebo škoricový aldehyd zo škorice.

### KLINČEKOVÁ SILICA (OLEJ)

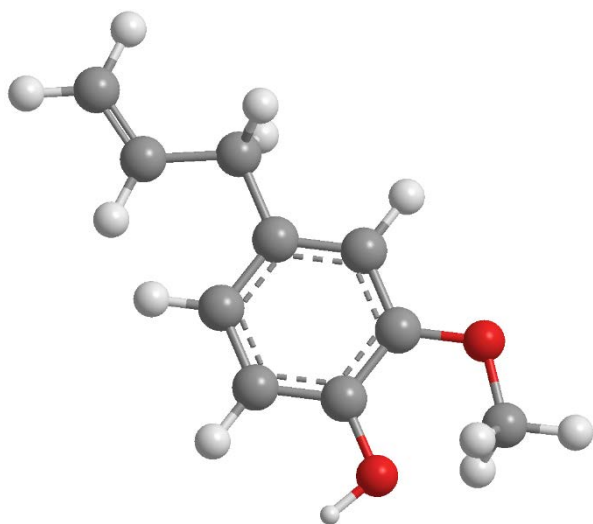
Klinčeková silica (*oleum caryophylli*) sa získava zo sušených kvetných pukov klinčekovca voňavého (*Syzygium aromaticum*) z čeľade myrtovité. Klinčekovec pochádza z Indonézie a pestuje sa aj inde v trópoch (Zanzibar, Madagaskar). Pod ľudovým názvom „klinček“ ho možno bežne kúpiť v obchode. Hlavnú obsahovú látku tvorí silica (15 – 26 %), v ktorej má majoritné zastúpenie eugenol (až 96 % z celkového obsahu silice). Ako minoritné zložky tejto silice boli identifikované acetyeugenol, furfural a seskviterpény humulén a karyofylén, ktorých chemické štruktúry sú uvedené nižšie.



Klinčekovec je ľahko rozpoznateľný podľa špecifickej aromatickej vône a korenistej chuti. Pri príprave jedál a nápojov sa často pridáva ako korenina zlepšujúca chuť do jedla a podporujúca vylučovanie tráviacich enzýmov. Ničením kvasných a hnilobných mikroorganizmov tiež pomáha normalizovať črevný mikrobióm. Tradiuje sa, že zvyk „žuvania klinčeka“ pri



oslovovaní cisára začal v Číne. Podobný zvyk bol aj na kráľovských dvoroch v Európe, napr. počas panovania kráľovnej Alžbety I.



#### EUGENOL

(2-metoxy-4-(prop-2-én-1-yl)fenol

Triviálne označovaný aj klinčekový olej sa extrahuje z korením klinčeka a škorice. Má príjemnú vôňu a používa sa aj pri výrobe parfumov. Na základe svojich dezinfekčných a lokálne anestetických účinkov sa spolu s oxidom zinočnatým používa ako materiál na vložky do kariéznych zubov a koreňov. Deriváty eugenolu sa používajú aj ako antioxidanty v gumárenskom priemysle a v priemysle plastov. Eugenol tvorí aj surovinu pre syntézu vanilínu.

#### POSTUP IZOLÁCIE EUGENOLU Z KLINČEKOV

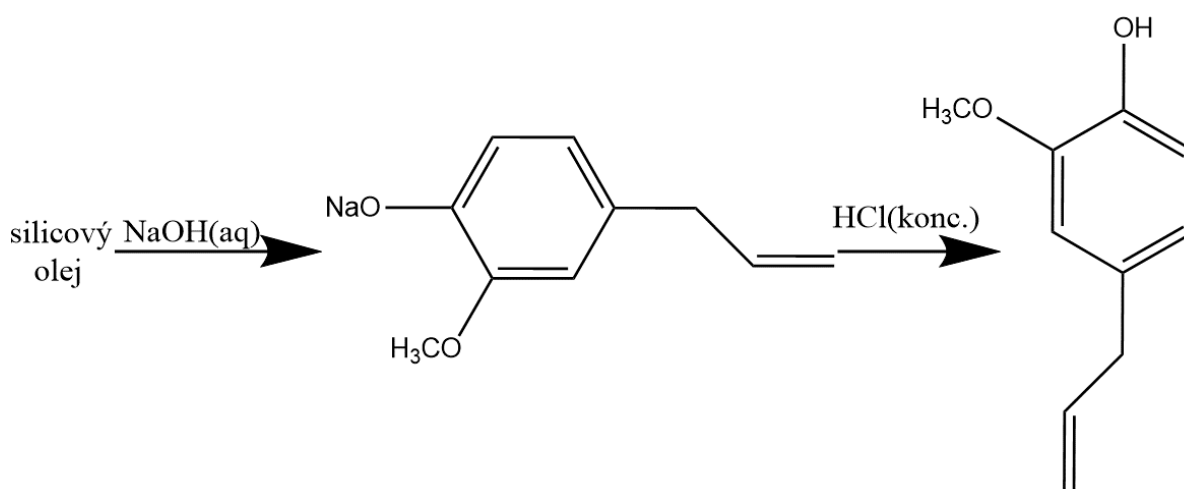
##### CHEMIKÁLIE A MATERIÁL:

dichlórmetán  
roztok NaOH (3 mol/l)  
koncentrovaná HCl (36 %)  
síran sodný ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , bezvodý)  
destilovaná voda  
dietyléter  
petroléter  
klinčeky

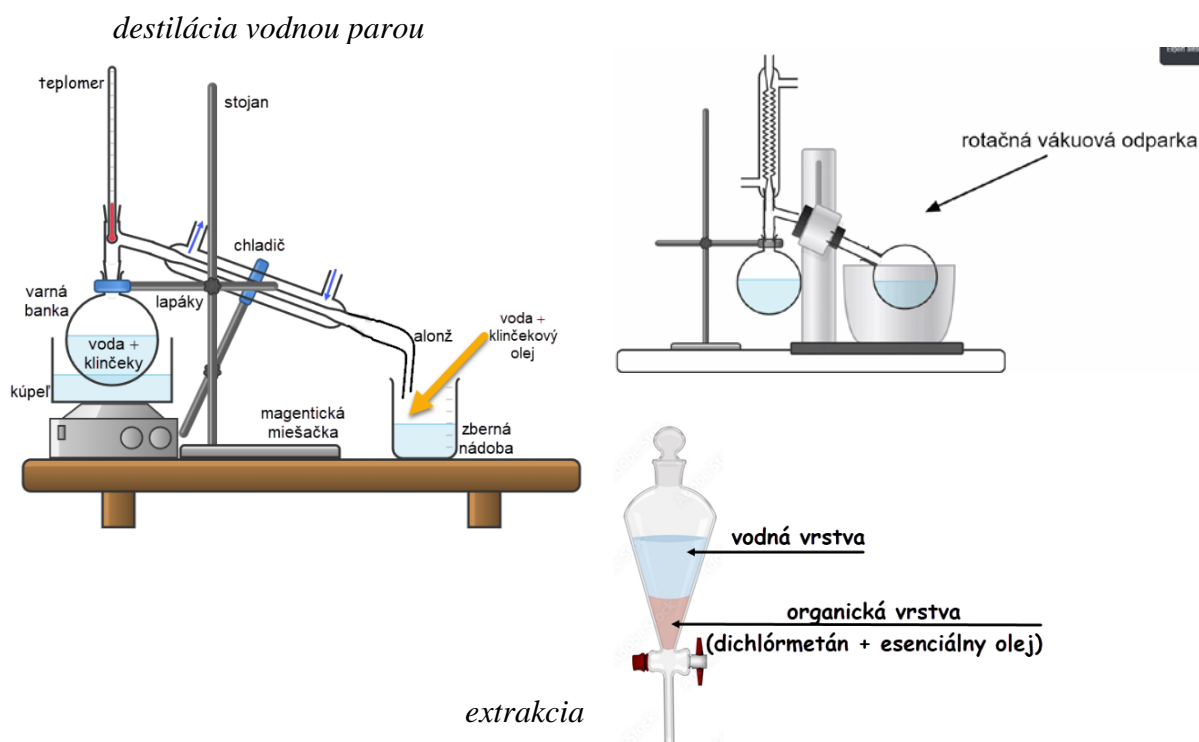
##### POMÔCKY:

destilačná banka  
Liebigov chladič  
oddeľovací lievik  
filtračný lievik  
banka s guľatým dnom  
kadička  
rotačná vákuová odparka (RVO)  
trecia miska

##### REAKČNÁ SCHÉMA:



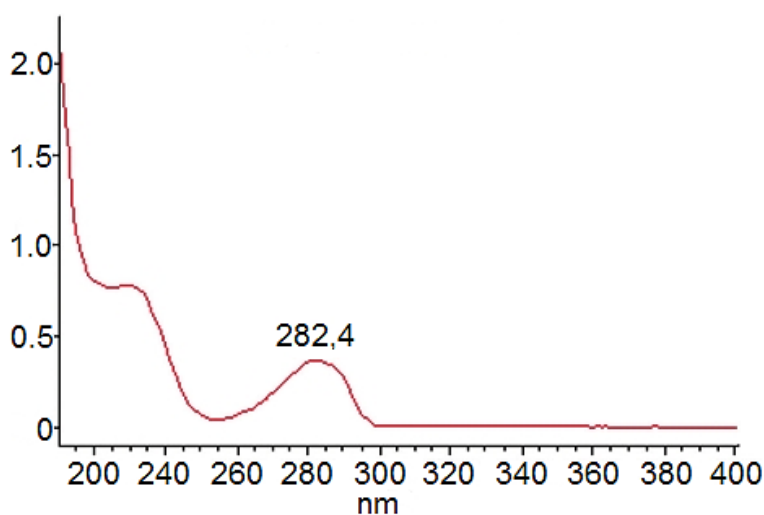
## POUŽÍVANÉ APARATÚRY A ZARIADENIA:



## PRACOVNÝ POSTUP:

- 1.) Do guľatej banky (250 ml) nasypeme 5 g klinčekov (rozdrvených v trecej miske) a pridáme 150 ml vody.
- 2.) Na banku nasadíme destilačný nástavec, teplomer a *Liebigov* chladíč s destilačnou predlohou, ústiacou do kadičky (250 ml) na zachytávanie destilátu.
- 3.) Banku s vodou a rastlinným materiálom zahrievame do varu, pričom zachytávame destilát mliečnej farby, obsahujúci silicu.
- 4.) Destilačnú banku zahrievame v olejovom kúpeli.
- 5.) Získaný destilát prenesieme do oddeľovacieho lievika. Silicu extrahujeme do dichlórmetánu, pričom vrchnú vodnú vrstvu extrahujeme dvomi 15 ml porciami dichlórmetánu a spodnú organickú vrstvu zberáme.
- 6.) Spojené organické vrstvy ďalej extrahujeme dvomi porciami roztoku hydroxidu sodného s koncentráciou 3 mol/l (pripravíme rozpustením 6 g NaOH v 50 ml vody). V tomto kroku sa eugenol prevedie na sodnú soľ, rozpustenú vo vodnej vrstve. Ostatné zložky izolovanej silice nie sú schopné zásaditej hydrolýzy, a preto zostanú v organickej vrstve.
- 7.) Sodnú soľ eugenolu, zachytenú v spojenej vodnej vrstve, prevedieme na eugenol pridávaním koncentrovanej kyseliny chlorovodíkovej, pričom kontrolujeme pH roztoku lakmusovými papierikmi. Pri dosiahnutí  $\text{pH} < 9$  sa ako mliečnobiela emulzia začne vylučovať vo vode nerozpustný eugenol.
- 8.) Opätovnou extrakciou do dichlórmetánu (podľa bodu 5.) izolujeme už čistý eugenol do spojenej organickej vrstvy.

- 9.) Organickú vrstvu vysušíme pomocou síranu sodného, ktorý následne odfiltrujeme cez skladaný filtračný papier.
- 10.) Roztok eugenolu v dichlórmetáne prelejeme do vopred odváženej guľatej banky (100 ml) a rozpúšťadlo odparíme na RVO. Odvážime získaný eugenol a vypočítame % obsah vo vzorke klinčekov.
- 11.) Čistotu overíme tenkovrstvovou chromatografiou:
- malé množstvo vzorky a štandardu rozpustíme v etanole;
  - vyvíjacia sústava: dietyléter / petroléter (2 : 1);
  - detekcia škvrn: pod UV lampou (254 nm);
  - určenie a porovnanie  $R_F$  hodnôt (produkt verzus štandard)
- 12.) Malé množstvo eugenolu rozpustíme v etanole. V kremennej kyvete zmeriame UV spektrum v rozsahu 200 – 350 nm. Namerané spektrum porovnáme so štandardom (obr. nižšie).



Ukážka UV spektra eugenolu

---

Vybrané časti z monografie európskeho liekopisu pre silicu kvetu klinčekovca  
(Ph. Eur., článok 01/2008:1091, úprava vo vydaní 7.6)

**Anglický názov:** Clove oil. **Latinský názov:** Caryophylli floris aetheroleum.

**Definícia:** Esenciálny olej získavaný destiláciou vodnou parnou sušených kvetných pukov rastliny *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. Et L.M.Perry (syn. *Eugenia caryophyllus* (Spreng.) Bullock et S.G.Harrison).

#### **Vlastnosti**

Vzhľad: číra, žltá kvapalina. Pri vystavení vzduch hnedne.

Rozpustnosť: miešateľná s dichlórmetánom, toluénom a masťnými kyselinami.

#### **Identifikácia:**

PRVÁ IDENTIFIKÁCIA: B (pozn. jedná sa chromatografický profil metódou plynovej chromatografie).

DRUHÁ IDENTIFIKÁCIA: A.

#### A. TENKOVSTVOVÁ CHROMATOGRRAFIA.

Skúšaný roztok. Rozpustite 20 µl skúšanej látky v 2,0 ml toluénu R.

Porovnávací roztok. Rozpustite 15 µl eugenolu R a 15 µl acetyeugenolu R v 2,0 ml toluénu R.

Platňa: TLC silikagél F<sub>254</sub> platňa R.

Mobilná fáza: toluén R.

Nanášanie: 20 µl skúšaného roztoku a 15 µl porovnávacieho roztoku (samostatné dráhy).

Vyvíjanie: dva krát v nenasýtenej nádobe, dĺžka dráhy 10 cm. Medzi jednotlivými vyvíjaniami nechajte odstáť 5 min.

Sušenie: vzduchom.

Detekcia A: pozorujte pod UV svetlom vlnovej dĺžky 254 nm. Označte škvrny.

Výsledky A: chromatogram skúšaného roztoku má v strednej časti škvrnu (eugenol), ktorá je pozíciou podobná škvrne na chromatograme porovnávacieho roztoku. Tesne pod touto škvrnou je viditeľná slabá škvrna (acetyeugenol), ktorá je pozíciou podobná škvrne acetyeugenolu na chromatograme porovnávacieho roztoku.

Detekcia B: nasprejajte [roztokom anízaldehydu R](#). Pozorujte pri dennom svetle za zahrievania na 100 – 105 °C po dobu 5 – 10 min.

Výsledky B: na chromatogramoch skúšaného roztoku a porovnávacieho roztoku sú výrazné hnedo-fialové škvrny prislúchajúce eugenolu. Na chromatograme skúšaného roztoku je mizivá fialovo-modrá škvrna prislúchajúca acetyeugenolu. Na chromatograme skúšaného roztoku sú aj ďalšie farebné škvrny, obzvlášť mizivá červená škvrna v spodnej časti dráhy a červenasto-fialová škvrna (β-karyofylén) vo vrchnej časti dráhy.

#### **Skúšky**

Relatívna hustota: 1,030 až 1,063.

Index lomu: 1,528 až 1,537.

Optická otáčavosť: - 2° až 0°.

Mastné kyseliny a živicové esenciálne oleje. Vyhovujúci výsledok testu.

Rozpustnosť v alkohole. 1,0 ml je rozpustných v 2,0 ml (alebo väčšom množstve) 70 (v/v %) etanolu R.

### Liekopisné prípravy uvedených roztokov a iné súvisiace texty

**Roztok anízaldehydu R:** zmiešajte nasledovné reagenty - zachovajte poradie: 1.) 0,5 ml anízaldehydu R, 2.) 10 ml ľadovej kyseliny octovej, 3.) 85 ml metanolu R, 4.) 5 ml kyseliny sírovej R.

**Liekopisná skúška podľa kapitoly 01/2008:20807 Mastné kyseliny a živicové esenciálne oleje v esenciálnych olejoch:** Kvapnite 1 kvapku esenciálneho oleja na filtračný papier. V priebehu 24 hodín sa kvapka úplne vyparí a nezanechá ani priehľadný, ani mastný flák.

**Eugenol** (4-Allyl-2-methoxyphenol) - bezfarebná alebo bledožltá olejovitá kvapalina. Pri vystavení vzduchu a svetlu tmavne a stáva sa viac viskóznou. Prakticky nerozpustná vo vode, miešateľná s 96 % etanolom a s mastnými a esenciálnymi olejmi.  $d_{20}^{20}$ : približne 1,07. Bod varu: približne 250 °C.

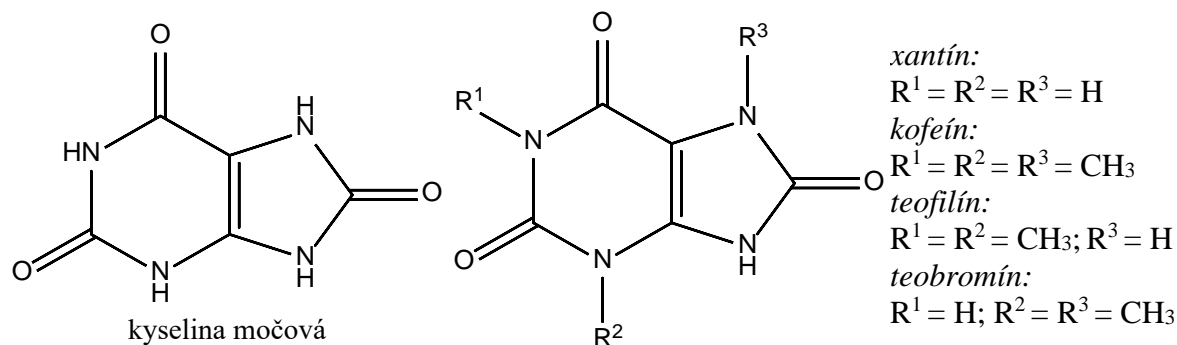
### ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY:

- BARANEC, T., POLÁČIKOVÁ, M., KOŠTÁL, J.: *Systematická botanika*, Vydavateľstvo Universum v spolupráci s Nadáciou Ochrana genofondu rastlín, 1998.
- EUROPIAN PHARMACOPOEIA 11.3
- HRNČIAR P.: *Organická chémia*, SPN Bratislava, 1990.
- JADHAV B.K., KHANDELWAL K.R., KETKAR A.R., PISAL S.S.: Formulation and evaluation of mucoadhesive tablets containing eugenol for the treatment of periodontal diseases. In: *Drug Dev Ind Phar.*, 2004, 30 (2), p. 195–203. DOI 10.1081/DDC-120028715.
- KRESÁNEK, J.: *Atlas liečivých rastlín a lesných plodov*, Vydavateľstvo Osveta, Martin, 1982.
- MEČIAROVÁ M., SIGMUNDOVÁ I., POLÁČKOVÁ P., et al.: *Podme experimentovať...*, UK (ISBN 978-80-223-2857-9), 2010.
- ŠKÁRKA B., FERENČÍK M.: *Biochémia*, Alfa Bratislava, 1983.
- TAO G., IRIE Y., LI D.J., KEUNG W.M.: "Eugenol and its structural analogs inhibit monoamine oxidase A and exhibit antidepressant-like activity". In: *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2005, 13 (15), p. 4777–88. doi:10.1016/j.bmc.2005.04.081
- TISSERAND, R., YOUNG, R.: *Essential oil safety : a guide for health care professionals*, ISBN 978-0443062414, Edinburgh, 2013, p. 73.
- TSUCHIYA H.: "Anesthetic Agents of Plant Origin: A Review of Phytochemicals with Anesthetic Activity". In: *Molecules*, 2017, 22 (8), p. 1369. doi:10.3390/molecules22081369

## PURÍNOVÉ ALKALOIDY

Purínové alkaloidy sú zlúčeniny odvodené od xantínu a kyseliny močovej.

Deriváty xantínu sú všeobecne známe, najmä *kofeín*, *teofilín* a *teobromín*. Navzájom sa odlišujú prítomnosťou alebo absenciou metylovej skupiny a jej polohou na základnom xantínovom skelete (obr. nižšie).



Purínové alkaloidy sú dusíkaté bázičné látky bežne sa vyskytujúce v listoch a semenách rastlín, prípadne ich plodoch. Takýchto rastlín je známych viac ako 100 a sú rozšírené po celom svete. Najznámejšie prírodné zdroje vyššie uvedených xantínových alkaloidov sú:

- a) káva: semeno kávové (*semen coffeae*) najčastejšie druhov kávovníka arabského - *Coffea arabica* L. a kávovníka mohutného - *C. robusta* Chev.
- b) čaj: list čajovníkový (*folium theae*) najčastejšie z druhov kamélie čínskej - *Camellia sinensis* (L.) O. Katze a čajovníka čínskeho - *Thea sinensis* L.
- c) kakao: semeno kakaové (*semen cacao*) kakaovníka pravého - *Theobroma cacao* L.
- d) koka-kola: semeno kolové (*semen colae*) z koly lesklej - *Cola nitida* (Vent.) Shott et Endl.
- e) maté: list maté (*folium maté*) cezmíny paraguajskej - *Ilex paraguaiensis* St. Hil.
- f) guarana: (*pasta guarana*) s najvyšším obsahom kofeínu; pripravuje sa zo semien, z rozdrvených a pražených klíčnych listov paulínie nápojovej - *Paullinia cupana* H.B.K.

### KOFEÍN

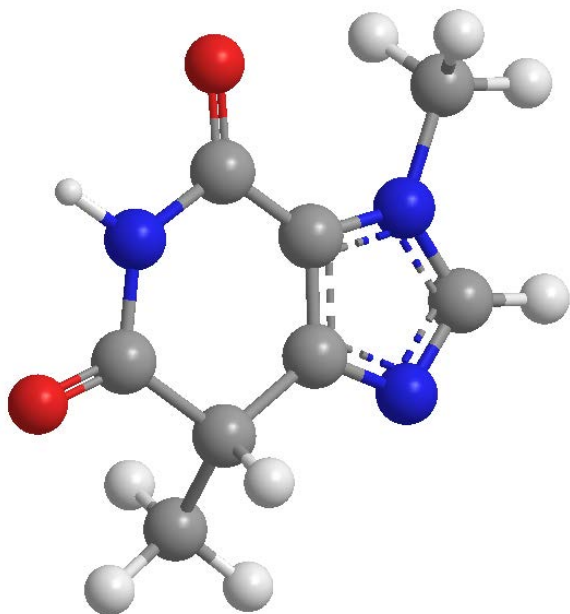
Systémovým názov: 3,7– dihydro– 1,3,7– trimetyl– 1*H*– purín–2,6–dión.

Obsah kofeínu v rastlinách mení v závislosti od druhu, resp. variety konkrétnej rastliny, miesta pestovania a môže sa meniť počas rastu a obdobia zberu. V nasledujúcej Tabuľke je uvedené porovnanie priemerného obsahu kofeínu v rôznych rastlinách:

rastlina	obsah kofeínu v %
paulínia nápojová	4,3
čajovník	2,0 – 4,5
kola lesklá	2,7
káva	0,3 – 2,5
cezmína paraguajská	0,9
citrónovník obrovský (pomelo)	0,9
kakaovník pravý	0,7

## KOFEÍN A KÁVA

Charakteristická horká chuť kávy vzniká pri procese spracovania kávových zŕn. Aj napriek tomu, že samotný kofeín má tiež horkú chuť, ku celkovej výslednej horkej chuti kávy prispieva vzhľadom na svoju nízku koncentráciu len malým podielom. Kofeín pôsobí povzbudivo na centrálny mozgový systém, rozširuje vencovité i mozgové cievy (zlepšuje prekrvenie a mozgovú činnosť) a rozširuje aj cievy obličiek (diurézu).



**KATEGÓRIA LIEČIVA:** stimulant, analeptikum, relaxačné účinky na hladké svalstvo (bronchodilatancium)

**VLASTNOSTI:** kryštalický *kofeín* tvorí biele ihlicovité kryštály. Pri miernom zahriatí sublimuje. Má dobrú rozpustnosť v studenej vode a výbornú rozpustnosť v horúcej vode, podobne je to aj v chloroforme. Menej sa rozpúšťa v etanole a zlú rozpustnosť má v éteri. Jeho teplota topenia je 235 – 239 °C.

Nežiadúce účinky, resp. škodlivosť *kofeínu* sú nejednoznačné. Každý človek však reaguje na prísun *kofeínu* individuálne. Denná dávka *kofeínu* do 300 mg by nemala mať nepriaznivé účinky. Smrteľná dávka kofeínu (LD<sub>50</sub>) je pri orálnom užití 150 mg/kg, inak povedané cca

12 g *kofeínu* na 80 kg vážiaceho človeka, čo zodpovedá asi 20 litrom kávy. Najvyššia zaznamenaná dávka, ktorú človek prežil, bola 24 g *kofeínu*. Predávkovanie (napr. skonzumovanie viac ako 300 mg *kofeínu* na jedenkrát, čo zodpovedá asi pol litru kávy) sa môže prejaviť búšením srdca, pocitmi strachu, bolesťami hlavy, červenou tvárou, poruchami koncentrácie, závratmi a halucináciami, trasením rúk, častým močením, zrýchlením tepu a zvýšením telesnej teploty. Je dobré poznamenať, že niektoré z nežiadúcich účinkov (podráždenie žalúdka a nepríjemné pocity spojené tlaku na žalúdku, kŕčov, hnačiek a zníženej chuti do jedla) môžu byť spôsobené produktmi praženia kávy a kyselinou chlorogénovou. Keďže *kofeín* sa dobre rozpúšťa vo vode, neusadzuje sa v organizme a behom niekoľkých hodín je z neho vylúčený.

Vo farmakológii sa *kofeín* používa ako súčasť niektorých liečiv. V malých dávkach stimuluje centrálnu nervovú sústavu, má bronchodilatačné účinky, v kombinácii s analgetikami sa užíva pri bolestiach hlavy, má močopudné účinky.

Priemyselne sa *kofeín* získava z odpadového čajového prachu. Medzi moderné technológie patrí získavanie z kávy pri príprave tzv. bezkofeínovej kávy, kedy sa využíva extrakcia oxidom uhličitým v nadkritickom stave. Táto metóda spĺňa trend nových technológií zavádzať také postupy, ktoré znižujú množstvo používaných toxických a karcinogénnych rozpúšťadiel.

Značná časť svetovej spotreby *kofeínu* sa získava modifikáciou príbuzného *xantínového* derivátu, alebo metyláciou *teobromínu*, ktorý sa nachádza v kakaovníkových šupkách, získaných z odpadu pri výrobe kakaového prášku.

## POSTUP IZOLÁCIE KOFEÍNU

Prakticky sa dá *kofeín* v laboratórnych podmienkach dobre izolovať z čierneho čaju, v ktorom sa nachádza v množstve od 2,0 do 4,5 % (v závislosti od pôvodu a spracovania čaju). Pri izolácii sa volí postup extrakcie kofeínu z vodného odvaru.

### CHEMIKÁLIE A MATERIÁL:

10 g uhličitanu sodného ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )

100 ml chloroformu ( $\text{CHCl}_3$ )

síran sodný bezvodý ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )

etanol, 95 % ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ )

destilovaná voda

20 g kávy alebo čierneho čaju

### POMÔCKY:

kadička (500 ml)

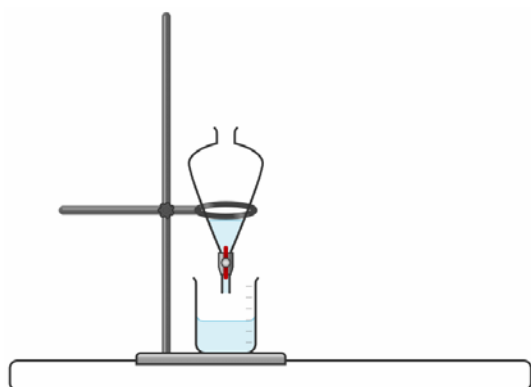
odsávací banka

Büchnerov lievnik

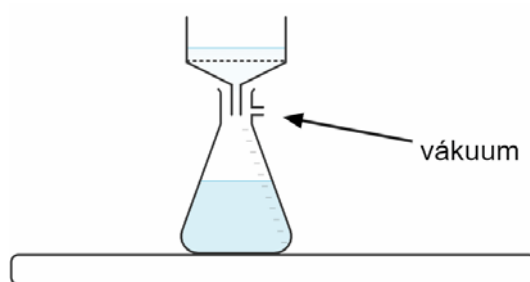
oddeľovací lievnik (500 ml)

rotačná vákuová odparka

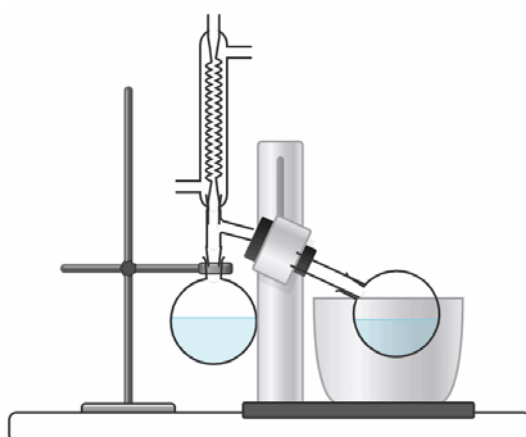
### POUŽITÉ APARATÚRY A ZARIADENIA:



extrakcia



filtrácia pri zníženom tlaku



rotačná vákuová odparka



#### POSTUP IZOLÁCIE KOFEÍNU Z ČIERNEHO ČAJU ALEBO KÁVY:

- 1.) Do 500 ml kadičky odvážime 20 g čierneho čaju alebo kávy, 10 g uhličitanu sodného a pridáme asi 200 ml vody. Varíme na variči cca 20 min.
- 2.) Zmes premiešame sklenenou tyčinkou a za horúca rýchlo prefiltrujeme cez Büchnerov lievik.
- 3.) Po ochladnutí na laboratórnu teplotu filtrát preniesieme do oddeľovacieho lievika a pridáme k nemu 50 ml chloroformu. Opatrne extrahujeme, aby nevznikli emulzie.
- 4.) Po oddelení vrstiev spodnú, chloroformovú, vrstvu vypustíme a odložíme.
- 5.) Hornú, vodnú, vrstvu ešte raz extrahujeme rovnakým spôsobom pomocou chloroformu v objeme 50 ml.
- 6.) Zachytené organické vrstvy spojíme a vysušíme státím nad  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  po dobu asi 15 min.
- 7.) Tuhý podiel odfiltrujeme cez skladaný filtračný papier do vopred odváženej guľatej varnej banky (100 ml).
- 8.) Chloroform oddestilujeme pomocou RVO (rotačnej vákuovej odparky).
- 9.) Surový produkt odvážime, stanovíme jeho teplotu topenia a porovnáme s referenčnou hodnotou (234 – 235 °C).
- 10.) Vypočítame percentuálny obsah kofeínu vo vzorke.

#### ZÍSKANÝ KOFEÍN MÔŽEME ĎALEJ PREČISTIŤ VIACERÝMI SPÔSOBMI:

- a) sublimáciou pri normálnom tlaku a teplote 180 – 200 °C
- b) kryštalizáciou z 95 % etanolu:
  - podľa hmotnosti surového produktu a rozpustnosti (1 g v 5 ml) si vypočítame množstvo etanolu, potrebného na kryštalizáciu,
  - vo vypočítanom množstve etanolu za horúca rozpustíme produkt a preniesieme do kryštalizačnej misky, položenej na ľade,
  - vylúčené kryštály odsajeme a vysušíme na vzduchu.
- c) vylučovaním z jeho acetónového roztoku pomocou izohexánu:
  - produkt rozpustíme postupným pridávaním horúceho acetónu,
  - do acetónového roztoku pridávame pomaly izohexán až do vytvorenia jemného zákalu,
  - zmes necháme ochladnúť a kryštalizovať,
  - vylúčené kryštály odsajeme a sušíme na vzduchu.

#### IDENTIFIKÁCIA PRODUKTU POMOCO U TENKOVRSŤVOVEJ CHROMATOGRAFIE:

Identifikáciu a overenie čistoty izolovaného kofeínu môžeme zrealizovať tenkovrstvovou chromatografiou (TLC). Jednozložková zmes (čistá látka) v chromatografii na tenkej vrstve vykazuje iba jednu škvrnu.

Postup: Malé množstvo izolovaného kofeínu a štandardu rozpustíme v 0,5 ml chloroformu. Malé množstvo (kvapku) takto pripravených roztokov naniesieme pomocou tenkej kapiláry na naznačený štart na silufolovej platni (s indikátorom pre UV detekciu pri 254 nm) vedľa seba s rozstupom aspoň 1 cm. Platňu dáme do vyvíjacej komory s elučnou zmesou (95 % chloroformu a 5 % metanolu). Necháme vyvíjať, pokiaľ eluent vystúpi do výšky cca 0,5 cm od horného okraja platne. Jednotlivé látky (produkt, štandard, príp. nečistoty) detegujeme pod UV lampou ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ) ako škvrny, ktoré obkreslíme ceruzkou a vypočítame ich  $R_F$  hodnoty.

---

Vybrané časti z monografie európskeho liekopisu pre kofeín  
(Ph. Eur., článok 01/2020:0267)

**Anglický názov:** Caffeine. **Latinský názov:** Coffeinum.

**Definícia:** 1,3,7-Trimetyl-3,7-dihydro-1H-purine-2,6-dione.

**Obsah:** 98.5 % až 101.5 % (na sušinu).

**Vlastnosti**

Vzhľad: biely alebo takmer biely kryštalický prášok alebo jemné kryštály.

Rozpustnosť: slabo rozpustný vo vode, voľne rozpustný vo vriacej vode, mierne rozpustný v 96 % etanole. Rozpúšťa sa v koncentrovaných roztokoch alkalických benzoátov alebo salicylátov.

Rýchlo sublimuje.

**Identifikácia**

Prvá identifikácia: A, B, E.

Druhá identifikácia: A, C, D, E, F.

**A.** Bod topenia: 234 °C až 239 °C.

**B.** Infračervená spektrofotometria.

Porovnávacia látka: certifikovaná porovnávacia látka **caffeine CRS**.

**C.** Do 2 ml nasýteného roztoku skúšanej látky pridajte 0,05 ml **jódovaného roztoku jodidu draselného**. Roztok ostane číry. Pridajte 0,1 ml **zriedenej kyseliny chlorovodíkovej**; vytvorí sa hnedá zrazenina. Neutralizujte roztok **zriedeným roztokom hydroxidu sodného**; zrazenina sa rozpustí.

**D.** V sklenej skúmavke so zábrusom a so sklenou zátkou rozpustíte približne 10 mg skúšanej látky v 0,25 ml zmesi 0,5 ml acetylacetónu a 5 ml **zriedeného roztoku hydroxidu sodného**. Zahrejte vo vodnom kúpeli na 80 °C po dobu 7 minút. Vychladte a pridajte 0,5 ml **roztoku dimetylamino benzaldehydu R2**. Opäť zahrejte vo vodnom kúpeli na 80 °C po dobu 7 minút. Nechajte vychladnúť a pridajte 10 ml vody. Vytvorí sa intenzívne modré zafarbenie.

**E.** Strata sušením (viď Skúšky).

**F.** Skúšaná látka má vyhovujúci výsledok **identifikačnej reakcie pre funkčné skupiny xantínov**.

**Skúšky**

**Roztok S.** Pomocou zahrievania rozpustíte 0,5 mg skúšanej látky v 30 ml odplynenej (t. j. prevarenej) vody, pripravenej z destilovanej vody. Vychladte a zriedte vodou do celkového objemu 50 ml.

**Kyslosť.** Do 10 ml roztoku S pridajte 0,05 ml **roztoku R1 brómtymolovej modrej**; roztok je zelený alebo žltý. Na zmenu farby na modrú nie je potrebných viac ako 0,2 ml **0.01 mol/l roztoku hydroxidu sodného**.

**Strata sušením:** maximálne 0,5 % pri stanovení sušením v sušiarňi pri 105 °C po dobu 1 hodiny v množstve 1,000 g skúšanej látky.

### Liekopisné prípravy uvedených roztokov a iné súvisiace texty

*Jódovaný roztok jodidu draselného:* rozpustite 2 g jódu a 4 g jodidu draselného v 10 ml vody. Keď je roztok homogénny, doplňte vodou do celkového objemu 100 ml.

*Zriedená kyselina chlorovodíková:* zriedte 20 g kyseliny chlorovodíkovej vodou do celkového objemu 100 ml.

*Zriedený roztok hydroxidu sodného:* rozpustite 8.5 g hydroxidu sodného vo vode a doplňte vodou do celkového objemu 100 ml.

*Roztok dimetylaminobenzaldehydu R2:* bez zahrievania rozpustite 0,2 g dimetylaminobenzaldehydu v zmesi 4,5 ml vody a 5,5 ml kyseliny chlorovodíkovej. Pripravte bezprostredne pred použitím.

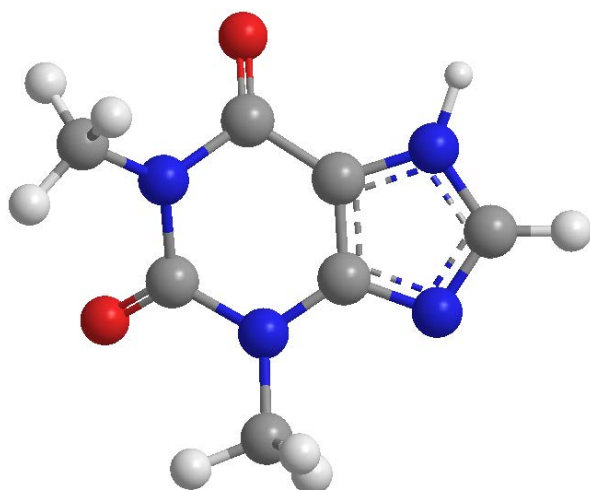
*Roztok R1 brómtymolovej modrej:* Rozpustite 50 mg brómtymolovej modrej v zmesi 4 ml 0,02 mol/l roztoku hydroxidu sodného (liekopisná príprava [0.1 mol/l roztoku hydroxidu sodného](#); zriedte 100.0 ml 1 mol/l roztoku hydroxidu sodného odplynenu vodou do celkového objemu 1000.0 ml) a 20 ml 96 % etanolu a zriedte vodou do celkového objemu 100 ml.

*1 mol/l roztok hydroxidu sodného:* Rozpustite 42 g hydroxidu sodného v odplynenej (t. j. prevarenej) vode a doplňte rovnakým rozpúšťadlom do celkového objemu 1000,0 ml.  
*Štandardizácia:* Rozpustite 1,50 g hydrogénftalátu draselného v 50 ml vody. Titrujte roztokom hydroxidu sodného. Určite bod ekvivalencie buď potenciometricky, alebo použitím 0,1 ml [roztoku fenolftaleínu](#) (rozpusťte 0,1 g fenolftaleínu v 80 ml 96 % etanolu a zriedte vodou do celkového objemu 100 ml) ako indikátora. 1 ml 1 mol/l roztoku hydroxidu sodného zodpovedá 204,2 mg  $C_8H_5KO_4$ .

*0.01 mol/l roztok hydroxidu sodného:* vid' príprava [0.1 mol/l roztoku hydroxidu sodného](#)

*Identifikačná reakcia pre funkčné skupiny xantínov:* ku pár miligramom skúšanej látky pridajte 0,1 ml [silného roztoku peroxidu vodíka](#) (zodpovedá 30 % roztoku peroxidu vodíka) a 0,3 ml [zriedenej kyseliny chlorovodíkovej](#). Zahrejte do sucha vo vodnom kúpeli do vytvorenia žltkastko-červeného zvyšku. Pridajte 0,1 ml [zriedeného amoniaku R2](#) (zriedte 14 g koncentrovaného amoniaku vodou do celkového objemu 100 ml). Farba zvyšku sa zmení na fialovo-červenú.

## TEOBROMÍN



Teobromín sa chemicky označuje ako 3,7-dihydro-3,7-dimetyl-1*H*-purín-2,6-dión.

**VLASTNOSTI:** kryštalický *teobromín* tvorí biely alebo žltkastý mikrokryštalický prášok. V studenej vode sa veľmi zle rozpúšťa, vo väčšine organických rozpúšťadiel je tiež slaboz rozpustný. Teplota topenia sa uvádza okolo 350 °C, presne sa zmerať nedá. Pri opatrnom zahrievaní sublimuje. Pomenovanie teobromínu pochádza z dvoch gréckych slov, *theo* - boh a *brosi* - pokrm. Takže čokoláda, v ktorej je hlavne teobromín, sa oddávna

považuje za pokrm bohov. Majitelia psov by však mali vedieť, že táto ich pochúťka je pre psov veľmi škodlivá. Práve teobromín je pre psy toxickou látkou, ktorá vyvoláva zvracanie, zvyšuje krvný tlak a negatívne pôsobí na CNS.

Zaujímavé sú výsledky experimentov vedeckého tímu z londýnskeho inštitútu Imperial College, ktorí študovali antitusický (kašeľ tlmiaci) účinok teobromínu. V skupine dobrovoľníkov vyvolali dráždivý kašeľ podaním kapsaicínu (alkaloidu čili papriky) a porovnali tlmiaci účinok bežne používaného antitusika kodeínu a teobromínu. Ukázalo sa, že teobromín bol účinnejší než kodeín a pri použití dávok nemal žiadne vedľajšie účinky. Teobromín a jeho soli sa v praxi používajú ako mierne diuretiká.

### POSTUP IZOLÁCIE TEOBROMÍNU Z KAKAA

Cieľ experimentu: izolácia teobromínu z prírodného materiálu

**EXPERIMENT:** Do 500 ml banky opatrenej spätným chladičom navážime 20 g kakaa, 6 g oxidu horečnatého (MgO), pridáme 20 ml etanolu a 40 ml vody. Zmes zahrievame na vodnom kúpeli za miešania, pokiaľ sa nevytvorí polotuhá kašovitá hmota (cca 45 minút). Banku ochladíme na laboratórnu teplotu a pridáme 150 ml chloroformu. Za miešania, najlepšie na magnetickom miešadle s ohrevom, zahrievame reakčnú zmes 30 minút pod refluxom. Ešte za horúca zmes prefiltrujeme (v digestore) cez Büchnerov lievik a tuhý zvyšok na filtri premyjeme cca 25 ml horúceho chloroformu tak, aby nedošlo ku strate produktu. Filtrát zahustíme na rotačnej vákuovej odparke oddestilovaním väčšiny rozpúšťadla a necháme cca 10 ml zvyšok obsahujúci teobromín, ktorý vyzrážame zo zvyšku pridaním 60 ml éteru. Banku s produktom necháme zatvorenú stáť a pozorujeme vylučovanie jemnej kryštalickej látky - teobromínu, ktorý izolujeme filtráciou.

**TENKOVSTVOVÁ CHROMATOGRAFICKÁ CHARAKTERISTIKA PRODUKTU:**

Čistotu izolovaného teobromínu môžeme overiť tenkovrstvovou (TLC) chromatografiou, porovnaním so štandardom. Malé množstvo izolovaného teobromínu rozpustíme v 0,5 ml chloroformu a časť takto pripravenej vzorky nanesieme pomocou tenkej kapiláry na štart na silufolovú TLC platňu (s indikátorom pre UV detekciu pri 254 nm). Vedľa, vo vzdialenosti cca 0,7 cm nanesieme vzorku štandardu - čistého teobromínu. Platňu dáme do vyvíjacej komory a za pomoci vhodnej elučnej zmesi necháme vyvíjať, pokiaľ eluent vystúpi do výšky cca 0,5 cm

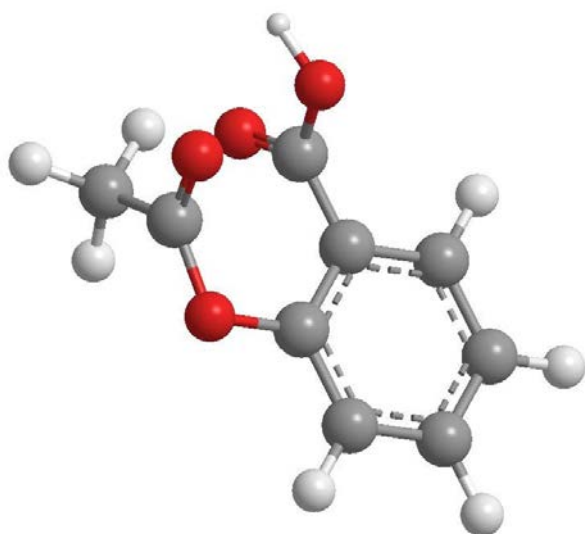
pod horný okraj platne. Jednotlivé zložky detegujeme pod UV svetlom ako škvrny. Škvryny obkreslíme ceruzkou a vypočítame ich RF hodnoty.

Podľa európskeho liekopisu je **teobromín** ( $C_7H_8N_4O_2$ ) biely, alebo takmer biely prášok, veľmi málo rozpustný vo vode a v bezvodom etanole, mierne rozpustný v amoniaku. Rozpúšťa sa v zriedených roztokoch alkalických hydroxidov a v minerálnych kyselinách.

#### ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY:

- ASHIHARA H., YOKOTA T., CROZIER A.: *"Biosynthesis and catabolism of purine alkaloids". New Light on Alkaloid Biosynthesis and Future Prospects.* ISBN 9780124080614, 2013, 68, p. 111–138. doi:10.1016/B978-0-12-408061-4.00004-3.
- BARANEC, T., POLÁČIKOVÁ, M., KOŠTÁL, J. Systematická botanika: Vydavateľstvo Universum v spolupráci s Nadáciou Ochrana genofondu rastlín, 1998.
- BARALDI P.G., TABRIZI M.A., GESSI S., BOREA P.A., "Adenosine receptor antagonists: translating medicinal chemistry and pharmacology into clinical utility". In: *Chemical Reviews*. 2008, 108 (1), p. 238–63. doi:10.1021/cr0682195
- CAMFIELD D.A., STOUGH C., FARRIMOND J., SCHOLEY A.B.: "Acute effects of tea constituents L-theanine, caffeine, and epigallocatechin gallate on cognitive function and mood: a systematic review and meta-analysis". In: *Nutrition Reviews*. 2014, 72 (8), p. 507–522. doi:10.1111/nure.12120
- DOWNS J., GIUST J., DUNN D.W.: "Considerations for ADHD in the child with epilepsy and the child with migraine". In: *Expert Review of Neurotherapeutics*, 2017, 17 (9), p. 861–869. doi:10.1080/14737175.2017.1360136
- EUROPIAN PHARMACOPOEIA 11.3
- GONZÁLEZ M.P., TERÁN C., TEIJEIRA M.: "Search for new antagonist ligands for adenosine receptors from QSAR point of view. How close are we?". In: *Medicinal Research Reviews*. 2008, 28 (3), p. 329–71. doi:10.1002/med.20108
- JULIANO L. M., GRIFFITHS R.R.: "A critical review of caffeine withdrawal: empirical validation of symptoms and signs, incidence, severity, and associated features". In: *Psychopharmacology*, 2004, 176 (1), p. 1–29. doi:10.1007/s00213-004-2000-x
- KRESÁNEK J.: Atlas liečivých rastlín a lesných plodov, Vydavateľstvo Osveta, Martin, 1982.
- MEREDITH S. E., JULIANO L.M., HUGHES J.R., GRIFFITHS R.R.: "Caffeine Use Disorder: A Comprehensive Review and Research Agenda". In: *Journal of Caffeine Research*. 2013, 3 (3), p. 114–130. doi:10.1089/jcr.2013.0016

- PETERS-GOLDEN M., CANETTI C., MANCUSO P., COFFEY M.J.: "*Leukotrienes: underappreciated mediators of innate immune responses*". In: *J. Immunol*, 2005, 174 (2), p. 589–94. doi:10.4049/jimmunol.174.2.589.
- POLESZAK E., SZOPA A., WYSKA E., KUKUŁA-KOCH W., SEREFKO A., WOŚKO S., et al.: "Caffeine augments the antidepressant-like activity of mianserin and agomelatine in forced swim and tail suspension tests in mice". In: *Pharmacological Reports*. 2016, 68 (1), p. 56–61. doi:10.1016/j.pharep.2015.06.138
- PRANCE G., NESBITT M.: *The Cultural History of Plants*. New York: Routledge, 2004, ISBN 978-0-415-92746-8.
- SCHUSTER J., MITCHELL E.S.: "More than just caffeine: psychopharmacology of methylxanthine interactions with plant-derived phytochemicals". In: *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 2019, 89, p. 263–274 doi:10.1016/j.pnpbp.2018.09.005
- TEMPLE J.L.: "Review: Trends, Safety, and Recommendations for Caffeine Use in Children and Adolescents". In: *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, 2019, 58 (1), p. 36–45. doi:10.1016/j.jaac.2018.06.030



## KYSELINA ACETYLSALICYLOVÁ

Viacere rastliny syntetizujú kyselinu salicylovú ako ochranu proti parazitom. Kôra vrbý jej obsahuje asi najväčšie množstvo.

Priaznivé účinky kyseliny salicylovej a jej derivátov boli využívané už v staroveku. Známy grécky lekár a filozof Hippokrates (460 – 377 pred Kristom) používal šťavu z vrbovej kôry na utíšenie reumatických bolestí svojich pacientov. Na dlhých pochodoch rímskych vojakov sa ako obľúbené liečivo žula kôra vrbý. Odvar z vrbovej kôry bol v ľudovom liečiteľstve využívaný na zníženie teploty od nepamäti.

Kyselina salicylová (vrba z lat. *Salix*), v chemickom názvosloví kyselina 2-hydroxybenzoová, a jej deriváty salicyláty sú účinné antipyretiká disponujúce aj miernymi analgetickými a antiflogistickými (protizápalovými) účinkami. Deriváty kyseliny salicylovej patria medzi nesteroidné protizápalové látky. Aj keď sa samotná kyselina salicylová v súčasnosti používa len v minimálnej (hlavne vo forme solí), jej najrozšírenejší derivát, kyselina acetylsalicylová (kyselina 2-acetoxybenzoová) je účinnou látkou humánnych liečiv acylpyrinu, aspirinu a anopyrinu. Kyselina acetylsalicylová je syntetický derivát, vyvinutý s cieľom redukcie lokálnej dráždivosti, spôsobovanej kyselinou salicylovou. Tento derivát sa po perorálnom podaní vo forme tabliet dostáva do organizmu už v sliznici tráviaceho traktu a je rýchlo distribuovaný do telových tkanív a medzibunkových tekutín. V pečeni sa kyselina acetylsalicylová deacetyláciou mení na účinnú zložku, kyselinu salicylovú. Mechanizmus účinku spočíva v obmedzení tvorby prostaglandínov (blokátor syntézy prostaglandínu E2) v tkanivách pri zápalovom procese. Salicyláty vrátane kyseliny acetylsalicylovej sú spolu s ďalšími nesteroidnými protizápalovými látkami schopné inhibovať cyklooxygenázu (COX1,2), ktorá je kľúčovým enzýmom pri ich biosyntéze. Prostaglandíny zároveň fungujú ako mediátory bolesti. Preto ich eliminácia salicylátmi vytvára aj sekundárny efekt a pôsobí analgeticky – tlmí bolesť. Salicyláty ďalej pôsobia priamo na hypotalamus centrálnej nervovej sústavy a majú analgetický účinok. Podľa štatistických údajov WHO je aspirin jeden z najčastejšie predpisovaných a užívaných liekov. Ordinuje sa najmä na zvládnutie horúčkovitých stavov (antipyretikum). Kyselina acetylsalicylová sa však využíva aj pre svoje antiagregačné a antikoagulačné účinky. Výskumy potvrdili jej schopnosť zhoršovať agregáciu krvných doštičiek, ktorá je jedným z predpokladov pre vytvorenie krvnej zrazeniny (trombu).

Krvné zrazeniny môžu zablokovat' cievne riečisko a tým odštartovať život ohrozujúce stavy ako infarkt myokardu, cievnu mozgovú príhodu a trombózu hlbokého žilového riečiska dolných končatín s následnou pľúcnou embóliou.

Acylpyrin alebo aspirin sa celosvetovo používa viac ako sto rokov. Širšie využitie kyseliny salicylovej a jej derivátov umožnila Kolbeho-Schmittova syntéza (v roku 1874). Účinky kyseliny salicylovej (protizápalové a bolesť utlmujúce) boli lekárom a vedcom známe ešte pred



objavom aspirínu. Avšak až koncom 19. storočia sa vďaka výskumu francúzskych a nemeckých vedcov podarilo eliminovať nežiadúce vedľajšie účinky. Ešte v roku 1853 syntetizoval kyselinu acetylsalicylovú C. Gerhardt, o pár rokov neskôr C. J. Kraut. Ani jeden z produktov však nebol dostatočne čistý. Podľa údajov nemeckej firmy Bayer sa prvú, dostatočne čistú kyselinu acetylsalicylovú podarilo syntetizovať v roku 1897. Firma Bayer sa do roku 1896 zaoberala iba chemickou výrobou. Na podnet vtedajšieho šéfa výskumu C. Duisberga vybudoval v tomto roku A. Eichengrün prvé farmaceutické oddelenie podniku.

Jedným z jeho prvých projektov bol vývoj nových zlúčenín z kyseliny salicylovej. Vedľajšie účinky tejto látky boli prekážkou širokého použitia v lekárskej praxi. Člen Eichengrünovho tímu F. Hoffman dokázal napokon ako prvý syntetickou cestou vyvinúť dnes už svetoznámu kyselinu acetylsalicylovú. Patentovaná bola v roku 1898. Princíp fungovania aspirínu objasnil v roku 1971 J. Vane. Ten ako prvý zistil, že spomaľuje produkciu hormónu prostaglandín, ktorý ovplyvňuje priebeh zápalových procesov, ako aj vnímanie bolesti. Acetylsalicylín je z pohľadu svojej histórie a dlhodobého uplatnenia výnimočné liečivo. Aj napriek tomu, že jeho gastrotoxicita predstavuje významné zdravotné riziko, stále patrí k najpoužívanejším liečivám pri analgetickej, antipyretickej a antiflogistickej indikácii a to aj vďaka svojej nízkej cene. Kyselina acetylsalicylová sa uplatňuje aj vo veterinárnej medicíne, kde sa používa pri prevencii a liečbe chorôb hydiny, psov, teliat, ošipáných a koní.

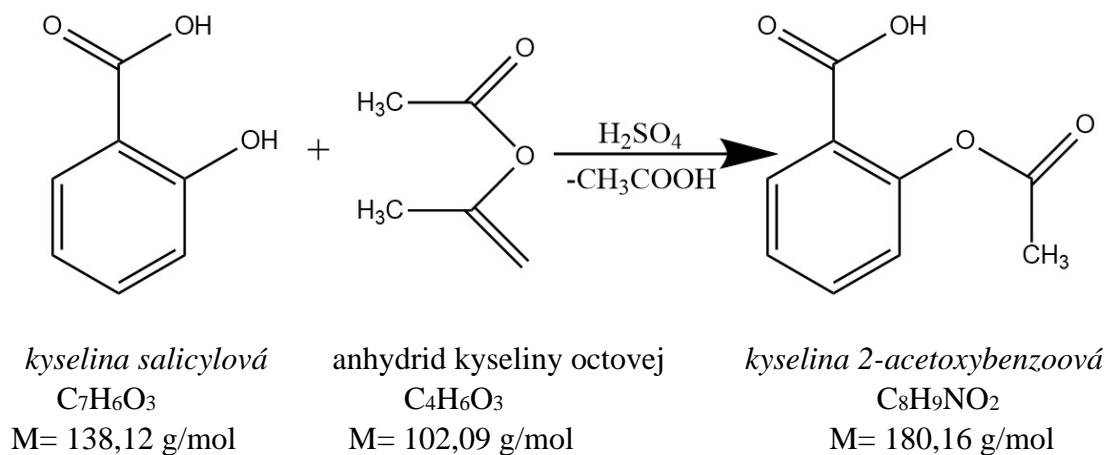


## SYNTÉZA KYSELINY ACETYLSALICYLOVEJ

CHEMICKÝ NÁZOV: *kyselina 2-acetoxybenzoová*

KATEGÓRIA LIEČIVA: analgetikum, antipyretikum, antiflogistikum, antikoagulant

REAKČNÁ SCHÉMA:



VÝPOČTY VZTIAHNUTÉ NA 2,5 GRAMU VÝCHODISKOVEJ LÁTKY:

Výpočty na 2,5 g východiskovej látky- kyseliny salicylovej.

$$n(\text{kys. salicylová}) = \frac{m(\text{kys. salicylová})}{M(\text{kys. salicylová})} = \frac{2,5 \text{ g}}{138,12 \text{ g/mol}} = 0,0181 \text{ mol}$$

Výpočet teoretického výťažku reakcie:

$$m(\text{kys. acetylsalicylová}) = n(\text{kys. salicylová}) * M(\text{kys. acetylsalicylová})$$
$$m(\text{kys. acetylsalicylová}) = 0,0181 \text{ mol} * 180,16 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = 3,26 \text{ g} \cong 3,3 \text{ g}$$

Anhydrid kyseliny octovej pridávame v nadbytku 300 %:

$$m(\text{anhydrid kys. octovej}) = 3 * n(\text{kys. salicylová}) * M(\text{anhydrid kys. octovej})$$
$$m(\text{anhydrid kys. octovej}) = 3 * 0,0181 \text{ mol} * 102,09 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = 5,543 \text{ g}$$

$$V(\text{anhydrid kys. octovej}) = \frac{m(\text{anhydrid kys. octovej})}{\rho(\text{anhydrid kys. octovej})} = \frac{5,543 \text{ g}}{1,08 \text{ g/ml}} = 5,1 \text{ ml}$$

CHEMIKÁLIE:

kyselina salicylová

anhydrid kyseliny octovej

kyselina sírová metanol

destilovaná voda

vodný roztok kyseliny octovej (1:1)

POMÔCKY:

Erlenmeyerova banka (100 ml)

Teplomer

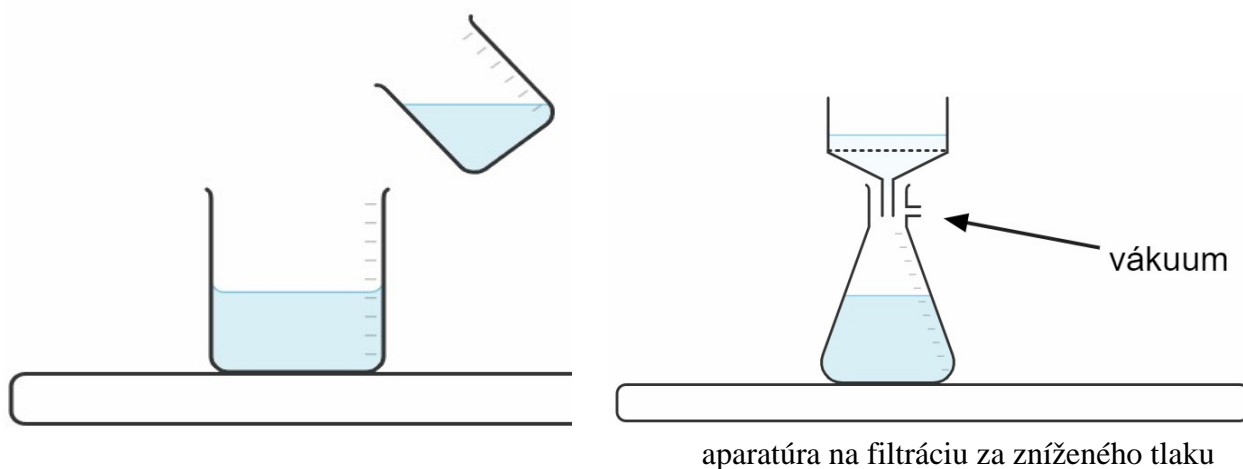
Kadička sklenený

lievik odsávací

banka Büchnerov

lievik

## POUŽITÉ APARATÚRY:



## PRACOVNÝ POSTUP:

- 1.) Do 100 ml Erlenmeyerovej banky odvážime 2,5 g kyseliny salicylovej.
- 2.) K návažku východiskovej látky pridáme 5,1 ml anhydridu kyseliny octovej a 2 kvapky kyseliny sírovej (katalyzátor reakcie).
- 3.) Reakčnú zmes v banke dobre premiešame, pričom teplota banky sa samovoľne zvýši na 70 až 80 °C.
- 4.) Tuhá kyselina salicylová sa postupne rozpúšťa. Približne po 12 až 15 minútach teplota klesne na 35 až 40 °C a obsah banky stuhne.
- 5.) Do banky pridáme 25 ml vody a dobre rozmiešame.
- 6.) Produkt odsajme za zníženého tlaku na Büchnerovom lieviku.
- 7.) Zachytený produkt rekryštalizujeme z vodného roztoku kyseliny octovej (1:1):
  - 25 ml vodného roztoku kyseliny octovej zohrejeme na teplotu približne 80 °C,
  - produkt v kadičke (100 ml) pomaly rozpúšťame prilievaním horúceho roztoku,
  - do roztoku produktu pridáme malé množstvo aktívneho uhlia a pomiešame,
  - aktívne uhlie z horúceho roztoku odfiltrujeme cez skladaný filtračný papier,
  - filtrát s produktom ochladíme v ľadovom kúpeli a necháme kryštalizovať,
  - vylúčené kryštály odsajme na Büchnerovom lieviku,
  - produkt sušíme na vzduchu, odvážime a vypočítame praktický výťažok.

## KONTROLA PRODUKTU

- 1.) Stanovíme teplotu topenia,  $t_f$  (kyseliny acetylsalicylovej) = 136 °C.
- 2.) Tenkovrstvovou chromatografiou:
  - malé množstvo vzorky a štandardu rozpustíme v dietyléteri;
  - vyvíjacia sústava: hexán : octan etylový (etylacetát) v pomere 1:3;
  - detekcia škvŕn: pod UV lampou (254 nm);
  - určenie a porovnanie  $R_F$  hodnôt (produkt verzus štandard)

---

Vybrané časti z monografie európskeho liekopisu pre kyselinu acetylsalicylovú  
(Ph. Eur., článok 01/2017:0309)

**Anglický názov:** Acetylsalicylic acid. **Latinský názov:** Acidum acetylsalicylicum.

**Definícia:** 2-(Acetyloxy)benzoic acid.

**Obsah:** 99.5 % až 101.0 % (na sušinu).

**Vlastnosti**

Vzhľad: biely alebo takmer biely kryštalický prášok, alebo bezfarebné kryštály.

Rozpustnosť: mierne rozpustná vo vode, voľne rozpustná v 96 % etanole. Bod topenia: približne 143 °C.

**Identifikácia**

PRVÁ IDENTIFIKÁCIA: A, B.

DRUHÁ IDENTIFIKÁCIA: B, C, D.

**A.** Infračervená spektrofotometria.

Porovnávacía látka: certifikovaná porovnávacía látka **acetylsalicylic acid** CRS.

**B.** Ku 0,2 g skúšanej látky pridajte 4 ml **zriedeného roztoku hydroxidu sodného** a povarte 3 minúty. Ochlaďte a pridajte 5 ml **zriedenej kyseliny sírovej**. Vytvorí sa kryštalická zrazenina.

Prefiltrujte. Zrazeninu premyte a vysušte pri teplote 100 – 105 °C. Bod topenia je 156 °C až 161 °C.

**C.** V skúmavke zmiešajte 0,1 g skúšanej látky s 0,5 g hydroxidu vápenatého. Zmes zahrejte a tvoriacim sa parám vystavte filtračný papier impregnovaný pomocou 0,05 ml **roztoku nitrobenzaldehydu**. Papier sa zafarbí na zeleno-modro alebo zeleno-žltó. Navlhčite papier **zriedenou kyselinou chlorovodíkovou**. Farba sa zmení na modrú.

**D.** Zahrievaním rozpustíte približne 20 mg zrazeniny, získanej pri identifikácii **B**, v 10 ml vody. Ochlaďte. Roztok má vyhovujúci výsledok **identifikačnej reakcie (a) pre funkčné skupiny salicylátov**.

**Skúšky**

**Príbuzné látky.** Kvapalinová chromatografia. Roztoky pripravte bezprostredne pred použitím. **Skúšaný roztok.** Rozpustíte 0,100 g skúšanej látky v acetonitrile pre chromatografiu a zriedíte rovnakým rozpúšťadlom do celkového objemu 10,0 ml.

**Porovnávací roztok (a).** Rozpustíte 50,0 mg kyseliny salicylovej R (nečistota C) v mobilnej fáze a zriedíte mobilnou fázou do celkového objemu 50,0 ml. Ďalej zriedíte 1,0 ml mobilnou fázou do celkového objemu 100,0 ml.

**Porovnávací roztok (b).** Rozpustíte 10,0 mg kyseliny salicylovej R (nečistota C) v mobilnej fáze a zriedíte mobilnou fázou do celkového objemu 10,0 ml. K 1,0 ml roztoku pridajte 0,2 ml testovacieho roztoku a zriedíte mobilnou fázou do celkového objemu 100,0 ml.

*Porovnávací roztok (c).* Obsah jednej vialky certifikovanej porovnávacjej látky **acetylsalicylic acid for peak identification CRS** rozpustite v 1,0 ml acetonitrilu v ultrazvukovom kúpeli.

*Kolóna:*

- Veľkosť:  $l = 0,25$  m,  $\Phi = 4,6$  mm;
- Stacionárna fáza: octadecylsilyl silikagél pre chromatografiu (5  $\mu$ m).

*Mobilná fáza:* kyselina fosforečná R, acetonitril pre chromatografiu R, voda R (2:400:600, v/v/v).

*Prietok:* 1 ml/min.

*Detekcia:* spektrofotometrická, 237 nm.

*Nástrek:* 10  $\mu$ l.

*Čas analýzy:* sedemnásobok retenčného času kyseliny acetylsalicylovej.

*Identifikácia nečistôt:* na identifikáciu nečistoty C použite chromatogram porovnávacieho roztoku (a). Na identifikáciu nečistôt A, B, D, E a F použite chromatogram porovnávacieho roztoku (c) v kombinácii so sprievodným chromatogramom pre certifikovanú porovnávaciu látku **acetylsalicylic acid for peak identification CRS**.

*Relatívna retencia voči kyseline acetylsalicylovej (retenčný čas = približne 5 min):* nečistota A = približne 0,7; nečistota B = približne 0,8; nečistota C = približne 1,3; nečistota D = približne 2,3; nečistota E = približne 3,2; nečistota F = približne 6,0.

*Vhodnosť systému:* porovnávací roztok (b):

Rozlíšenie: minimum 6,0 medzi píkmi kyseliny acetylsalicylovej a nečistotou C. *Limity:*

Nečistoty A, B, C, D, E, F: pre každú nečistotu nie viac ako 1,5 násobok plochy hlavného píku v chromatograme porovnávacieho roztoku (a) (0,15 %);

Nešpecifikované nečistoty: pre každú nečistotu nie viac ako 0,5 násobok plochy hlavného píku v chromatograme porovnávacieho roztoku (a) (0,05 %);

Suma: nie viac ako 2,5 násobok plochy hlavného píku v chromatograme porovnávacieho roztoku (a) (0,25 %);

Hranica zanedbateľnosti (*disregard limit*): 0,3 násobok plochy hlavného píku v chromatograme porovnávacieho roztoku (a) (0,03 %).

**Strata sušením:** maximálne 0,5 % pri stanovení vákuovým sušením množstva 1,000 g. **Obsah** V sklenej banke so zábrusom a sklenou zátkou rozpustite 1,000 g skúšanej látky v 10 ml 96 % etanolu. Pridajte 50,0 ml 0,5 mol/l roztoku hydroxidu sodného. Banku zazátkujte a nechajte stáť 1 hodinu. Titrujte 0,5 mol/l roztokom kyseliny chlorovodíkovej, ako indikátor použite 0,2 ml roztoku fenolftaleínu. Titrujte blank na korekciu spotreby.

1 ml 0,5 mol/l roztoku hydroxidu sodného zodpovedá 45,04 mg  $C_9H_8O_4$ .

Liekopisné prípravy uvedených roztokov a iné súvisiace texty

**Zriedený roztok hydroxidu sodného:** rozpustite 8,5 g hydroxidu sodného vo vode a doplňte vodou do celkového objemu 100 ml.

**Zriedená kyselina sírová:** Do 60 ml vody pridajte 5,5 ml kyseliny sírovej. Nechajte ochladnúť a doplňte vodou do celkového objemu 100 ml.

**Roztok nitrobenzaldehydu:** Pridajte 0,12 g práškoveho nitrobenzaldehydu do 10 ml zriedeného roztoku hydroxidu sodného (viď poznámka pod čiarou číslo 1). Za častého miešania ponechajte stáť 10 min. Prefiltrujte. Pripravte bezprostredne pred použitím. **Zriedená kyselina chlorovodíková:** Zriedte 20 g kyseliny chlorovodíkovej vodou do celkového objemu 100 ml.

**1 mol/l roztok hydroxidu sodného:** Rozpustite 42 g hydroxidu sodného v odplynenej (t. j. prevarenej) vode a doplňte rovnakým rozpúšťadlom do celkového objemu 1000,0 ml. **Štandardizácia:** Rozpustite 1,50 g hydrogénftalátu draselného v 50 ml vody. Titrujte roztokom hydroxidu sodného. Určite bod ekvivalencie buď potenciometricky, alebo použitím 0,1 ml **roztoku fenolftaleínu** (rozpustite 0,1 g fenolftaleínu v 80 ml 96 % etanolu a zriedte vodou do celkového objemu 100 ml) ako indikátora. 1 ml 1 mol/l roztoku hydroxidu sodného zodpovedá 204,2 mg  $C_8H_5KO_4$ .

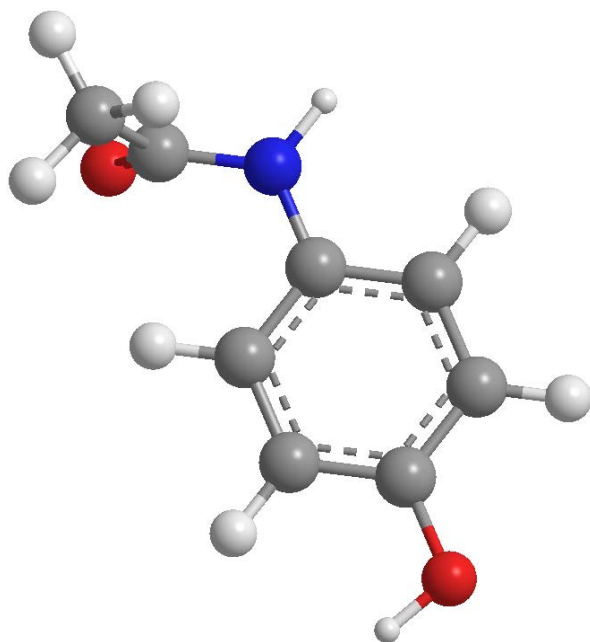
**1 mol/l roztok kyseliny chlorovodíkovej:** Zriedte 103,0 g kyseliny chlorovodíkovej vodou do celkového objemu 1000,0 ml. **Štandardizácia:** Rozpustite 0,950 g trometamolu v 50 ml vody. Titrujte roztokom kyseliny chlorovodíkovej. Určite bod ekvivalencie buď potenciometricky, alebo použitím 0,1 ml **roztoku metyloranže** (rozpustite 0,1 g metyloranže v 80 ml vody a zriedte 96 % etanolom do celkového objemu 100 ml) ako indikátora do dosiahnutia žltkasto-červenej farby. 1 ml 1 mol/l roztoku kyseliny chlorovodíkovej zodpovedá 121,1 mg  $C_4H_{11}NO_3$ .

**Identifikačná reakcia (a) pre funkčné skupiny salicylátov:** Do 1 ml roztoku pridajte 0,5 ml R1 roztoku chloridu železitého ( $105 \text{ g/l } FeCl_3 \times 6 H_2O$ ). Vznikne fialové zafarbenie. Fialové zafarbenie ostáva prítomné aj po pridaní 0,1 ml kyseliny octovej (zriedte 30 g ľadovej kyseliny octovej vodou do celkového objemu 100 ml).

#### ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY:

- ELEČKO P., MEČIAROVÁ M., PUTALA M., SALIŠOVÁ M. & ŠRAGA J.: *Laboratórne cvičenie z organickej chémie*, Prírodovedecká fakulta UK Bratislava, 1998.
- DEÁK, G.: *Menné reakcie v organickej chémii*, Vydavateľstvo technickej a ekonomickej literatúry, Bratislava, 1967, 229.
- KRESÁNEK J.: *Atlas liečivých rastlín a lesných plodov*, Vydavateľstvo Osveta, Martin, 1982.
- EUROPIAN PHARMACOPOEIA 11.3
- Haynes WM: *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. ISBN 1-4398-5511-0, CRC Press, 2011, 3800 p.
- JONES A.: *Chemistry: An Introduction for Medical and Health Sciences*, ISBN 978-0470-09290-3, John Wiley & Sons, 2015, 259 p. .
- RAVINA E.: *The Evolution of Drug Discovery: From Traditional Medicines to Modern Drugs*, ISBN 978-3-527-32669-3, John Wiley & Sons, 2011, 496 p.
- JEFFREYS D.: *Aspirin the remarkable story of a wonder drug*, ISBN 978-1-59691-8160, Bloomsbury Publishing USA, 2008, 352 p.
- PALLEROS D.R.: *Experimental organic chemistry*, ISBN 978-0-471-28250-1, New York: John Wiley & Sons, 2000, 494 p.

## PARACETAMOL (ACETAMINOFÉN)



Patrí medzi bežne dostupné lieky (bez lekárskeho predpisu), čo súvisí s jeho prvenstvom – je najčastejšie používaným liečivom proti horúčke a bolesti v USA, ale aj v Európe. Nachádza sa aj na liste základných liečiv WHO. Predáva sa pod rôznymi obchodnými názvami, napr. TYLENOL, PANADOL a i.

Prvá syntéza paracetamolu sa pripisuje H. N. Morseovi v roku 1878 alebo C. F. Gerhardtovi v roku 1852.

Rozšírené pomenovanie „*acetaminofen*“ predstavuje skratku z chemického názvu **N-acetyl-amino-fenol** a bolo použité ako obchodné označenie spoločnosťou McNeil Laboratories v roku 1955. Druhé zaužívané

označenie „*paracetamol*“ vzniklo skrátením chemického názvu **para-aceto-amino-fenol**, zavedené spoločnosťou Frederick Stearns & Co v roku 1956.

Paracetamol je analgetikum neomamného charakteru s antipyretickými účinkami. Z pohľadu chemickej štruktúry sa zaraďuje medzi deriváty anilínu. Používa sa na zníženie horúčky a zmiernenie bolesti sprevádzajúcich chrípku, prechladnutie alebo iné infekčné ochorenia. Tiež je vhodný na úľavu od miernej až stredne silnej bolesti rôzneho pôvodu, ako napr. bolesť hlavy, migréna, bolesti chrbta, zubov, menštruačné bolesti, bolesť hrdla alebo nezápalová bolesť pohybového aparátu. Mechanizmom antipyretického účinku je inhibícia enzýmu COX-2 (cyklooxygenáza 2) v hypotalame. Nepriame pôsobenie na 5-HT<sub>3</sub> (sérotonínové) receptory v mieche je zodpovedné za jeho analgetický účinok. Nástup účinku je do 30 minút od požitia v závislosti od liekovej formy a výrobcu.

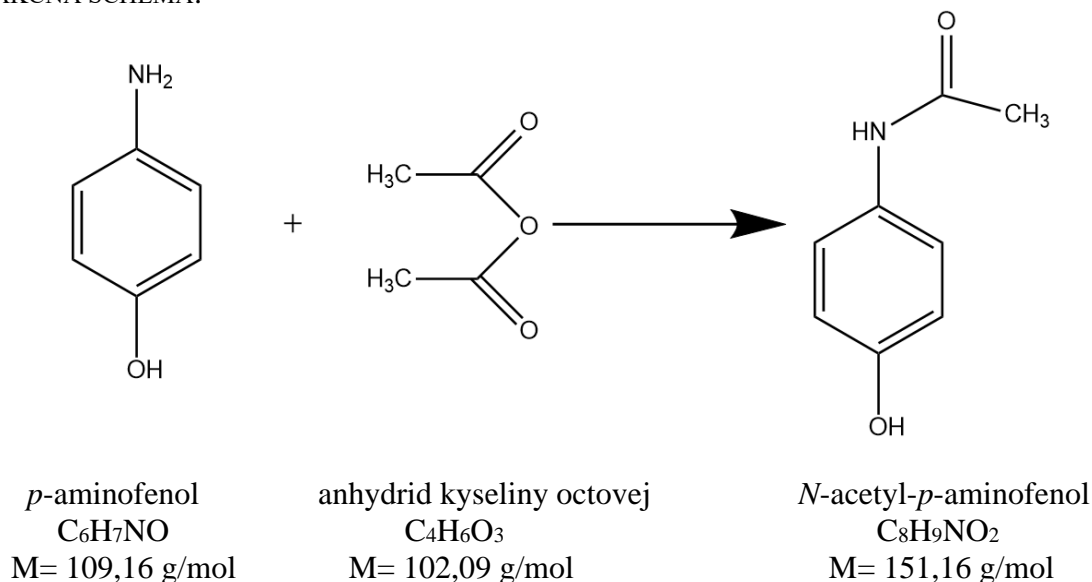
Ak sa paracetamol používa podľa odporúčania lekára alebo výrobcu, je považovaný za bezpečné a účinné liečivo. Nežiadúce účinky sú zriedkavé a podobné nežiadúcim účinkom ibuprofenu. Najmä pri dlhšom užívaní je považovaný za jedno z bezpečnejších nesteroidných protizápalových liečiv. Často je podávaný pacientom, ktorí nemôžu užívať ibuprofen. S rozšírenou dostupnosťou a používaním paracetamolu však súvisí aj riziko nadmerného užívania, ktoré môže viesť ku poklesu hladiny hemoglobínu, krvácaniu do tráviaceho traktu a zlyhaniu pečene. Protilátkou paracetamolu je acetylcysteín.

## POSTUP SYNTÉZY PARACETAMOLU

CHEMICKÝ NÁZOV: *N*-acetyl-*p*-aminofenol alebo 4-hydroxyacetanilide

KATEGÓRIA LIEČIVA: analgetikum; antipyretikum

REAKČNÁ SCHÉMA:



VÝPOČTY VZTIAHNUTÉ NA PRÍPRAVU 6 G PARACETAMOLU:

$$n(\text{paracetamol}) = \frac{m(\text{paracetamol})}{M(\text{paracetamol})} = \frac{6 \text{ g}}{151,16 \text{ g/mol}} = 0,0397 \text{ mol} \cong 0,04 \text{ mol}$$

$$m(p - \text{aminofenol}) = n(\text{paracetamol}) * M(p - \text{aminofenol})$$

$$m(p - \text{aminofenol}) = 0,04 \text{ mol} * 109,16 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = \mathbf{4,4 \text{ g}}$$

Anhydrid kyseliny octovej pridávame v nadbytku 10 %:

$$m(\text{anhydrid kys. octovej}) = 1,1 * n(\text{paracetamol}) * M(\text{anhydrid kys. octovej})$$

$$m(\text{anhydrid kys. octovej}) = 0,04 \text{ mol} * 102,09 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = 4,49 \text{ g}$$

$$V(\text{anhydrid kys. octovej}) = \frac{m(\text{anhydrid kys. octovej})}{\rho(\text{anhydrid kys. octovej})} = \frac{4,49 \text{ g}}{1,08 \text{ g/ml}} = \mathbf{4,2 \text{ ml}}$$

### CHEMIKÁLIE:

4,4 g 4-aminofenolu

4,2 ml anhydridu kyseliny octovej

aktívne uhlie

destilovaná voda

### POMÔCKY:

25 ml Erlenmeyerova banka

Teplomer

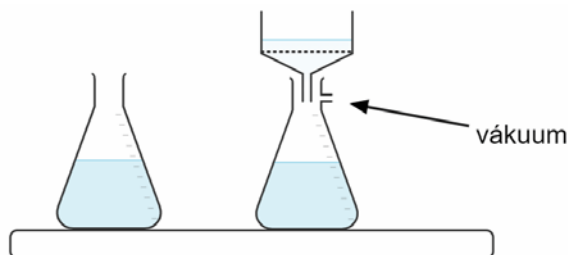
odsávací banka

Büchnerov lievnik alebo sklenená fritka

100 ml kadička



#### POUŽITÉ APARATÚRY:



#### PRACOVNÝ POSTUP:

- 1.) Do Erlenmeyerovej banky na odvážiame 4,4 g *p*-aminofenolu a následne ho suspendujeme (rozmiešame) v 10 ml destilovanej vody.
- 2.) Suspenziu *p*-aminofenolu intenzívne miešame a pomaly do nej pridáme po kvapkách 4,2 ml anhydridu kyseliny octovej.
- 3.) Po úplnom rozpustení *p*-aminofenolu reakčnú zmes ochladíme a necháme stáť v ľadovom kúpeli niekoľko minút.
- 4.) Vylúčené kryštály produktu odsajeme na Büchnerovom lieviku alebo sklenej frite a dôkladne premyjeme studenou vodou. Premytím sa odstránenia zvyšky kyseliny octovej, ktorá vzniká ako vedľajší produkt reakcie.
- 5.) Produkt ďalej čistíme rekryštalizáciou z vody:
  - 50 až 100 ml destilovanej vody zohrejeme na teplotu približne 80 °C,
  - produkt v kadičke (100 ml) pomaly rozpúšťame prilievaním horúcej vody,
  - do roztoku produktu pridáme malé množstvo aktívneho uhlia a pomiešame,
  - aktívne uhlie z horúceho roztoku odfiltrujeme cez skladaný filtračný papier,
  - filtrát s produktom ochladíme v ľadovom kúpeli a necháme kryštalizovať,
  - vylúčené kryštály odsajme na Büchnerovom lieviku alebo sklenej frite,
  - sušíme na vzduchu alebo pri teplote 90 °C za zníženého tlaku.

#### POTVRDENIE PRODUKTU- PARACETAMOLU:

- 1.) Stanovíme teplotu topenia na Koflerovom bloku  $t_f$  (paracetamol) = 169 °C.
- 2.) Tenkovrstvovou chromatografiou:
  - malé množstvo vzorky a štandardu rozpustíme v etanole;
  - vyvíjacia sústava: etylacetát;
  - detekcia škvrn: pod UV lampou (254 nm), prípadne v jódovej komore;
  - určenie a porovnanie  $R_F$  hodnôt (produkt verus štandard).



---

Vybrané časti z monografie európskeho liekopisu pre paracetamolu  
(Ph. Eur., článok 04/2022:0049)

**Anglický názov:** Paracetamol. **Latinský názov:** Paracetamolum

**Definícia:** *N*-(4-Hydroxyphenyl)acetamide

**Obsah:** 99,0 % až 101,0 % (na sušinu).

**Vlastnosti**

*Vzhľad:* biely alebo takmer biely kryštalický prášok

*Rozpustnosť:* čiastočne rozpustný vo vode, voľne rozpustný v 96 % etanole, veľmi málo rozpustný v dichlórmetáne

**Identifikácia**

PRVÁ IDENTIFIKÁCIA: B.

DRUHÁ IDENTIFIKÁCIA: A.

A. BOD TOPENIA:

*Stanovenie A:* stanovte bod topenia skúšanej látky.

Výsledok A: 168 °C až 172 °C

*Stanovenie B:* zmiešajte rovnaké podiely skúšanej látky a certifikovanej porovnávacej látky **paracetamol CRS** a stanovte bod topenia.

Výsledok B: absolútny rozdiel medzi bodom topenia zmesi a hodnotou nameranou v Stanovení A nie je väčší ako 2 °C.

B. INFRAČERVENÁ SPEKTROFOTOMETRIA:

Porovnávacia látka: certifikovanej porovnávacia látka **paracetamol CRS**.

**Skúšky**

*Strata sušením:* maximálne 0,5 % pri stanovení v sušiarňi pri teplote 105 °C v množstve 1,000 g.

**Obsah**

Rozpustíte 0,300 g skúšanej látky v roztoku zloženého z 10 ml vody a 30 ml **zriedenej kyseliny sírovej**. Varte pod refluxom 1 hodinu, vychladíte a doplníte vodou do celkového objemu 100,0 ml. Ku 20,0 ml roztoku pridajte 40 ml vody, 40 g ľadu, 15 ml **zriedenej kyseliny chlorovodíkovej** a 0,1 ml **feroínu**. Titrujte **0,1 mol/l roztokom síranu ceričitého** do zelenkasto-žltého zafarbenia. Titrujte blank na korekciu spotreby.

### Liekopisné prípravy uvedených roztokov

**Zriedená kyselina sírová:** do 60 ml vody pridajte 5.5 ml kyseliny sírovej. Nechajte vychladnúť a doplňte vodou do celkového objemu 100 ml.

**Zriedená kyselina chlorovodíková:** zriedte 20 g kyseliny chlorovodíkovej vodou do celkového objemu 100 ml.

**Feroín:** Rozpusťte 0.7 g síranu železnatého a 1.76 g fenantrolínu hydrochloridu v 70 ml vody. Doplňte vodou do celkového objemu 100 ml.

**0.1 mol/l roztok síranu ceričitého:** Rozpusťte 40.4 g síranu ceričitého v zmesi 500 ml vody a 50 ml kyseliny sírovej. Nechajte vychladnúť a doplňte vodou do celkového objemu 1000.0 ml.

**Štandardizácia:** Rozpusťte 0.300 g etyléndiamónia síranu železnatého v 50 ml zriedeného roztoku kyseliny sírovej (49 g/L). Titrujte roztokom síranu ceričitého. Určite bod ekvivalencie buď potenciometricky, alebo použitím 0.1 ml feroínu ako indikátora. 1 ml 0.1 mol/l roztoku síranu ceričitého zodpovedá 38.21 mg  $\text{Fe}(\text{C}_2\text{H}_{10}\text{N}_2)(\text{SO}_4) \times 4 \text{H}_2\text{O}$ .

### ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY:

AGHABABIAN R.V.: *Essentials of emergency medicine*. ISBN 978-1-4496-1846-9, Jones & Bartlett Publishers, 2010, 1068 p.

EUROPIAN PHARMACOPOEIA 11.3

GRANBERG R. A., RASMUSON A. C.: Solubility of paracetamol in pure solvents. In: *Journal of Chemical & Engineering Data*, 1999, 44 (6), pp. 1391–1395. doi:10.1021/jc990124v

HAMILTON R. J. Tarascon pocket pharmacopoeia. ISBN 9781449665869, Burlington, Massachusetts: Jones & Bartlett Learning, 2013, 204 p.

LINCOVÁ D., FARGHALI H., a kol.: *Základní a aplikovaná farmakologie*, Praha: Karolinum, 2002, s. 276.

Kol. *Pharmindeks Brevír*, Praha: MediMedia, 2005, 1134 s.

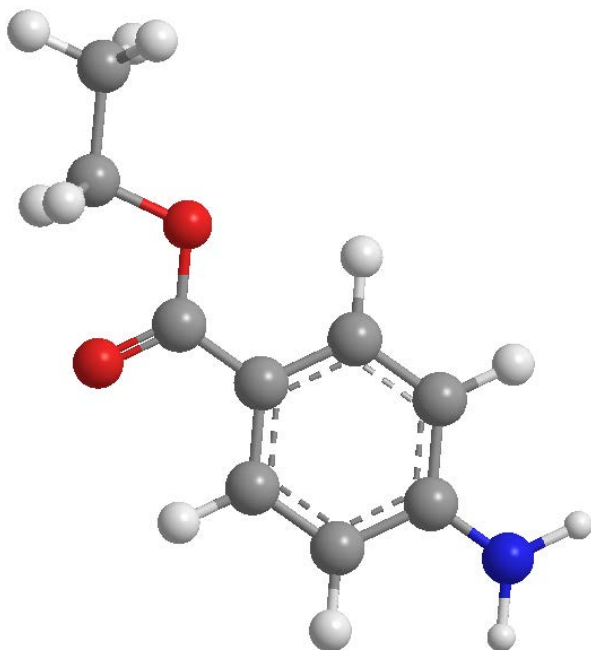
MANGUS B.C. , MILLER M.G.: *Pharmacology application in athletic training*, ISBN 9780803620278, Pennsylvania: F.A. Davis, 2017, 235 p.

PRESCOTT L. F.: Paracetamol: past, present, and future. In: *American Journal of Therapeutics*. 7 (2), 2000, pp. 143–147. doi:10.1097/00045391-200007020-00011

ROY J.: "Paracetamol – the best selling antipyretic analgesic in the world". An introduction to pharmaceutical sciences: production, chemistry, techniques and technology, ISBN 978-1-908818-04-1, Oxford: Biohealthcare, 2011, 404 p.

WARWICK C.: Paracetamol and fever management". In: *J. R. Soc Promot Health*. 128 (6), 2008, pp. 320–323. doi:10.1177/1466424008092794

## BENZOKAÍN



Liečivá používané v medicínskej praxi na znecitlivenie určitej ohraničenej oblasti ľudského tela sa označujú pojmom „*lokálne anestetiká*“. Princíp ich fungovania je založený na dočasnom potlačení šírenia vzruchov (signálov) v periférnom nervovom tkanive. Tento účinok dosahujú lokálne anestetiká blokovaním receptorov bolesti, ktoré sa nachádzajú na bunkovej membráne v tesnej blízkosti sodíkových kanálov. Takto sa dočasne obmedzí prestup  $\text{Na}^+$  iónov, ktoré participujú na šírení nervového podráždenia (signálu). Typická pre tento typ anestézie je absencia bezvedomia, teda znecitlivená je len určitá časť ľudského tela, resp. tkaniva. Toto sa často využíva v humánnej i veterinárnej praxi

pri povrchovom znecitlivení kože alebo slizníc, napríklad pri menších chirurgických zákrokoch, v zubnom lekárstve, kožných operáciách a podobne. Lokálne anestetiká bývajú ďalej bežne zložkou prípravkov a masť, ktoré pre svoj účinok potrebujú miestne znecitlivenie. Jedná sa najmä o rôzne masti a obklady pre športovcov, používané pri bolestivých poraneniach svalov. Lokálne anestetiká sú vo všeobecnosti dostupné a podávané v rôznych liekových formách: od injekčných roztokov cez spreje, masti, zásypy, čapíky až po kvapky.

Z historického hľadiska bol prvým masovo používaným lokálnym anestetikom kokaín. Jedná sa o alkaloid pochádzajúci z listu kokového (*folium coca*) juhoamerickej kroviny *Erythroxylon coca* Lam. Rastliny dnes už divo nerastú. Kokaín otupuje nervové zakončenia na sliznici, pričom sťahuje cievy, zamedzuje sekréciu a odstraňuje opuchy. I pri lokálnom upotrebení má však centrálnu pôsobnosť. Malé dávky pôsobia povzbudivo a euforicky, vyvolávajú príjemný stav telesnej a duševnej pohody, väčšie však vyvolávajú halucinácie, pričom hrozí, že pacient si naň navykne. V čistej kryštalickej forme bol kokaín po prvý raz využitý už v roku 1884 pri operácii oka. Čoskoro sa však zistili jeho vedľajšie nepriaznivé účinky, najmä neurotoxická a vysoká návykovosť. I trvalejšie tradičné užívanie, rozšírené medzi obyvateľmi Južnej Ameriky, vedie k duševnej a telesnej degenerácii.

Štúdie spojené s určením chemickej štruktúry kokaínu, ako aj ďalší výskum orientovaný na elimináciu jeho nežiadúcich účinkov viedli k záveru, že na zachovanie anestetickej aktivity je nutná prítomnosť benzoylovej skupiny, ktorá je viazaná esterovou väzbou  $\text{R}-\text{O}-\text{R}$ . Tento poznatok bol kľúčový pre vývoj novej skupiny synteticky pripravených esterov kyseliny *p*-aminobenzoovej s rôznymi substituentmi. Jedná sa o kyselinu označovanú skratkou PABA (*p*-aminobenzoic acid), patriacu medzi vitamíny rozpustné vo vode. Bežne sa používajú aj ďalšie jej synonymické označenia, ako napr. vitamín Bx alebo bakteriálny faktor P. Kyselina PABA má význam aj ako rastový faktor a v malých množstvách sa nachádza v každej bunke. Medzi jej najčastejšie prírodné zdroje patria mäso, obilné zrná, kvasnice, špargľa, špenát, huby, pečeň, mlieko a vajcia.

Na základe chemickej štruktúry možno lokálne anestetiká rozdeliť do dvoch hlavných skupín, a to:

- a) esterového typu,
- b) amidového a anilidového typu.

K najstarším a dokonca aj v súčasnosti ešte stále používaným lokálnym anestetikám patria deriváty zo skupiny esterov kyseliny 4-aminobenzoovej, ako napríklad prokaín (*Procain*) a benzokaín (*Herbadent*). Zo skupiny lokálnych anestetík anilidového typu sú typickými príkladmi tetrakaín a trimekaín (*Mesocain*), ktorý sa vyrába podľa československého patentu (CS-203208-B1; 1977-04-20). Pri syntéze benzokaínu sa ako východisková látka využíva kyselina *p*-aminobenzoová, z ktorej esterifikáciou s etanolom vzniká konečný produkt-etyléster kyseliny *p*-aminobenzoovej. Táto esterifikačná reakcia je katalyzovaná kyslým prostredím, teda prítomnosťou  $H^+$  iónov.

Syntéza pomocou kyslokatalyzovanej esterifikačnej reakcie z karboxylovej kyseliny je vo svojej podstate vratná, pričom posúvanie chemickej rovnováhy k východiskovým látkam môže byť ovplyvnené prítomnosťou vody v reakčnej zmesi. Z tohto dôvodu je výhodné použiť absolútny (bezvodý) etanol, ktorý nemá negatívny vplyv na výťažok. V prípade syntézy väčších množstiev sa odporúča pri reakcii vznikajúcu vodu kontinuálne odoberať (napr. azeotropickou destiláciou) a tým posúvať chemickú rovnováhu v prospech produktu.

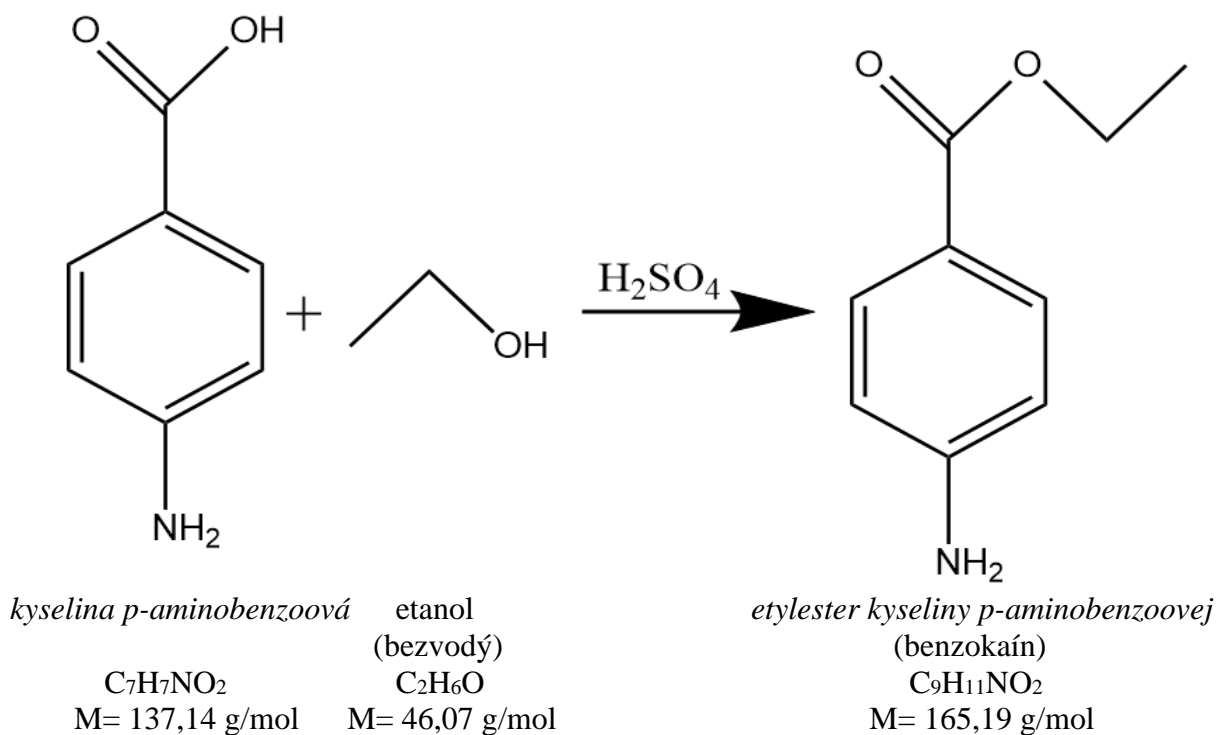
Alternatívna syntéza benzokaínu vychádza opäť z karboxylovej kyseliny ako východiskovej látky, ale v prvom kroku sa z nej pripraví jej chlorid pomocou tionylchloridu ( $SOCl_2$ ). Vo všeobecnosti platí, že chloridy karboxylových kyselín sú výrazne reaktívnejšie pri nukleofilnom ataku ako samotné karboxylové kyseliny. Tento spôsob prípravy esterov zväčša poskytuje vyššie výťažky. Túto dvojkrokovú syntézu možno realizovať ako „one pot“ reakciu, teda obidva stupne sa realizujú v jednej aparatúre (banke), bez potreby izolácie a purifikácie jej medziproduktu – chloridu karboxylovej kyseliny.

## POSTUP SYNTÉZY BENZOKAÍNU

CHEMICKÝ NÁZOV: etyl 4-aminobenzoát, etylester kyseliny *p*-aminobenzoovej

KATEGÓRIA LIEČIVA: lokálne anestetikum

REAKČNÁ SCHÉMA:



VÝPOČTY VZTIAHNUITÉ NA 2,7 GRAMU VÝCHODISKOVEJ LÁTKY:

Na hmotnosť východiskovej látky (kys. *p*-aminobenzoovej) 2,7g:

$$n(\text{kys. } p - \text{aminobenzoová}) = \frac{m(\text{kys. } p - \text{aminobenzoová})}{M(\text{kys. } p - \text{aminobenzoová})} = \frac{2,7 \text{ g}}{137,14 \text{ g/mol}} = 0,020 \text{ mol}$$

Výpočet teoretického výťažku benzokaínu:

$$m(\text{benzokaín}) = n(\text{kys. } p - \text{aminobenzoová}) * M(\text{benzokaín}) = 0,020 \text{ mol} * 165,19 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = 3,3 \text{ g}$$

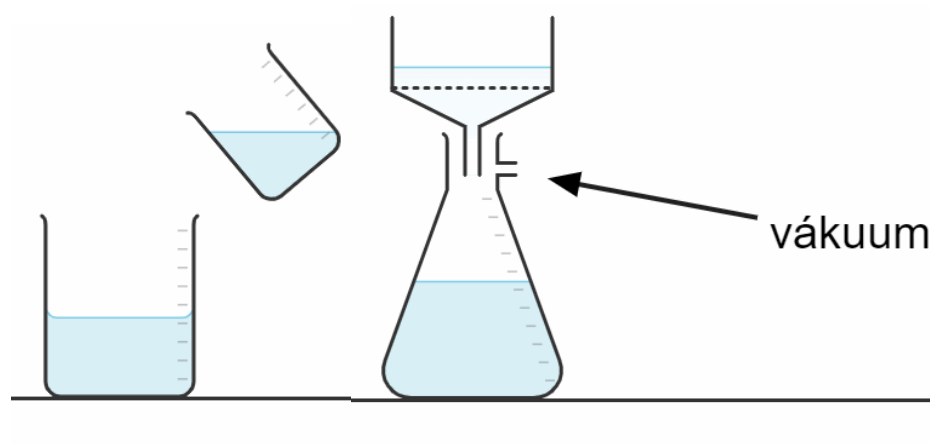
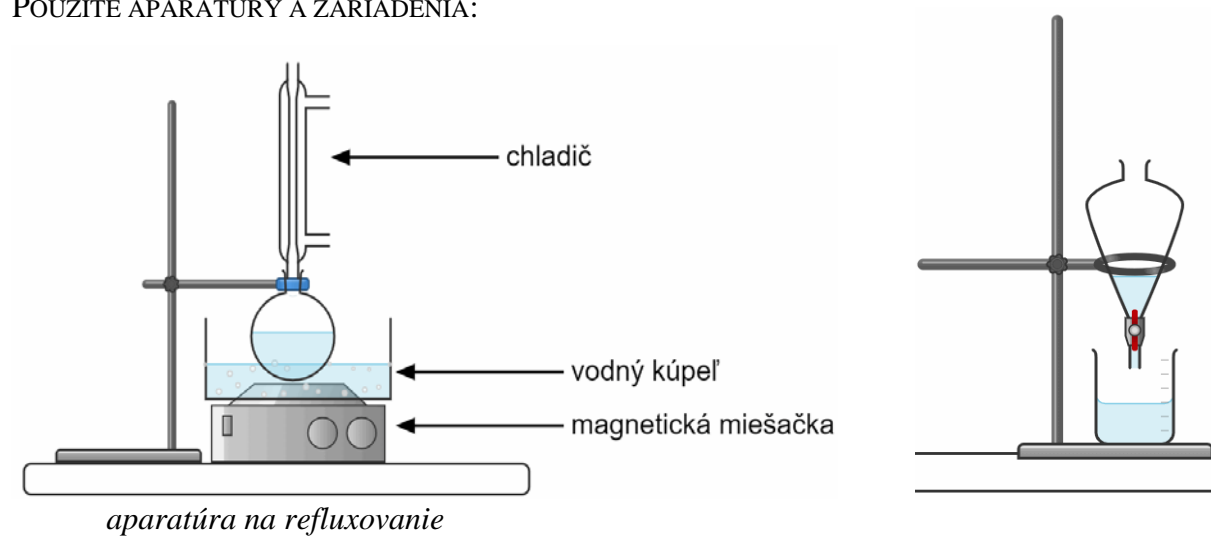
### CHEMIKÁLIE:

kyselina *p*-aminobenzoová (2,70 g)  
bezvodý etanol (35 ml)  
kyselina sírová,  $H_2SO_4$  (2,5 ml)  
uhličitan sodný ( $Na_2CO_3$ )  
síran sodný ( $Na_2SO_4$ )  
dietyléter (50 ml)  
etanol (95 %)

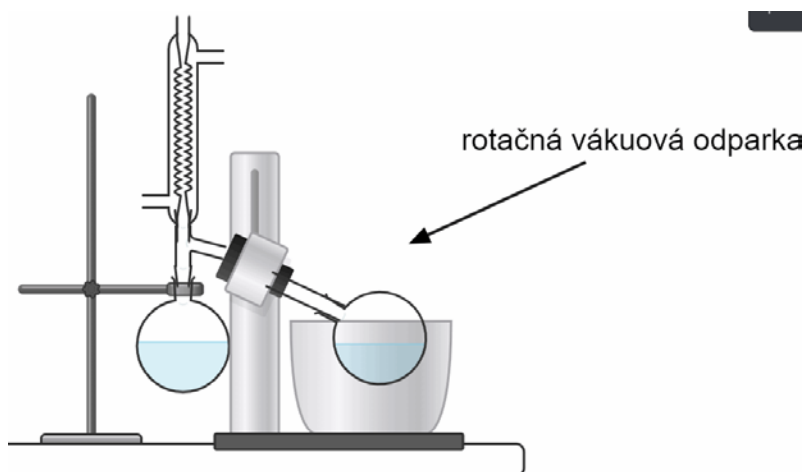
### POMÔCKY:

250 ml banka s guľatým dnom  
ľadový kúpeľ  
spätný chladič  
ľadový kúpeľ  
kadička  
oddeľovací lievnik  
Liebigov chladič  
odsávací banka  
Büchnerov lievnik

POUŽITÉ APARATÚRY A ZARIADENIA:



*aparátúra na filtráciu pri zníženom tlaku*



*rotačná vákuová odparka*

#### PRACOVNÝ POSTUP:

- 1.) Do suchej varnej banky s guľatým dnom odvážíme 2,7 g kyseliny *p*-aminobenzoovej, prilejeme 35 ml absolútneho (bezvodého) etanolu a jemne zamiešame.
- 2.) V ľadovom kúpeli znížime teplotu roztoku a za stáleho chladenia pomaly pridávame 2,5 ml koncentrovanej H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.
- 3.) Po pridaní celého objemu kyseliny sírovej začneme reakčnú zmes zahrievať vo vodnom kúpeli a za stáleho miešania ju refluxujeme 2 hodiny.
- 4.) Obsah banky za horúca prelejeme do kadičky (250 ml) a ochladíme na laboratórnu teplotu.
- 5.) Do roztoku v kadičke veľmi pomaly (po malých množstvách) a za stáleho miešania sklenou tyčinkou pridávame roztok 20 % uhličitanu sodného (20 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> rozpustíme v 80 ml vody) dovtedy, kým pH roztoku nebude aspoň 9. Reakčnú zmes priebežne testujeme počas pridávania roztoku uhličitanu sodného pomocou lakmusových papierikov (spotreba cca 30 ml). Počas tejto neutralizačnej reakcie sa z roztoku uvoľňuje CO<sub>2</sub>.
- 6.) Reakčnú zmes ochladíme na laboratórnu teplotu a preniesieme do oddeľovacieho lievika, kde ju extrahujeme dvakrát 25 ml dietyléteru (vrchná vrstva v lieviku).
- 7.) Spojené organické (éterové) vrstvy vysušíme nad bezvodým síranom sodným (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) a tuhý podiel (sušidlo) odfiltrujeme do varnej banky s guľatým dnom (100 ml).
- 8.) Rozpúšťadlo (dietyléter) potom oddestilujeme na rotačnej vákuovej odparke bez použitia ohrevu, stačí len vákuum – vodná výveva.
- 9.) V momente, keď sa v destilačnom zvyšku objaví olejovitá vrstva, systém zavzdušníme, do banky pomaly pridávame 95 % etanol (cca 50 ml).
- 10.) Zmes opatrne zahrejeme, aby sa olej rozpustil a prelejeme ju do kryštalizačnej misky.
- 11.) Potom do nej pomaly pridávame horúcu vodu (cca 100 ml), kým sa neobjaví zákal, alebo sa nezačne opätovne tvoriť olej.
- 12.) Zmes za miešania ochladíme v ľadovom kúpeli, pričom sa najprv vylúči produkt v podobe oleja, ktorý postupne stuhne.
- 13.) Kryštály benzokaínu odsajeme a vysušíme na vzduchu. Produkt odvážíme a vypočítame praktický výtťažok reakcie.

#### KONTROLA PRODUKTU:

- a) Stanovíme teplotu topenia a porovnáme s referenčnou, 88 °C až 92 °C.
- b) Čistotu produktu posúdime pomocou tenkovrstvovej chromatografie (TLC): produkt a štandard rozpustíme v dietyléteri, vyvíjacia sústava hexán : etylacetát (1:3), detekcia pod UV lampou (254 nm) alebo v jódovej komore.

---

Vybrané časti z monografie európskeho liekopisu pre benzokaín  
(Ph. Eur., článok 04/2020: 0011)

**Anglický názov:** Benzocaine. **Latinský názov:** Benzocainum.

**Definícia**

Ethyl 4-aminobenzoate.

**Obsah:** 99.0 % až 101.0 % (na sušinu).

**Vlastnosti**

Vzhľad: biely, alebo takmer biely kryštalický prášok, alebo bezfarebné kryštály.

Rozpustnosť: veľmi málo rozpustný vo vode, voľne rozpustný v 96 % etanole.

Polymorfný.

**Identifikácia**

PRVÁ IDENTIFIKÁCIA: A.

DRUHÁ IDENTIFIKÁCIA: B.

**A.** Infračervená spektrofotometria.

Porovnávacia látka: certifikovaná porovnávacia látka **benzocaine CRS**.

Ak sú namerané spektrá odlišné, rozpustíte zvlášť skúšanú látku a zvlášť porovnávaciu látku v bezvodom etanole R. Odparte do sucha a vo zvyškoch po odparení namerajte nové spektrá.

**B.** Bod topenia.

Stanovenie A: stanovte bod topenia testovanej látky.

Výsledok A: 89 °C až 92 °C.

Stanovenie B: Zmiešajte rovnaké podiely skúšanej látky a certifikovanej porovnávacej látky **benzocaine CRS** a stanovte bod topenia zmesi.

Výsledok B: absolútny rozdiel medzi bodom topenia zmesi a hodnotou nameranou v Stanovení A nie je väčší ako 2 °C.

**Skúšky**

**Príbuzné látky.** Kvapalinová chromatografia.

*Rozpúšťadlo:* **acetonitril R1**, voda pre chromatografiu R (50:50 V/V).

*Skúšaný roztok.* Rozpustite 25,0 mg skúšanej látky v 5 ml acetonitrilu R. Doplňte rozpúšťadlom do celkového objemu 50,0 ml.

*Porovnávací roztok (a).* Rozpúšťadlom zriedte 1,0 ml skúšaného roztoku do celkového objemu 100,0 ml. 1,0 ml ďalej zriedte rozpúšťadlom do celkového objemu 10,0 ml.

*Porovnávací roztok (b).* Rozpustite 5 mg skúšanej látky a 5 mg 4-nitrobenzoovej kyseliny (nečistota E) v 10 ml rozpúšťadla. 1 ml roztoku ďalej zriedte rozpúšťadlom do celkového objemu 50 ml.

*Kolóna:*

- Veľkosť:  $l = 0,10$  m,  $\Phi = 4,6$  mm;
- Stacionárna fáza: endkapovaný octadecylsilyl silikagél pre chromatografiu, kompatibilný so 100 % vodnými mobilnými fázami (3  $\mu$ m);
- Teplota: 35 °C.



*Mobilná fáza:*

- Mobilná fáza A: Vodou pre chromatografiu zried'ite 1 ml kyseliny perchlórovej do celkového objemu 100 ml. 1 ml tohto roztoku ďalej zried'ite vodou pre chromatografiu do celkového objemu 100 ml. Zmiešajte 9 objemov tohto roztoku s jedným objemom acetonitrilu R1.
- Mobilná fáza B: [acetonitril R1](#).

Čas (min)	Mobilná fáza A (% V/V)	Mobilná fáza B (% V/V)
0	100	0
2	100	0
15	38,5	61,5

*Prietok:* 1,5 ml/min

*Detekcia:* spektrofotometer, 215 nm

*Nástrek:* 10 µm

*Identifikácia nečistôt:* na identifikáciu píku nečistoty E použite chromatogram porovnávacieho roztoku (b).

*Relatívna retencia voči benzokaínu (retenčný čas približne 10 min):* nečistota E = približne 0.9.

*Vhodnosť systému:* porovnávací roztok (b):

- Rozlíšenie: minimum 5.0 medzi píkmi nečistoty E a benzokaínom.

*Výpočet percentuálneho obsahu:* pre každú nečistotu použite koncentráciu benzokaínu v porovnávacom roztoku (a).

*Limity:*

- Nešpecifické nečistoty: pre každú nečistotu maximum 0.10 %;
- Celkový obsah: maximum 0.2 %;
- Medza reportovania (reporting threshold): 0.05 %.

**Strata sušením:** maximálne 0,5 % pri stanovení vákuovým sušením množstva 1,000 g.

**Obsah**

Stanovte aromatický primárny amín. Rozpustite 0,400 g skúšanej látky v zmesi 25 ml kyseliny chlorovodíkovej a 50 ml vody. Pridajte 3 g bromidu draselného. Vychlad'ite v ľadovej vode a za stáleho miešania pomaly titrujte [0,1 mol/l roztokom dusitanu sodného](#).

1 ml 0,1 M dusitanu sodného je ekvivalentný 16,52 mg C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub>.

### Liekopisné prípravy uvedených roztokov a iné súvisiace texty

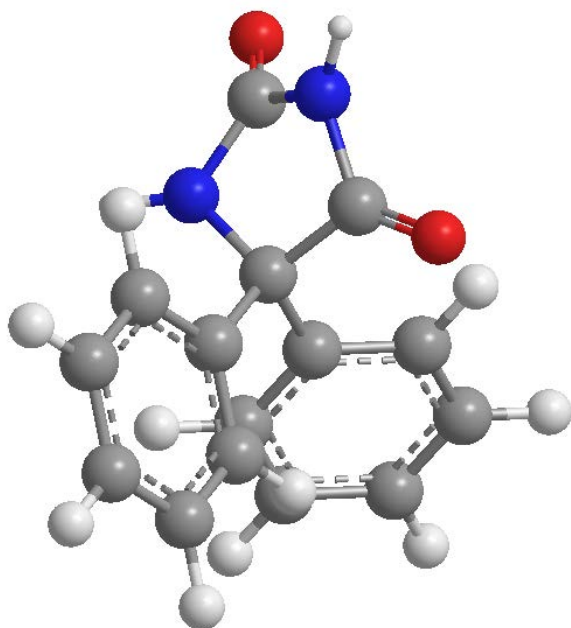
**Acetonitril R1** musí okrem požiadaviek pre acetonitril spĺňať aj dodatočné kritériá, menovite obsah (minimum 99,9 %) a absorbančiu (maximum 0,10 pri meraní vlnovou dĺžkou 200 nm a použití vody R ako kompenzačnej kvapaliny).

**0,1 mol/l roztok dusitanu sodného**: rozpustíte 7,5 g dusitanu sodného vo vode a zriedíte vodou do celkového objemu 1000,0 ml. Štandardizácia: Rozpustíte 0,150 g kyseliny paraaminosulfónovej v 50 ml zriedenej kyseliny chlorovodíkovej (zriedíte 20 g kyseliny chlorovodíkovej vodou do celkového objemu 100 ml). Pridajte 3 g bromidu draselného. Vychladíte v ľadovej vode a za stáleho miešania pomaly titrujete **0,1 mol/l roztokom dusitanu sodného**. Štandardizujte bezprostredne pred použitím. 1 ml 0,1 mol/l roztoku dusitanu sodného je ekvivalentný 17,32 mg  $C_6H_7NO_3S$ .

### ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY:

- ZAFAR A., MELENDEZ R., GEIB S.J., HAMILTON A.D.: Hydrogen bond controlled aggregation of guanidinium-carboxylate derivatives in the solid state. In: *Tetrahedron*. 2002, 58, pp. 683 - 690.
- FISCHER J., GANELLI C.R.: Analogue-based Drug Discovery, ISBN 9783527607495, John Wiley & Sons, 2006, 475 p.
- KRESÁNEK J.: *Atlas liečivých rastlín a lesných plodov*, Vydavateľstvo Osveta, Martin, 1982, 398 s.
- ESLAMIAN L., BORZABADI-FARAHANI A., EDINI H. Z., BADIEE M. R., LYNCH E., MORTAZAVI A.: The analgesic effect of benzocaine mucoadhesive patches on orthodontic pain caused by elastomeric separators, a preliminary study. In: *Acta Odontologica Scandinavica*, 2013, 71 (5), pp. 1168–1173.
- DEMARE P., REGLA I. 2012. : Synthesis of Two Local Anesthetics from Toluene: An Organic Multistep Synthesis in a Project-Oriented Laboratory Course. In: *Journal of Chemical Education*, 2012, 89 (1), pp. 147-149. doi:10.1021/ed100838a.
- SALKOWSKI H.: *Ueber Esterbildung bei aromatischen Amidosäuren*. In: *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 1895, 28 (2), pp. 1917-1923. doi:10.1002/cber.189502802150.
- ERLENMEYER E., WANKLYN J. A.: *Ueber das durch Einwirkung von Jodwasserstoff auf Mannit beziehungsweise auf Melampyrin (Dulcit) entstehende  $\beta$  Hexyljodür und einige seiner Derivate*. In: *Annalen der Chemie und Pharmacie*, 1865, 135 (2), pp. 129–151. doi:10.1002/jlac.18651350202.
- LIMPRICHT H.: *Ueber die Verbindungen aus Benzoylchlorid oder Phtalylchlorid und den Estern der drei Oxybenzoësäuren*. In: *Justus Liebig's Annalen der Chemie*, 1898, 303 (3), pp. 274–289.
- ADAMS R., COHEN F. L.: *Ethyl p-aminobenzoate*. *Organic Syntheses*, 1928, 8 ,66 Collective Volume 1928, vol. 1, p. 240

## FENYTOÍN



Patrí do skupiny liečiv *antiepileptiká*, ktoré potláčajú excitabilitu neurónov, a to tak, že sa zameriavajú na široké spektrum receptorov, ako napr.: sodíkové, vápnikové alebo draslíkové kanály, GABAergné (inhibičné) alebo glutamátové (excitačné) receptory, prípadne sa môžu viazať na synaptické proteíny. Detailný mechanizmus účinku nebol objasnený. Z pohľadu ich zamerania sa na cieľové receptory delíme antiepileptiká na úzkospektrálne a širokospektrálne.

a) *Úzkospektrálne* cieľia na len jeden typ receptorov:

- kanály  $\text{Na}^+$ , napr. fenytoín, lakosamid, eslikarbamazepín, karbamazepín
- kanály  $\text{Ca}^{2+}$ , napr. pregabalin, gabapentin, etosuximid
- GABA, napr. fenobarbital, primidon, tiagabin, vigabatrin, klobazan, klonazepam
- glutamát, napr. perampanel
- väzba na synaptické proteíny, napr. levetiracetam, brivaracetam

b) *Širokospektrálne antiepileptiká* ovplyvňujú viaceré až majoritu možných cieľových štruktúr (receptorov). Patria sem napr. flebamát, zonisamid, topiramát, lamotrigín a valproát. Medzi hlavné nežiadúce účinky antiepileptík patria vo všeobecnosti spomalenie, poruchy pamäti, závrate, ospalosť, zmeny v spánkovom režime, poruchy videnia a stres. Môžu tiež ovplyvňovať telesnú hmotnosť (nárast pri valproáte a vigibatrine, alebo pokles pri zonisamide a topiramáte).

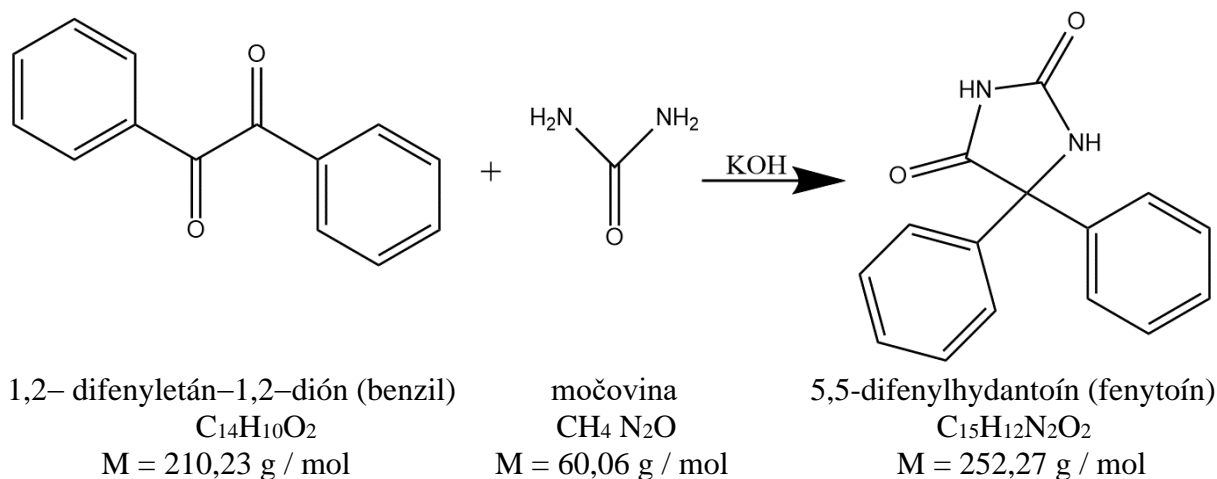
FENYTOÍN je účinnou látkou rôznych komerčne dostupných prípravkoch, ako napr. Dilantin a Epilan D. Podáva sa buď perorálne alebo intravenózne. Pri intravenóznom podaní nastupuje účinok do 30 minút a pôsobí 24 hodín. Fenytoín bol prvýkrát syntetizovaný nemeckým chemikom H. Biltzom v roku 1908. Jeho pozitívne účinky pri liečbe záchvatov bez sedatívnych účinkov boli objavené až neskôr v roku 1938. Podľa WHO patrí do zoznamu základných liekov. Je dostupný aj ako generické liečivo.

## POSTUP SYNTÉZY FENYTOÍNU

CHEMICKÝ NÁZOV: 5,5-difenylyhydantoín

KATEGÓRIA LIEČIVA: antiepileptikum

REAKČNÁ SCHÉMA:



VÝPOČTY VZTIAHNUTÉ NA 2 GRAMY VÝCHODISKOVEJ LÁTKY:

Všetky výpočty sú vzťahované na 2 g východiskovej látky – benzilu.

$$n(\text{benzil}) = \frac{m(\text{benzil})}{M(\text{benzil})} = \frac{2 \text{ g}}{210,23 \text{ g/mol}} = 0,0095 \text{ mol}$$

Výpočet teoretického výťažku fenytoínu:

$$m(\text{fenytoín}) = n(\text{benzil}) * M(\text{fenytoín}) = 0,0095 \text{ mol} * 252,27,19 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = 2,4 \text{ g}$$

Výpočet východiskovej látky, močoviny, v nadbytku 30 %:

$$m(\text{močovina}) = 1,3 * n(\text{benzil}) * M(\text{močovina})$$

$$m(\text{močovina}) = 1,3 * 0,0095 \text{ mol} * 60,06 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = 0,7 \text{ g}$$

POMÔCKY:

vodný kúpeľ

dvojhrdlová banka

teplomer

chladič

magnetická miešačka s miešadlom

odsávací banka

Büchnerov lievik

filtračný lievik

pipeta

kryštalizačná miska

CHEMIKÁLIE:

benzil (2,0 g)

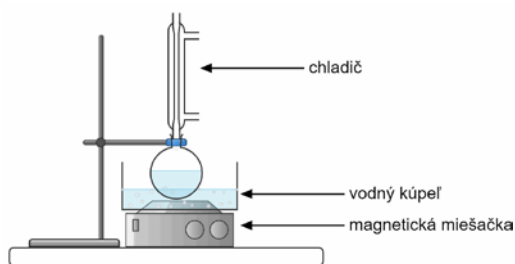
močovina (0,78 g)

koncentrovaná kyselina chlorovodíková

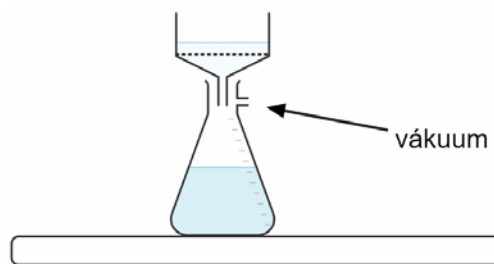
bezvodý etanol (80 ml)

hydroxid draselný (2,0 g)

## POUŽITÉ APARATÚRY A ZARIADENIA:



aparátúra na refluxovanie



aparátúra na odsávanie

## PRACOVNÝ POSTUP:

- 1.) Do dvojhrdlovej banky vložíme odvážený benzil (2,00 g), hydroxid draselný (2,00 g) a močovinu (0,78 g) a rozpustíme ich v suchom etanole (80 ml)
- 2.) Zmes refluxujeme za mierneho varu na vodnom kúpeli.
- 3.) Koniec reakcie indikujeme tenkovrstvovou chromatografiou:
  - východiskovú látku benzil rozpustíme v etanole,
  - na štart nanášame roztok benzilu ako referenčnú škvrnu, ktorú porovnávame s druhou nanesenou škvrnou- reakčnou zmesou,
  - platňu vyvíjame v zmesi etylacetát : hexán v pomere 20:80,
  - škvrny detegujeme pod UV lampou pri vlnovej dĺžke 254 nm.
- 4.) Absencia škvrny benzilu v dráhe reakčnej zmesi indikuje úplné spotrebovanie východiskových látok a teda koniec reakcie.
- 5.) Reakčnú zmes vylejeme do pripravenej zmesi ľad/voda (100 ml).
- 6.) Vzniknutý roztok prefiltrujeme, aby sme odstránili malé množstvá vedľajšieho produktu: 4,5-difenyl-4,5-dihydroxy-2-imidazolu.
- 7.) Červený filtrát okyslíme postupným pridávaním (po kvapkách) koncentrovanej kyseliny chlorovodíkovej, pričom produkt sa vylučuje vo forme bielej tuhej látky.
- 8.) Produkt odsajeme, premyjeme vodou a vysušíme.
- 9.) Produkt čistíme rekryštalizáciou z etanolu:
  - malé množstvo etanolu privedieme do varu a postupne pridávame do kadičky s produktom,
  - po úplnom rozpustení produktu roztok udržiavame horúci a pridáme malé množstvo aktívneho uhlia,
  - za horúca prefiltrujeme do kryštalizačnej misky, ktorú necháme na ľade,
  - vylúčené kryštály odsajeme.
- 10.) Produkt odvážime a vypočítame praktický výťažok syntézy.

## KONTROLA PRODUKTU:

- a) Stanovíme teplotu topenia a porovnáme s referenčnou, 293 – 298 °C.
- b) Tenkovrstvová chromatografia:
  - vzorku a referenčný štandard rozpustíme v acetóne,
  - vyvíjacia sústava na platňu: etylester kyseliny octovej,
  - detekcia škvrn pod UV lampou ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ).

---

Vybrané časti z monografie európskeho liekopisu pre fenytoín  
(Ph. Eur., článok 01/2019:1253)

**Anglický názov:** Phenytoin. **Latinský názov:** Phenytoinum.

**Definícia:** 5,5-diphenylimidazoline-2,4-dione.

**Obsah:** 98,0 % až 102,0 % (na sušinu).

**Vlastnosti**

Vzhľad: biely, alebo takmer biely kryštalický prášok.

Rozpustnosť: prakticky nerozpustný vo vode, mierne rozpustný v 96 % etanole, veľmi málo rozpustný v dichlórmetáne. Rozpúšťa sa v zriedených roztokoch alkalických hydroxidov.

**Identifikácia**

Infračervená spektrofotometria.

Porovnávacia látka: certifikovaná porovnávacia látka **phenytoin CRS**.

**Skúšky**

**Kyslosť alebo zásaditosť.** Ku 1,0 g skúšanej látky pridajte 45 ml vody a povarte po dobu 2 minút. Nechajte vychlaďť a prefiltrujte. Filter premyte odplynenu (t. j. prevarenou) vodou. Filtrát skombinujte s kvapalinou z premývania a zriedťte odplynenu vodou do celkového objemu 50 ml. Do 10 ml roztoku pridajte 0,15 ml **roztoku R metylčervene**. Na zmenu farby do červena nie je potrebné pridať viac ako 0,5 ml **0,01 mol/l roztoku kyseliny chlorovodíkovej**. Do 10 ml roztoku pridajte 0,15 ml **roztoku R1 brómtymolovej modrej**. Na zmenu farby do modra nie je potrebné pridať viac ako 0,5 ml **0,01 mol/l roztoku hydroxidu sodného**.

**Príbuzné látky.** Kvapalinová chromatografia.

*Skúšaný roztok (a).* Rozpustite 50,0 mg skúšanej látky v mobilnej fáze a zriedťte mobilnou fázou do celkového objemu 50,0 ml.

*Skúšaný roztok (b).* Zriedťte 1,0 ml skúšaného roztoku (a) mobilnou fázou do celkového objemu 20,0 ml.

*Porovnávací roztok (a).* Zriedťte 1,0 ml skúšaného roztoku (a) mobilnou fázou do celkového objemu 100,0 ml. Ďalej zriedťte 1,0 ml mobilnou fázou do celkového objemu 10,0 ml.

*Porovnávací roztok (b).* Rozpustite 2 mg 2,2-diphenylglycínu R (nečistota C) v 100 ml mobilnej fázy.

*Porovnávací roztok (c).* Rozpustite 10 mg certifikovanej porovnávacej látky **phenytoin for system suitability CRS** (obsahujúcej nečistoty D a E) v mobilnej fáze, pridajte 1 ml porovnávacieho roztoku (b) a zriedťte mobilnou fázou do celkového objemu 10 ml.

*Porovnávací roztok (d).* Rozpustite 50 mg certifikovanej porovnávacej látky **phenytoin CRS** v mobilnej fáze a zriedťte mobilnou fázou do celkového objemu 50,0 ml. Ďalej zriedťte 1,0 ml mobilnou fázou do celkového objemu 20,0 ml.

*Kolóna:*

- veľkosť:  $l = 0,25$  m,  $\Phi = 4,6$  mm;

- stacionárna fáza: endkapovaný oktaedecylsilyl silikagél pre chromatografiu, kompatibilný so 100 % vodnými mobilnými fázami R (5  $\mu$ m).

**Mobilná fáza:** zmiešajte 20 objemov **metanolu R2**, 35 objemov **acetonitrilu R1** a 45 objemov 5,75 g/l roztoku dihydrogénfosforečnanu amónneho, upraveného kyselinou fosforečnou na pH 2,5.

**Prietok:** 1,5 ml/min.

**Detekcia:** spektrofotometer, 220 nm.

**Nástrek:** 20 µl skúšaného roztoku (a) a porovnávacích roztokov (a) a (c).

**Čas analýzy:** štvornásobok retenčného času fenytoínu.

**Identifikácia nečistôt:** na identifikáciu nečistôt C, D a E použite sprievodný chromatogram pre certifikovanú porovnávaciu látku **phenytoin for system suitability CRS** v kombinácii s chromatogram porovnávacieho roztoku (c).

**Relatívna retencia voči fenytoínu (retenčný čas = približne 4 minúty):** nečistota C = približne 0,5; nečistota D = približne 0,6; nečistota E = približne 0,8.

**Vhodnosť systému:** porovnávací roztok (c):

**Rozlíšenie:** minimum 3,5 medzi píkmi nečistoty D a nečistoty E.

**Limity:**

- **korekčné faktory:** pre výpočet obsahu prenásopte plochy nasledovných nečistôt príslušnými korekčnými faktormi: nečistota D = 1,7; nečistota E = 1,4;
- **nečistota E:** nie viac ako trojnásobok plochy hlavného píku v chromatograme porovnávacieho roztoku (a) (0,3 %);
- **nečistota C:** nie viac ako dvojnásobok plochy hlavného píku v chromatograme porovnávacieho roztoku (a) (0,2 %);
- **nečistota D:** nie viac ako plocha hlavného píku v chromatograme porovnávacieho roztoku (a) (0,1 %);
- **nešpecifikované nečistoty:** pre každú nečistotu: nie viac ako plocha hlavného píku v chromatograme porovnávacieho roztoku (a) (0,10 %);
- **suma:** nie viac ako päťnásobok plochy hlavného píku v chromatograme porovnávacieho roztoku (a) (0,5 %);
- **medza zanedbateľnosti (disregard limit):** polovica plochy hlavného píku v chromatograme porovnávacieho roztoku (a) (0,05 %).

**Strata sušením:** maximálne 0,5 % pri stanovení sušením množstva 1,000 g v sušiarňi pri teplote 105 °C.

## Obsah

Kvapalinová chromatografia, ako je opísaná pri skúške pre príbuzné látky, s nasledujúcou obmenou:

**Nástrek:** skúšaný roztok (b) a porovnávací roztok (d).

Vypočítajte percentuálny obsah  $C_{15}H_{12}N_2O_2$  vzhľadom na deklarovanú hodnotu certifikovanej porovnávačej látky **phenytoin CRS**.



### Liekopisné prípravy uvedených roztokov a iné súvisiace texty

**Roztok R metylčervene:** rozpustíte 50 mg metylčervene v zmesi 1,86 ml 0,1 mol/l roztoku hydroxidu sodného (liekopisná príprava: zriedíte 100,0 ml 1 mol/l roztoku hydroxidu sodného odplynenou vodou do celkového objemu 1000,0 ml) a 50 ml 96 % etanolu. Zriedíte vodou do celkového objemu 100 ml.

**0,1 mol/l roztok kyseliny chlorovodíkovej:** zriedíte 100,0 ml 1 mol/l roztoku kyseliny chlorovodíkovej odplynenou (t. j. prevarenou) vodou do celkového objemu 1000,0 ml.

**1 mol/l roztok kyseliny chlorovodíkovej:** Zriedíte 103,0 g kyseliny chlorovodíkovej vodou do celkového objemu 1000,0 ml. **Štandardizácia:** Rozpustíte 0,950 g trometamolu v 50 ml vody. Titrujete roztokom kyseliny chlorovodíkovej. Určíte bod ekvivalencie buď potenciometricky, alebo použitím 0,1 ml roztoku metyloranže (rozpustíte 0,1 g metyloranže v 80 ml vody a zriedíte 96 % etanolom do celkového objemu 100 ml) ako indikátora do dosiahnutia žltkasto-červenej farby. 1 ml 1 mol/l roztoku kyseliny chlorovodíkovej zodpovedá 121,1 mg  $C_4H_{11}NO_3$ .

**Roztok R1 brómtymolovej modrej:** Rozpustíte 50 mg brómtymolovej modrej v zmesi 4 ml 0,02 mol/l roztoku hydroxidu sodného (liekopisná príprava 0,1 mol/l roztoku hydroxidu sodného: zriedíte 100,0 ml 1 mol/l roztoku hydroxidu sodného odplynenou vodou do celkového objemu 1000,0 ml) a 20 ml 96 % etanolu a zriedíte vodou do celkového objemu 100 ml.

**1 mol/l roztok hydroxidu sodného:** Rozpustíte 42 g hydroxidu sodného v odplynenej (t. j. prevarenej) vode a doplňte rovnakým rozpúšťadlom do celkového objemu 1000,0 ml. **Štandardizácia:** Rozpustíte 1,50 g hydrogénftalátu draselného v 50 ml vody. Titrujete roztokom hydroxidu sodného. Určíte bod ekvivalencie buď potenciometricky, alebo použitím 0,1 ml roztoku fenolftaleínu (rozpustíte 0,1 g fenolftaleínu v 80 ml 96 % etanolu a zriedíte vodou do celkového objemu 100 ml) ako indikátora. 1 ml 1 mol/l roztoku hydroxidu sodného zodpovedá 204,2 mg  $C_8H_5KO_4$ .

**Metanol R2** musí okrem požiadaviek pre metanol R aj dodatočné kritériá, menovite obsah (minimálne 99,8 %) a absorbanciu (maximum 0,17 pri vlnovej dĺžke 225 nm pri použití vody ako kompenzačnej kvapaliny).

**Acetonitril R1** musí okrem požiadaviek pre acetonitril spĺňať aj dodatočné kritériá, menovite obsah (minimum 99,9 %) a absorbanciu (maximum 0,10 pri meraní vlnovou dĺžkou 200 nm a použití vody R ako kompenzačnej kvapaliny).



#### ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY:

- Biltz H: "Über die Konstitution der Einwirkungsprodukte von substituierten Harnstoffen auf Benzil und über einige neue Methoden zur Darstellung der 5,5-Diphenylhydantoine" [Constitution of the Products of the Interaction of Substituted Carbamides on Benzil and Certain New Methods for the Preparation of 5,5-Diphenylhydantoin]. In: *Chemische Berichte* (in German). 1908, 41 (1), p. 1379–1393. doi:10.1002/cber.190804101255.
- Friedlander W.J.: "Putnam, Merritt, and the discovery of Dilantin". In: *Epilepsia*. 27 (3): S1-20. doi:10.1111/j.1528-1157.1986.tb05743.x.
- KUBA, R.: *Antiepileptika a jejich klinické použití v epileptologii*. In: *Praktické lékařství*. ISSN 1803-5329 , 2010, 6 (2), p. 62-66.
- LAPENNA P. & TORMOEHLER L. M.: The Pharmacology and Toxicology of Third-Generation Anticonvulsant Drugs. In: *Journal of Medical Toxicology*. ISSN 1556-9039, 2017, 4 (13), p. 329-342. DOI: 10.1007/s13181-017-0626-4.
- MARUŠIČ P., OŠLEJŠKOVÁ H. & BRÁZDIL M.: Classification of the epileptic seizures and classification of the epilepsies ILAE. In: *Neurologie pro praxi*. ISSN 1213-1814/2018, 2017, 9 (1), p. 32-36. DOI: 10.36290/neu.2018.075.
- MARUŠIČ P., *et al.* Soubor minimálních diagnostických a terapeutických standardů u pacientů s epilepsií, 2017. ISBN 978-80-906982-0-8.
- SEIDL Z. & OBENBERGER J.: *Neurologie pro studium i praxi*, Praha : Grada Publishing, 2004, ISBN 80-247-0623-7.
- STRZELCZYK A., ZÖLLNER J.P. & WILLEMS L.M.: Lacosamide in status epilepticus: Systematic review of current evidence. In: *Epilepsia*. ISSN 0013-9580/2017, 6 (58), p. 933-950. DOI: 10.1111/epi.13716.
- SYNEK S.: *Novinky v neurologii*. Praha. 2019.

## LABORATÓRNE CVIČENIA Z MEDICÍNSKEJ CHÉMIE

**Autor:** Mgr. Peter Nemeček, PhD.

**Recenzenti:** doc. Ing. Jozef Sokol, CSc.  
Ústav chémie a environmentálnych vied, FPV, UCM Trnava

doc. Ing. Dáša Kružlicová, PhD.  
Katedra farmaceutickej analýzy a nukleárnej farmácie,  
Farmaceutická fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave

**Grafická úprava:** Mgr. Peter Nemeček, PhD.

**Vydavateľ:** Univerzita sv. Cyrila a Metoda v Trnave  
Fakulta prírodných vied

**Vydanie:** prvé, 2024

**Počet strán:** 56

**Počet AH:** 3,73 AH

**Forma vydania:** online, <https://www.ucm.sk/download/LabCvZMedChem-Nemecek-2024.pdf?s=NzA6YjZiMzUxZDQ6ZDoxOjM0NWQ3OCAG>

ISBN 978-80-572-0434-3

